



Optimisation et prédiction de la production algale en polycultures, approches expérimentales et modélisation mathématique

Emna Krichen

► To cite this version:

Emna Krichen. Optimisation et prédiction de la production algale en polycultures, approches expérimentales et modélisation mathématique. Modélisation et simulation. Université Montpellier, 2020. Français. NNT: . tel-03520846

HAL Id: tel-03520846

<https://hal.inrae.fr/tel-03520846>

Submitted on 11 Jan 2022

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

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

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L' UNIVERSITE DE MONTPELLIER

En: Mathématiques et Modélisation

École doctorale: Information, structures, systèmes

Unité de recherche: UMR MISTEA & UMR MARBEC

**Optimisation et prédiction de la production algale en polycultures
approches expérimentales et modélisation mathématique**

Présentée par Emna Krichen

Le 14 décembre 2020

**Sous la direction de Alain Rapaport
et Éric Fouilland**

Devant le jury composé de

Mme. Sakina-Dorothée Ayata, Maître de conférences, Sorbonne Univ.

M. Olivier Bernard, Directeur de recherche INRIA , Sophia-Antipolis

Mme. Filipa Lopes, Professeur, LGPM Paris

M. Denis Dochain, Professeur, Univ. Cath. Louvain-la-Neuve

M. Jérôme Harmand, Directeur de recherche INRAE, LBE, Narbonne

M. Alain Rapaport, Directeur de recherche INRAE, MISTEA, Montpellier

M. Éric Fouilland, Chargé de recherche CNRS, MARBEC, Sète

Mme. Aicha El Khamlichi, Ingénieure ADEME, Angers

Rapportrice

Rapporteur

Examinatrice

Examineur

Examineur

Directeur

**Co-directeur
invitée**



**UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER**

OPTIMISATION ET PRÉDICTION DE LA PRODUCTION ALGALE EN POLYCULTURES

APPROCHES EXPÉRIMENTALES ET MODÉLISATION MATHÉMATIQUE

Résumé

Dans le contexte de l'utilisation des microalgues pour la bioremédiation d'effluents et la production de biomasse d'intérêt industriel, la stabilité et les performances des systèmes de production sont des enjeux majeurs. Une des voies de recherche privilégiées est la mise à profit de la diversité des microalgues en assemblages (polycultures) pour l'amélioration des performances de la production. Néanmoins, l'exploitation de ces assemblages complexes en système ouvert extérieur est sujette à divers stress biotiques (microalgues indésirables ou bactéries compétitrices) et abiotiques (limitation des ressources, notamment l'azote et la lumière) qui influencent les interactions au sein des assemblages, rendant difficiles la prédiction et l'optimisation de la production. L'objectif de la présente thèse est de proposer des méthodes et des outils permettant de comprendre, prédire et optimiser la production de biomasse d'un assemblage algal (consortium microbien naturel ou artificiellement composé) sous la fluctuation des ressources et des conditions de culture. Plus particulièrement, nous avons développé des modèles mathématiques basés sur des systèmes dynamiques, qui peuvent être confrontés à des expériences en laboratoire et à l'échelle-pilote. Les premiers travaux de cette thèse ont consisté à choisir une méthode expérimentale pour la caractérisation de la vitesse de croissance spécifique des microorganismes photosynthétiques en fonction de la ressource limitante. Par ailleurs, une nouvelle méthode d'estimation fonctionnelle est proposée produisant deux courbes de croissance qui encadrent les données de vitesse de croissance et permettant ainsi des estimations dynamiques des variables d'état par intervalles garantis. Dans un deuxième temps, la nature des interactions entre deux microalgues *Chlorella sorokiniana* et *Scenedesmus pectinatus*, qui se succèdent classiquement dans les bassins extérieurs utilisés pour le traitement des eaux usées urbaines, a été caractérisée en fonction de la fluctuation des différentes formes de l'azote ($\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$) et ensuite de la lumière disponible. Les modèles mathématiques associés aux expérimentations menées au cours de cette thèse ont permis de démontrer que le développement initial d'une espèce microalgale de type opportuniste, plus résistante aux fortes teneurs en $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ était nécessaire pour que puisse s'établir ensuite une espèce microalgale plus efficace vis-à-vis de la faible lumière disponible dans ces procédés très turbides. Dans un troisième temps, nous avons exploré les interactions paradoxales qui existent entre les microalgues et les bactéries hétérotrophes. En effet, les microalgues stimulent, à travers l'exsudation du carbone, leurs compétiteurs pour une ressource commune : l'azote ou le phosphore. Nous avons étudié l'influence de ce phénomène en proposant un modèle dynamique en dimension quatre. L'analyse mathématique a révélé l'unicité de l'équilibre de coexistence et la robustesse de l'installation des bactéries, car il a été démontré que l'équilibre en absence de bactéries est répulsif. Nous montrons que lorsque la concentration de la ressource minérale alimentant en continu le bioréacteur est suffisamment grande, il existe des valeurs du taux de renouvellement du réacteur pour lesquelles il y a coexistence, alors que les bactéries ne pourraient pas se développer en l'absence de microalgues dans ces mêmes conditions opératoires. Enfin, il a été montré à l'aide de simulations que lors de la coexistence, leur biomasse respectives peut osciller.

Ces résultats témoignent de la complexité des interactions biotiques, fournissent des méthodes applicables à d'autres organismes modèles permettant de les étudier, et soulèvent des possibilités d'application prometteuses pour l'optimisation et le contrôle des systèmes dynamiques de procédés pour les travaux futurs.

Mots-clés : microalgues, modélisation dynamique, biomasse, fluctuations des ressources, azote, bactéries, lumière, estimation par intervalles, interactions, polycultures.

OPTIMIZATION AND PREDICTION OF ALGAL PRODUCTION IN OUTDOOR POLYCULTURES

EXPERIMENTAL APPROACHES AND MATHEMATICAL MODELING

Abstract

The stability and the performances of microalgae production systems are challenging issues, particularly in the context of the use of microalgae for the bioremediation of effluents and the production of biomass of industrial interest. One of the challenging axes of research is to take advantage of the diversity of microalgae through the use of assemblages (polycultures) for improving the overall production performances. However, the exploitation of these complex assemblages in an open system is subject to various stresses : biotic (undesirable microalgae or competing bacteria) and abiotic (limitation of resources, especially nitrogen and light). These stressing factors could influence interactions within assemblages, making thereby difficult the prediction and the optimization of the overall production. The objective of this thesis is to propose methods and tools for understanding, predicting, and optimizing the biomass production of an algal assemblage (natural or artificially designed microbial consortium) under the fluctuation of resources and culture conditions. More specifically, we have developed mathematical models based on dynamical systems that can be compared to laboratory and pilot-scale experiments. Firstly, an experimental method was defined for characterizing the specific growth rate of photosynthetic microorganisms, according to the limiting resource. Furthermore, a new functional estimation method is proposed. This method provides two growth curves that envelop scattering growth rate data and thus allow dynamic estimates of the state variables with guaranteed intervals. Secondly, the type of the interactions between two microalgae *Chlorella sorokiniana* and *Scenedesmus pectinatus*, which typically have successional trends in the outdoor ponds used for the treatment of urban wastewater, has been characterized ; first according to the fluctuation of the different forms of nitrogen ($\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$), and secondly to the light availability. The mathematical models associated with the experiments carried out during this thesis demonstrate that the initial development of an opportunistic microalgal species, which is more resistant to high levels of $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ was required for the subsequent development of a more efficient microalgal species under low light availability in these turbid processes. Third, we explored the paradoxical interactions occurring between microalgae and heterotrophic bacteria. Through the exudation of carbon, microalgae stimulate its competitors for common resources : nitrogen or phosphorus. We have thus studied the influence of this phenomenon by proposing a four-dimensional model. The mathematical analysis revealed that the equilibrium of coexistence is unique, and the installation of bacteria is robust, as it has been shown that the equilibrium without bacteria is unstable. We show that when the concentration of the mineral resource that continuously feeds the bioreactor is large enough, there are renewal rate values for which there is coexistence, while bacteria could not grow in the absence of microalgae under these same operating conditions. Finally, it has been shown, using simulations, that during coexistence their biomasses can oscillate.

These results demonstrate the complexity of biotic interactions, provide methods applicable to other model organisms, and raise promising application possibilities for the optimization and the control of bioprocess dynamical systems for future work.

Keywords : microalgae, dynamical modeling, biomass, resource fluctuations, nitrogen, bacteria, light, interval estimation, interactions, polycultures.

*à ma famille,
à ma fille Yasmine
à tous ceux qui ont cru en moi*

• Remerciements •

Au terme de ce travail, je souhaite adresser mes remerciements à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à sa réalisation. Certains s'y retrouveront plusieurs fois, d'autres seront peut-être oubliés et je m'en excuse par avance.

Je tiens pour commencer à remercier le Labex NUMEV et l'ADEME pour la confiance qu'ils m'ont accordée en finançant ce projet de recherche.

Je suis profondément reconnaissante à M. Alain Rapaport et M. Éric Fouilland pour avoir accepté de diriger ma thèse. Je vous remercie vivement pour la manière dont vous m'avez orienté et m'avez remotivé lors de mes nombreuses périodes de doute. Vos qualités pédagogiques, vos connaissances et compétences ont largement contribué à ce travail de thèse. J'aimerais également vous dire que j'ai été extrêmement sensible à vos qualités humaines d'écoute et de compréhension durant ces années. Soyez assurés de mon attachement et de ma profonde gratitude.

J'adresse mes remerciements, les plus sincères aux membres du jury pour avoir accepté de participer à l'évaluation de ce travail. Je remercie vivement Mme. Sakina-Dorothée Ayata et M. Olivier Bernard pour l'intérêt qu'ils ont porté à mes travaux en acceptant de rapporter ma thèse sans aucune hésitation. Je tiens également à remercier Mme. Filipa Lopes et M. Denis Dochain d'avoir accepté d'examiner ce travail. Je suis particulièrement reconnaissante à M. Jérôme Harmand de m'avoir guidé dans mes premiers pas dans la recherche et de m'avoir donné envie de poursuivre en thèse sur un sujet pluridisciplinaire qui répondait à mes attentes. Je tiens aussi à remercier Mme. Aicha El Khamlichi, Mme. Alice GUEUDET et M. Grégoire DAVID, pour l'intérêt qu'ils ont porté à mes travaux de recherche.

Ce travail représente le fruit d'une collaboration au sein de l'UMR MISTEA et l'UMR MARBEC. Je remercie les deux équipes de m'avoir aussi bien accueillie parmi eux. Je tiens à remercier les directeurs de ces unités M. Pascal NEVEU et Mme. Nadine HILGERT (MISTEA) et Laurent DAGORN (MARBEC) de m'avoir fait l'honneur de m'accueillir dans leur unité. Je voudrais remercier également M. Sébastien MAS et Mme. Marielle LAURENS de m'avoir accueilli à la Station Marine de Sète où se sont déroulés mes premières expérimentations.

Je voudrais remercier Mme. Bénédicte FONTEZ pour son aide dans le choix des tests d'analyses statistiques. J'adresse mes vifs remerciements à Mme. Émilie Le Floc'h pour sa collaboration et sa disponibilité pour discuter de mes résultats et m'aider à résoudre les problèmes rencontrés lors des expérimentations. Je suis extrêmement reconnaissante envers Mme. Ariane ATTEIA pour ses qualités humaines inestimables et pour avoir apporté à ce travail les pratiques de biologie moléculaire. Je tiens également à remercier tous les membres du projet PHYCOVER pour avoir mis à ma disposition des données expérimentales et de m'avoir permis de présenter mes résultats lors des réunions annuelles du projet. Je tiens également à remercier M. Tewfik SARI, M. Claude LOBRY et tous les membres du réseau TREASURE pour la richesse des échanges. Je remercie sincèrement Marc JOANNIDES pour sa confiance et de m'avoir donné l'occasion d'avoir ma première expérience d'enseignement.

Je saisis cette occasion pour remercier ceux que j'ai rencontrés durant ces dernières années et avec qui j'ai partagé d'excellents moments. Je commence par Mme. Sari et mes chères copines Fatima, Nesrine, Kenza et Manel qui m'ont permis de garder le coeur au chaud malgré d'être loin de ma famille. Merci pour vos petites attentions qui me tiennent à cœur. Sans vous toutes, il n'aurait pas été facile de tenir jusqu'au bout. Un merci tout particulier à Maria, Malika, Céline, Anne, Bertrand, Sébastien, Patrice et à tous les autres membres de MISTEA pour leur sympathie, amitié et soutien. Également, merci à Christine, Emmanuelle, Angélique, Christophe et Martine et à tous les autres membres de MARBEC. Un grand merci à Tatiana, Audrey, et Axelle pour les bons moments qu'on a passés ensemble. Merci à Geneviève, pour sa gentillesse, ses conseils et sa bonne humeur permanente. Soyez tous assurés de ma sincère et profonde amitié et gratitude.

Je tiens également à remercier vivement ceux qui m'ont toujours accompagné malgré la distance. Mes ami-e-s de longue date qui m'ont soutenu tout au long de mes années universitaires : Roua, et Manel, Rim, Nizar, Talel et Hamidou. Sans oublier tous mes collègues et mes chers amis de la SONEDE Faten, Zihen, Ezzeddine, Nizar, Tarek pour leur soutien et encouragement.

Je tiens également à présenter mes sincères remerciements à tout le corps enseignant, qui m'a tant apporté durant toutes les années de ma formation.

Mes remerciements vont à ceux qui m'ont précédé dans la vie, ceux qui surent avec amour, recevoir, célébrer et transmettre. Merci à toute ma famille et à ma belle-famille, pour leurs soutiens moraux et leurs encouragements. Je me trouve chanceuse de vous avoir dans ma vie. Vous êtes un modèle de générosité et de force. Trouvez ici l'expression de mon fidèle attachement et tous mes souhaits de bonheur et de prospérité. Je ne sais pas si ces mots suffisent pour remercier ma mère, qui de par son amour, son soutien, son assistance, sa patience et sa présence dans ma vie, a œuvré pour ma réussite pendant toute ma vie. Maman je me souviendrai toujours avec gratitude des sacrifices énormes consentis par toi. Merci d'avoir fait de moi la femme que je suis aujourd'hui.

Un grand merci pour mon mari qui m'a soutenu et accepté mon choix de me tourner vers un parcours scientifique et surtout de m'accorder sa patience, sa confiance et son amour. Merci de m'avoir prouvé pendant ces trois années, que ni la distance, ni les épreuves ne nous séparent jamais. Merci pour tout ce que tu fais pour moi, pour nous.

Mes derniers remerciements vont à mon petit ange Yasmine qui m'a fait une découverte incroyable qu'est la maternité ; un beau chemin, parfois sinueux, fait de doutes, mais de beaucoup de joie, et de bonheur. Depuis quelques mois, tu me donnes déjà tout l'amour et toute la force dont j'ai besoin.

Avant-propos

Cette thèse a été financée par :

- le Labex NUMEV
- l'ADEME

Les travaux de recherche présentés dans cette thèse se sont déroulés entre Montpellier et Sète au sein de deux unités mixtes de recherches :

- Mathématiques, Informatique et STatistique pour l'Environnement et l'Agronomie (UMR MISTEA – Univ. Montpellier – INRA – Montpellier SupAgro)
- MARine Biodiversity, Exploitation and Conservation (UMR MARBEC – Univ. Montpellier – CNRS – IRD – IFREMER)

Le projet de thèse a bénéficié de collaboration dans le cadre du projet ANR PHYCOVER (2014-2018). Le projet PHYCOVER est un projet collaboratif en partenariat public-privé coordonné par l'INRAE LBE. Il associe aussi le groupe SAUR, l'entreprise NASKEO, ainsi que les laboratoires IFREMER PBA, INRIA BIOCORE, et l'UMR MARBEC. Le projet a débuté le 1er octobre 2014 et a duré 48 mois.

Les travaux de recherche ont donné lieu aux publications et communications suivantes :

- Publications dans des revues internationales :

Krichen, E., Rapaport, A., and Fouilland, E. (2020). About frame estimation of growth functions and robust prediction in bioprocess modeling. *Journal of Process Control*, 85 :121–135.

Krichen, E., Rapaport, A., Le Floch, E., and Fouilland, E. (2019). Demonstration of facilitation between microalgae to face environmental stress. *Scientific Reports*, 9(1) :1–11.

- Publications soumises ou en préparation

Krichen, E., Rapaport, A., Fouilland, E., et al. (2020). A new kinetics model to predict the growth of micro-algae subjected to fluctuating availability of light. (Submitted to *algal research*, under review)

- Communications nationales et internationales :

Krichen, E. ; Rapaport, A. ; Le Floch, E. ; Fouilland, E., Demonstration of facilitation between microalgae to face ammonia toxicity in a High Rate Algal Pond, *IWA Conference on Algal Technologies and Stabilisation Ponds for Wastewater Treatment and Resource Recovery. IWAAlgae 2019 ; Valladolid (Espagne), 01-02 juillet (2019)*

Krichen, E. ; Rapaport, A. ; Fouilland, E., Étude et prédiction des interactions en coculture

algale, séminaire TREASURE, Hammamet (Tunisie), 10-14 décembre (2018).

Krichen, E. ; Rapaport, A. ; Le Floch, E. ; Fouilland, E., Facilitation écologique entre deux espèces de microalgues *Chlorella sp.* & *Scenedesmus sp.*, Journée de la Société Phycologique de France, Paris (France), novembre (2018).

Krichen, E. ; Rapaport, A. ; Fouilland, E., Optimisation et prédiction de la production algale en polycultures : approches expérimentales et modélisation mathématique, Journées Thématiques du LBE : JT Modélisation - Journée des doctorants et postdoctorants en modélisation et commande des bioprocédés, Narbonne (France), mai (2017).

Ce manuscrit de thèse comprend deux parties. La première partie, introduit le contexte général de l'étude et donne un aperçu sur les méthodes utilisées pour répondre aux objectifs de la thèse. La deuxième partie, inclut le détail de quatre études valorisées au cours de la thèse en articles scientifiques (publiés, soumis ou en cours de finalisation), intercalés par des conclusions sur les contributions et les perspectives des différents travaux.

Table des matières

Résumé	i
Abstract	iii
Remerciements	vii
Préambule	I
Table des matières	VII
Liste des Figures	IX
Liste des Tableaux	XV
 INTRODUCTION GÉNÉRALE : CONTEXTE, OBJECTIFS ET MÉTHODES	 1
Introduction	3
1 État de l'art	7
1.1 Utilisation des microalgues pour le traitement des eaux usées et la production de biomasse d'intérêt industriel	7
1.1.1 Généralités sur les microalgues et ses applications	7
1.1.1.1 Définition et caractéristiques	7
1.1.1.2 Métabolisme et efficacité photosynthétique	8
1.1.1.3 Croissance et principaux métabolismes d'adaptation	9
1.1.1.4 Nombreuses applications des microalgues	11
1.1.2 Bioremédiation et production de biomasse en systèmes ouverts	12
1.1.2.1 Avantages et limites de la culture des microalgues sur des eaux usées	12
1.1.2.2 Exemple d'un lagunage naturel en lagunage à haut rendement algal : projet PHYCOVER	14

1.2	Importance des interactions au sein des systèmes de production de microalgues	16
1.2.1	Biodiversité et fonctionnement des écosystèmes microbiens	16
1.2.1.1	Grands types d'interactions biotiques	16
	Les interactions conflictuelles :	16
	Les interactions bénéfiques :	17
1.2.1.2	Diversité, productivité et stabilité : relations et mécanismes	18
1.2.2	Potentiel des associations entre espèces microalgales dans les cultures intensives	19
1.2.3	Interactions entre microalgues et bactéries : multiples, complexes et difficiles à élucider	20
1.2.4	Interactions possibles entre les consortia microbiens naturels dans la lagune expérimentale du projet PHYCOVER	22
1.3	Modèles et concepts sur les procédés de production algale	24
1.3.1	Modélisation prédictive, optimisation et contrôle : étapes clés à intérêt théorique et applicatif	24
1.3.2	Modélisation d'un système biologique	25
1.3.2.1	Trois modes de fonctionnement	25
1.3.2.2	Modèle mathématique du chémostat : quelques notions et principes	28
1.3.2.3	Enjeux de la caractérisation mathématique de la croissance microbienne et du choix du degré de complexité d'un modèle	29
1.3.3	Facteurs et cinétiques de la croissance algale	30
1.3.3.1	Limitation par les nutriments	30
	Besoins nutritionnels :	30
	Modèles mathématiques pour décrire la limitation en nutriments : . .	34
1.3.3.2	Limitation par la disponibilité de la lumière	36
1.3.3.3	Limitation par d'autres facteurs abiotiques	39
1.3.3.4	Conclusion	42
1.4	Estimations dynamiques par intervalles pour borner les incertitudes	44
1.4.1	Principe et intérêt de l'approche des observateurs par intervalles	44
1.4.2	Théorème de Muller	46
1.4.3	Exemple illustratif sur le chémostat	46
1.5	Concluion du chapitre : objectifs de l'étude et hypothèses de recherche	48

2 Méthodologie de travail 53

2.1	Méthodes, techniques et outils de recherche	53
2.1.1	Approches expérimentales et dispositifs expérimentaux	53
2.1.1.1	Expérimentations in situ et microalgues isolées	53
2.1.1.2	Expérimentations au laboratoire et dispositifs expérimentaux	55
2.1.2	Approches de modélisation mathématique	56
2.1.2.1	Développement des modèles mathématiques	57
	La partie physique :	57
	La partie biologique :	57
2.1.2.2	Outils mathématiques pour l'analyse d'un modèle dynamique	58

2.1.2.3	Ajustement des données aux modèles, identification des paramètres, validation et prédiction	60
2.2	Mise en pratique des outils et étapes de la démarche de recherche	63
2.3	Répartition des activités de la thèse	64

ARTICLES PUBLIÉS, SOUMIS OU EN PRÉPARATION : RÉSULTATS ET DISCUSSIONS 67

3	Demonstration of facilitation between microalgae to face environmental stress	69
3.1	Introduction	72
3.2	Results and Discussion	74
3.2.1	No direct toxic effect of high NH_4^+ and pH on microalgae growth rates. . . .	74
3.2.2	Evidence of species-dependent ammonia effect	75
3.2.3	Evidence of facilitation interaction through a modeling approach	76
3.2.4	Importance of the initial populations densities on the degree of facilitation in simulated HRAP	78
3.2.5	Validation of the ecological facilitation in real HRAP	79
3.3	Materials and Methods	82
3.3.1	HRAP experiment	82
3.3.2	Microalgae strains, cultivation conditions, and laboratory experiments	82
3.3.3	DNA isolation, PCR, and sequencing	83
3.3.4	Sample analyses	83
3.3.5	Data Analysis	84
3.3.6	Modeling procedures	84
3.4	Principales contributions et perspectives sur les interactions algue–algue vis-à-vis de la ressource azotée	87
4	A new kinetics model to predict the growth of micro-algae subjected to fluctuating availability of light	89
4.1	Introduction	92
4.2	Materials and methods	94
4.2.1	micro-algae strains and pre-culture medium	94
4.2.2	Experimental procedure and cultivation conditions	95
4.2.3	Analytical procedures	96
	Batch cultures	96
	Continuous cultures	96
	Carbon conversion	96
4.2.4	Model identification methods	97
4.2.5	Statistical tests	97
4.3	Results and discussion	98
4.3.1	Effects of the incident light on the specific growth rate of <i>C. sorokiniana</i> and <i>S. pectinatus</i> in batch monoculture	98

4.3.2	Effects of the density of the biomass on the growth rates of <i>C. sorokiniana</i> and <i>S. pectinatus</i> in batch mono-culture	100
4.3.3	Modeling the light attenuation within cultures	103
4.3.4	Coupling the photo-inhibition and photo-limitation effects in micro-algal growth kinetics	105
4.3.5	Model calibration and extension for poly-culture predictions in continuous mode photo-bioreactors	109
4.3.6	Prediction of the possible outcomes of the competition for light availability in continuous mode photo-bioreactors under periodic light conditions	112
4.4	Conclusion	117
4.5	Principales contributions et perspectives sur les interactions algue–algue vis-à-vis de la ressource lumineuse	119
5	Modeling Algal-bacterial interactions under algal exudation	123
5.1	Introduction	126
5.2	Model description and hypotheses	127
5.3	Study of steady-states	129
5.4	Stability analysis	131
5.5	Discussion	132
5.6	Numerical simulations	133
5.7	Principales contributions et perspectives sur la modélisation de l’effet des exsudats des microalgues sur les interactions algue–bactérie	143
6	About frame estimation of growth functions and robust prediction in bioprocess modeling	145
6.1	Introduction and motivations	148
6.2	Presentation of the method	151
6.3	Extensions of the method	160
6.3.1	Framing with different upper and lower classes	160
6.3.2	Relaxing with one or more points out of the frame	160
6.4	Application to the framing of growth curves	162
6.5	Numerical illustrations	163
6.5.1	Example of a batch process	165
6.5.2	Example of a continuous process	167
6.6	Illustration on real data	170
6.7	Conclusion and perspectives	173
6.8	Principales contributions et perspectives sur l’utilisation d’une collection de données de croissance spécifique pour obtenir des prédictions robustes « par intervalles » en bioréacteurs	175
	Conclusion générale	177
	Annexe A	185

Annexe B	209
Annexe C	209
Annexe D	213
Annexe E	218
Références bibliographiques	221

Liste des Figures

- 1.1 Schéma des phases lumineuses et obscures de la réaction de photosynthèse d'après [1]. 8
- 1.2 Schéma d'une courbe de croissance dans une culture batch (trait plein) d'après [2]. Les différentes phases de croissance sont représentées par des chiffres : 1 phase de latence; 2 phase exponentielle représentant le taux de croissance maximal dans les conditions spécifiques; 3 phase de croissance linéaire, 4 phase de croissance stationnaire; et 5 phase de déclin phase de mort cellulaire. Les nutriments (ligne pointillée) suivent le schéma opposé indiquant l'épuisement des nutriments. 10
- 1.3 Schéma du procédé intégré PHYCOVER composé d'une lagune algale à haut rendement à vocation épuratoire des eaux usées urbaines, d'un fermenteur anaérobie co-digérant la biomasse produite de manière à réduire les contaminants produisant un vecteur énergétique d'intérêt, et d'un module valorisant le digestat vers les filières agricoles (engrais) et des cultures de microalgues vers la chimie verte (d'après [3]). . 15
- 1.4 Procédé pilote de culture de microalgues alimenté en continu avec des eaux usées et mis en place dans le Calvados par la direction R&D SAUR (société d'aménagement urbain et rural) dans le cadre du projet PHYCOVER [3] 15
- 1.5 Résumé des interactions écologiques possible entre membres d'espèces différentes d'après [4]. La représentation sous forme de roue a été introduite par [5] et a été adaptée pour résumer toutes les interactions possibles par paires. Pour chaque partenaire, il existe 3 résultats possibles : positif (+), négatif (−) et neutre (0). Par exemple, pour le parasitisme, le parasite tire profit de la relation (+) tandis que l'hôte est lésé (−), cette interaction est représentée ainsi par les symboles (+/−). 17
- 1.6 Biomasse en carbone des bactéries et des microalgues *Chlorella sp.* et *Scenedesmus sp.* dans le bassin LHRA du nord (Argences) au cours de la période d'étude d'après [6]. 23

1.7	Résultats de simulations qualitatives d'une action positive du microorganisme 1 (rouge) sur le microorganisme 2 (bleu) en croissance sur un substrat commun (noir) d'après le modèle de compétition proposé dans [7]. Figure de gauche : Vitesses spécifiques des deux micro-organismes et taux de dilution appliqué au bioréacteur. Figure de droite : Comparaison de la biomasse du microorganisme 2 et du substrat résiduel obtenus en monoculture (traits discontinus) et en coculture (en présence du microorganisme 1) (traits continus).	23
1.8	Schéma de classification des réacteurs homogènes par les débits d'entrée et de sortie	26
1.9	Représentation schématique de la courbe de réponse photosynthétique à la lumière , [8]	37
1.10	Effet de la température sur le taux croissance de <i>Asterionella formosa</i> , d'après [9]	40
1.11	Diagrammes de Prédominance (DP) Figure A : DP de l'acide carbonique avec les formes H_2CO_3 (bleu), HCO_3^- (rose) et CO_3^{2-} (jaune); Figure B : DP de l'ammonium NH_4^+ (bleu) et l'ammoniac NH_3 (rose).	41
1.12	Effet du pH sur le taux de photosynthèse normalisé d' <i>Isochrysis galbana</i> d'après [10].	42
1.13	Schéma illustratif de la technique ensembliste avec des intervalles garantis.	45
1.14	Cinétique de croissance avec une borne inférieure d'Haldane et une borne supérieure de Monod (à gauche) et les qui y sont simulations associées sur le substrat et la biomasse (à droite).	46
2.1	(a) <i>Scenedesmus sp.</i> et (b) <i>Chlorella sp.</i> , [11]	54
2.2	Différents photobioréacteurs en mode batch utilisés pour le suivi de croissance des espèces étudiées – Schéma du batch	55
2.3	Deux chemostats (photobioréacteurs en mode continu) mis en place au laboratoire pour le suivi de croissance des espèces étudiées – Schéma du chemostat	56
3.1	Growth rates from multiple comparisons on growth rate values estimated based on ANOCOVA analyses for <i>C. sorokiniana</i> (in red) and <i>S. pectinatus</i> (in blue) at different levels of (a) TAN concentrations, (b) pH conditions, (c) NH_3 concentrations.	76
3.2	SE2 and SE3 data sets (full points) compared to the proposed kinetic model for <i>C. sorokiniana</i> (continuous red line) and <i>S. pectinatus</i> (continuous blue line) in (a), with a focus on low TAN concentrations in (b) (Data points are the mean of 3 replicate measurements of growth rate).	77

3.3	Simulation results obtained under a continuous supply with a high TAN concentration (dotted line in (b) & (c)) at a fixed dilution rate (dotted line in (a)). (a) growth functions previously identified for <i>C. sorokiniana</i> (in solid red line) and <i>S. pectinatus</i> (in solid blue line), (b) dynamics when <i>S. pectinatus</i> is cultivated alone, (c) dynamics when <i>S. pectinatus</i> and <i>C. sorokiniana</i> are cultivated together. In (b) and (c), the biomass variations over time are presented in blue for <i>Scenedesmus sp.</i> and in red for <i>Chlorella sp.</i> while the substrate variations are in solid black lines for TAN and in black dashed lines for NH_3	78
3.4	Isovalue diagrams: resilience time (a) and succession time (b) (in days) depending on the initial biomass densities of <i>C. sorokiniana</i> (A_1) and <i>S. pectinatus</i> (A_2) (in mgC.L^{-1}) under a continuous supply of a high nitrogen concentration.	80
3.5	HRAP data points compared to the model prediction (in continuous lines) under a continuous supply of wastewater containing fluctuating concentrations of TAN (dotted black line). (a) biomass variations over time of <i>Chlorella sp.</i> (in red) & <i>Scenedesmus sp.</i> (in blue), (b) substrate variations over time of TAN (in black) & NH_3 (in magenta).	81
4.1	The growth–light relationship for <i>C. sorokiniana</i> and <i>S. pectinatus</i> obtained by the comparison of the growth data, collected from microplate incubations, with the kinetic functions of Monod, Haldane, and Steele. The data of growth rates are reported as means with standard deviations of 8 replicate measurements obtained at an initial biomass concentrations around $1.1 \pm 0.1 \text{ mgC L}^{-1}$ for both species.	100
4.2	The growth–biomass density relationship for <i>C. sorokiniana</i> and <i>S. pectinatus</i> obtained from microplate incubations. The data of growth rates are reported as means with standard deviations of 8 replicate measurements obtained under a continuous incident light intensity of $467 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ for <i>C. sorokiniana</i> and $439 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ for <i>S. pectinatus</i>	102
4.3	Simulation of the attenuated light model I_{attx} compared to data obtained in monocultures of <i>C. sorokiniana</i> and <i>S. pectinatus</i> growing in flasks at different stages of growth and biomass concentrations.	104
4.4	The effect of incident light intensities I_{in} ($\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$) and the biomass densities x (mgC L^{-1}) on the growth of <i>C. sorokiniana</i> in microwell plates. The data of growth rates are reported as means with standard deviations of 8 replicate measurements.	108
4.5	The effect of incident light intensities I_{in} ($\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$) and the biomass densities x (mgC L^{-1}) on the growth of <i>S. pectinatus</i> in microwell plates. The data of growth rates are reported as means with standard deviations of 8 replicate measurements.	109

4.6	Simulation of chemostat model using the new kinetic function compared to biomass data (means with standard deviations of 3 replicate measurements of OD_{650} and cell count converted to $mgC\ L^{-1}$) tracked in mono-cultures of <i>C. sorokiniana</i> and <i>S. pectinatus</i> under similar conditions of incident light intensity $I_{in} = 165 \pm 5\ \mu E\ m^{-2}s^{-1}$ and dilution rate $D = 0.25 \pm 0.02\ d^{-1}$ (in Erlenmeyer photo-bioreactors).	110
4.7	Validation of the chemostat model using the new kinetic function on biomass data (3 replicate measurements of cell count converted to $mgC\ L^{-1}$) tracked in species assemblage of <i>C. sorokiniana</i> and <i>S. pectinatus</i> under a fixed incident light intensity $I_{in} = 165 \pm 5\ \mu E\ m^{-2}s^{-1}$ and a piece-wise constant dilution rate $D = 0.11\ d^{-1}$ for $t < 2.74$; then $D = 0.25 \pm 0.02\ d^{-1}$ (in Erlenmeyer photo-bioreactors).	112
4.8	Some illustrative simulations obtained in continuous mode photo-bioreactors exposed to periodic illumination in mono-culture (first column A, C, E and G) and in assemblage (second column B, D, F and H) for species 1 (<i>C. sorokiniana</i>) (in red) and species 2 (<i>S. pectinatus</i>) (in blue) according to the examples of operational conditions stated in Table 4.4.	116
5.1	Simulation under nitrogen limitation for $T_f = 60$, $D = 0.15$, $C_{in} = 0$, $N_{in} = 10$, $A_0 = 0.05$, $B_0 = 9.20$, $C_0 = C_{in}$, $N_0 = N_{in}$, $K = 0.8$, and $\alpha = 1$	133
5.2	Simulation under phosphorus limitation for $T_f = 100$, $D = 0.15$, $C_{in} = 0$, $N_{in} = 10$, $A_0 = 0.05$, $B_0 = 9.20$, $C_0 = C_{in}$, $N_0 = N_{in}$, and $\alpha = 1$	133
6.1	Growth curves randomly generated (left) and random data points (s_i, μ_i) corrupted with noise (right).	165
6.2	Wrapping of the data (left) and dynamical simulation (right).	165
6.3	Convergence of the method. Functions μ_k^- , μ_k^+ are obtained with pairs (p_k^-, p_k^+) solutions of problem $\mathcal{P}_{\gamma+}$ at the k -th iteration of Algorithm 1.	166
6.4	Sensitivity of $D(p_j^{*-}, p_j^{*+})$ (where (p_j^{*-}, p_j^{*+}) is given by Algorithm 2) with respect of the number j of data points allowed to be unwrapped.	166
6.5	Data wrapping (left) and corresponding simulation (right) allowing three data points to be out of the frame.	167
6.6	Data wrapping (left) and simulation (right) with only ten experimental data points (in red: with all the data; in green: with exclusion of one point.	168
6.7	Growth curves randomly generated (left) and random data points (s_i, μ_i) corrupted with noise (right).	168
6.8	Wrapping with Monod growth functions (left) and associated dynamical simulation (right)	168
6.9	Convergence of the method. Functions μ_k^- , μ_k^+ are obtained with pairs (p_k^-, p_k^+) solutions of problem $\mathcal{P}_{\gamma+}$ at the k -th iteration of Algorithm 1.	169

6.10	Wrapping with Monod and Haldane growth functions (left) and associated simulation (right)	169
6.11	Sensitivity of $D(p_j^{*-}, p_j^{*+})$ (where (p_j^{*-}, p_j^{*+}) is given by Algorithm 2) with respect of the number j of data points allowed to be unwrapped.	169
6.12	Data wrapping (left) and corresponding simulation (right) allowing height data points to be out of the frame.	170
6.13	Bounds on the biomass concentration obtained with the observer proposed in [12] with gains $G_1 = 1$, $G_2 = -10$ without measurement noise (left) and with a 10% uniform noise (right).	170
6.14	Wrapping 100% of data of micro-algae growth rates (left up) and 100% yields data (right up) and associated dynamical simulation in batch culture, along with data points (down)	173
6.15	Wrapping 70% of data of micro-algae growth rates (left up) and 70% yields data (right up) and associated dynamical simulation in batch culture, along with data points (down)	174
16	Monod-type growth curve	211
17	Réacteur à membrane séparatrice : les micro-algues ne se reproduisent que dans le compartiment de gauche, alors que les bactéries peuvent se développer dans les deux compartiments.	216

Liste des Tableaux

2.1	Répartitions des diverses activités durant la préparation de la thèse	65
3.1	Calibration results on SE2 and SE3 growth data obtained in batch cultures.	77
3.2	Calibration results on HRAP data.	81
4.1	Summary and comparison of the kinetic parameters, estimated from growth data collected during microplate incubations for <i>C. sorokiniana</i> and <i>S. pectinatus</i> , using Monod, Haldane, and Steele kinetics. The results are represented as param. $\pm$ SE, $n = 64$; the statistical comparison was assessed on $2n$ observations. * significant regression parameter at $p < 0.05$ ($n = 128$), ** significant difference between the parameters of the two species at $p < 0.05$ ($n = 128$), ns non-significant difference between the parameters of the two species at $p > 0.05$ ($n = 128$).	98
4.2	Summary and comparison of the kinetic parameters, estimated from growth data collected during microplate incubations for <i>C. sorokiniana</i> and <i>S. pectinatus</i> , depending on biomass density. The results are represented as param. $\pm$ SE, $n = 96$; the statistical comparison was assessed on $2n$ observations. * significant regression parameter at $p < 0.05$, ** significant difference between the parameters of the two species at $p < 0.05$	101
4.3	Summary and comparison of the new model parameters used in the modeling of <i>C. sorokiniana</i> and <i>S. pectinatus</i> growth depending on both incident light intensity and biomass density (in microwell plates). The results are represented as param. $\pm$ SE, $n = 864$; the statistical comparison was assessed on $2n$ observations. * significant regression parameter at $p < 0.05$, ** significant difference between the parameters of the two species at $p < 0.05$, ns non-significant difference between the parameters of the two species at $p > 0.05$	106

4.4	Some illustrative examples of the possible outcomes of the multispecies model using different operational conditions of dilution rate D and periodic illumination (taking I_{min} and I_{max} over the period T). The test conditions C_1 and C_2 are computed on species 1 (<i>C. sorokiniana</i>) and species 2 (<i>S. pectinatus</i>) in monoculture, while C_{12} and C_{21} are given for assemblages. The other parameters are taken to be: $\alpha = 0.4$; For species 1 : $\bar{\mu} = 3.25 \text{ d}^{-1}$, $K_{sI_{att}} = 52 \text{ } \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, $K_{hsx} = 52 \text{ mgC L}^{-1}$, and $I_0 = 1068 \text{ } \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$; For species 2 : $\bar{\mu} = 1.75 \text{ d}^{-1}$, $K_{sI_{att}} = 26 \text{ } \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, $K_{hsx} = 26 \text{ mgC L}^{-1}$, and $I_0 = 1836 \text{ } \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$	115
5.1	Summary of the model parameters employed in two cases of inorganic nutrient limitation (N or P)	134
6.1	Parameters estimates for the growth function	172
6.2	Parameters estimates for the yield function	173
3	Résultats de la qualité des estimations de paramètres obtenues à l'aide de la première méthode ([1]) sur différentes combinaisons de données expérimentales.	212
4	Résultats de la qualité des estimations de paramètres obtenues à l'aide de la deuxième méthode ([2]) sur différentes combinaisons de données expérimentales.	212

INTRODUCTION GÉNÉRALE :

CONTEXTE, OBJECTIFS ET MÉTHODES

Introduction

LA richesse et la complexité du vivant et de son environnement est une source d'inspiration sans limite. L'inspiration de l'Homme des principes et stratégies élaborés par les organismes vivants (animaux, végétaux, micro-organismes, etc.) et des écosystèmes (l'ensemble de ces êtres vivants et leur environnement en interaction), a permis l'éclosion de plusieurs inventions respectueuses de l'environnement aussi appliquées dans le monde contemporain. Inspirées des écosystèmes naturels, les microalgues sont à l'aube des biotechnologies comparables à celles développées avec les plantes terrestres et les bactéries. Ces microorganismes photo-synthétiques colonisent des habitats très variés, aussi bien aquatiques que terrestres [13]. Cette adaptabilité à des conditions environnementales diverses permet la production de multiples molécules à haute valeur ajoutée comme les vitamines, les antioxydants, les sucres, les protéines et les lipides [14], ce qui explique la valorisation de leur biomasse dans de nombreux domaines.

Une des techniques de dépollution qui commence à émerger et à faire ses preuves est la dépollution par les microalgues [15, 16]. Ces microorganismes photosynthétiques ont démontré qu'ils sont de bons candidats pour la bioremédiation des milieux contaminés en plus de leur potentiel important pour la production de la biomasse d'intérêt industriel [17, 18]. Un tel procédé permet de limiter la contamination croissante, d'origine principalement anthropique. Il se réfère à la capacité des espèces de micro-algues d'assimiler des nutriments essentiels à leur croissance, en particulier l'azote et le phosphore présents en fortes teneurs dans les eaux polluées, et sur le potentiel énergétique de la biomasse produite. Un enjeu majeur de ce procédé est la stabilité de production [16]. Une limite économique est également posée, avec des coûts élevés d'investissement et de production, freinant le développement à l'échelle industrielle. L'innovation en assainissement est actuellement peu dynamique. Une nouvelle filière, exploitant l'énergie solaire (photosynthèse) et consommant au plus juste l'énergie et les réactifs pour fournir un système d'assainissement de qualité, serait de toute évidence une opportunité.

Pour rester économiquement viable, la production algale doit pouvoir utiliser les intrants (lumière, CO₂, azote, phosphore) issues de sources renouvelables et durables tels que la lumière naturelle, et les produits de recyclage ou de déchets (eaux usées, fumées industrielles) dans la mesure du possible [19]. Le choix de la culture qui maintiendrait ces fonctions est aussi crucial. Bien que l'utilisation de cultures monospécifiques en réacteurs fermés et bien contrôlés soit largement répandue pour la production de la biomasse valorisable, elle s'avère très sensible aux variations climatiques et notamment aux contaminations chimiques et biologiques, notamment si on la transporte en milieu extérieur ouvert ou si on l'alimente par des effluents non contrôlés.

La mono-culture de microalgue est donc un paradigme dominant pour la production à grande échelle. En outre, contrairement à ce principe de culture, l'utilisation des polycultures (i.e. cultures mixtes, culture d'assemblage d'espèces) serait avantageuse pour les applications biotechnologiques. En effet, comme pour la permaculture où les systèmes agricoles sont développés en synergie sur la base

de la diversité des cultures, leur résilience et leur productivité naturelle; les cultures mixtes de microorganismes semblent être une voie prometteuse pour garantir un procédé plus résilient, productif et durable à grande échelle [24, 25]. Une nouvelle méthode de culture algale consistera ainsi à mettre en place de manière efficace des assemblages d'espèces stables et productives à travers l'approche de l'écologie synthétique [20, 21]. Cette approche offre le potentiel de sélectionner artificiellement des microorganismes en assemblage favorisant la croissance des espèces algales souhaitées [20, 22, 23].

Des études récentes ont souligné l'importance de la diversité sur la productivité et la stabilité des systèmes de lagunage à haut rendement algal LHRA [84, 85, 6]. Il a été suggéré qu'une grande diversité au sein de la communauté de microalgues se développant naturellement dans un LHRA, joue un rôle important dans le maintien de la communauté contre les pressions climatiques ou encore prédatrices [85]. L'intérêt de l'association de microalgues et de bactéries a été aussi soulevé dans plusieurs études [83, 133]. Ce type d'association permet aussi d'améliorer la résistance aux changements de température, de pH et de milieu [77].

L'inspiration des symbioses naturelles au sein des communautés présente donc une voie de recherche privilégiée. Une alternative à la culture algale monospécifique, serait donc l'utilisation d'assemblages constitués de microalgues locales issues du milieu naturel, adaptées aux conditions environnementales imposées par le lieu de production et cultivées en milieu extérieur. Cependant, les interactions au sein d'un écosystème (naturel ou artificiel) sont complexes et peuvent résulter d'un ensemble d'interactions positives (échanges d'azote, de vitamines, d'O₂ et de CO₂), négatives (compétition pour les nutriments, production de molécules allélopathiques comme des antibiotiques ou des toxines) ou neutres [20]. Ces interactions sont multivariées et dépendent des paramètres environnementaux tels que la disponibilité en nutriments, la température, la lumière et le pH [368]. Elles sont encore mal connues et peu d'études ont été réalisées sur la sélection et l'optimisation de co-cultures à vocation industrielle [26].

En vue d'étendre l'exploitation de la diversité des microalgues sur des systèmes intensifs de production et mettre en place des procédés efficaces pour une dépollution durable, une meilleure compréhension des interactions au sein de ces écosystèmes est primordiale. Une bonne compréhension des interactions, aussi bien positives que négatives, et comment elles peuvent influencer le fonctionnement des écosystèmes sous la variation des conditions environnantes, est cruciale. Les interactions positives seront particulièrement intéressantes pour faire évoluer ou créer de nouvelles stratégies de production plus fiables et à moindre coût.

Pour comprendre, optimiser et prédire l'impact des variations des facteurs abiotiques (conditions de culture) et biotiques (diversité spécifique) sur la performance des polycultures, une modélisation mathématique permet d'éprouver les différentes hypothèses de mécanismes sous-jacents sur l'écologie des populations (compétition, complémentarité, effets refuges, densité dépendance, etc.) [27, 7, 28]. Cette modélisation doit être dynamique pour tenir compte à la fois de la variation des ressources (lumière, nutriments) et de la diversité des différentes espèces mises en jeu.

L'objectif principal de cette thèse est de fournir des outils de prédictions et d'optimisation de la production de biomasse des assemblages naturels ou artificiellement composés en milieux fluctuants.

Le manuscrit est organisé en deux parties : la première est introductive (Chapitres 1 et 2); et la deuxième porte sur quatre articles scientifiques (Chapitres 3, 4, 5 et 6).

Le chapitre 1 : présente le contexte scientifique général lié aux enjeux de cette thèse à partir d'un état de l'art qui vise à énoncer les questionnements à soulever et les hypothèses de travail.

Le chapitre 2 donne un aperçu sur les méthodes utilisées pour répondre aux objectifs de la thèse.

Le chapitre 3 : démontre par des approches expérimentales et de modélisation une interaction de type facilitation entre deux espèces de microalgues en succession dans les bassins extérieurs ouverts alimentés par des eaux usées, à travers la fluctuation de la ressource azotée;

Le chapitre 4 : décrit la croissance algale sous l'effet de la disponibilité de la ressource lumineuse à travers une nouvelle expression cinétique qui intègre à la fois les effets lumineux d'inhibition et de limitation. Les paramètres de cette fonction permettent de caractériser les sensibilités de différentes espèces à ces phénomènes. Le modèle prédit l'exclusion compétitive ou la coexistence sous des conditions de lumière périodique.

Le chapitre 5 : propose un modèle en dimension 4 permettant d'étudier l'association des microalgues et des bactéries à travers le phénomène d'exsudation et la consommation d'une ressource commune. Les simulations numériques montrent la possibilité d'une coexistence dans un chémostat s'accompagnant de régimes oscillants sur toutes les variables d'état. L'analyse du modèle a montré l'unicité de l'équilibre de coexistence et la robustesse de l'installation des bactéries. Une facilitation s'opère lorsque les bactéries ne peuvent pas croître seules, et les conditions pour lesquelles l'ajout de microalgues leur permet de s'installer sont définies.

Le chapitre 6 : propose une nouvelle méthode d'encadrement des vitesses de croissance à partir de données expérimentales permettant d'obtenir des bornes fonctionnelles, utiles pour réaliser des prédictions dynamiques à l'aide d'observateurs à intervalles garantis.

Le manuscrit est clôturé avec des conclusions générales sur les différents travaux réalisés en ouvrant des perspectives, autant d'un point de vue fondamental qu'appliqué.

1.1 Utilisation des microalgues pour le traitement des eaux usées et la production de biomasse d'intérêt industriel

1.1.1 Généralités sur les microalgues et ses applications

1.1.1.1 Définition et caractéristiques

Le terme microalgue est un terme générique qui désigne les algues microscopiques, au sens strict (eucaryotes¹) et les cyanobactéries (procaryotes²). Unicellulaires ou pluricellulaires indifférenciés, ce sont des micro-organismes photosynthétiques extrêmement diversifiés et hétérogènes des points de vue évolutif et écologique. Les microalgues sont des constituants majeurs du phytoplancton et contribuent à la moitié de la production primaire globale de carbone. Le nombre total d'espèces d'algues est estimé entre 1 et 10 millions, dont la majorité est microscopique [29]; les estimations de la richesse globale en espèces de microalgues restent vague [30]. Environ 6000 espèces de microalgues sont identifiées dans le milieu marin, et plus de 14000 en eau douce [31], et bien plus restent à découvrir. Ces espèces sont caractérisées par une variété de morphologies (sphérique, ellipsoïde, fusiforme, cylindrique, spirale, etc.) et peuvent se présenter sous différentes formes de cellules (cellule unique, en chaînes ou en groupes de cellules), mobiles ou sessiles. Leur taille peut varier de quelques microns à plusieurs centaines de microns (de 0.5 à 10^4 microns, [32]). Si leur taille réduite ne permet leur observation qu'au microscope, leur présence en grand nombre est parfois détectable par la couleur de l'eau (verte, brune, bleu, etc., selon l'espèce en question) grâce à la présence de pigments à l'intérieur des cellules dont la fonction est d'assurer la photosynthèse. Par leurs couleurs et leur structure, les microalgues se répartissent en plusieurs groupes différenciés : algues bleues (i.e. cyanobactéries), diatomées, coccolithes, chrysophycées, dinoflagellés et chlorophycées [31]. La reproduction préférentielle des microalgues est une duplication asexuée par mitose car elles colonisent leur milieu par division cellulaire si les conditions physicochimiques et nutritives sont favorables.

¹organismes unis ou pluricellulaires qui présentent une structure complexe contenant un noyau entouré d'une membrane ainsi que plusieurs organites intracellulaires (noyau, chloroplaste, mitochondrie, etc.).

²organismes unicellulaires qui sont dépourvus de noyau et ne présentent que très rarement des organites cellulaires.

1.1.1.2 Métabolisme et efficacité photosynthétique

Moyennant une capacité d'adaptation qui est à l'origine des métabolismes variés, les microalgues peuvent croître dans différentes conditions autres qu'autotrophes³ ; elles peuvent être hétérotrophes⁴ ou mixotrophes⁵ au besoin. Le principe de la culture des micro-organismes photosynthétiques repose sur l'optimisation de leurs besoins pour favoriser la photosynthèse et la productivité de biomasse.

La photosynthèse est le processus qui confère aux microalgues leur autotrophie. Grâce à la photosynthèse elles sont capables de transformer l'énergie lumineuse en énergie chimique. En effet, ce processus leur permet de capturer le dioxyde de carbone CO_2 (puits de carbone) en présence de l'énergie lumineuse et de l'eau H_2O et d'élaborer des composés organiques $(\text{CH}_2\text{O})_n$ (amidon, fructose et saccharose) nécessaires à leur métabolisme et à leur croissance ; l'eau est quant à elle photo-oxydée en oxygène O_2 selon la réaction globale suivante : $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow (\text{CH}_2\text{O})_n + \text{O}_2$.

Cette réaction est divisée en deux phases : la phase lumineuse (photochimique) et la phase obscure (non photochimique) (voir Figure 1.1). Dans la phase photochimique, la chlorophylle utilise l'énergie lumineuse pour scinder la molécule d'eau (photolyse) ; il y a libération d'oxygène et production d'hydrogène et d'énergie chimique transitoire (stockée dans les intermédiaires NADPH⁶ et ATP⁷). Cette réaction est particulièrement rapide. Dans la phase non photochimique, l'hydrogène et cette énergie chimique vont permettre par le cycle de Calvin (ensemble de réactions biochimiques) la consommation du CO_2 (fixé par l'enzyme Rubisco) et la production de molécules glucidiques, puis de protéides et de lipides ultérieurement (biomasse valorisable). Cette étape est significativement plus lente que la précédente.

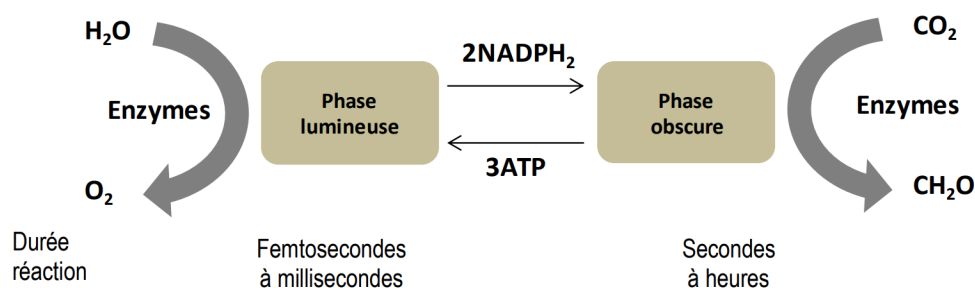


FIGURE 1.1 : Schéma des phases lumineuses et obscures de la réaction de photosynthèse d'après [1].

Une des caractéristiques principales des microalgues est leur rendement photosynthétique qui se définit comme la fraction de l'énergie solaire convertie en énergie chimique par ces organismes photosynthétiques. Il se trouve que les microalgues ont un rendement photosynthétique très important comparé à celui des plantes terrestres (10% vs. 5% [33]). Leur rendement important se traduit par un taux de

³un organisme est dit autotrophe s'il est capable de se développer uniquement à partir d'éléments minéraux.

⁴un organisme est dit hétérotrophe s'il ne peut pas élaborer sa propre matière organique autrement qu'à partir de matières organiques déjà élaborées par d'autres organismes.

⁵un organisme est dit mixotrophe s'il est capable de se nourrir par autotrophie (via la photosynthèse) aussi bien que par hétérotrophie (aux dépens de constituants organiques préexistants voire la consommation d'organismes en entier).

⁶Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate.

⁷adénine triphosphate (vecteur d'énergie chimique).

croissance très élevé, c'est-à-dire un court temps de doublement de la population (de quelques heures chez certaines espèces), ce qui permet leur culture dans le cadre de production industrielle à grande échelle. Cependant, différents phénomènes lumineux comme la photorespiration, la photosaturation et la photoinhibition peuvent limiter l'efficacité de la photosynthèse en fonction des espèces et des conditions de culture considérées. Le phénomène de photorespiration permet de tamponner la concentration en O_2 lorsque celle-ci est en excès. Il peut conduire à une dégradation de matière organique et donc au relargage du CO_2 fixé lors de la photosynthèse. Pour limiter ce phénomène, il est important d'évacuer régulièrement l' O_2 produit par la photosynthèse.

On parle de saturation par la lumière lorsque l'énergie lumineuse captée par les pigments ne peut pas être utilisée entièrement, ce qui fait qu'une partie est dissipée par fluorescence ou sous forme de chaleur. La plupart des algues sont saturées de lumière à environ 20 % de l'intensité de la lumière solaire [34, 35, 36] alors qu'un fort éclaircissement peut ralentir, inhiber la croissance des microalgues voire conduire, à terme, à la destruction des photosystèmes entraînant la mort cellulaire. Ce phénomène est connu sous le nom de photoinhibition et souvent accompagné d'une diminution de la productivité de biomasse [37, 36, 38].

La croissance des microalgues et donc la production de biomasse, dépendra de la quantité de lumière perçue par les cellules ; l'efficacité de la photosynthèse est l'un des facteurs contrôlant la productivité.

1.1.1.3 Croissance et principaux métabolismes d'adaptation

La croissance algale peut être caractérisée par différentes phases reflétant les changements de la biomasse et de son environnement au cours du temps. La réponse typique de la croissance algale (i.e. taux de croissance spécifique) au fil du temps par rapport à la teneur en éléments nutritifs peut être schématisée en 5 étapes, comme le montre la Figure 1.2, d'après [2]. Une première phase, dite de latence, correspond à un taux de croissance sous maximal qui peut être observé. Le retard de croissance lors de cette phase pourrait s'expliquer par l'ajustement physiologique des cellules (i.e. adaptation cellulaire) aux changements des conditions de nutriments ou de culture (e.g. température, lumière). Cette phase peut être évitée lorsque les cellules utilisées au début de l'expérience en mode batch⁸ sont pré-adaptées aux conditions de culture ou sont préalablement cultivées en mode continu⁹ et maintenues à l'équilibre. La deuxième phase, dite exponentielle, est caractérisée par une croissance accélérée puis exponentielle (ou logarithmique) tant que les ressources essentielles pour la croissance sont en abondance. La troisième phase de croissance est linéaire et suivie d'une phase stationnaire qui se produit à partir d'une certaine concentration cellulaire où la biomasse commence à s'accumuler à une vitesse constante jusqu'à ce qu'un substrat dans le milieu de culture (ou des inhibiteurs : des bactéries, des champignons et des virus) devienne le facteur limitant la croissance. La dernière phase de déclin correspond ainsi à une multiplication ralentie due à une insuffisance de ressources, la mort cellulaire ou

⁸un mode de culture où les micro-organismes croissent sur des nutriments qui sont initialement présents dans le milieu ; aucun ajout ne se produit au cours des temps.

⁹un mode de culture où les micro-organismes sont conditionnés par la vitesse d'apport des nutriments qui est généralement égale à la vitesse de soutirage.

encore la dominance d'autres espèces entraînant finalement un effondrement total de la culture.

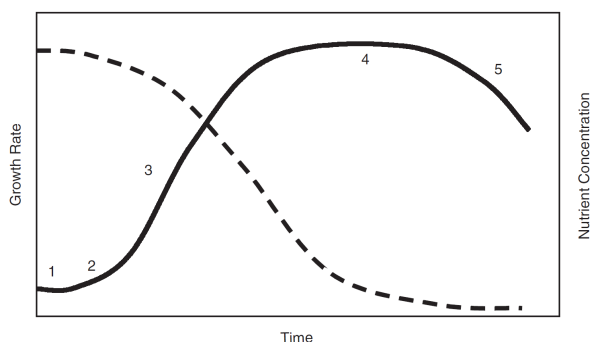


FIGURE 1.2 : Schéma d'une courbe de croissance dans une culture batch (trait plein) d'après [2]. Les différentes phases de croissance sont représentées par des chiffres : 1 phase de latence ; 2 phase exponentielle représentant le taux de croissance maximal dans les conditions spécifiques ; 3 phase de croissance linéaire, 4 phase de croissance stationnaire ; et 5 phase de déclin phase de mort cellulaire. Les nutriments (ligne pointillée) suivent le schéma opposé indiquant l'épuisement des nutriments.

Les facteurs reconnus pour impacter la vitesse de croissance des microalgues et leur prolifération sont de plusieurs natures. Les microalgues sont sensibles à la disponibilité des nutriments (notamment le carbone C, l'azote N et le phosphore P), de la ressource lumineuse et à la variation d'autres facteurs abiotiques comme la température et le pH du milieu. Les microalgues s'adaptent aux conditions de leurs environnements pour récupérer les ressources, que ce soit par le biais de changements structuraux, d'un stockage ou d'une utilisation plus efficace des ressources. Les ajustements internes impliquent une acclimatation biochimique et physiologique, tandis qu'à l'extérieur, ils peuvent excréter une variété de composés pour, entre autres, rendre les nutriments disponibles ou limiter la croissance des concurrents.

Du point de vue de la structure, le carbone est le composant principal, après l'hydrogène et l'oxygène. Mais l'azote et le phosphore peuvent limiter la croissance des microalgues et conditionner leur prolifération. C'est à partir des substances minérales dissoutes dans l'eau que les microalgues synthétisent leurs propres substances organiques et se multiplient. La quantité et la qualité de la biomasse produite à partir des microalgues sont sensibles à la variation des nutriments présents (fluctuation des intrants notamment l'azote et le phosphore) ou encore du pH pouvant jouer un rôle déterminant sur la prolifération des microalgues. Les teneurs en réserve de carbone stocké (notamment le stockage de lipides) dans les microalgues peuvent varier notamment par la carence en phosphore ou en azote [39, 40], car elles résultent d'un déséquilibre transitoire entre le flux de carbone issu de la photosynthèse et le flux de ces nutriments essentiels. Par exemple, lorsque le milieu de culture est carencé en azote, les microalgues se développent à des taux plus faibles, mais accumulent des glucides et/ou des lipides [41, 42, 43]. La cellule carencée n'interrompt pas immédiatement l'acquisition du CO_2 nécessaire à la photosynthèse, alors qu'elle ne peut pas l'utiliser pour construire des protéines (puisque, par exemple, l'azote est manquant). Elle doit donc stocker ce flux ; chez certaines espèces, ce stockage a lieu prin-

ciement sous forme de lipides pouvant représenter jusqu'à 60% de leur poids sec [13, 44, 45]. Une addition de phosphore sous des conditions de limitation en azote a été proposée comme stratégie pour améliorer la production de biomasse de microalgues en monoculture [40, 46], l'augmentation de l'accumulation et de la productivité en lipides [47, 46, 48]. Par ailleurs, la gestion du rapport N :P des ressources disponibles constitue un moyen de maîtriser l'équilibre entre les populations dans les écosystèmes phytoplanctoniques complexes [49].

Certaines microalgues peuvent ajuster à long terme la production et le stockage de l'énergie en réponse à une carence en nutriments, ou encore à une forte exposition à la lumière [50] via des mécanismes d'adaptation pouvant se traduire, entre autre, par l'expression spécifique de certains gènes [51]. Par exemple, une carence en azote peut réduire la productivité des microalgues en modifiant la morphologie cellulaire en raison de l'accumulation de composants biochimiques (glucides, protéines et lipides) qui augmentent les volumes cellulaires, et l'épaississement de la paroi [52]. De plus, des cellules photoadaptées (i.e. photoacclimatées) peuvent changer leurs pigmentations, macro-molécules (e.g. les enzymes associées à la photosynthèse et à la respiration) ou encore leur morphologie (e.g. volume de cellule, transparence, etc.) [53, 54, 55].

Un autre mécanisme d'adaptation qui peut survenir en raison du manque de ressources nutritives, est l'excrétion d'exsudats [56].

Ce phénomène consiste en une libération de composés organiques dissous à l'extérieur de la cellule afin de maintenir son intégrité lorsqu'elle n'est pas en mesure de métaboliser ces composés [57]. Ce phénomène peut jouer un rôle important sur les flux de nutriments qui régissent les équilibres entre les microalgues qui cohabitent avec d'autres micro-organismes (e.g. des bactéries) dans l'environnement naturel ou artificiel (culture en bassins).

L'adaptation des microalgues aux variations de leur environnement est généralement difficile à prédire à l'échelle de la cellule. Tenir compte de tous les effets et les phénomènes possibles nécessite des modèles mécanistes plus ou moins sophistiqués, dont le degré de complexité est défini en fonction de l'étude ainsi que l'échelle et les fins de leur application.

1.1.1.4 Nombreuses applications des microalgues

Les micro-algues sont au centre de beaucoup d'attention et intéressent les industriels dans de nombreux domaines très variés (alimentation et nutrition, cosmétiques et santé, énergie, chimie verte...). Ces micro-organismes se présentent aujourd'hui comme une solution durable et prometteuse pour faire face aux problématiques environnementales, alimentaires ou encore énergétiques [58, 59, 60, 61, 62]. Avec plusieurs milliers d'espèces potentiellement utilisables, la biomasse des microalgues constitue un réservoir majeur de bioressources pouvant contenir de multiples molécules comme les vitamines, les antioxydants, les sucres, les protéines, et les lipides, qui présentent un potentiel d'application énorme et un grand intérêt pour les industriels, mais aussi pour les scientifiques [63, 64]. Déjà utilisées comme intrants pour l'agriculture, compléments pour l'alimentation humaine et ani-

male, composants pour le cosmétique et molécules pour l'industrie pharmaceutique [65, 66]; les microalgues sont en cours de développement pour la dépollution de l'air et de l'eau et pour la production de bioénergies (biodiesels, biohydrogène, biogaz) [14, 67, 1, 45].

Au vu de la diversité de compositions biochimiques et la plasticité métabolique des microalgues et la multiplicité des applications, leur potentiel et intérêt sont évidents; elles représentent aujourd'hui une grande voie de recherche à approfondir. L'expansion croissante de la biotechnologie microalgale nécessite l'amélioration et l'optimisation continues des systèmes de production microalgaux. La question posée est celle de l'extrapolation des procédés pour permettre la production de masse des microalgues notamment devant les performances de croissance limitée dans les cultures industrielles, particulièrement en systèmes ouverts [68]. La caractérisation de ces systèmes de culture est nécessaire et comprend principalement l'établissement des conditions de croissance optimales (lumière, niveaux de nutriments, pH, etc.), la caractérisation de la croissance (taux de croissance et densité de culture finale) et l'analyse de l'accumulation de métabolites (e.g. composition et accumulation des lipides).

1.1.2 Bioremédiation et production de biomasse en systèmes ouverts

1.1.2.1 Avantages et limites de la culture des microalgues sur des eaux usées

Les microalgues sont cultivées soit en systèmes fermés (photobioréacteurs), ou en systèmes ouverts, appelés bassins ouverts (open ponds). Le choix du système de production dépend du degré de contrôle nécessaire à la biomasse produite et de sa valeur [69]. Les photobioréacteurs offrent un certain nombre d'avantages par rapport aux systèmes ouverts. Ils présentent un environnement de culture clos (protégeant la culture des contaminations directes et limitant les pertes) permettant un meilleur rendement de fixation du CO₂ par les microalgues, un meilleur contrôle du procédé et une meilleure productivité. Cependant, les coûts d'investissement et d'exploitation (construction et consommation en énergie) de ces systèmes sont très élevés, contrairement aux bassins ouverts. Ces derniers continuent d'être utilisés pour la culture industrielle et sont mieux adaptés pour la culture de microalgues à grande échelle [70, 71, 72].

Pour atténuer les inconvénients des bassins ouverts, notamment le problème de faible productivité (0.05 à 0.1 g L⁻¹ j⁻¹ vs. une productivité supérieure à 0.8 à 1.3 g L⁻¹ j⁻¹ en photobioréacteurs [68]), un focus particulier doit être mis sur la phase de production. Certaines études ont montré que l'utilisation des microalgues mixotrophes pour la bioremédiation des effluents liquides ou gazeux peut augmenter leur productivité. Les molécules organiques dans les eaux usées peuvent servir de substrat pour les cultures mixotrophes et hétérotrophes, ce qui peut considérablement augmenter la productivité par rapport aux conditions photoautotrophes [73, 33]. Les eaux urbaines et industrielles sont riches en matière organique, en azote, phosphore et d'autres microéléments qui peuvent subvenir aux besoins des microalgues pour leur croissance. Leur métabolisme rapide et efficace leur permet de consommer ces composés, ce qui en fait des micro-organismes intéressants et potentiellement performants pour la bioremédiation. Les recherches sur l'utilisation des microalgues pour le traitement

tertiaire des eaux municipales ont débuté dès les années 1970 en-vue de réduire le potentiel eutrophisant de ces eaux. Il s'est avéré ensuite que les microalgues présentaient un potentiel de traitement leur permettant une application dans les processus de traitement secondaire [74] grâce à leur capacité de retirer de nombreux nutriments des eaux avec une efficacité supérieure aux boues activées. Cette efficacité a ouvert la voie à de nombreuses recherches sur la croissance de différentes espèces de microalgues dans des eaux usées spécifiques avec des compositions différentes [15, 75]. Néanmoins, l'expansion de cette technologie est, à ce jour, limitée et se heurte à la variabilité de l'efficacité de l'assainissement liée aux conditions climatiques, à la nature même des eaux à traiter et à la présence de prédateurs.

L'utilisation des eaux usées pour la culture des microalgues permet aussi de réduire les coûts liés à l'apport d'eau et de fertilisants chimiques et minéraux, pouvant représenter jusqu'à 50 % du coût total de production de biomasse [76, 77, 78]. Le traitement biologique des eaux usées peut améliorer la durabilité économique et environnementale grâce au recyclage des nutriments et à l'extraction de la biomasse algale à valeur ajoutée tout en réduisant l'impact des polluants sur l'environnement.

L'intégration du processus microalgal aux processus industriels tels que le traitement des effluents liquides riches en nutriments ou riches en gaz carbonique CO₂, associée à une valorisation des sous-produits de la biomasse générée [16], pourrait rendre la culture ouverte à l'échelle industrielle moins polluante, moins consommatrice d'énergie et à moindre coût. Mais, cela ne serait pas possible sans la maîtrise et l'optimisation des conditions de culture et des espèces microalgales d'intérêt. En effet, une culture en extérieur sur des eaux usées présente plusieurs inconvénients. Elle est sujette non seulement à la variation des paramètres environnementaux et opérationnels (lumière et température, temps de séjour hydraulique, etc.), mais aussi à la variété des contaminations chimiques (pH, nutriments, métaux, etc.) et biologiques (bactéries, champignons, etc.) des effluents. D'un côté, des problèmes potentiels peuvent découler de la forte concentration en substances toxiques ou encore la réduction de la pénétration de la lumière dans la culture à cause des matières en suspension contenues dans les eaux usées. Un autre problème possible est la limitation en azote, notamment dans des eaux usées urbaines. Ces eaux contiennent des concentrations qui peuvent varier entre 10 et 100 mg.L⁻¹ et rapport N :P de la ressource proche de 3, plus petit que le rapport typiquement nécessaire pour la croissance des microalgues (autour de 15). Cela signifie que l'azote sera entièrement consommé avant le phosphore ; il en résulte un manque d'azote et une accumulation de phosphore. Avant de devenir limitantes, ces teneurs en azote peuvent supporter une production de biomasse de 0.1 à 1 g.L⁻¹ [33]. D'un autre côté, les monocultures de microalgues sont extrêmement difficiles à maintenir en système ouvert alimenté avec des eaux usées, car elles sont rapidement contaminées par la colonisation d'autres micro-organismes contenus dans les eaux usées ou dans l'air [79]. La présence de contaminants biologiques (e.g. agents pathogènes, prédateurs, compétiteurs) peut réduire fortement la productivité [80, 81]. Toutefois dans certains cas des relations positives (e.g. entre les microalgues et les bactéries) sont aussi possibles et se sont avérées capables de protéger les microalgues contre les

composés toxiques voire améliorer l'élimination des contaminants [82, 83]. Quelques études récentes ont aussi souligné l'importance de la présence des microalgues dans les eaux usées sur la diversité de la communauté microalgale [84], sa productivité, ainsi que sa résistance contre les conditions climatiques et les pressions prédatrices [85, 6]. L'étude de ces interactions est ainsi nécessaire afin de pouvoir contrôler leur influence sur la performance du système.

Comme déjà souligné plus haut, l'optimisation des conditions de cultures des systèmes extérieurs à grande échelle est nécessaire afin d'éviter les phénomènes d'inhibition et de limitation par les ressources (niveaux de nutriment et contaminant, disponibilité de la lumière) pouvant empêcher la culture de maintenir ses fonctions essentielles (production de biomasse et abattement de la pollution des effluents). En parallèle, la compréhension des interactions au niveau des assemblages d'espèces sous les conditions extérieures fluctuantes est primordiale pour pouvoir contrôler et extrapoler ce que fait la nature ; éventuellement en proposant de nouvelles stratégies de culture tenant en compte des interactions biologiques et la possibilité de les orienter par l'optimisation et le contrôle des conditions dont elles dépendent (e.g. l'apport des ressources). Ces interactions peuvent être complexes, en particulier sous l'environnement fluctuant des cultures extérieures. Ainsi, elles doivent être identifiées et optimisées en milieu extérieur et au laboratoire dans le but d'être déployées à l'échelle industrielle.

1.1.2.2 Exemple d'un lagunage naturel en lagunage à haut rendement algal : projet PHYCOVER

Le projet PHYCOVER¹⁰ a débuté en décembre 2014, avec un financement de 774 341 euros de l'agence nationale de la recherche et est labellisé par les pôles Mer Bretagne atlantique et méditerranée, ainsi que par le pôle Trimatec. L'objectif du projet PHYCOVER est de concevoir une évolution de la filière épuration des effluents issus des activités anthropiques, notamment des effluents urbains. Autrement dit, le but est d'identifier un procédé modulaire intégré de traitement des effluents d'origine urbaine permettant la production de biogaz, tout en déterminant les possibilités de valorisation optimale de la matière résiduelle, appelée digestat. Le procédé retenu (Figure 1.3), traite les effluents urbains dans une lagune à haut rendement en mobilisant une communauté microbienne complexe (microalgues et bactéries) diversifiée qui assure l'assimilation des éléments comme le carbone (C), l'azote (N), le phosphore (P), l'assimilation/adsorption des métaux lourds, l'adsorption / dégradation des composés traces organiques et la réduction des organismes pathogènes.

SAUR a mis à disposition du projet Phycover deux bassins de Lagunage à Haut Rendement Algal (LHRA) sur deux sites : au Sud et au Nord de la France (1 bassin à Nîmes et un autre bassin dans le Calvados). L'alimentation se fait par pompage et le rejet s'effectue par surverse. Le bassin est agité par une pompe centrifuge externe avec une buse d'agitation (voir Figure 1.4).

Parmi les défis de ce projet, nous citons : i) l'identification des paramètres saisonniers influant sur la productivité et la capacité épuratoire d'une unité de culture de microalgues sur la globalité d'une

¹⁰Projet PHYCOVER ANR-14-CE04-0011 (2014-2018)

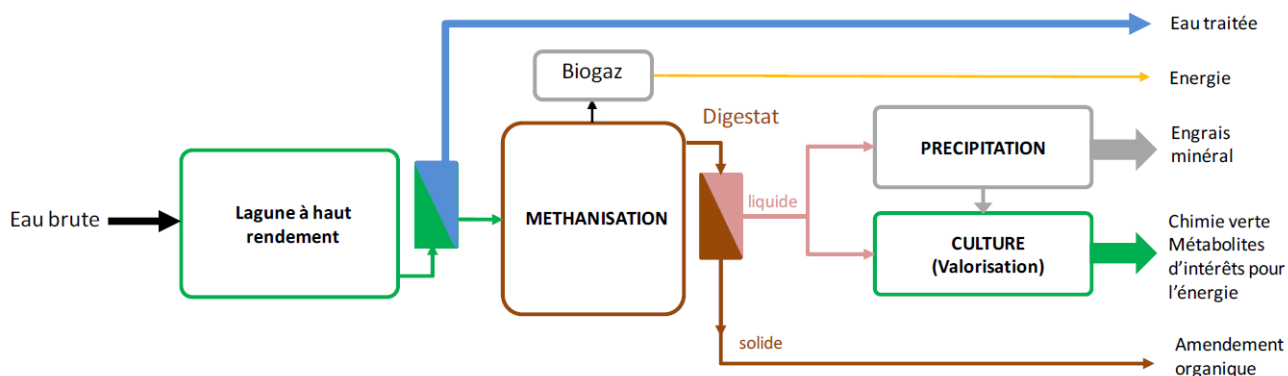


FIGURE 1.3 : Schéma du procédé intégré PHYCOVER composé d'une lagune algale à haut rendement à vocation épuratoire des eaux usées urbaines, d'un fermenteur anaérobie co-digérant la biomasse produite de manière à réduire les contaminants produisant un vecteur énergétique d'intérêt, et d'un module valorisant le digestat vers les filières agricoles (engrais) et des cultures de microalgues vers la chimie verte (d'après [3]).

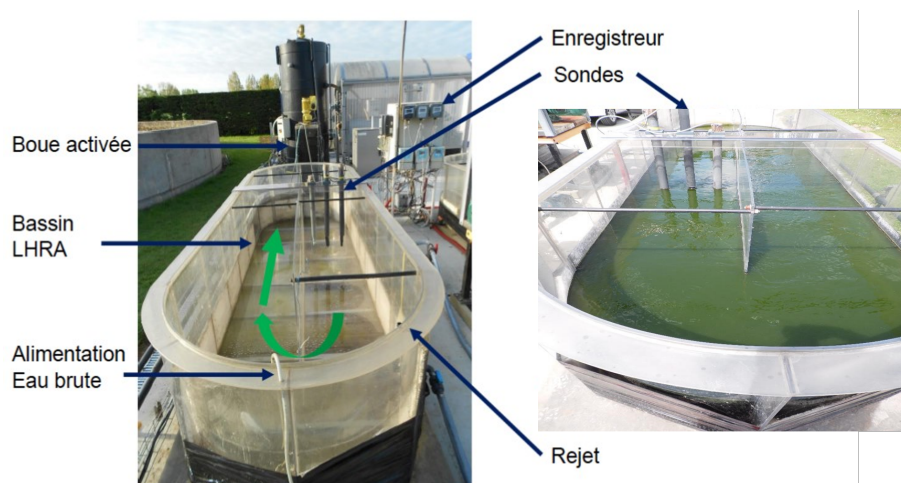


FIGURE 1.4 : Procédé pilote de culture de microalgues alimenté en continu avec des eaux usées et mis en place dans le Calvados par la direction R&D SAUR (société d'aménagement urbain et rural) dans le cadre du projet PHYCOVER [3]

année, ii) la sélection de communautés microbiennes diverses à forte capacité épuratoire, résilientes aux variabilités temporelles et productives à proximité de sites industriels et iii) la proposition de stratégies à mettre en œuvre pour dépasser les limites de la technologie à base de microalgues pour le traitement des eaux résiduaires urbaines.

Dans le cadre de ce projet collaboratif, les travaux de cette thèse ont contribué à i) tester les performances des consortia algue-algue algues-bactéries isolés du bassin LHRA [86] ii) comprendre le phénomène de démarrage du LHRA ; et iii) affiner la modélisation des phénomènes.

1.2 Importance des interactions au sein des systèmes de production de microalgues

1.2.1 Biodiversité et fonctionnement des écosystèmes microbiens

La prolifération algale (algal bloom) dans les bassins ouverts extérieurs se produit souvent naturellement comme dans tout environnement aquatique (eaux douces ou salées) présentant les conditions favorables à un assemblage d'espèces ou à un taxon unique. Même si les proliférations algales dans les milieux naturels sont souvent considérées comme étant dominées par une espèce algale, il est important de tenir compte de la dynamique de succession des différentes espèces algales durant une même prolifération, chacune étant successivement capable de devenir dominante sur un certain laps de temps [87]. Ces dynamiques impliquent des conditions très hétérogènes et en constante évolution, nécessitant la compréhension des mécanismes d'interaction entre les différents composants de l'écosystème.

En milieu naturel, la distribution et l'abondance des microalgues sont généralement déterminées par leur capacité physiologique à s'adapter à l'environnement physique et chimique [88, 89, 90, 91]. L'établissement et la persistance d'individus en succession dans les milieux nouveaux ou perturbés dépendent de leur capacité à résister aux pressions environnementales et à survivre dans les conditions abiotiques dominantes [92, 93]. La succession des espèces phytoplanctoniques est souvent expliquée par la différence au niveau de leurs constantes écophysiologiques spécifiques. La croissance instantanée dépend, quant à elle, des variables externes comme l'intensité lumineuse, la photopériode, la température, le pH, les concentrations en CO₂ et en O₂, la matière organique pour certaines espèces, les nutriments et l'état physiologique des cellules.

Les algues vivent en interaction avec de nombreux micro-organismes (e.g. les virus, les bactéries,...). Les mécanismes mis en jeu sont souvent difficiles à isoler et à comprendre.

1.2.1.1 Grands types d'interactions biotiques

Les interactions conflictuelles : Les micro-organismes naturellement présents ou ajoutés dans un milieu de croissance de microalgues d'intérêt peuvent affecter leur croissance à travers des interactions négatives, appelées aussi antagonistes, comme le parasitisme, la prédation [80], l'amensalisme, ou encore la compétition [94] (Voir Figure 1.5). Ces interactions sont négatives pour au moins un des deux associés.

Le parasitisme est une relation (positive/négative) entre deux espèces (parasite et hôte qui coexistent en association) dont l'existence de l'une est tributaire de celle de l'autre. Le parasite vit aux dépens de l'hôte qui est habituellement lésé. Cela peut comprendre un prélèvement de nourriture sur l'hôte, et/ou l'installation physique dans ou sur l'hôte. Selon l'équilibre établi entre les deux organismes, leur coexistence peut varier et passer d'une relation parasite stable à une relation pathogène qui peut être considérée comme une prédation [4].

La prédation peut se définir comme une relation (positive/négative) dans laquelle un individu, le pré-

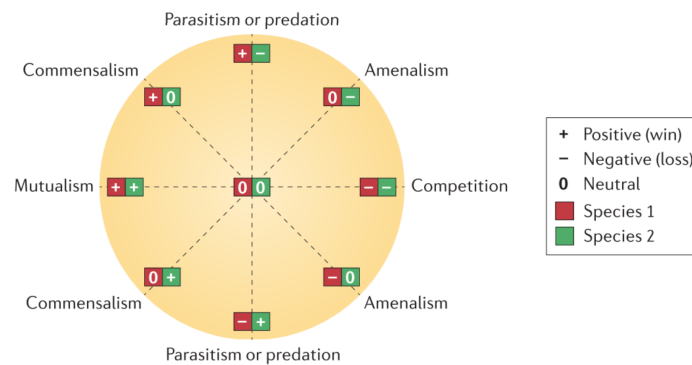


FIGURE 1.5 : Résumé des interactions écologiques possible entre membres d'espèces différentes d'après [4]. La représentation sous forme de roue a été introduite par [5] et a été adaptée pour résumer toutes les interactions possibles par paires. Pour chaque partenaire, il existe 3 résultats possibles : positif (+), négatif (-) et neutre (0).

Par exemple, pour le parasitisme, le parasite tire profit de la relation (+) tandis que l'hôte est lésé (-), cette interaction est représentée ainsi par les symboles (+/-).

dateur, se nourrit d'autres individus, les proies (ainsi bénéfique pour le prédateur et négative pour la proie).

L'amensalisme est une relation (négative/neutre) dans laquelle un partenaire est lésé, sans qu'aucun avantage ne profite à l'autre. Il s'agit d'un processus unidirectionnel, basé sur la production, par un organisme, d'un composé spécifique qui agit négativement sur un autre organisme.

La compétition interspécifique quant à elle, est une relation (négative/négative) qui représente la rivalité entre membres d'espèces différentes pour l'accès aux mêmes ressources limitées du milieu. L'espèce la plus efficace, ayant la meilleure affinité pour cette ressource, finira par éliminer l'autre selon le principe de l'exclusion compétitive valable dans un environnement constant [95].

Il existe aussi une interaction (neutre/neutre) appelée neutralisme où les deux espèces interagissent, mais sans aucun effet l'une sur l'autre. Cette dernière est souvent omise ou non développée car elle est quasiment indémontrable en pratique ; cependant elle sert de point de repère pour graduer les autres interactions qui s'en rapprochent plus ou moins.

Les interactions bénéfiques : En plus des interactions négatives, il existe des interactions mutualistes (ou positives) bénéfiques pour au moins un des deux partenaires : mutualisme et commensalisme (voir la Figure 1.5). Si chacun des micro-organismes tire des bénéfices, l'interaction est dite de type mutualisme (positive/positive), tandis que, si l'association est profitable pour l'un d'eux, il s'agit de commensalisme (positive/neutre). Cette interaction est souvent rencontrée dans le cas de biodégradation, dans laquelle l'organisme commensal se nourrit de composés qui sont produits par d'autres membres de la communauté. Ainsi l'interaction est bénéfique pour une des deux espèces tandis que l'autre n'en tire aucun avantage mais aucun inconvénient non plus. La facilitation comprend des in-

teractions mutualistes, commensales et antagonistes [96]

1.2.1.2 Diversité, productivité et stabilité : relations et mécanismes

Dans un milieu ouvert de production de microalgues, certaines espèces indésirables vont inévitablement être introduites avec le temps et envahir le système de culture. Ces contaminants biologiques peuvent affecter significativement l'efficacité d'utilisation des nutriments, la production de la biomasse algale dans le système [97] ainsi que sa stabilité [98].

La stabilité écologique, telle que décrite dans la littérature, est définie comme étant (i) la capacité de rester inchangé (i.e. la constance ou persistance sur de longues périodes) ou ii) la capacité de revenir à l'état de référence après une perturbation (i.e. résilience) [99].

Les cultures extérieures sont confrontées à un compromis entre une productivité maximale et une stabilité production de biomasse algale [98]. Elles représentent un écosystème complexe composé d'assemblages d'espèces qui interagissent entre elles par le parasitisme, prédation, la compétition, la facilitation, etc. Le parasitisme par les virus est bien connu pour jouer un rôle crucial dans le contrôle de la prolifération des microalgues [100, 101]. La prédation peut réduire la concentration des microalgues jusqu'à 90 % en 2 à 5 jours [102, 97]. Une contamination avec un groupe de prédateurs (rotifères) peut nuire à la croissance jusqu'à anéantir les cultures, tandis que l'installation de microalgues étrangères ou de bactéries compétitrices sur la ressource est extrêmement difficile à éradiquer [103] et peut réduire le rendement des microalgues jusqu'à 10 fois [104]. De plus, la compétition pour les nutriments et l'allélopathie¹¹ peuvent altérer considérablement la quantité et la qualité de la biomasse produite [105].

La théorie suggère que les relations positives entre la biodiversité et le fonctionnement des écosystèmes (e.g. stabilité, productivité) [106, 25, 107]. Théoriquement, ces relations peuvent découler de deux mécanismes principaux : la facilitation ou la complémentarité de niches écologiques différentes ; il est souvent difficile de savoir quel mécanisme prévaut [107].

La facilitation désigne toute interaction où l'action d'un individu a un effet bénéfique sur un autre. Cela inclut donc les interactions mutualistes, commensales et antagonistes [96]. Une interaction dite de type facilitation si la présence d'une espèce bénéficie, via la création de conditions favorables, à l'installation, la vie ou la survie d'autres espèces. Celles-ci, étant plus exigeantes, ne sont pas capables de s'installer directement ou se développer correctement, sans ces modifications. Une facilitation écologique peut être accomplie à travers des espèces facilitatrices pouvant être caractérisées par un effet refuge/abri contre le stress (environnement, prédation, concurrence), une disponibilité accrue des ressources, ou bien des effets atténuateurs ou stabilisateurs face aux perturbations ou stress environnementaux [108, 109, 96].

¹¹un phénomène biologique qui représente l'ensemble des interactions biochimiques pouvant s'établir entre deux ou plusieurs organismes.

La complémentarité des niches se produit lorsque les espèces diffèrent dans leurs modes d'utilisation des ressources et peuvent augmenter leur vitesse de croissance et d'assimilation des nutriments. Avoir des espèces qui diffèrent dans leurs besoins en ressources, entraîne une compétition interspécifique plus faible pouvant conduire à l'utilisation des ressources par des communautés plus spécifiques [110]. Deux microalgues avec des niches écologiques différentes n'auront pas les mêmes besoins nutritionnels, les mêmes sensibilités ou les mêmes localisations dans la colonne d'eau, ce qui peut favoriser leur coexistence. Les changements dus à l'hétérogénéité spatiale et temporelle des ressources peuvent créer de multiples niches pour les espèces présentant différentes conditions optimales. Il est important de noter que les conditions environnementales peuvent influencer cette complémentarité et aussi la structuration des communautés.

La stabilité des écosystèmes peut être améliorée avec la fluctuation de l'environnement si les espèces présentes peuvent réagir différemment vis-à-vis de cet environnement (grâce à des tolérances différentes) [106, 25]. Autrement dit, le fait d'avoir une gamme d'espèces qui réagissent différemment aux différentes perturbations environnementales peut stabiliser la productivité en réponse aux perturbations et aux variations des conditions abiotiques. Les caractéristiques fonctionnelles des espèces influencent fortement les propriétés des écosystèmes. Les espèces présentes et le rôle qu'elles jouent dans l'écosystème sont donc importants pour déterminer à la fois la stabilité et la productivité de l'écosystème [111, 112, 113]. Ainsi, l'identification de quelles espèces et combien d'espèces agissent de manière complémentaire dans des communautés complexes présentes en systèmes extérieurs ouverts de production algale serait nécessaire pour assurer le fonctionnement d'un tel écosystème.

1.2.2 Potentiel des associations entre espèces microalgales dans les cultures intensives

L'importance de la facilitation et de la complémentarité des niches sur les relations diversité-productivité dans les communautés de microalgues, déjà documentées dans les écosystèmes naturels [114, 107], suggère que ces mêmes mécanismes pourraient expliquer le développement de communautés algales plus productives et stables, efficaces pour éliminer des contaminants et résistance aux pressions prédatrices lorsqu'elles seront cultivées en milieu extérieur.

Des études récentes ont montré des relations positives entre la diversité des microalgues et leur efficacité dans l'utilisation de la ressource (phosphate, nitrate) pour des communautés d'eau douce et saumâtre [114, 115]. La grande variété des modes de nutrition des microalgues leur permettant d'acquérir différentes sources de carbone ou de substances minérales, les aide à augmenter les opportunités de niche dans des environnements fluctuants [115, 76]. Selon l'espèce, leur physiologie, leur taille et les conditions biotiques et abiotiques de croissance, les microalgues peuvent utiliser des formes diverses d'azote voire même des substances organiques particulières pour leur croissance [116, 117].

Des polycultures qui combinent efficacement des espèces avec des capacités métaboliques différentes (e.g. incorporation de différentes formes d'azote, de carbone, dégradation des contaminants), pour-

raient améliorer la capacité globale de dépollution lorsqu'elles sont nourries avec des ressources multiples (cf. [16]). Une étude a montré que l'efficacité d'élimination du cadmium toxique augmentait avec la richesse spécifique des communautés algales (chlorophycées) [118]. En outre, des assemblages d'espèces algales (assemblage d'espèces mixotrophes [119], de cyanobactéries [120], ou de diatomées et chlorophycées [121, 122], nourries avec des eaux contaminées, ont été cultivées avec succès; ces assemblages ont permis d'éliminer la quasi-totalité des contaminants, produire des lipides utilisables comme biodiesel, et encore résister aux pressions environnementales et prédatrices [123, 85]. Ces polycultures montraient une meilleure efficacité de production et de dépollution que celle issue de culture monospécifique [124, 125, 126, 127, 128].

De la même manière, l'utilisation de microalgues appartenant à différents groupes (i.e. algues vertes, cyanobactéries et diatomées) augmentait non seulement l'efficacité d'utilisation de la lumière [113, 129], mais également le rendement en lipides [130]. Étant donné que la disponibilité spatiale et temporelle de la lumière peut être assez hétérogène, même dans des systèmes ouverts homogènes [131], la variété de pigments photosynthétiques chez les communautés de microalgues pourrait exploiter plus efficacement l'apport de lumière disponible à différentes longueurs d'onde [132] voire résister à une forte photoinhibition [129].

L'efficacité d'utilisation des ressources nutritives ou lumineuses peut donc jouer un rôle moteur et promouvoir des interactions positives de type facilitation entre des espèces algales différentes. Bien que les microalgues soient en compétition pour les nutriments et la lumière, ces études indiquent que la complémentarité de l'utilisation de ces ressources est un mécanisme clé des relations positives au sein d'espèces algales. Lorsque plusieurs espèces sont en compétition pour une de ces ressources, une espèce qui ne peut pas s'établir en raison de la photoinhibition ou la toxicité de certains polluants (e.g. le cadmium, l'azote ammoniacal ou autre toxique), pourrait être facilitée par d'autres espèces moins sensibles aux facteurs de stress.

1.2.3 Interactions entre microalgues et bactéries : multiples, complexes et difficiles à élucider

Les assemblages entre microalgues et bactéries que l'on croyait nuisibles à la croissance des microalgues, ont fait l'objet de nombreuses recherches (voir les revues [83, 133]). Plusieurs études montrent que les bactéries hétérotrophes, consommateurs majoritaires de ce carbone organique, jouent un rôle omniprésent dans la croissance des micro-algues par des mécanismes de communications complexes et d'échanges de nutriments; réciproquement les microalgues influencent également la croissance des bactéries.

Une amélioration de la croissance des microalgues est possible via l'échange de métabolites ou de macronutriments (vitamine, carbone, azote, phosphore, etc.) [134, 135, 136, 137, 84, 138], la réduction de stress [139], ou encore via l'exclusion d'agents compétiteurs ou pathogènes opportunistes potentiels [140, 141].

Un exemple typique d'une relation mutualiste entre les microalgues et les bactéries serait de considérer que les microalgues utilisent le CO₂ par la photosynthèse pour générer de l'O₂, qui pourrait être utilisé par les bactéries hétérotrophes pour assimiler et dégrader le carbone, l'azote et le phosphore à l'état organique. En outre, le CO₂, l'azote inorganique et le phosphore libérés après le métabolisme aérobie des bactéries pourraient être utilisés comme nutriments par les microalgues pour la photosynthèse ultérieure [82, 83]. Un autre exemple de mutualisme est possible quand le carbone fixé par la photosynthèse est fourni par les microalgues par exsudation pour subvenir aux besoins des bactéries qui, à leur tour, produisent de la vitamine (B12)¹² [23, 142, 20, 143], ou encore des sidérophores¹³ [144].

Les interactions microalgues-bactéries sont généralement classées comme des interactions de type mutualisme/commensalisme (e.g. [141, 137]) ou encore de type facilitation (e.g. [145, 139]). Par ailleurs, il peut s'établir également des relations négatives; la présence d'espèces bactériennes peut inhiber ou ralentir la croissance des micro-algues et impacter grandement la production algale [146].

La plupart des interactions sont difficiles à identifier et étudier en raison de la forte association entre certains micro-organismes. Les deux partenaires peuvent être naturellement liés l'un à l'autre ce qui rend difficile la mise en oeuvre de leur dissociation [83]. De plus, il n'est pas toujours possible de catégoriser de façon stricte les interactions en pratique au sein de polycultures naturelles ou synthétiques en raison de leur complexité, multiplicité et dépendance vis-à-vis des variations du milieu et des paramètres environnementaux [147, 83]. Par exemple, les relations de compétition peuvent s'établir entre les bactéries et les microalgues vis-à-vis des éléments nutritifs communs présents dans leur environnement [148, 149], notamment dans les milieux pauvres en nutriments. Dans les mêmes conditions, les interactions peuvent évoluer au cours du temps. L'hypothèse d'exsudation algale de matières organiques sous des conditions de stress nutritifs (e.g. milieu carencé en C, N et P), conduit à une situation paradoxale où les micro-organismes photosynthétiques stimulent leurs compétiteurs hétérotrophes sur les ressources minérales [150, 151, 56, 152]. Sous cette situation, l'interaction est considérée comme commensalisme [151]; mais elle peut aussi basculer en mutualisme [153, 154] ou en parasitisme. Se trouvant en association étroite avec les microalgues ce qui implique le partage d'éléments essentiels tels que l'azote ou le phosphore, les bactéries peuvent jouer un rôle important sur la production algale. Par exemple, des microalgues limitées en phosphore perdent leur pouvoir compétitif vis-à-vis de cette ressource, ce qui permet aux bactéries commensales d'être plus nombreuses et de prendre le dessus sur les microalgues [83].

La compréhension des interactions algue-bactérie est nécessaire pour le contrôle de la production algale et la proposition de bonnes pratiques de culture pour éliminer les contaminations inévitables en culture ouverte [102]. L'interaction des bactéries avec les microalgues peut être plus importante dans des milieux limités en matière organique ou lorsque les bactéries ont des préférences pour les

¹²un cofacteur de croissance pour certaines microalgues.

¹³des petites molécules qui se lient avec beaucoup d'efficacité aux atomes de fer et permettent au microalgues de les capturer.

exsudats des microalgues s'ils sont plus faciles à dégrader par rapport à d'autres molécules plus complexes présentes dans leurs milieux. Les microalgues peuvent favoriser les bactéries à leur détriment ou générer des associations écologiques stables à travers des relations positives.

La disponibilité des ressources peut donc promouvoir des interactions négatives ou positives entre ces deux communautés et impacter les équilibres entre les deux populations dans les écosystèmes naturels aussi bien qu'en milieu artificiel (cultures en bassins). Bien que les microalgues soient en compétition avec les bactéries sur les ressources minérales, et favorisent ses compétiteurs via l'exsudation de la matière organique, il existerait des conditions sur la vitesse d'apport en nutriments qui pourraient expliquer leur coexistence classiquement observée dans des bassins extérieurs et dans le milieu naturel.

1.2.4 Interactions possibles entre les consortia microbiens naturels dans la lagune expérimentale du projet PHYCOVER

L'observation des variations microbiologiques (comme les communautés algales et bactériennes, les prédateurs) qui se développent dans des dispositifs expérimentaux en milieu extérieur (expériences in situ) permet de proposer des hypothèses quant aux interactions mises en jeu entre ces organismes en fonction de la variation des conditions environnementales (comme la lumière, la température, les nutriments).

Nous rappelons que dans le cadre du projet PHYCOVER, la prolifération des microalgues dans les bassins expérimentaux LHRA s'est produite naturellement sans aucune inoculation. La figure 1.6 montre les dynamiques microbiologiques observées dans le bassin LHRA d'Argences (Calvados). Ces résultats rapportés dans une étude récente [6] montrent une succession de deux espèces dominantes de chlorophycées classiquement observées dans des bassins utilisés pour le traitement des eaux usées, avec un développement initial de *Chlorella sp.* puis de *Scenedesmus sp.*. Cette succession observée pourrait s'expliquer par une facilitation écologique vis-à-vis de la fluctuation des ressources nutritives ou la disponibilité de la lumière. La variation de ces ressources essentielles peut favoriser de manière différente la croissance de ces deux espèces. En effet, il semblerait, d'après une comparaison de ces dynamiques par rapport aux teneurs en azote dans le bassin (présent principalement sous la forme ammonium), que *Chlorella sp.* assimilerait les fortes concentrations en ammonium du milieu rendant possible la croissance de *Scenedesmus sp.* plus efficace pour les faibles concentrations en ammonium. La même hypothèse pourrait également être reformulée en fonction de l'évolution de la lumière disponible dans le bassin.

La modélisation mathématique est un outil important pour la compréhension et la prédiction. Les modèles sont utilisés pour définir des stratégies de production optimales de biomasse ou de molécules à haute valeur ajoutée [155]. Par exemple, la stratégie de bio-cotrole par bio-augmentation¹⁴ a été proposée dans [7] et peut se traduire par une facilitation écologique entre deux espèces qui ont

¹⁴introduction de plus de cultures bactériennes pour améliorer la dégradation des contaminants.

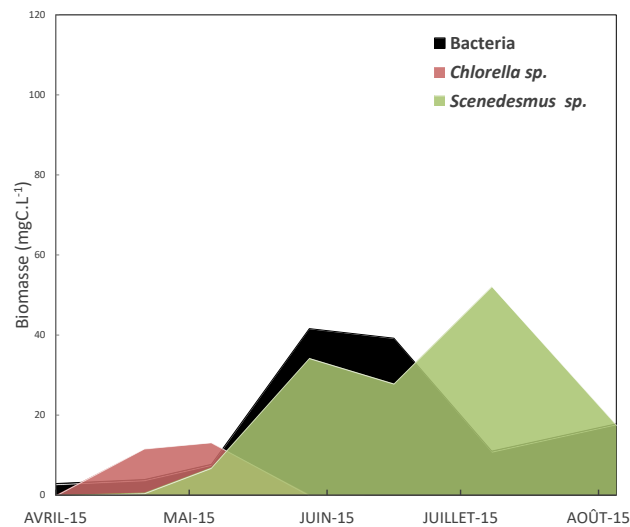


FIGURE 1.6 : Biomasse en carbone des bactéries et des microalgues *Chlorella sp.* et *Scenedesmus sp.* dans le bassin LHRA du nord (Argences) au cours de la période d'étude d'après [6].

des cinétiques de croissance différentes vis-à-vis de la ressource commune utilisée (voir Figure 1.7 de gauche). Ce type d'interaction, jouant un rôle très important en écologie, confère à une espèce d'intérêt (micro-organisme 2) la possibilité de s'installer dans un système à environnement fortement contraint à sa croissance (comme dans le cas de présence d'un substrat inhibant) et ce grâce à la présence d'une autre espèce (micro-organisme 1) (voir la Figure 1.7 de droite). Ce principe de faci-

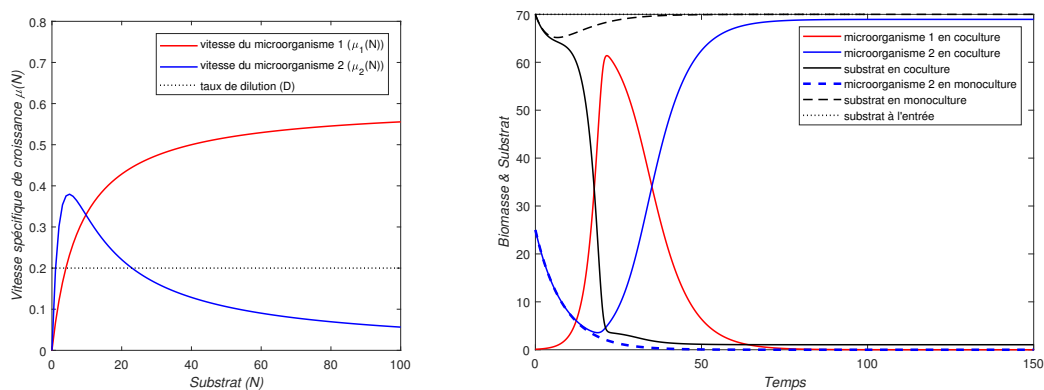


FIGURE 1.7 : Résultats de simulations qualitatives d'une action positive du microorganisme 1 (rouge) sur le microorganisme 2 (bleu) en croissance sur un substrat commun (noir) d'après le modèle de compétition proposé dans [7].

Figure de gauche : Vitesses spécifiques des deux micro-organismes et taux de dilution appliqué au bioréacteur.

Figure de droite : Comparaison de la biomasse du microorganisme 2 et du substrat résiduel obtenus en monoculture (traits discontinus) et en coculture (en présence du microorganisme 1) (traits continus).

litation a été démontré de façon purement théorique dans [7] par extension du principe d'exclusion compétitive, mais n'a jamais été validé expérimentalement auparavant. Il semblerait, que ce modèle de compétition permettrait de reproduire qualitativement les comportements observés en bassins ouverts où la dynamique de *Chlorella sp.* est comparable au micro-organisme 1 et *Scenedesmus sp.* au micro-organisme 2 (voir Figure 1.6 et Figure 1.7 de droite).

Par ailleurs, la présence d'un consortia bactérien a également été observée dans les bassins [6]. La Figure 1.6 montre une relation de coexistence entre les microalgues et les bactéries. Ces communautés bactério-planctoniques sont supposées être en interaction avec les micro-algues présentes à travers des relations de mutualisme (ex : production de composés vitaux, dégradation de substances toxiques), de commensalisme (à travers les exsudats des algues utilisés par les bactéries) ou de compétition (notamment pour la ressource minérale limitante).

Toutes ces questions auront des conséquences importantes sur la performance du procédé d'épuration et la proposition de stratégie pour remédier à l'instabilité du système. Pour y répondre, il est nécessaire d'isoler les micro-organismes présents pour tester leur performance sous différentes conditions et évaluer le rôle de chacun à l'aide des approches expérimentales. L'approche de modélisation, quant à elle, représente un atout pour prototyper efficacement des expériences, valider les mécanismes mis en jeu et déterminer les conditions expérimentales optimales. Les modèles développés pour des co-cultures permettent également d'identifier les associations les plus prometteuses [156] et de définir des stratégies de production optimales de biomasse ou de molécules à haute valeur ajoutée [155].

1.3 Modèles et concepts sur les procédés de production algale

1.3.1 Modélisation prédictive, optimisation et contrôle : étapes clés à intérêt théorique et applicatif

La modélisation, l'analyse, la simulation, l'optimisation et la commande sont cinq étapes, qui sont aussi riches en contenu mathématique qu'en applications. L'utilisation de la modélisation mathématique en écologie théorique s'est montrée très utile pour comprendre et prédire l'évolution du phytoplancton en milieu naturel, mais aussi les processus clés du fonctionnement des écosystèmes naturels [157, 158]. Dans un contexte industriel, les approches de modélisation offrent des moyens intéressants pour maîtriser le processus algal, selon les leviers d'action disponibles (débits, éclairage, composition en entrée des bioréacteurs...) [159], ce qui est d'une grande importance dans l'industrialisation de la production microalgale.

La **modélisation** consiste en la construction d'une « représentation mathématique » décrivant la dynamique du phénomène auquel on s'intéresse. La nature des termes mathématiques représente un choix de modélisation. La représentation mathématique du phénomène biologique observé (i.e. modèle) et l'étude de ses propriétés (i.e. l' **analyse du modèle**) permettent d'appréhender le phénomène, ainsi que confronter les résultats mathématiques avec l'expérience et identifier les limites de la modélisa-

tion. Cette représentation est synthétique et souvent partielle car un modèle ne reflète qu'une partie de la réalité mais permet, en réduisant sa complexité, de mieux l'appréhender et de rechercher comment l'optimiser. La pertinence et la validité d'un modèle, seront ainsi assurées par des allers-retours entre la modélisation et l'expérimentation. Autrement dit, à travers la confrontation du modèle avec des données réelles obtenues avec des outils d'expérimentation qui sont plus à même d'être utilisées pour valider le modèle explicatif. L'élaboration d'un modèle mathématique est donc une opération délicate, car elle se heurte au principe de rationalité limitée. Pour parvenir à un ensemble complet de connaissances et logiquement consistantes, le modèle doit synthétiser et résumer les caractéristiques les plus appropriées des phénomènes tout en satisfaisant l'exactitude et la clarté d'exposition en limitant la complexité mathématique afin de pouvoir l'analyser. Malgré le caractère réducteur du modèle mathématique, l'apport scientifique qu'il procure est considérable ; non seulement il permet d'établir un cadre théorique (essentiel à toute démarche scientifique) mais également d'explorer des configurations qui, en pratique, pourraient s'avérer difficiles à étudier. En effet, certaines de ces configurations peuvent être impossibles à recréer expérimentalement. Devant les limites de l'expérimentation qui pourrait s'avérer coûteuse en matière de moyens et de temps compte tenu de l'impossibilité de tester toutes les combinaisons de conditions possibles, la possibilité de « résoudre/simuler » les modèles mathématiques avec des méthodes adaptées (i.e. *simulation numérique*) offre un outil intéressant de prédiction, aussi nécessaire pour l'estimation, l'optimisation et le contrôle des cultures sous différentes conditions.

La *théorie de commande* des systèmes dynamiques, quant à elle, consiste en la prise en main du phénomène par l'étude de la possibilité de contrôler le système pour l'amener, de son état actuel, vers un autre état « désiré ». Elle permet de proposer des chemins d'exploitation et des stratégies de régulation robustes des systèmes de production qui peuvent également maximiser (ou minimiser) un certain critère associé au modèle (e.g. la maximisation de la biomasse ou la minimisation de la concentration des contaminants). On parle de *commande optimale* dans le cas où la commande est recherchée pour optimiser un certain critère.

Cette thèse se situe dans la modélisation, un peu dans l'analyse et la simulation. Nous aurons affaire à des modèles mathématiques issus de systèmes de cultures biologiques « bioréacteurs », décrits par des équations différentielles ordinaires. Ces outils mathématiques permettent de comprendre la structure et le comportement de tels systèmes ainsi et d'explorer leurs caractéristiques.

1.3.2 Modélisation d'un système biologique

1.3.2.1 Trois modes de fonctionnement

La culture des microalgues présente des similarités avec celle d'autres micro-organismes tels que les bactéries ; leurs cultures se font dans des réacteurs biologiques. La particularité de la culture de microalgues réside dans leur besoin en énergie lumineuse suffisante pour assurer l'activité photosynthétique. Les microalgues sont majoritairement cultivées dans deux types de systèmes : les systèmes

fermés appelés photobioréacteurs et les systèmes ouverts. Un réacteur biologique ou photobioréacteur (si exposé à une source de lumière), consiste en une enceinte dans laquelle on met en contact des micro-organismes avec les ressources nécessaires à leur croissance et où on maintient les conditions appropriées pour leur croissance.

Le fonctionnement d'un réacteur biologique est caractérisé par les débits d'entrée et de sortie, les paramètres physiques de fonctionnement du réacteur, son ensemencement, les caractéristiques de l'alimentation et le degré de mélange. En ce qui concerne les débits d'entrée et sortie (Q_{in} , Q_{out}), ils permettent de définir les trois types les plus courants de réacteurs qui sont : le réacteur en mode « Batch » ($Q_{out}(t) = Q_{in}(t) = 0$), le réacteur en mode semi-continu ou « Fed-Batch » ($Q_{out}(t) = 0$ et $Q_{in}(t) \neq 0$), et le réacteur à flux continu appelé aussi Chémostat ou « CSTR » (Continuous Stirred Tank Reactor) ($Q_{in}(t) = Q_{out}(t) \neq 0$) comme illustré sur la Figure 1.8.

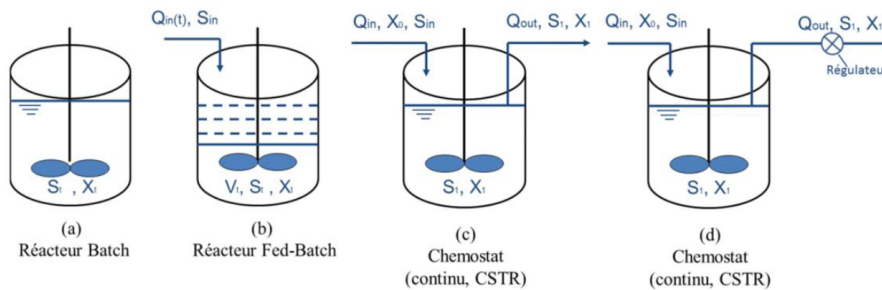


FIGURE 1.8 : Schéma de classification des réacteurs homogènes par les débits d'entrée et de sortie

Le mode batch est le plus simple à mettre en place. La culture dans ce type de réacteur consiste en l'ajout de nutriments lors de l'inoculation des micro-organismes. Les nutriments sont consommés et la lumière s'atténue progressivement alors que la biomasse s'accumule dans le milieu. Du point de vue industriel, une culture fermée limite les risques de la contamination. Cependant, un apport initial d'une grande quantité de substrat peut inhiber la croissance des micro-organismes, ce qui peut limiter rapidement la durée du processus et la performance du système.

Le Fed-batch est moins utilisé pour décrire la croissance des micro-organismes. Ce mode de culture permet d'optimiser la productivité de biomasse et d'éviter les effets de limitation et d'inhibition par les nutriments mais sa modélisation nécessite de tenir compte de la variable supplémentaire sur le volume qui est variable au cours du temps puisque le réacteur est rempli progressivement. À partir d'un volume initial préalablement ensemencé, le réacteur est alimenté par un débit contrôlé en boucle fermée. De plus, c'est ce dernier point qui limite fortement l'utilisation du fedbatch à l'échelle industrielle. Enfin, ce mode de fonctionnement, tout comme le précédent, est plus particulièrement recommandé lorsque la récupération des produits est effectuée à intervalles ou lorsqu'il est dangereux de libérer des matières toxiques résiduelles (ce qui peut se produire en mode continu).

Le mode continu (Chémostat) est plus précis pour la caractérisation de la croissance car conçu pour fonctionner en régime d'équilibre constant, mais il est plus difficile à opérer. Ce type de bioréacteur

permet également d'ajuster facilement les paramètres de culture tels que la température, le pH et la concentration du substrat et les étudier à des taux de croissance spécifique choisis. Les cultures en mode continu sont caractérisées par un volume constant (la vitesse du flux entrant est égale à la vitesse du flux sortant). Le flux traversant le réacteur est caractérisé par le taux de dilution qui est équivalent à l'inverse du temps de séjour hydraulique. À l'état stationnaire (i.e. équilibre), les micro-organismes présents se développent à une vitesse égale au taux de dilution (pour des conditions d'alimentation fixe), ce qui correspond à une production constante en biomasse dans la phase exponentielle de la croissance cellulaire. Ainsi, il est possible de fixer le taux de croissance spécifique d'une culture à plusieurs valeurs, en ajustant le taux de dilution de la culture. De plus, il représente le mode de fonctionnement le plus riche d'un point de vue dynamique, car il permet d'étudier des phénomènes transitoires sur de longues périodes de croissance. C'est également le mode le plus utilisé dans le domaine du traitement biologique de l'eau car il nécessite des volumes plus petits que les bacs de décantation, et donc des temps de séjour plus courts.

Les systèmes ouverts (ou bassins ouverts) peuvent être considérés comme des réacteurs biologiques qui subissent des contraintes extérieures liées aux conditions climatiques et des contaminations biologiques. Les bassins ouverts peu profonds (i.e. lagunage à haut rendement algal LHRA) favorisent la prolifération des microalgues notamment en présence des facteurs favorables à leur croissance. Ces systèmes de culture bénéficient de l'énergie solaire, du gaz carbonique CO_2 et des nutriments qui peuvent provenir de ressources locales disponibles (comme les eaux usées, fumées industrielles) pour une production en masse. Ces systèmes de culture ont été développés pour la première fois à la fin des années 1950 pour le traitement des eaux usées et la récupération des ressources [160]. Leur utilisation a gagné en importance au cours de ces décennies car ils se sont généralement bien comportés en matière de traitement des eaux usées et présentent aussi l'avantage supplémentaire d'abattre les éléments nutritifs des eaux usées tout en favorisant le développement d'une biomasse algale/bactérienne valorisable pour divers usages industriels. Ces systèmes peuvent fonctionner en mode batch, continu (chémostat) ou encore Fed-batch avec une récolte de la biomasse (par flottation ou par filtration) et un renouvellement du milieu de culture.

Les systèmes LHRA représentent un excellent système-modèle pour comprendre les dynamiques au sein des communautés et décrire les processus écologiques des assemblages microbiens [85].

Le suivi de ces systèmes constitue un outil intéressant pour isoler des souches naturelles de microalgues d'intérêt industriel. Ces souches peuvent présenter de meilleures performances et robustesse en matière de coût, de productivité et de durabilité comparées aux souches modifiées par manipulation génétique [161, 162] ou autres espèces introduites qui se révèlent être plus sensibles au climat et aux espèces locales contaminantes [163, 164, 161].

Pour tester et valider des hypothèses quant au fonctionnement de ces systèmes biologiques complexe et de même que pour étudier la dynamique des micro-organismes présents, la culture en laboratoire (sous des conditions contrôlées) de souches isolées de ces systèmes s'avère nécessaire. Des expériences dans les réacteurs en mode batch et notamment en mode continu « chémostat » se révèlent

deux outils complémentaires d'investigation de la croissance sous différents facteurs, et la robustesse des souches lorsqu'elles sont cultivées seules ou en assemblage.

1.3.2.2 Modèle mathématique du chimostat : quelques notions et principes

Toutes les configurations, présentées plus haut, peuvent être décrites par des équations différentielles ordinaires sous l'hypothèse de milieux homogènes (cf. [165]). Ces modèles sont généralement calibrés à l'aide d'expériences à l'échelle du laboratoire et parfois à plus grande échelle pour des applications biotechnologiques [166, 167, 168].

Nous donnons ici l'exemple du modèle du chimostat qui a été inventé indépendamment par Jacques Monod [169] et par Aaron Novick et Leo Szilard [170] dans les années 50. La formulation générale de ce modèle est obtenue en faisant le bilan des termes faisant varier chacune des grandeurs d'intérêt au cours du temps pour tenir compte de la variation des concentrations en substrat s (nutriment) et en biomasse x (micro-organismes). La formulation est formée d'un ensemble d'équations différentielles non linéaires qui sont obtenues à partir des équations dynamiques du bilan de matière sur le bioréacteur entre les instants t et $t + dt$ des composés substrat de concentration $s(t)$ et biomasse de concentration $x(t)$ à l'instant t . Elle est donnée par le système suivant

$$\begin{cases} \dot{x} &= \mu(\cdot)x - \frac{Q_{in}}{V}x \\ \dot{s} &= -\frac{\mu(\cdot)}{Y}x + \frac{Q_{in}}{V}(S_{in} - s) \end{cases} \quad (1.1)$$

où $\dot{x}$ et $\dot{s}$ désignent les dérivées au cours du temps, S_{in} est la concentration du substrat à l'entrée, Y est le rendement de conversion et $\mu(\cdot)$ est le taux de croissance spécifique des micro-organismes. On introduit couramment le changement de variable $D = \frac{Q_{in}}{V}$, où D est le taux de dilution. Il est à noter que $D = \frac{1}{\tau}$ est homogène à un temps : c'est le « temps de séjour hydraulique » qui définit le temps moyen de résidence d'une molécule dans le réacteur.

L'équation $\dot{x}$ dans (1.1) est commune à tout modèle de cultures bien mélangée. Des équations différentielles supplémentaires peuvent être couplées à $\dot{x}$ (e.g. $\dot{s}$ dans le cas du chimostat limité par un substrat) en fonction des facteurs déterminant le taux de croissance.

En général, le modèle du chimostat constitue le point de départ pour tester différentes hypothèses de mécanismes sous-jacents sur l'écologie des populations (compétition, symbiose, complémentarité, effet refuge, densité ou ratio dépendance) (cf. [27, 7, 28]), donnant lieu à des modèles biologiques plus réalistes. Lorsque plusieurs espèces sont présentes dans un chimostat, elles sont généralement en compétition pour une ressource limitante nécessaire à leur croissance. Si le milieu est homogène, et alimenté avec un débit constant apportant la ressource, la théorie mathématique affirme le paradigme du **principe d'exclusion compétitive**, et que c'est l'espèce ayant la meilleure affinité pour cette ressource qui l'emportera [95, 171, 172]. Toutefois, ce principe n'est pas toujours vérifié dans la nature. Un certain nombre d'hypothèses a été avancé en proposant des mécanismes permettant d'expliquer la

coexistence des espèces comme la variation temporelle ou la périodicité de la vitesse de l'apport de la ressource limitante ou de sa concentration/intensité [173, 174, 173, 175], la densité-dépendance de la vitesse de croissance [176, 28], la considération de plusieurs ressources limitantes [177], etc.). Il est important de noter que les résultats théoriques d'exclusion ou de coexistence peuvent dépendre des propriétés de la fonction de croissance suivie par les micro-organismes pour se multiplier dans leur milieu [176, 28]. Il est à noter que les possibilités offertes par la théorie sont rarement confrontées aux données réelles ou appliquées sur des espèces identifiées, ce qui soulève plusieurs questionnements notamment lors du choix d'un modèle.

1.3.2.3 Enjeux de la caractérisation mathématique de la croissance microbienne et du choix du degré de complexité d'un modèle

L'étude des interactions d'une population avec son environnement est l'objet d'intenses recherches depuis de nombreuses années aussi bien en écologie théorique qu'en microbiologie. La description de ce processus soulève plusieurs questions notamment sur la dépendance de la vitesse de croissance des organismes [178], utilisée dans les modèles mathématiques. De même, un des enjeux de la modélisation des bioprocédés est la caractérisation du taux de croissance des micro-organismes. En effet, les processus biologiques sont connus par leur complexité impliquant des organismes vivants dont les caractéristiques sont très difficiles à appréhender. Nous nous plaçons dans cette thèse à l'échelle des populations de micro-organismes, et non à l'échelle des individus microbiens, qui peut présenter plus de variabilité. Cependant, même à cette échelle macroscopique, la modélisation de ces systèmes se heurte à plusieurs difficultés comme l'imprécision des mesures, le problème de reproductibilité des expériences et l'adaptation des organismes à long terme et le choix et la validation de la structure du modèle à considérer. La caractérisation de la vitesse de croissance est importante à la fois pour l'estimation et l'optimisation des paramètres de production et pour le contrôle des conditions du processus. Du point de vue de la commande, ces outils de prédiction présentent une base pour le développement d'*observateurs* (permettant de reconstruire au cours du temps les variables non mesurées) et la mise en place de stratégies de commande de bioprocédés ([179, 180]).

La plupart des études considèrent un suivi de la croissance microbienne dans des réacteurs parfaitement mélangés qui sont décrits par des équations différentielles ordinaires faisant intervenir les fonctions de croissance $\mu(\cdot)$ (comme dans (1.1)). Souvent, les lois mettent en évidence deux grandes classes de taux de croissance bactérienne selon qu'elles font intervenir uniquement la densité de substrat (e.g. [181]) ou qu'elles font intervenir non seulement cette densité mais également la densité de la biomasse (e.g. [182]). Dans une revue précédente, les propriétés de ces deux catégories de modèles ont été étudiées dans le cadre du modèle classique du chimostat [183]. La théorie du chimostat prédit notamment qu'en cas de croissance substrat dépendante, la concentration en substrat à l'équilibre ne dépend que du taux de dilution alors qu'en cas de densité dépendance, le rapport des densités de substrat et de biomasse à l'équilibre devrait rester constant. La modélisation des données expérimentales provenant d'un écosystème microbien complexe, couplée à une analyse fine des mesures

réalisées dans le cadre des suivis des dispositifs expérimentaux ont permis de conclure que lorsque la concentration en substrat est faible et que la structure des communautés bactériennes est simple, les bactéries ne se gênent pas et c'est une relation substrat dépendante qui est plus à même d'expliquer les données. En revanche, lorsque la concentration de la biomasse est suffisamment élevée ou qu'elle se structure en floccs, la croissance densité-dépendante permet une meilleure interprétation des données. Une nouvelle famille paramétrée de fonctions de croissance a été proposée à cet effet et réconcilie à la fois les modèles de Monod et de Contois avec un seul paramètre supplémentaire dans la fonction de croissance permettant de mesurer la force de la densité-dépendance dans chaque cas d'expérience (voir l' [Annexe A](#) pour plus de détails sur l'étude).

Les mêmes effets vis-à-vis du substrat ou de la densité peuvent se retrouver chez les microalgues qui peuvent aussi subir la limitation de ressources (lumière ou nutriments), s'agréger sous forme de floccs au cours de leur croissance, ou encore dépendre des effets d'auto-ombrage à fortes densités cellulaires.

La modélisation d'un système de culture de microalgues repose généralement sur des lois de croissance empiriques développées pour les microorganismes microbiens de manière générale ou pour les microalgues de manière plus spécifique. Ces fonctions permettent généralement de tenir compte des réactions au sein de la population algale avec les éléments chimiques présents dans leur milieu de culture (dioxyde de carbone, azote, phosphore, etc.) et de l'influence des conditions environnementales (lumière, température, etc.). Dans la littérature, on trouve un grand nombre de structures d'expression de cinétiques plus ou moins complexes qui ont été proposées pour décrire la vitesse de croissance $\mu(\cdot)$ en fonction des paramètres biologiques et physico-chimiques du système, souvent calibrés dans des réacteurs biologiques parfaitement mélangés. Dans ce qui suit, nous passons en revue les différents facteurs et modèles mathématiques proposés dans la littérature pour $\mu(\cdot)$.

1.3.3 Facteurs et cinétiques de la croissance algale

1.3.3.1 Limitation par les nutriments

Rappel de la notion de limitation : Un facteur est dit limitant s'il est strictement nécessaire à la croissance des micro-organismes ; sa densité dans le milieu est influencée par la consommation qu'en font les espèces. C'est en jouant sur l'un des facteurs limitants (les autres étant fournis en quantité suffisante (pour les nutriments) ou maintenus à des niveaux constants (comme pour le pH, la température,...)) qu'il sera possible de quantifier l'effet de ce facteur sur la croissance d'une espèce dans un bioréacteur.

Besoins nutritionnels : Les différents modes nutritionnels des microalgues (l'autotrophie, l'hétérotrophie ou la mixotrophie) sont adaptés chez certaines espèces en fonction de la disponibilité des ressources essentielles (la lumière et les nutriments contribuent à la croissance et la production de biomasse). La biomasse algale est composée principalement de glucides, des protéines et des lipides. Le carbone (C), l'azote (N), le phosphore (P) et la silice dans certains cas, sont des éléments

indispensables au développement des cellules algales et doivent être présents dans l'environnement de croissance. Ces éléments sous forme nutritive sont dits macroéléments présentant des minéraux majeurs nécessaires en grande quantité à la croissance et le développement de la matière organique cellulaire. Outre ces macroéléments, des microéléments comprenant les éléments-traces (B, Ba, Ca, Co, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Zn) et les vitamines (B12, B1, B7) sont également nécessaires et déterminantes dans l'activité métabolique de certaines espèces de microalgues ([184, 185, 186]).

Les besoins nutritionnels moyens pour la croissance algale peuvent être déduits sur la base du ratio molaire des quantités des trois éléments 106 C : 16 N : 1 P, qui se trouve relativement constant en milieu naturel d'après les travaux de Redfield [187]. Le rapport molaire N :P est un facteur crucial pour la croissance des microalgues et le rapport optimal appliqué globalement est de 11 :1. La présence de ces nutriments, à des concentrations limitées peut entraîner des taux de croissance réduits et des productivités faibles de biomasse.

Le carbone est l'élément majeur qui constitue les cellules des microalgues. Il représente jusqu'à 35% du poids sec [188] de la biomasse algale. Les microalgues nécessitent une source de carbone inorganique, essentielle à la photosynthèse et donc à la croissance et à la reproduction algale, généralement apportée sous forme de sels (bicarbonate) ou par enrichissement de l'air par injection de CO₂. Le carbone fixé par les microalgues peut aboutir à trois destinations ; il sera soit utilisé : pour la respiration ; en tant que source d'énergie ; ou en tant que matière première pour la formation de nouvelles cellules [189]. Il participe à la synthèse des acides nucléiques et des métabolites organiques primaires tels que les glucides, les lipides et les protéines. L'allocation du carbone aux compartiments biochimiques peut fluctuer en fonction des facteurs abiotiques (température, intensité lumineuse, composition du milieu et pH) pouvant modifier l'activité de certaines voies métaboliques et donc le fonctionnement cellulaire de tout l'organisme.

En condition d'autotrophie, le CO₂ doit préalablement être transféré dans la phase liquide sous forme de carbone inorganique dissous pour être biofixé. La dissolution du CO₂ est étroitement liée au pH et à la physico-chimie du milieu de culture en général. Le carbone dissous dans l'eau peut ainsi prendre plusieurs formes (CO₂, acide carbonique H₂CO₃, ions bicarbonates HCO₃⁻ et carbonates CO₃²⁻) en fonction des conditions de pH, de température et de la teneur en éléments nutritifs dans la phase liquide : $CO_2 + H_2O \leftrightarrow H_2CO_3 \leftrightarrow H^+ + HCO_3^- \leftrightarrow 2H^+ + CO_3^{2-}$.

Une préférence de l'espèce algale peut être distinguée vis-à-vis de l'une des formes du carbone (CO₂ ou HCO₃⁻) selon le mécanisme biologique de concentration du CO₂ (CCM) [190, 191]). Ce mécanisme représente une série de voies complexes d'accumulation du CO₂ dans la cellule. Il intervient lorsque le transport passif du CO₂ (absorbé par diffusion au travers de la membrane cellulaire et traversant plusieurs compartiments intracellulaires) se trouve insuffisant pour approvisionner l'enzyme « Rubisco » ¹⁵ Un processus de la CCM repose sur le transport actif de HCO₃⁻, permettant aux mi-

¹⁵enzyme clef de la photosynthèse et indispensable à la fixation du CO₂.

croalgues d'accumuler le carbone inorganique sous la forme de HCO_3^- [192]. Celui-ci nécessite en partie l'intervention d'une seconde enzyme « l'anhydrase carbonique », pouvant être aussi bien extracellulaire qu'intracellulaire, qui déshydrate le HCO_3^- pour le convertir en CO_2 accumulé au niveau cellulaire. Ce carbone accumulé subit une biotransformation par « Rubisco » selon le cycle de Calvin pour être utilisés par la suite pour la synthèse de matières organiques.

La consommation du CO_2 entraîne une augmentation progressive du pH dans le milieu durant la photosynthèse. Une augmentation significative de pH (au-delà de 9) limite la disponibilité du CO_2 dans le milieu qui se transforme en HCO_3^- (forme la plus courante de carbone inorganique présent en solution, voir Figure 1.11 A plus loin). Dans ces conditions, les microalgues ne peuvent pas assimiler efficacement le carbone et requièrent un apport élevé en carbonates pour maintenir l'activité photosynthétique [193].

Dans le cas où il y a de fortes concentrations de CO_2 dissous dans le milieu de culture (après injection de CO_2 en excès), l'acidification du milieu (chute de pH) qui en résulte peut conduire à une inactivation l'enzyme « Rubisco ».

Dans des conditions alternatives à l'autotrophie, certaines espèces de microalgues sont aptes à absorber directement le carbone organique dissous, on parle alors d'hétérotrophie et de mixotrophie. Les substrats organiques « simples » préférentiels sont le glucose et l'acétate. Dans la voie hétérotrophe, l'incorporation du carbone dans la cellule est plus coûteuse d'un point de vue énergétique et entraîne des taux de croissance plus faibles, alors que dans la voie mixotrophe le taux de croissance spécifique global sera sensiblement égal à la moyenne des taux de croissance obtenu dans les deux types trophiques (autotrophe et hétérotrophe)[1].

L'azote est un élément indispensable pour la croissance algale et représente un constituant essentiel de toutes les protéines structurales et fonctionnelles dans les cellules des algues[194]. Sa teneur compte pour 1 à 10 % du poids sec des cellules [195].

En milieux aqueux, l'azote se trouve sous forme inorganique ou organique, à l'état dissous ou particulaire. La disponibilité de cette source dans le milieu affecte fortement la productivité et la composition biochimique des microalgues. Dans des cultures en autotrophie et hétérotrophie, les sources d'azote utilisable par la plupart des microalgues sont principalement minérales (ammonium NH_4^+ , nitrates NO_3^- et nitrites NO_2^-), néanmoins, certaines espèces peuvent aussi se développer sur des sources organiques azotées telles que l'urée et les acides aminés [196]. L'utilisation de ces différents éléments azotés peut être scindée artificiellement selon les étapes suivantes i) l'absorption, ii) la conversion en ammonium étant la seule forme directement assimilable, iii) l'assimilation qui consiste en la conversion de l'ammonium sous forme de métabolites organiques (essentiellement en acides aminés) et iv) incorporation de ces métabolites au sein des macromolécules (protéines, pigments et acide nucléique) [197].

Les microalgues eucaryotes sont capables d'assimiler les différentes formes minérales d'azote fixé

[198]; cela requiert que l'azote soit réduit au niveau intracellulaire en ammonium pour qu'il soit assimilé. L'assimilation du nitrate dans les cellules se fait en deux étapes catalysées par les enzymes nitrate-réductase et nitrite-réductase, assurant une réduction en NO_2^- , puis en NH_4 , respectivement [199, 200]. L'ammonium, étant réduit directement, est assimilé facilement par les microalgues.

Les cyanobactéries, capables d'assimiler l'azote atmosphérique, utilisent préférentiellement l'ammonium et les nitrates [201]. Les rendements de croissance avec les composés azotés organiques sont généralement comparables à ceux obtenus avec les nitrates ou l'ammonium, bien que les taux de croissance varient considérablement, en fonction de la source d'azote organique, de la source de carbone et de la souche ([202]).

D'après les données disponibles sur le métabolisme de l'azote dans des conditions hétérotrophes, l'ordre d'utilisation d'une source d'azote par la plupart des espèces de microalgues est, par ordre décroissant : ammonium > nitrate > nitrite > urée ([195]).

Il a été démontré qu'une forte concentration d'ammonium peut inhiber la croissance et entraîner des effets négatifs sur la croissance et la physiologie des microalgues selon la classe et l'espèce (voir [203]). La toxicité peut être aussi liée à l'une des formes dominantes NH_4^+ ou l'ammoniac NH_3 dont les teneurs sont des fonctions de la température et du pH. Un transport excessif d'ammonium au sein des cellules peut empêcher la formation d'ATP provoquant une inhibition de la photosynthèse [204].

Le contrôle des apports azotés constitue le mode de régulation de la synthèse et du stockage des composés organiques des réserves dans la cellule. D'une part, une augmentation de la concentration d'azote, jusqu'à une certaine valeur-limite, peut entraîner une amélioration de la productivité cellulaire et protéique et la synthèse de chlorophylle. D'autre part, la carence de cet élément peut induire une limitation de l'activité photosynthétique et cellulaire et une accumulation importante de réserve lipidique (polysaccharides et acides gras poly-insaturés), même au détriment des protéines et des pigments [41].

Le phosphore est un élément extrêmement important dans le métabolisme des microalgues et représente environ 1 % du poids sec de la cellule ([205]). Il intervient pour l'essentiel dans le transfert d'énergie, la synthèse des acides nucléiques et la formation de la membrane cellulaire [206]. Les microalgues sont capables d'utiliser les formes inorganiques du phosphore (phosphate PO_4^{3-} , dihydrogénophosphate H_2PO_4^- et l'hydrogénophosphate HPO_4^{2-}) ainsi que ses formes organiques via d'hydrolyse. L'utilisation de ces différents éléments phosphorés se fait par une transformation en ion phosphate (PO_4^{3-}) par l'action de diverses enzymes phosphatases qui peuvent être intracellulaires, extracellulaires ou fixées sur la paroi cellulaire. L'activité de ces enzymes est affectée par divers facteurs environnementaux, tels que le pH, la température, la lumière et la présence de métaux ou d'autres inhibiteurs [117]. Les phosphates sont stockés dans les cellules algales sous forme de granules polyphosphates. Cette réserve de phosphore peut être utilisée comme source de phosphore lorsque le phosphate s'épuise dans le milieu environnant. Ce comportement est connu sous le nom d'absorption

de luxe et est observé chez les microalgues ainsi que les cyanobactéries.

La présence du phosphore dans le milieu peut être influencée par les conditions environnementales telles que le pH et la concentration en oxygène dissous. Par exemple, lorsque le pH du milieu de culture dépasse 8,0 et que la concentration en oxygène est élevée, une précipitation de phosphore peut survenir [124, 207] et rapidement sa disponibilité [117].

Comme pour l'azote, la régulation des apports en phosphore est aussi un moyen de contrôler le stockage du carbone organique intracellulaire. La carence en phosphore induit une augmentation de l'accumulation des réserves en lipides dans les cellules[208, 39].

Pour tester des hypothèses sur l'effet de la fluctuation des ressources nutritives sur la croissance des microalgues, il faut varier les teneurs de ces nutriments dans un milieu nutritif de base adapté aux souches étudiées.

Modèles mathématiques pour décrire la limitation en nutriments : Pour décrire mathématiquement une croissance limitée par l'un des nutriments cités ci-dessus, il existe deux grandes approches de modèles qui sont classiquement utilisés : Droop [209] et Monod [181].

Le modèle de Droop [209] est un modèle à rendement variable. Cette variabilité est liée au quota cellulaire du nutriment. La croissance dans ce modèle est dictée par la quantité de réserve en nutriment limitant se trouvant à l'intérieur de la cellule par unité de biomasse (quota cellulaire) notée q selon la relation suivante :

$$\mu(q) = \bar{\mu} \left(1 - \frac{Q_0}{q} \right)$$

avec $\bar{\mu}$ le taux de croissance hypothétique pour un quota infini, Q_0 le quota minimum de survie qui représente la valeur de q pour laquelle $\mu = 0$. Le quota cellulaire diminue avec la croissance algale et augmente avec l'absorption du nutriment qui se fait à la vitesse $\rho(s)$ avec

$$\rho(s) = \rho_m \frac{s}{s + K_s}$$

où K_s est la constante de demi-saturation pour l'absorption du substrat, associée au taux maximum d'absorption ρ_m .

Ainsi le quota cellulaire sera donné par une variable supplémentaire (par rapport au modèle de Monod, décrit plus loin). Ce modèle a été initialement proposé pour étudier l'effet du facteur limitant de croissance, la vitamine B12, sur une microalgue dans une culture en chimostat et permettait une meilleure représentation des données expérimentales que le modèle de Monod [209]. Le modèle de Droop prédit que même si le substrat est complètement épuisé dans le milieu d'une culture batch, les cellules algales continuent à croître quelques jours sur les réserves intracellulaires stockées [210]. Ce modèle a été également appliqué pour tenir compte des limitations par l'azote et le phosphore [211, 212, 213, 214]. Il a été aussi considéré que le quota cellulaire est compris entre un quota minimum

Q_0 et un quota maximum (correspondant à une vitesse de croissance maximale), définis comme des limites physiologiques [215, 194]. Un grand nombre d'extensions a été établi à partir de cette structure afin de tenir compte de l'influence d'autres nutriments dans le milieu de culture ou même de facteurs environnementaux tels que la lumière, le pH, etc.

Le modèle de Monod [181] ou modèle à rendement constant, a été initialement proposé sur des cultures bactériennes, mais il a été aussi appliqué sur des cultures algales [216, 217, 218]. En cas de limitation par un seul nutriment (i.e. substrat) de concentration s , le modèle classique de Monod, montre que le taux de croissance spécifique μ est lié directement à s selon une fonction monotone et bornée (sa borne supérieure est μ_{max})

$$\mu(s) = \mu_{max} \frac{s}{s + K_s}$$

où μ_{max} (temps^{-1}) est le taux de croissance spécifique maximal et K_s ($\text{masse} \cdot \text{volume}^{-1}$) est la constante de demi-saturation. La valeur de μ_{max} est intrinsèque au microorganisme mis en culture. Elle peut être déterminée pendant la phase exponentielle de croissance lorsque le substrat est abondant à une concentration largement supérieure à la valeur de K_s . Le paramètre K_s correspond à la concentration du substrat pour laquelle la vitesse de croissance est égale à la moitié de sa valeur maximale ($\frac{\mu_{max}}{2}$), d'où son appellation (constante de demi-saturation). Sa valeur permet de donner une idée sur l'affinité du microorganisme en question par rapport à s . Une espèce qui présente une meilleure affinité à un substrat est celle qui possède la plus petite valeur de K_s pour ce même substrat.

Le modèle de Monod est bien adapté pour modéliser la culture algale pendant la phase exponentielle dans le cas d'une culture en batch et pendant la phase stationnaire dans le cas d'une culture en continu. Il a été appliqué pour tenir compte des limitations en CO_2 [219, 220, 221], azote et phosphore [222, 217]. Comme pour le modèle de Droop, on trouve plusieurs extensions de l'expression de Monod, utilisée pour tenir compte de l'influence d'autres nutriments dans le milieu de culture, voire d'autres facteurs environnementaux comme la lumière, le pH, etc.

Le modèle d'Andrews–Haldane [223] est complémentaire de celui de Monod, dans le sens où il permet de tenir compte des effets de limitation et d'inhibition qui s'opère pour les fortes concentrations de substrat. Son expression est donnée par

$$\mu(s) = \mu_m \frac{s}{K_s + s + \frac{s^2}{K_i}}$$

où K_i ($\text{masse} \cdot \text{volume}^{-1}$) est la constante d'inhibition.

Ce modèle a été appliqué sur la croissance algale en fonction du CO_2 [224, 225].

Le modèle Aiba-Edward [226] est également utilisé pour représenté l'effet d'inhibition par un sub-

strat

$$\mu(s) = \mu_m \frac{s}{K_s + s} e^{-\frac{s}{K_i}}$$

Le modèle de Contois [182] permet de mettre en évidence l'effet simultané de la limitation par le substrat s et de l'impact de la concentration cellulaire x sur la cinétique de croissance. En effet, cette loi admet une éventuelle limitation suite à l'augmentation de la concentration cellulaire qui pourrait ralentir les phénomènes de transfert massique et ainsi limiter la disponibilité des éléments nutritifs. La vitesse de croissance est inversement proportionnelle à la concentration cellulaire [227]. L'expression mathématique de cette loi est la suivante

$$\mu(s, x) = \mu_m \frac{s}{s + Kx}$$

D'autres formes alternatives à celle de Monod ont été proposées et listées dans la revue [180].

La mise en équations de cinétiques dépendant de la ressource nutritive nécessite donc de déterminer si le substrat, suivant sa concentration dans le milieu réactionnel, inhibe, active ou limite la réaction et dans quelle proportion.

Contrairement aux modèles avec quota de type-Droop, les modèles simples de type-Monod et Andrews-Haldane ne permettent pas de tenir compte des évolutions physiologiques et cellulaires des microalgues, mais uniquement de l'évolution de la concentration des nutriments dans le milieu de culture. Cependant, ils apportent des solutions plus simples aux problèmes activation/inhibition par le substrat avec moins de paramètres à identifier.

1.3.3.2 Limitation par la disponibilité de la lumière

La lumière est la source d'énergie de base pour les microalgues phototrophes, étant indispensable au métabolisme photosynthétique. L'énergie lumineuse ne s'accumule pas, et c'est pour cela que la lumière doit être fournie en permanence et doit être considérée comme un substrat [228]. L'apport de l'énergie lumineuse peut se produire de manière naturelle grâce à l'énergie solaire ou bien artificiellement à des intensités et des longueurs d'onde bien spécifiques (dans le cas de cultures contrôlées).

L'activité photosynthétique des microalgues est influencée par l'intensité lumineuse (voir Figure 1.9) et diffère entre espèces. L'efficacité maximale du transport d'électrons photosynthétiques peut être mesurée par la pente initiale α de la courbe de réponse du taux de photosynthèse à la lumière incidente (Figure 1.9) qui correspond à la phase de limitation en lumière. Cette phase est suivie d'une phase de saturation qui a lieu pour des intensités lumineuses optimales. La lumière de saturation, E_k peut être déterminée par l'intersection entre le taux photosynthétique maximum (P_{max}) et α cf. Figure 1.9). Lorsque la photosynthèse atteint son maximum, le surplus d'énergie au-dessus de la valeur de E_k est dissipé. Mais, pour des intensités très fortes, la vitesse de photosynthèse décline, à cause du

phénomène de photoinhibition.

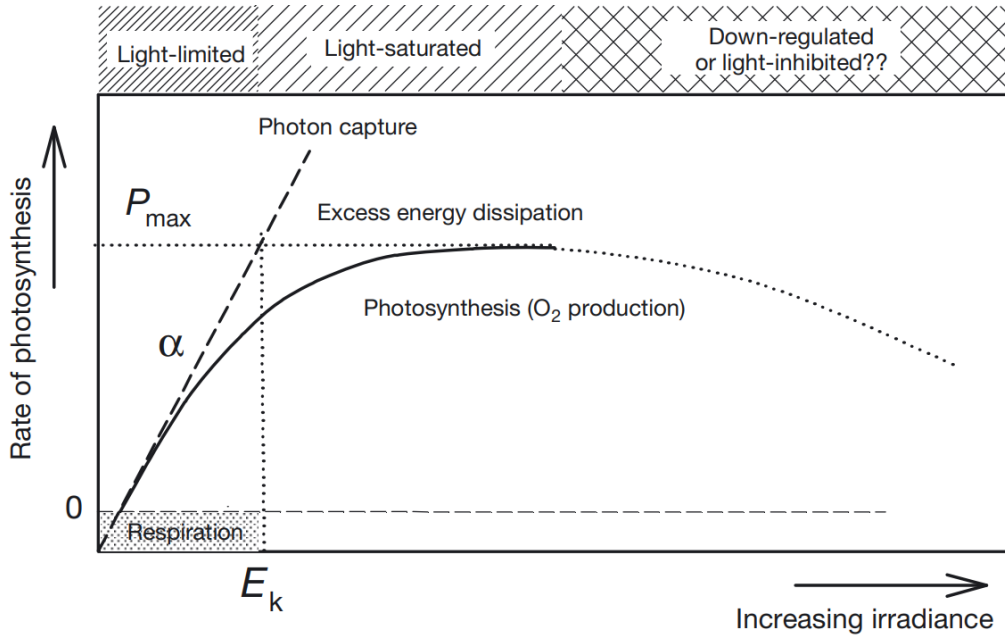


FIGURE 1.9 : Représentation schématique de la courbe de réponse photosynthétique à la lumière , [8]

Plusieurs modèles dans la littérature ont été développés pour décrire la courbe de réponse photosynthétique à la lumière (voir les revues [166, 180]). Dans ces modèles, la photosynthèse peut être exprimée soit par le taux de transfert d'électrons, le dégagement d'O₂ ou la consommation du CO₂, soit remplacée par un taux de croissance spécifique noté μ ; toutes ces considérations aboutissent à la même forme de courbe. Parmi les modèles les plus marquants, citons

i) les équations de type-Monod où le substrat est remplacé par l'intensité lumineuse I . Cette relation a été utilisée dans plusieurs études (e.g. [229, 230, 231]) pour tenir compte des phénomènes de saturation et de limitation par la lumière

$$\mu(I) = \mu_{max} \frac{I}{K_I + I}$$

avec μ_{max} est le taux de croissance spécifique maximum, K_I est la constante de demi-saturation ;

ii) les expressions de type-Andrews/Haldane ou de Steele permettant de tenir compte à la fois les phénomènes de limitation et de photoinhibition pour les fortes intensités :

- Andrews-Haldane sous la forme classique [232, 233]

$$\mu(I) = \mu_m \frac{I}{K_{sI} + I + \frac{I^2}{K_{iI}}}$$

avec μ_m le taux de croissance spécifique maximal, K_{sI} est la constante de demi-saturation et K_{iI} est

la constante d'inhibition ; ou encore sous la forme [9]

$$\mu(I) = \mu_{max} \frac{I}{I + \frac{\mu_{max}}{\alpha} \left(\frac{I}{I^*} - 1 \right)^2}$$

avec α la pente initiale à la coube de μ ; et

- Steele [234]

$$\mu(I) = \mu_{max} \frac{I}{I^*} e^{(1 - \frac{I}{I^*})}$$

avec I^* est l'intensité lumineuse pour laquelle μ atteint sa valeur maximale.

Il faut noter qu'il existe des études dans lesquelles ces modèles ont été exprimés en fonction de la lumière incidente (e.g. [232]), alors que dans d'autres études le taux de croissance a été exprimé en fonction d'une intensité lumineuse moyenne pour tenir compte des effets de la concentration cellulaire et de la géométrie du réacteur, et notamment la profondeur (e.g. [235, 236]).

Les antennes collectrices de lumière des cellules algales sont extrêmement efficaces et absorbent toute la lumière qui y parvient même si elles ne peuvent pas toutes être utilisées pour la photosynthèse. Ainsi, à des concentrations élevées de cellules algales, presque toute la lumière disponible est absorbée accentuant le phénomène d'auto-ombrage qui fait que certaines cellules restent dans l'obscurité [237, 238, 36]. Ce phénomène d'atténuation de la lumière est courant dans les cultures denses de microalgues où l'intensité lumineuse diminue progressivement dans le milieu de culture en raison de l'absorption et diffusion [131]. Pour tenir compte de ces effets sur le taux de croissance, il existe plusieurs approches plus au moins complexes qui ont été proposées dans la littérature (voir revue [166]). Dans la plupart des études, l'effet d'atténuation de la lumière à travers un photobioréacteur (ou un bassin) bien mélangé et éclairé par une source lumineuse d'intensité I_{in} , traversant une colonne de hauteur L , est souvent décrit par la loi de Beer-Lambert [166, 180]

$$I(z) = I_{in} e^{-\xi z}, \quad z \in [0, L]$$

où le coefficient d'atténuation de la lumière ξ dépend linéairement de la biomasse [131, 239]. Cette loi suppose que la distribution de l'intensité lumineuse diminue de façon exponentielle avec la profondeur.

Malgré sa popularité, la loi de Beer-Lambert présente certaines limites car elle ne tient pas compte des effets de diffusion, ce qui augmente l'imprécision notamment dans les cultures denses [232, 240, 241, 242]. La disponibilité locale de la lumière peut être calculée à l'aide d'équations plus sophistiquées tenant compte de l'absorption et de la diffusion de la lumière dans le réacteur [230]. Cependant, cela implique des paramètres d'entrée supplémentaires dont la détermination peut être difficile.

Pour déterminer la quantité de lumière qu'une cellule peut absorber et à partir de laquelle le taux de croissance peut être calculé, une des approches suppose que la vitesse de croissance algale dépend

de toutes les intensités lumineuses rencontrées par les cellules dans le milieu de culture. Ceci revient à considérer plusieurs taux de croissance locaux dont la sommation permet d'obtenir un taux de croissance moyen sur la profondeur [240] donné par

$$\mu = \frac{1}{L} \int_0^L \mu(I(z)) dz$$

Une autre approche plus simple, suppose qu'un taux de croissance moyen peut être donné en fonction de l'intensité lumineuse moyenne I_{av} ou moyenne absorbée. Cette approche considère que la régénération du photosystème peut avoir lieu quelle que soit la position des cellules dans une culture bien mélangée en visitant les deux zones très éclairée et sombre avec une même vitesse moyenne [235, 236].

Les problèmes de photoinhibition (en face de la source) et de saturation lumineuse (au fond de la culture) affectant très significativement la productivité, peuvent être surmontés i) en réduisant la profondeur du système de culture pour augmenter la pénétration de la lumière et en augmentant la densité cellulaire jusqu'à un point auquel l'autombrage minimise la photo-inhibition des cellules d'algues, ou encore ii) par un mélange approprié qui garantit que les cellules individuelles ne sont pas placées exclusivement dans les zones sombres ou claires de la culture [36].

D'autres effets lumineux ont été considérés, comme la photoacclimation des cellules (i.e. adaptation cellulaire de la teneur en pigments en fonction de la lumière disponible) dont la modélisation nécessite de considérer des variables supplémentaires [243, 244].

Étant la source d'énergie de base pour les microalgues phototrophes, la disponibilité de la lumière est l'un des paramètres clés affectant les cultures d'algues sous des conditions de non limitation en nutriments. Pour prédire macroscopiquement l'influence des effets lumineux sur la croissance algale sous ces conditions, un « bon » modèle de croissance serait, à la fois, capable de i) tenir compte des phénomènes lumineux clés impactant la croissance à l'aide d'une approche simple pouvant s'appliquer sur des photobioréacteurs à différentes échelles, ii) surpasser les biais importants de l'utilisation loi de Beer-Lambert en milieux denses, iii) inclure peu de paramètres avec une signification biologique claire facilitant sa calibration et interprétation, iv) être facilement extrapolé à la culture d'un assemblage d'espèces et v) permettre de contrôler et optimiser la croissance algale à travers l'ajustement de la lumière incidente ou de la concentration de la culture.

1.3.3.3 Limitation par d'autres facteurs abiotiques

La température affecte les réactions biochimiques impliquées dans la croissance des microalgues et peut provoquer des changements de la structure cellulaire, et notamment de son volume [205]. Généralement, l'augmentation de la température entraîne une augmentation exponentielle de la croissance jusqu'à ce qu'un niveau optimal soit atteint et au-delà duquel une chute de croissance est observée (voir Figure 1.10).

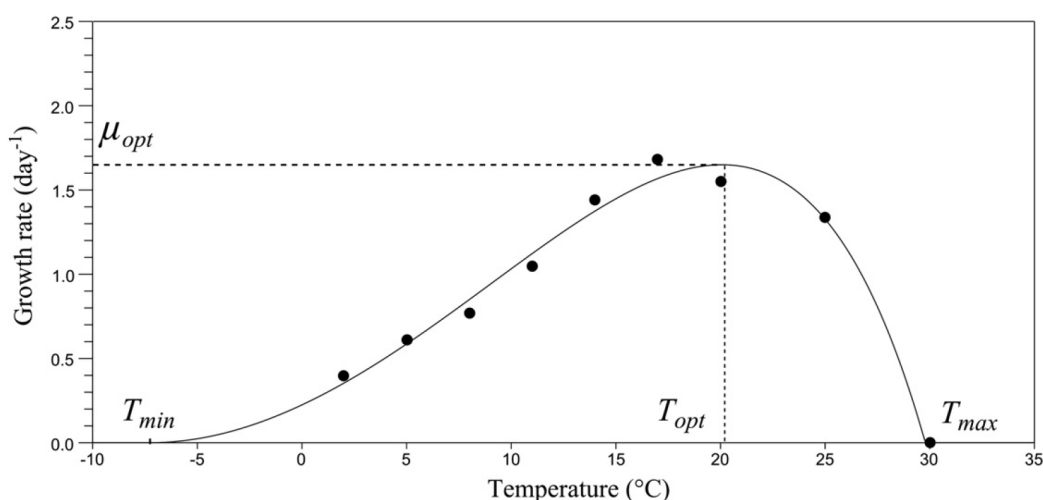


FIGURE 1.10 : Effet de la température sur le taux croissance de *Asterionella formosa*, d'après [9]

Les microalgues tolèrent en général une gamme de températures comprise entre 15 et 30° C [245, 14]. En revanche, des températures extrêmes, supérieures à 35°C, peuvent causer la mort de certaines espèces d'algues [246]. Chaque espèce est caractérisée par une température optimale. Un développement optimal des microalgues se trouve en général entre 20 et 25° C pour des espèces mésophiles, mais peut aller jusqu'à 40° C pour des espèces thermophiles ou baisser en dessous de 17° C pour des espèces psychrophiles. Certaines espèces comme *Chlorella sp.* supportent une grande gamme de températures entre 26 et 36° C [247]. *Scenedesmus sp.* peut aussi assurer une croissance à des températures allant de 4 à 35° C [248, 42] avec une température de croissance optimale à 35° C [249]. Ces microalgues mésophiles colonisent plusieurs milieux naturels et sont supposées mieux supporter les changements de température ce qui suggère leur importance dans les systèmes extérieurs de production algale. C'est principalement à cause de ces optimums que Canovas et al. (1996) [250] ont observé des changements d'espèces en extérieur entre l'hiver et le printemps sur des bassins à haut rendement algal.

L'effet de la température sur le taux de croissance a été principalement représenté par de simples lois croissantes, comme la loi d'Arrhenius dérivée de l'équation thermodynamique de Van't Hoff pour l'équilibre chimique [251, 219]. Ces modèles permettent de prédire uniquement l'augmentation de la croissance algale avec la température. D'autres modèles ont été donc proposés pour tenir compte des effets sur toute la plage cinétique, y compris la réduction du taux de croissance pour les températures élevées [9]. Ils ont été inspirés des modèles [252] initialement proposés pour prédire la croissance bactérienne sous des conditions de non limitation en nutriments. Les prédictions du modèle [9] sont illustrées sur la Figure 1.10.

Le pH est l'un des facteurs les plus importants dans la croissance microbienne car il agit sur la forme et la disponibilité des nutriments. Par exemple, les mécanismes d'assimilation du carbone que

l'on retrouve chez les microalgues dépendent considérablement du pH, car ce paramètre détermine la solubilité du (CO_2) dans le milieu de culture. Le pH détermine aussi la prédominance de certaines entités chimiques comme par exemple l'ammonium NH_4^+ et l'ammoniac NH_3 (voir Figure 1.11).

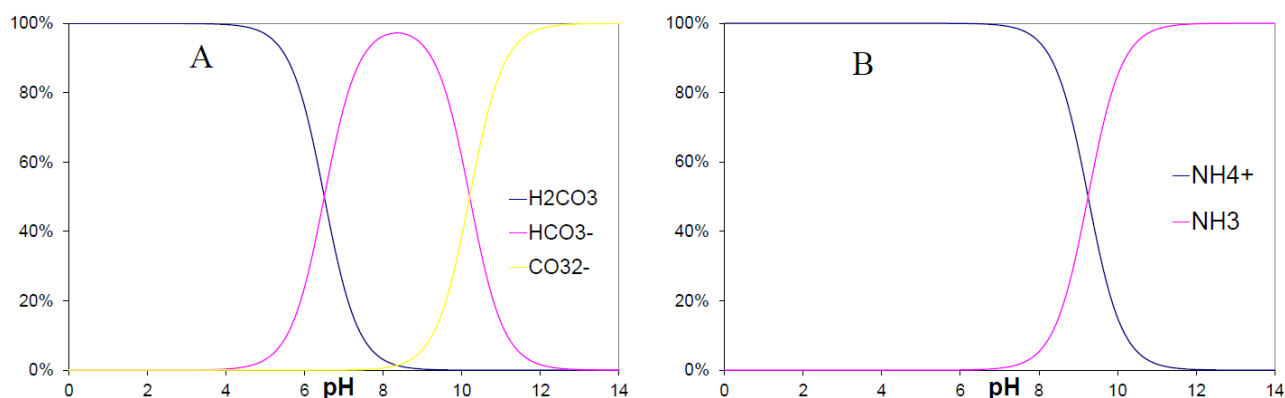


FIGURE 1.11 : Diagrammes de Prédominance (DP)

Figure A : DP de l'acide carbonique avec les formes H_2CO_3 (bleu), HCO_3^- (rose) et CO_3^{2-} (jaune);
 Figure B : DP de l'ammonium NH_4^+ (bleu) et l'ammoniac NH_3 (rose).

De plus, un pH élevé peut induire la précipitation des phosphates sous forme de phosphates de calcium [124, 207] et peut aussi entraîner la floculation des algues, réduisant ainsi l'absorption des nutriments et la croissance.

Le pH est aussi un paramètre délicat, bien qu'il soit assez facilement ajustable avec l'ajout du CO_2 . Dans ce cas, il est conseillé d'injecter le dioxyde de carbone à un pH de 8.3-8.5 (voir Figure 1.11 A), de façon à ce que les ions hydrogénocarbonates soient la forme prédominante du carbone inorganique (en rose). Les différentes espèces algales ont différents niveaux de pH optimaux. Le pH doit, en général, être supérieur à 6 pour permettre un développement correct des microalgues [217]. Le pH gouverne la spéciation $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$. Si le pH est supérieur à 8.5-9, l'azote devient principalement sous la forme NH_3 (voir Figure 1.11 B) qui est toxique selon l'espèce [203]. De plus, la croissance algale peut faire varier le pH de deux façons : en l'augmentant, lors de la photosynthèse à cause de la consommation de CO_2 [253]; en le diminuant, lors de l'utilisation des ions ammonium. En effet lorsque les algues assimilent NH_4^+ elles libèrent des ions H^+ qui font diminuer le pH aussi bas que 3. En revanche, l'assimilation d'ions de nitrate augmente le pH car il y a libération des ions OH^- [117]. Pour éviter les problèmes de chute de pH rencontrés avec l'utilisation d'un milieu de culture où l'azote est présent sous une seule forme ammonium, l'ajout d'un tampon (e.g. HEPES) et d'un élément alcalinisant (carbonate qui permet aussi de soutenir la croissance algale), s'avèrent nécessaires.

La plupart des modèles qui tiennent compte les effets du pH dans leur expression ont été proposés pour représenter son effet combiné à la variation du carbone dans le milieu de croissance. Ces modèles dépendent des concentrations de $[\text{H}^+]$ (pouvant être calculées à partir du pH ($[\text{H}^+] = 10^{-\text{pH}}$)) et permettent de tenir compte soit de l'effet unique de la variation du CO_2 [254], soit de l'effet de

différentes formes CO_2 , HCO_3^- et CO_3^{2-} [255].

Une autre approche de modélisation a été proposée dans [256, 10], équivalente à celle utilisée pour la température qui consiste à considérer des seuils de pH (minimum et maximum) sur la croissance (voir Figure 1.12).

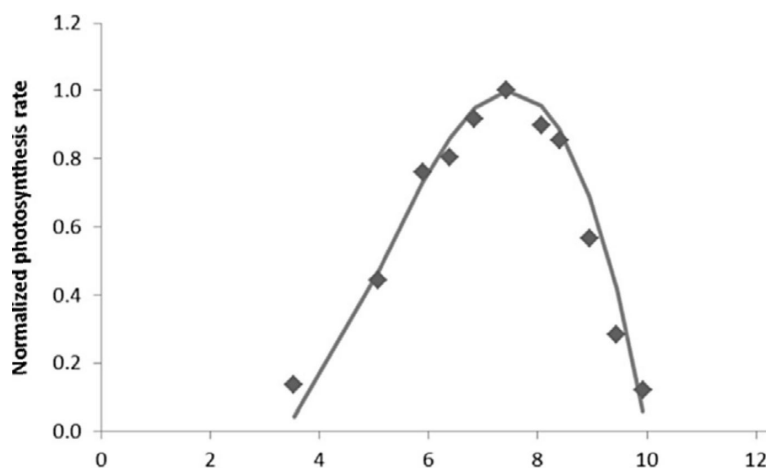


FIGURE 1.12 : Effet du pH sur le taux de photosynthèse normalisé d'*Isochrysis galbana* d'après [10].

1.3.3.4 Conclusion

La croissance des microalgues et son expression cinétique peuvent être décrites en utilisant de nombreux types d'équations mathématiques, à savoir l'équation de Monod, l'équation d'Haldane, l'équation de Steele, l'équation de Droop, etc. Ces modèles ont été initialement développés en observant le comportement des micro-organismes par rapport à un seul facteur (e.g. azote, carbone, phosphore, intensité lumineuse) [222, 220]. Toutefois, il existe des modèles dynamiques plus compliqués qui prennent en compte les limitations de plusieurs substrats couplées aux facteurs physiques (e.g. limitation par l'azote ou le carbone, affectée simultanément par la température et/ou l'intensité lumineuse) suivant une structure selon la cinétique de Droop ou celle de Monod [71, 210, 168].

En général, la combinaison de plusieurs facteurs nutritifs essentiels pour la croissance est le plus souvent exprimée sur les cinétiques soit selon une loi du minimum (Liebig), soit selon la loi multiplicative (cf. revue [180]). La loi du minimum considère que la vitesse de croissance sera dictée par l'élément le plus limitant relatif au besoin de la cellule, alors que la loi multiplicative suppose que les concentrations de tous les nutriments essentiels peuvent exercer une influence simultanée sur la vitesse de la croissance. Cependant, l'utilisation de l'une ou de l'autre n'est généralement pas justifiée théoriquement dans la plupart des études, et dépend de la nature des ressources (solution aqueuse, gaz, énergie, etc.).

Pour caractériser la croissance, il faut sélectionner les facteurs physico-chimiques et biologiques qui influencent la cinétique. Ces facteurs doivent être alors capables de représenter l'influence des différents constituants du système sur la vitesse de croissance. Une connaissance des phénomènes liés au

procédé permettra aussi de déterminer précisément la possible activation ou inhibition de la vitesse de croissance par les variables du système. Parfois, il peut arriver qu'une variable soit activatrice mais qu'elle devienne inhibitrice à forte concentration (e.g. Monod vs Haldane).

La conception des expériences sous des conditions maîtrisées en utilisant une approche d'optimisation basée sur un modèle pour estimer les paramètres est une étape délicate, nécessitant des allers-retours entre les expérimentations et le modèle. Les données recueillies des expérimentations doivent être analysées car elles peuvent présenter des problèmes lors de l'identification des paramètres, dus essentiellement au manque de reproductibilité caractéristique des procédés biotechnologiques et parfois, au manque d'information au niveau des données expérimentales. L'expérimentation et la modélisation sont donc complémentaires, et pourtant les études couplant les deux approches restent limitées et sont présentes à des échelles de complexité différentes.

La modélisation des interactions dans les environnements naturels ou synthétiques est une étape difficile à cause de la variabilité et la complexité de ces écosystèmes. L'étude des cocultures augmente le degré de complexité des modèles du fait du nombre d'éléments liés au niveau de diversités considérées dans le modèle. Cette complexité est perceptible notamment lors de l'analyse mathématique du modèle. Un des enjeux de la modélisation réside donc dans le choix du degré de complexité du modèle sur les éléments dynamiques à considérer ainsi que sur la caractérisation $\mu(\cdot)$ des micro-organismes. Dans la littérature, les types de modèles existants sont aussi nombreux que les objectifs fondamentaux pour lesquels ils ont été développés. L'échelle de complexité des modèles de cocultures à proposer doit être choisie en fonction des questions spécifiques posées en intégrant les aspects dynamiques : comme par exemple l'évolution des conditions du milieu en relation avec le consortium, l'évolution de la prédominance au sein du consortium, la production de biomasse ou de certaines molécules spécifiques à haute valeur ajoutée, etc. Les modèles de structure simple peuvent ne pas avoir la précision des modèles détaillés en matière de formulation de ce qui se passe à l'intérieur d'une cellule, mais ils peuvent être mieux adaptés pour les populations à grande échelle et pour les cultures à long terme de microalgues où certains phénomènes tels que l'adaptation (qui sont difficiles à modéliser dans une modélisation à court terme) peuvent être considérés comme négligeables [180]. Réduire la complexité des modèles permet aussi de simplifier l'étude du système et réduire le nombre de paramètres à identifier. Une première approche de simplification pour l'étude de la performance globale d'un modèle serait de supposer que les conditions comme le pH ou la température, voire la lumière, soient plus ou moins similaires la plupart des jours, avec seulement de légers changements dus aux conditions météorologiques. Cette approche permet de construire des modèles avec un plus petit nombre de paramètres et réduire les difficultés de leurs applications et validation en systèmes ouverts extérieurs [180].

1.4 Estimations dynamiques par intervalles pour borner les incertitudes

1.4.1 Principe et intérêt de l'approche des observateurs par intervalles

Les progrès récents dans l'analyse dynamique et le contrôle de rétroaction des bioréacteurs et des photobioréacteurs, la conception d'observateurs efficaces et de capteurs logiciels pour estimer les variables pertinentes, ainsi que de nouvelles techniques en ligne pour mesurer et agir sur la culture, offrent la possibilité de s'améliorer au-delà pratiques industrielles actuelles. La modélisation, l'estimation et le contrôle des processus biotechnologiques, comme le traitement des eaux usées et la biorestauration, l'estimation des variables pertinentes et le contrôle de rétroaction des bioprocédés ont reçu beaucoup d'attention ces dernières années. Cependant, l'estimation des variables pertinentes et le contrôle de rétroaction des bioprocédés, en particulier dans les environnements industriels, est difficile en raison de certaines caractéristiques des processus à contrôler : i) manque de connaissances sur les variables clés du système représentant l'état physiologique de la culture, ii) complexité élevée de la dynamique de processus non linéaire à plusieurs composantes, iii) des conditions non homogènes, et iv) une grande variabilité et des perturbations opératoires dont les statistiques ne sont pas toujours disponibles, notamment dans les transitoires. Les observateurs permettent l'estimation de variables décrivant l'état d'un système qui ne sont pas directement mesurables (inaccessibles) tout en prenant en compte la richesse dynamique. Un capteur logiciel peut être décrit comme étant l'association d'un capteur physique à un algorithme (appelé observateur) permettant de délivrer, à partir des mesures fournies par le capteur physique et des entrées appliquées au système, des estimations en ligne des différentes variables d'état. La construction d'un observateur, afin d'estimer ces variables, s'appuie sur un modèle mathématique représentant le comportement du système dynamique (1.2). Une modélisation possible de l'incertain consiste à isoler au niveau du modèle les termes mal connus, par exemple à l'aide d'un système dynamique de la forme :

$$\begin{cases} \dot{x} = f(t, x, u, w(t)), \\ y(t) = h(t, x, u, w(t)) \end{cases} \quad (1.2)$$

où l'application $t \mapsto w(t)$ représente les incertitudes,

$x(t)$ représente le vecteur d'état, $u(t)$ est l'entrée du système, et $y(t)$ représente la sortie du système (ensemble des informations disponibles sur l'état du système grâce aux capteurs). Les fonctions f et h sont généralement non linéaires.

Ainsi, un observateur est un système ayant pour entrées la commande (s'il y a lieu) du système $u(t)$, sa sortie $y(t)$, et les incertitudes $w(t)$ et ayant pour sortie le vecteur d'état estimé $\hat{x}(t)$:

$$\begin{cases} \dot{z} = \kappa(t, z, u, y, w(t)), \\ y(t) = \rho(t, z, u, y, w(t)) \end{cases} \quad (1.3)$$

où z représente le vecteur d'état interne à l'observateur, et tel que l'erreur d'estimation d'état $e(t) = \hat{x}(t) - x(t)$ tend asymptotiquement vers zéro.

Dans un contexte applicatif, cela supposerait des mesures parfaites alors qu'en pratique, les capteurs disponibles ne renseignent que partiellement sur l'état du système et fournissent le plus souvent des informations perturbées et bruitées.

L'approche par intervalles « garantis en tout temps », qui consiste à borner les incertitudes par des intervalles (voir Figure 1.13), a été introduite dans [257, 258] pour les systèmes dynamiques en biologie ou en écologie selon la philosophie suivante :

intervalles garantis sur les entrées inconnues

$\implies$

intervalles garantis sur les variables de sortie

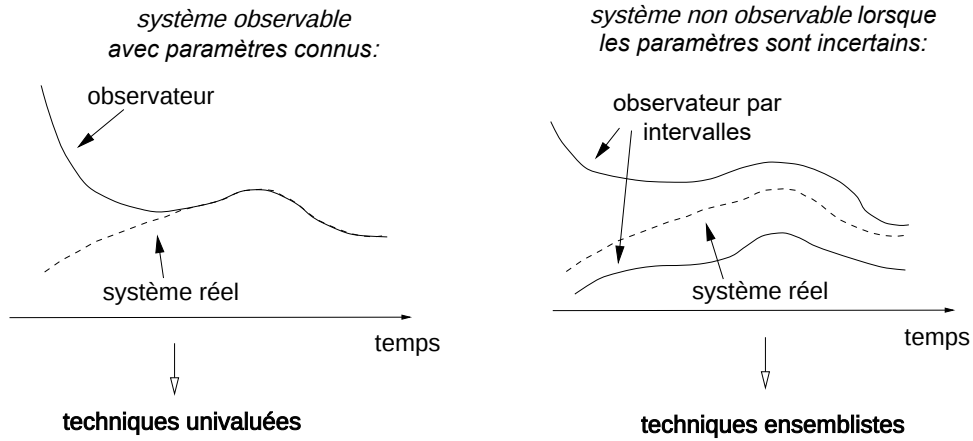


FIGURE 1.13 : Schéma illustratif de la technique ensembliste avec des intervalles garantis.

Plus concrètement, soit un modèle de la forme (1.2) avec des vecteurs d'observations $y^-(.)$, $y^+(.)$ tels que

$$h(t, x(t), u(t), w(t)) \in [y^-(t), y^+(t)], \quad \forall t \geq t_0,$$

pour une certaine fonction d'observation $h(.)$, nous considérons deux estimateurs $x^-(.)$, $x^+(.)$ couplés :

$$\begin{cases} \dot{x}^- = f^-(t, x^-, x^+, y^-(t), y^+(t)) \\ \dot{x}^+ = f^+(t, x^-, x^+, y^-(t), y^+(t)) \end{cases} \quad (1.4)$$

de telle sorte que pour tout encadrement borné des entrées inconnues $w(.)$ et de la condition initiale inconnue x_0 , on sait initialiser le système (1.4) pour garantir l'encadrement en tout temps¹⁶ :

$$x^-(t) \leq x(t) \leq x^+(t), \quad \forall t \geq t_0, \quad (1.5)$$

sans exiger la convergence des estimateurs $x^-(.)$, $x^+(.)$ (les inégalités vectorielles (1.5) sont à inter-

¹⁶ces propriétés d'encadrement garanti sont basées sur la coopérativité des systèmes dynamiques.

préter composante par composante).

1.4.2 Théorème de Muller

1.4.3 Exemple illustratif sur le chémostat

Nous expliquons dans ce paragraphe comment on peut avoir les estimations dynamiques « par intervalles » connues des incertitudes sur les variables d'état à estimer du modèle du chémostat (2.1) (présenté plus haut, point 1.3.2.2), comme illustré sur la Figure 1.14.

$$\begin{cases} \dot{x} &= \mu(s)x - Dx \\ \dot{s} &= -\frac{\mu(s)}{Y}x + D(S_{in} - s) \end{cases} \quad (1.6)$$

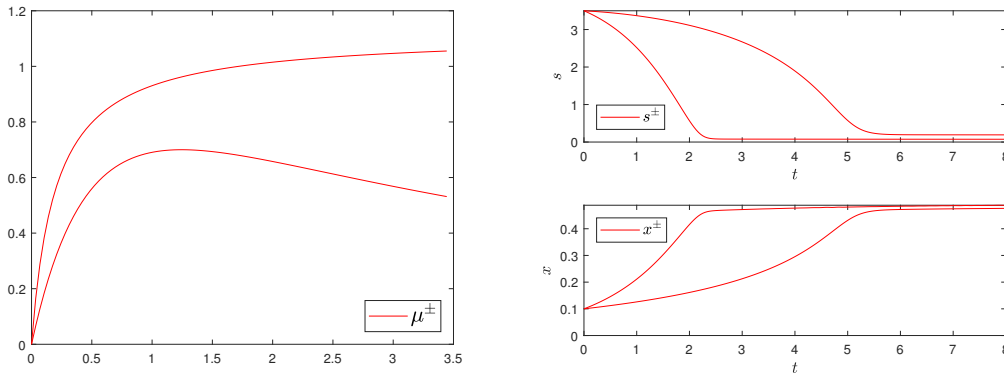


FIGURE 1.14 : Cinétique de croissance avec une borne inférieure d'Haldane et une borne supérieure de Monod (à gauche) et les qui y sont simulations associées sur le substrat et la biomasse (à droite).

On suppose que le coefficient de rendement Y , le taux de dilution D (qui peut éventuellement être variable dans le temps) et la condition initiale (x_0, s_0) soient connus. Nous supposons que la fonction de croissance $\mu(s)$ est caractérisée par deux fonctions inférieure et supérieure tel que

$$\mu^-(s) \leq \mu(s) \leq \mu^+(s), \quad s \geq 0 \quad (1.7)$$

Montrons comment on peut utiliser la fonctions inférieure $\mu^-(\cdot)$ et la fonctions supérieure $\mu^+(\cdot)$ pour obtenir des prédictions garanties de $x(\cdot)$ et $s(\cdot)$.

Nous pouvons facilement vérifier que la variable $z(t) = x(t) + Ys(t)$ est une solution de $\dot{z} = D(YS_{in} - z)$. Par conséquent, on a

$$z(t) = YS_{in} + (x_0 + Ys_0 - YS_{in})e^{-Dt}, \quad t \geq 0. \quad (1.8)$$

On va maintenant distinguer les prédictions de $x(t)$ et $s(t)$.

1. Les prédictions de $x(t)$. De $s(t) = \frac{1}{Y}(z(t) - x(t))$, on obtient que $x(\cdot)$ est une solution de l'équation différentielle scalaire (non-autonome) :

$$\dot{x} = \mu\left(\frac{1}{Y}(z(t) - x)\right) x - Dx$$

Ensuite, en utilisant les résultats de comparaisons des solutions d'équations différentielles [259] (voir [Annexe E](#)), l'encadrement $x^-(t) \leq x(t) \leq x^+(t)$ est obtenu pour tout $t \geq 0$ quand $x^-(\cdot)$ et $x^+(\cdot)$ sont des solutions de

$$\begin{cases} \dot{x}^- = \mu^-\left(\frac{1}{Y}(z(t) - x^-)\right) x^- - Dx^-, & x^-(0) = x_0 \\ \dot{x}^+ = \mu^+\left(\max\left(\frac{1}{Y}(z(t) - x^+), 0\right)\right) x^+ - Dx^+, & x^+(0) = x_0 \end{cases} \quad (1.9)$$

2. Les prédictions de $s(t)$. De la même façon, on a $x(t) = z(t) - Ys(t)$ et $s(\cdot)$ est une solution de la dynamique scalaire

$$\dot{s} = -\frac{1}{Y}\mu(s)(z(t) - Ys(t)) + D(S_{in} - s)$$

Ce qui donne l'encadrement $s^-(t) \leq s(t) \leq s^+(t)$ où $s^-(\cdot)$ et $s^+(\cdot)$ sont des solutions de

$$\begin{cases} \dot{s}^- = -\frac{1}{Y}\mu^+(s^-)(z(t) - Ys^-) + D(S_{in} - s^-), & s^-(0) = s_0 \\ \dot{s}^+ = -\frac{1}{Y}\mu^-(s^+)\max(z(t) - Ys^+, 0) + D(S_{in} - s^+), & s^-(0) = s_0 \end{cases} \quad (1.10)$$

On remarque les incertitudes sur la condition initiale $(x_0, s_0) \in [x_0^-, x_0^+] \times [s_0^-, s_0^+]$ peuvent également être incorporées dans le cadrage, en considérant

$$z^-(t) = YS_{in} + (x_0^- + Ys_0^- - YS_{in})e^{-Dt}, \quad z^+(t) = YS_{in} + (x_0^+ + Ys_0^+ - YS_{in})e^{-Dt}$$

au lieu de $z(t)$ dans les systèmes (1.9)-(1.10) avec les conditions initiales $x^-(0) = x_0^-$, $x^+(0) = x_0^+$, $s^-(0) = s_0^-$, $s^+(0) = s_0^+$.

Dans les modèles de bilan de matière pour les bioprocédés [159, 165], l'incertitude la plus critique se trouve principalement sur les fonctions de croissance spécifiques des micro-organismes, souvent désignées par $\mu(\cdot)$. Par exemple, dans le modèle du chimostat, plusieurs études ont considéré que les fonctions de croissance effective $\mu(\cdot)$ des fonctions de la concentration s dont les caractéristiques varient au cours du temps de façon inconnue, mais peuvent être bornées par deux fonctions connues $\mu^-(\cdot)$, $\mu^+(\cdot)$ vérifiant :

$$\mu^-(s) \leq \mu(t, s) \leq \mu^+(s), \quad s \geq 0 \quad (1.11)$$

au cours du temps t et quelles que soient les valeurs de s . Des estimations dynamiques par intervalles « garantis en tout temps » peuvent donc être dérivées de $\mu^-(\cdot)$ et $\mu^+(\cdot)$ (au lieu de $\mu(\cdot)$) comme illustré dans [260, 261, 12]. Cependant, on peut se demander comment obtenir ces bornes fonctionnelles à partir de données expérimentales sachant qu'il est particulièrement important de faire un bon choix des fonctions μ^- , μ^+ qui a un impact sur la largeur de l'encadrement durant les phases transitoires(1.5) pouvant s'avérer assez conservateur.

1.5 Concluion du chapitre : objectifs de l'étude et hypothèses de recherche

Tel que mentionné précédemment, le développement de la biotechnologie algale, malgré les nombreuses recherches démontrant le potentiel énorme de la biomasse des microalgues, reste, à ce jour, insuffisamment approfondi et peu applicable à grande échelle principalement à cause des contraintes relatives à la stabilisation des cultures en milieux extérieurs sujets à divers stress biotiques et abiotiques et la difficulté d'augmenter leur productivité. Étant donnée leur importance écologique et la possibilité d'améliorer la productivité, la résilience ou la stabilité des écosystèmes, de plus en plus d'études s'intéressent aux polycultures. L'utilisation des assemblages multi-espèces sur des eaux polluées a été suggérée pour rendre les cultures industrielles de microalgues plus efficaces, résilientes et résistantes que les monocultures face aux perturbations extérieures; et pour remplir une double fonction : la production de biomasse valorisable et la dépollution. Quoique la théorie et les études réalisées semblent encourageantes, la diversité ne garantit pas toujours une productivité importante ou une stabilité de production en milieu extérieur ouvert principalement à cause de la complexité de ces écosystèmes, la variabilité et la limitation potentielle des ressources essentielles comme l'azote et la lumière. Avoir une polyculture stable, résistante, contrôlable et à forte productivité sous ces conditions changeantes, reste un défi majeur de la culture algale et nécessite plus d'investigation.

Comprendre les interactions au sein des polycultures extérieures : assemblages d'espèces de microalgues (algue–algue) ou de microalgues-bactéries (algue–bactérie) et leur réponse à l'environnement (i.e. la manière dont les communautés vivantes évoluent sous les conditions réelles des bassins ouverts extérieurs); et leur influence sur la production de la biomasse, est une nécessité pour faire face aux problèmes qui entravent l'expansion de l'exploitation algales à grande échelle.

La recherche des interactions clés au sein d'assemblages d'espèces locales issues de ces écosystèmes complexes (milieu naturel, bassins extérieurs) qui permettent un meilleur rendement, une meilleure efficacité d'élimination des nutriments, la facilitation ou la complémentarité des niches peut simplifier l'identification des souches intéressantes et des environnements stables et plus productifs.

Identifier les traits qui régissent la coexistence et la dynamique des espèces en assemblage est la première étape vers l'application des principes écologiques en vue de générer des techniques stables et productives. Une étape importante à cet effet est la modélisation mathématique permettant d'éprouver les différentes hypothèses sur les interactions à différentes échelles en intégrant les aspects dy-

namiques. Les approches expérimentales et de modélisation sont complémentaires. Et pourtant, la majorité des modèles développés dans la littérature nécessitent une validation expérimentale encore rare, notamment à grande échelle et à long terme en bassins extérieurs.

Pour tester et réaliser facilement des assemblages artificiellement composés d'espèces ayant le potentiel d'atteindre des productivités de biomasse plus élevées qu'en monocultures, il sera nécessaire de développer un modèle de croissance de la biomasse avec des paramètres d'entrée physiologiques déterminés expérimentalement pour toutes les espèces en question. Ce modèle pourrait être utilisé pour identifier les meilleures conditions de croissance des polycultures y compris les conditions opérationnelles du réacteur (e.g. le taux de dilution, consigne sur le pH, etc.) permettant une production maximale de la biomasse et des concentrations minimales de polluants.

Avoir des modèles prédictifs des interactions communautaires est nécessaire aussi pour proposer des chemins optimaux d'exploitation et des stratégies de régulation robustes des systèmes de production (possibilité d'actions sur les conditions de culture comme la vitesse d'apport des nutriments ou encore sur la diversité par ajout d'espèces d'intérêt pour la culture (i.e. bioaugmentation) durant la phase d'exploitation des polycultures à l'échelle industrielle.

Enfin, les techniques d'observateurs par intervalles offrent la possibilité d'avoir des estimations « garantis en tout temps » sur les variables du modèle dynamique (e.g. évolution de la production en biomasse ou de l'abattement des nutriments au cours du temps). Le modèle étant dépendant des vitesses de croissance spécifiques (source majeure d'incertitude), il est nécessaire que la cinétique des micro-organismes mis en jeu soit bien bornée pour permettre des prédictions par intervalles garantis.

L'objectif principal de cette thèse s'inscrit dans la volonté de

- (i) contribuer à une meilleure compréhension des dynamiques de croissance des microalgues en mélange (naturel ou synthétique) avec d'autres micro-organismes (autres microalgues ou des bactéries) sous l'effet de la variation des facteurs biotiques (diversité spécifique) et abiotiques (condition de culture) ;
- (ii) fournir des outils et des méthodes, nécessaires pour pouvoir prédire et optimiser la production des systèmes extérieurs ouverts.

Bien qu'il soit difficile de prédire et élucider le comportement de différentes espèces de microalgues et de bactéries dans les systèmes extérieurs complexes soumis à un environnement variable et stressant (e.g. système alimenté en continu par des eaux usées urbaines [6]), on peut envisager que les successions de dominance de différentes espèces dans ces systèmes seront analogues à celles observées en milieux naturels, généralement expliquées par la différence de leur capacité spécifique vis-à-vis des variations environnantes externes ; et que la fluctuation des ressources nutritives et lumineuses affecte grandement la production de biomasse et la composition spécifique des communautés présentes (e.g. espèces algales, bactéries). Nous supposons également que le mécanisme sous-jacent des successions de micro-organismes et de stabilisation de bassins extérieurs de production de biomasse algale, contenant des communautés diversifiées, est lié à la complémentarité des ressources ou à la facilitation pour

contrer un stress biotique ou abiotique (e.g. [129, 118, 85]). Si des facilitateurs sont absents, les voisins ne peuvent pas s'établir bien qu'ils soient en compétition pour les mêmes ressources.

Nous avons donc étudié dans un premier temps les hypothèses suivantes

Hypothèse 1 La succession de deux espèces de microalgues dominantes (e.g. deux chlorophycées observées en succession dans [6] : *Chlorella sp.* puis *Scenedesmus sp.*) peut s'expliquer par une facilitation écologique vis-à-vis de la fluctuation de l'azote ammoniacal, représentant un facteur limitant la croissance algale sur des eaux usées [33] et inhibant pour certaines espèces [203, 262] ;

Hypothèse 2 La succession des espèces algales [6] peut aussi s'expliquer par une facilitation écologique vis-à-vis de la fluctuation de la lumière [129], représentant un facteur limitant dans ces procédés turbides et inhibant pour certaines espèces ;

Hypothèse 3 La coexistence des algues et des bactéries dans des bassins extérieurs [6], limités par du carbone labile, peut être expliquée par des interactions paradoxales difficiles à élucider [151] de type commensalisme (via le phénomène d'exsudation algale) et compétition (via la consommation de ressource minérale commune).

Dans un deuxième temps, nous admettons que la formulation des cinétiques de réaction n'est qu'approximative étant donné la complexité de réactions biologiques et la difficulté d'identifier avec précision les fonctions des cinétiques de croissance (à cause des fluctuations des conditions de croissance) ce qui peut entraîner des imprécisions sur les dynamiques (pouvant être toutes encadrées à l'aide d'intervalles garantis en tout temps [257, 258]). Nous avons étudié l'hypothèse suivante

Hypothèse 4 à partir de données de cinétique suffisamment riches (i.e. ayant rencontré différentes fluctuations possibles lors de la réalisation de plusieurs expérimentations au laboratoire), une méthode qui permet de construire deux fonctions qui encadrent géométriquement ces données, permettra leur utilisation en vue d'obtenir des estimations dynamiques par intervalles garantis en tout temps.

Les travaux de cette thèse se situent donc à la jonction de l'écologie microbienne et de la modélisation mathématique. Les différentes hypothèses énoncées ci-dessus ont été testées à l'aide de deux approches expérimentales et de modélisation mathématique, et peuvent être traduites sous formes de questions :

- [1] Peut-on mettre en évidence une interaction de type facilitation entre espèces de microalgues dominantes en bassins extérieurs vis-à-vis de la fluctuation de l'azote ammoniacal ? Cette interaction permet-elle d'expliquer leurs dynamiques de succession ? Si oui, dans quelle mesure, et sous quelles conditions ?
- [2] Peut-on mettre en évidence les mêmes interactions (positives) vis-à-vis de la fluctuation de la disponibilité de la lumière ? Comment caractériser la croissance des microalgues et prédire la production de biomasse de l'assemblage en fonction de la lumière disponible ?

- [3] Peut-on mettre en évidence des interactions (positives) entre des assemblages algue–bactérie ? Est-ce que le phénomène d'exsudation peut régir un équilibre de coexistence entre les microalgues et ses compétiteurs bactériens ? Si oui, dans quelle mesure, et sous quelles conditions ?
- [4] Comment obtenir des bornes fonctionnelles sur la cinétique des micro-organismes pour inclure la variabilité des conditions de culture sur données expérimentales de croissance et pouvoir prédire des dynamiques avec des intervalles garantis ?

Méthodologie de travail

Afin de fournir des outils de prédiction robustes et contribuer à une meilleure compréhension des interactions algue–algue (à travers l’hypothèse de la facilitation écologique) et algue–bactérie (à travers l’hypothèse d’interactions paradoxales de type commensalisme et compétition), deux approches principales ont été utilisées : l’expérimentation et la modélisation.

Dans ce chapitre nous donnons un aperçu sur les différents outils utilisés pour répondre à nos objectifs de recherche (détaillés dans le chapitre 1, point 1.5). Ces outils comportent principalement : des expérimentations à différentes échelles, la modélisation, l’analyse mathématique et des simulations numériques. Nous expliquons à la fin de ce chapitre, comment nous avons procédé dans les quatre articles scientifiques (présentés dans les chapitres 3, 4, 5 et 6) selon une méthodologie qui repose sur la jonction de deux ou plusieurs de ces outils.

2.1 Méthodes, techniques et outils de recherche

2.1.1 Approches expérimentales et dispositifs expérimentaux

L’observation des dynamiques des communautés algales qui se développent dans des dispositifs expérimentaux en milieu extérieur (expériences in situ) permet de proposer des hypothèses quant aux interactions mises en jeu entre ces organismes et les facteurs qui les influencent. Les expérimentations au laboratoire permettent de tester ces hypothèses sous des conditions contrôlées en utilisant des dispositifs appropriés.

2.1.1.1 Expérimentations in situ et microalgues isolées

Dans cette thèse, nous avons utilisé des données préexistantes de suivi des phénomènes microbiologiques et physico-chimiques d’un bassin LHRA de 1.9 m³ de volume, alimenté en continu par des eaux usées urbaines avec un temps de séjour hydraulique de 6 jours. Le suivi de ce bassin a été réalisé dans le cadre du projet PHYCOVER présenté au Chapitre 1, point 1.1.2.2, Figure 1.4). Ce bassin a été exploité du 28/04/2015 au 30/11/2017. Le suivi physico-chimique a été assuré par l’enregistrement de

mesures réalisées par des sondes d'une part, et d'analyses par micro-méthodes avec prélèvements réguliers (quotidien, hebdomadaire ou mensuel en fonction de la période et du paramètre) de l'eau brute (eaux résiduaires urbaines) et de l'eau traitée (bassin) d'autre part. L'eau brute était particulièrement chargée en matière en suspension (366 mg L^{-1}) au moment du remplissage du bassin. L'ammonium est la principale forme d'azote, et forme avec le phosphate un rapport (mol :mol) de 36 [3].

Une collecte d'échantillons dans le bassins a permis l'isolement des micro-algues dominantes à partir d'un milieu de culture. L'isolement a été réalisé par une dilution successive en microplaque (milieu liquide), et par une technique d'étalement sur boîte de Pétri (milieu solidifié). Elles ont été maintenues sur le milieu de culture par repiquage successif toutes les 3 semaines [3].

Ces souches ont été isolées et maintenues sur milieu synthétique (Z8-NH_4^+ , cf. [Annexe B](#)) au laboratoire avant le début de la thèse. La composition chimique du milieu est donnée dans l'[Annexe B](#). Ce milieu a été supplémenté par l'ajout de carbonates pour éviter la limitation en carbone [232].

Les espèces isolées appartiennent aux genres *Chlorella* et *Scenedesmus* (voir Figure 2.1). Ces deux

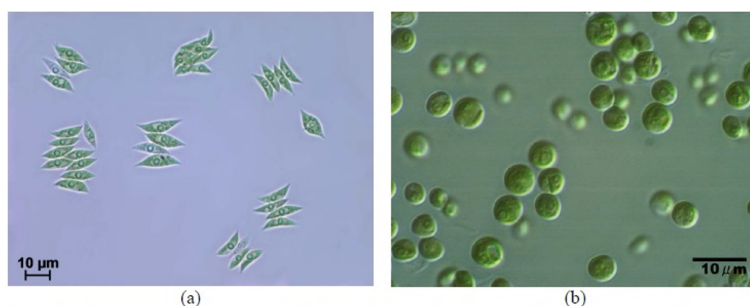


FIGURE 2.1 : (a) *Scenedesmus* sp. et (b) *Chlorella* sp., [11]

microalgues étaient dominantes ; l'ensemble représentant plus de 70 % de l'abondance des micro-algues du bassin. Ces dernières ont démontré des caractéristiques intéressantes pour le traitement des eaux usées. Elles ont été citées dans de nombreuses études portant sur la bioremédiation des eaux usées, ce qui a établi l'intérêt pour cette recherche. En effet, ces deux microalgues ont démontré une capacité à éliminer l'azote, le phosphore et diminuer la demande chimique en oxygène (DCO) [222, 263, 264, 75, 18] et des métaux lourds des eaux usées ([265, 266]. Elles sont aussi connues pour leur contenu important en lipides [14, 267, 40, 47] et leur potentiels pour la production de biodiesels. La microalgue *Scenedesmus* est particulièrement intéressante car elle est connue pour sa résistance aux prédateurs [268] qui sont une des causes majeures de chute de production algale en bassins ouverts. Ces deux microalgues unicellulaires vertes d'eau douce et appartenant à la division des chlorophycées, ont servi de microalgues-modèles dans nos travaux.

L'analyse des dynamiques issues du suivi microbiologique réalisé sur le bassin extérieur (voir Figure 1.6), a permis d'émettre certaines hypothèses. D'un côté, la colonisation du bassin qui s'opère par une succession des deux espèces de microalgales majoritaires (*Chlorella* sp. et ensuite *Scenedesmus* sp.) pourrait s'expliquer par une facilitation écologique à travers la variation des facteurs susceptibles

de limiter la croissance algale en bassin alimenté par des eaux usées : l'azote et la lumière disponible. D'un autre côté, la synchronisation des pics des bactéries avec ceux des microalgues pendant la période de forte prolifération algale pourrait s'expliquer par des interactions de type mutualisme ou commensalisme (voir Chapitre 1, point , Figure 1.6)).

2.1.1.2 Expérimentations au laboratoire et dispositifs expérimentaux

Dans le but de comprendre la colonisation naturelle du dispositif expérimental en extérieur (LHRA du projet PHYCOVER) par les microalgues dominantes (*Chlorella* et *Scenedesmus*), nous avons caractérisé la croissance de ces microalgues, en fonction des facteurs : azote (cf. Chapitre 3) et lumière (cf. Chapitre 4) au laboratoire. Les noms des deux espèces ont été confirmés dans un deuxième temps, par séquençage. Il s'agissait de *Chlorella sorokiniana* et *Scenedesmus pectinatus*.

Différents photobioréacteurs ont été mis en place (voir les Figures 2.2 et 2.3) pour tester les hypothèses émises sur les interactions entre *C. sorokiniana* et *S. pectinatus* et sur les modèles initialement proposés pour expliquer leurs dynamiques en bassin extérieur. Les conditions de culture et de fonctionnement de ces bioréacteurs sont donnés en détail dans les chapitres correspondants des études d'interaction entre espèces microalgales (cf. Chapitre 3 et Chapitre 4).

Pour résumer, les photobioréacteurs en mode batch ont été utilisés pour caractériser la croissance des espèces en monoculture vis-à-vis des ressources (azote puis lumière) (voir Figure 2.2) ou encore pour tester l'effet d'autres facteurs comme le pH.



FIGURE 2.2 : Différents photobioréacteurs en mode batch utilisés pour le suivi de croissance des espèces étudiées – Schéma du batch

Contrairement à la simplicité de mise en place des réacteurs en mode batch, la culture continue «chémostat » a nécessité beaucoup de temps pour la mise en place et les ajustements techniques ; ce dispositif expérimental étant nouveau pour les opérations de routine dans le laboratoire (pas de précédentes installations) (voir Figure 2.3). Ces réacteurs ont été initialement conçus pour i) suivre la croissance des souches cultivées individuellement et ensuite en mélange jusqu'à leur stabilisation, ii) calculer les taux de consommation sur les nutriments (azote et phosphore) en régime stationnaire (équilibre) et iii) produire de la biomasse à la phase exponentielle de croissance cellulaire (étant à l'équilibre) pour l'utiliser comme inoculum de départ pour les expériences en batch (Figure 2.2) afin d'éviter les phases de latence.

Les données du suivi des espèces seules ou en assemblage jusqu'à leur stabilisation dans ces réacteurs, étant obtenues sous des conditions de limitation en lumière et de non limitation en nutriments, ont été utilisées pour l'étude des interactions algue–algue sous l'effet de la lumière disponible (Chapitre 4).



FIGURE 2.3 : Deux chemostats (photobioréacteurs en mode continu) mis en place au laboratoire pour le suivi de croissance des espèces étudiées – Schéma du chemostat

Dans le but de mettre en évidence des interactions entre les microalgues isolées et les bactéries qui leur sont associées au laboratoire, une élimination sélective de la croissance algale a été assurée par l'utilisation d'un inhibiteur de la biosynthèse des protéines (cycloheximide) chez les deux espèces *C. sorokiniana* et *S. pectinatus*. Ces expériences ont été réalisées en monoculture en mode batch.

Le suivi des photobioréacteurs (Figures 2.2 et 2.3) a nécessité l'utilisation d'outils de détection des densités de cellules (comptages par microscopie, mesures de densité optique, analyse du carbone organique particulaire), et la mesure de la consommation des éléments nutritifs présents dans le milieu de culture (principalement ammonium et phosphate) ainsi que d'autres mesures comme la lumière, le pH, etc. Les différentes techniques utilisées sont décrites dans les chapitres correspondants des études d'interaction entre les espèces algales étudiées (cf. Chapitres 3 et 4).

La possibilité de mener des expériences sur des cultures à l'échelle du laboratoire et en bassins ouverts extérieurs à l'échelle-pilote représente une opportunité unique pour caractériser la performance de croissance des microalgues-modèles et proposer des outils de prédiction et d'optimisation de la production algale des polycultures algales en milieu ouvert.

2.1.2 Approches de modélisation mathématique

Les approches de modélisation ont été utilisées afin d'élaborer des modèles de compréhension des interactions entre différents microorganismes, de prédiction et d'optimisation de la production de biomasse algale. La modélisation proposée couple la diversité et la ressource variable, basée sur les bilans de matière. L'analyse mathématique et numérique servent à comprendre et prédire le comportement des éléments définis dans les modèles développés. La confrontation des modèles aux mesures expérimentales acquises sert à valider les modèles les mieux adaptés pour prédire et optimiser la robustesse des cultures mixtes d'espèces algales. Plus précisément, les travaux de la thèse reposent sur l'analyse et surtout sur la modélisation et la simulation des modèles à base d'équations différentielles.

2.1.2.1 Développement des modèles mathématiques

Nous décrivons dans ce paragraphe les éléments de modélisation nécessaires pour la compréhension et l'élaboration des modèles dynamiques présentés dans les travaux de cette thèse (cf. 3, 4 et 5). Nous rappelons le modèle du chémostat dans le cas le plus simple (2.1) comme un exemple de base qui tient compte de la variation des concentrations en substrat s (nutriment) et en biomasse x (micro-organismes)

$$\begin{cases} \dot{x} &= \mu(s)x - Dx \\ \dot{s} &= -\frac{\mu(s)}{Y}x + D(S_{in} - s) \end{cases} \quad (2.1)$$

où $\dot{x}$ et $\dot{s}$ désignent les dérivées au cours du temps, S_{in} est la concentration du substrat à l'entrée, $D = \frac{Q}{V}$ est le taux de dilution, Y est le rendement de conversion et $\mu(s)$ est le taux de croissance spécifique des microorganismes. Sous l'hypothèse d'une limitation de croissance des microorganismes par un substrat s , d'après Monod [181],

$$\mu(s) = \mu_{max} \frac{s}{s + K_s} \quad (2.2)$$

où μ_{max} (temps⁻¹) est le taux de croissance spécifique maximal et K_s (masse·volume⁻¹) est la constante de demi-saturation.

Le modèle (2.1) est formé d'un ensemble d'équations différentielles non linéaires qui sont obtenues à partir des équations dynamiques du bilan de matière sur le bioréacteur entre les instants t et $t + dt$ des composés substrat de concentration $s(t)$ et biomasse de concentration $x(t)$ à l'instant t . Un bilan de matière définit la variation de la quantité d'un composé comme étant la somme de ce qui est apporté ou produit, diminué de ce qui est soutiré ou consommé (on suppose ici un réacteur parfaitement mélangé de telle sorte que les concentrations sont spatialement uniformes à l'intérieur du réacteur). Dans l'écriture du bilan de chaque composé, nous distinguons deux parties : la partie biologique qui décrit les processus biologiques ayant lieu à l'intérieur du chémostat ; et la partie physique qui décrit les flux de matières dus à la circulation du liquide dans le chémostat.

La partie physique : Cette partie est indépendante du modèle que l'on construit et ne nécessite pas d'hypothèses particulières. La variation par unité de temps d'un composé présent dans le chémostat (dans (2.1), une seule biomasse x ; un seul substrat s), est la différence entre la quantité pénétrant dans le réacteur au taux D , à une concentration connue à l'entrée (dans (2.1), 0 pour biomasse ; S_{in} pour substrat) et la quantité sortant au même taux, à la concentration de ce composant (dans (2.1), x pour biomasse ; s pour substrat). Ainsi, nous aurons les quantités $-Dx$ et $DS_{in} - Ds$ respectivement sur $\dot{x}$ et $\dot{s}$.

La partie biologique : Contrairement à la partie physique, son écriture n'est pas unique car elle dépend de l'expression de la cinétique $\mu(\cdot)$. Elle nécessite de faire des choix sur i) la considération de concentration cellulaire en nombre ou en masse de cellules et ii) son degré de complexité qui est fonction des connaissances phénoménologiques disponibles et de la précision que l'on souhaite obtenir.

Chaque réaction biologique est caractérisée par les concentrations des composés (substrat, biomasse, produits), la cinétique de réaction et les taux de conversion Y (i.e. rendement). Le taux de conversion Y représente la quantité théorique de produit formé à partir d'une quantité donnée de réactif. Généralement, il représente la conversion du substrat en biomasse (comme dans (2.1)). La valeur de Y peut être déterminée par une expérimentation en mode batch (quand $D = 0$) : on laisse évoluer librement les composés de la réaction étudiée dans un réacteur fermé sans ajout ni soutirage. Le taux est alors déterminé par la quantité de produits formés (biomasse produite) divisés par la quantité de réactifs consommés (substrats) une fois le substrat entièrement consommé. Il peut être également déterminé à l'équilibre du chémostat.

Pour chaque réaction biologique, les vitesses de consommation et de production des composés impliqués sont précédés respectivement du signe $-$ et du signe $+$ dans le bilan de matière. Pour une cinétique de réaction de type Monod, nous notons $\mu(\cdot) = \mu(s)$ la croissance spécifique des microorganismes sur le substrat limitant s . Ainsi, dans (2.1), nous avons $+\mu(s)x$ pour la production de biomasse et $-\frac{\mu(s)}{Y}x$ pour la consommation équivalente en substrat, respectivement sur $\dot{x}$ et $\dot{s}$. Nous notons également que dans la partie biologique peuvent apparaître des facteurs de perte liée à la maintenance¹ (sur $\dot{s}$) ou la mortalité cellulaire² (sur $\dot{x}$). L'écriture d'un bilan pour chacune des variables d'état (les composés intervenant dans les réactions biologiques) en sommant les parties, physique et biologique, aboutit à la proposition d'un modèle global du procédé (ici (2.1)). Pour que le système ait un sens biologique et soit bien posé, les conditions initiales doivent être strictement positives $x_0 > 0$ et $s_0 \geq 0$.

2.1.2.2 Outils mathématiques pour l'analyse d'un modèle dynamique

Grâce à l'analyse mathématique et numérique des modèles élaborés, nous pouvons étudier les dynamiques des nutriments et de la biomasse dans les écosystèmes étudiés. Ainsi, la détermination des états d'équilibre et les conditions conduisant à un changement d'état d'un écosystème à un autre fournissent des informations précieuses pour mieux comprendre et prédire le comportement de l'écosystème.

Nous rappelons dans ce paragraphe les étapes nécessaires pour étudier le comportement d'un modèle dynamique (voir [269] pour plus de détails). Nous illustrons ces étapes sur l'exemple du modèle classique du chémostat dans le cas le plus simple ((2.1) avec un coefficient de rendement $Y = 1$). Ces étapes seront suivies plus loin pour analyser un modèle proposé pendant la thèse, mais dans un cas plus compliqué (modèle en dimension quatre cf. Chapitre 5).

Une *première étape* consiste à étudier qualitativement des solutions. Cette étude commence par la recherche des points d'équilibre (encore appelés singularités, points stationnaires, points fixes, ou simplement équilibres) de l'équation différentielle. En un point d'équilibre, la vitesse s'annule, les

¹énergie requise par un organisme pour vivre, en excluant les processus de croissance, de reproduction et développement.

²dégénérescence des fonctions vitales

entrées étant maintenues constantes. Les équilibres sont alors des solutions constantes du système différentiel.

Exemple

Pour le système 2.1, les points d'équilibre sont solutions de

$$\begin{cases} \dot{s} = 0 \\ \dot{x} = 0 \end{cases} \quad (2.3)$$

Ainsi, il existe deux équilibres : l'équilibre de lessivage $(s_{in}, 0)$ et l'équilibre strictement positif (s^*, x^*) tel que

$$\mu(s^*) = D \quad \text{et} \quad x^* = S_{in} - s^*.$$

Le nombre des équilibres positifs et leur stabilité sont liés au type de la fonction de croissance μ . Lorsque μ est de type Monod et lorsque la valeur de D est inférieure strictement à $\mu(s_{in})$, il existe un seul équilibre strictement positif.

Une *deuxième étape* consiste à déterminer si un point d'équilibre est localement exponentiellement stable. Pour cela, il faut linéariser le système en faisant une approximation du premier ordre au voisinage du point d'équilibre. La matrice Jacobienne en un point d'équilibre donné s'obtient en écrivant le modèle linéaire en forme matricielle. On dit qu'un équilibre est localement stable si et seulement si toutes les valeurs propres de cette matrice sont à partie réelle strictement négative. Cela veut dire que toute trajectoire issue d'une condition initiale prise dans le voisinage du point d'équilibre va retourner au point d'équilibre avec une vitesse exponentielle.

Exemple

Dans l'exemple précédent, le nombre des équilibres positifs et leur stabilité sont liés au type de la fonction de croissance μ . Lorsque μ est de type Monod et lorsque la valeur de D est inférieure strictement à $\mu(S_{in})$, il existe un seul équilibre strictement positif. La matrice jacobienne en cet équilibre est

$$J(s^*, x^*) = \begin{bmatrix} -D - \mu'(s^*)x^* & -\mu(s^*) \\ \mu'(s^*)x^* & \mu(s^*) - D \end{bmatrix} \quad (2.4)$$

Pour cet équilibre on a $\mu(s) = D$. les valeurs propres sont alors $-D$ et $-\mu'(s)x$. Puisque les valeurs propres de cette matrice sont à partie réelle strictement négative alors cet équilibre est localement stable.

Il faut préciser que la linéarisation au voisinage d'un point d'équilibre ne permet pas de conclure en général la stabilité globale de cet équilibre. Pour connaître la dynamique globale, il faut utiliser d'autres méthodes, plus globales, tenant compte des termes non linéaires dans les équations. La fonction de Lyapunov est parmi ces outils permettant de déterminer la stabilité d'un point d'équilibre d'un point de vue global et non seulement local. Lorsque le système présente des solutions périodiques ou

des cycles limites non réduits à des équilibres, il faut utiliser d'autres méthodes comme les théorèmes de Poincaré-Bendixon ou de Dulac, malheureusement valables uniquement en dimension deux.

2.1.2.3 Ajustement des données aux modèles, identification des paramètres, validation et prédiction

Comme nous l'avons précisé dans les approches expérimentales (paragraphe 2.1.1.2), la caractérisation des vitesses de croissance au laboratoire a été réalisée dans les réacteurs en mode batch décrit par le modèle suivant

$$\begin{cases} \dot{x} &= \mu(\cdot)x \\ \dot{s} &= -\frac{\mu(\cdot)}{Y}x \end{cases} \quad (2.5)$$

Le modèle de Monod (2.2), connu pour sa capacité à reproduire macroscopiquement la dynamique de la biomasse se produisant dans une culture limitée en substrat a été initialement considéré $\mu(\cdot) = \mu(s)$. Une difficulté rencontrée en utilisant le mode de culture batch, en particulier avec des bioréacteurs de faible volume initial, est l'impossibilité de suivre les concentrations de substrat sur de longues périodes de temps à cause des volumes importants nécessaires pour l'échantillonnage. L'hypothèse du rendement constant dans le modèle de Monod est une condition qui rend possible l'identification de ses paramètres même lorsque seule la mesure de la biomasse est disponible. En effet, la valeur de la concentration du substrat à un instant donné, peut être déduite des équations (2.5) et exprimée en fonction de la biomasse comme suit

$$\dot{s} = -\frac{1}{Y}\dot{x} \quad (2.6)$$

Considérons que seule la concentration de biomasse est suivie dans le temps après avoir fixé les conditions initiales à des concentrations connues de biomasse (x_0) et de substrat (s_0). L'absorption du substrat étant liée à la formation de la biomasse par le biais du coefficient de rendement Y ; ce dernier est défini par le rapport entre l'augmentation de la biomasse microbienne et la quantité de substrat consommée

$$Y = \frac{x - x_0}{s_0 - s} \quad (2.7)$$

D'un côté, nous avons d'après le modèle (2.5), $x(t) + Ys(t) = X_f$ pour tout t , où X_f désigne $\lim_{\tau \rightarrow +\infty} x(\tau)$. La concentration du substrat peut alors être donnée pour tout t de la mesure de la biomasse par

$$s(t) = \frac{X_f - x(t)}{Y} \quad (2.8)$$

En pratique, X_f est estimée lorsque $x(\cdot)$ est sur le point d'être stationnaire. D'un autre côté, le taux de croissance correspondant entre deux mesures de x peut être défini selon les équations suivantes

$$\mu(s) = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt} = \frac{d \ln(x)}{dt} \quad (2.9)$$

- Ces relations conduisent à deux méthodes possibles pour identifier les paramètres de la fonction de croissance (2.2).

[1] Méthode 1 : reconstruction de la courbe de croissance sous sa forme non-linéaire

Cette méthode consiste à ajuster la fonction (2.2) aux taux de croissance estimés à partir de l'équation (2.9), tracé contre s données par (2.8); μ_{max} et K_s étant trouvé comme des paramètres de régression non-linéaire avec la méthode des moindres carrés.

[2] Méthode 2 : linéarisation de la courbe de croissance

Une transformation linéaire de la fonction de croissance (2.2) est donnée sous la forme suivante

$$\frac{1}{\mu(s)} = \frac{1}{\mu_{max}} + \frac{K_s}{\mu_{max}} \frac{1}{s} \quad (2.10)$$

Cette transformation conduit à ajuster un modèle de régression linéaire sur les données expérimentales estimées à partir de l'inverse de (2.9) (i.e. $\frac{1}{\mu(s)}$), tracées contre l'inverse de (2.8) (i.e. $\frac{1}{s} = \frac{Y}{X_f - x}$). Les paramètres μ_{max} et K_s peuvent être déduits de la pente A et de l'ordonnée à l'origine B comme suit

$$\mu_{max} = \frac{1}{B}, \quad K_s = \frac{A}{B} \quad (2.11)$$

- Deux autres méthodes, plus généralistes (pouvant s'appliquer aux cinétiques autres que Monod), peuvent être aussi appliquées aux données de suivi de la biomasse au cours du temps et nécessitent des conditions initiales connues. La méthode [3] rejoint le principe des deux méthodes précédentes ([1] et [2]), s'applique directement sur des données de cinétiques estimées, alors que la méthode [4] est indirecte (repose sur l'intégration des équations différentielles ordinaires).

[3] Méthode 3 : détermination de la pente initiale sur la courbe de croissance de la biomasse

Le principe de cette méthode consiste à estimer le taux de croissance en utilisant que les premières mesures de la variation de la biomasse sur la phase exponentielle de croissance pour différentes concentrations initiales de substrat s_0 . Ainsi, pour chaque concentration initiale connue de s_0 , le taux de croissance spécifique correspondant $\mu(s_0)$ peut être estimé entre le temps de départ t_0 et un temps intermédiaire t_1 (proche de t_0) à partir de (2.9). En d'autres termes, d'après l'intégration de $\dot{x} = \mu(\cdot)x$ on a

$$\ln(x) = \mu t + c \quad (2.12)$$

Si l'on porte graphiquement $\ln(x)$ en fonction du temps, la phase exponentielle sera représentée par une droite dont la pente sera égale à la vitesse de croissance μ . Nous considérons que cette approximation est représentative de l'influence de la condition initiale de la ressource testée. Par conséquent, cette méthode peut être utilisée pour vérifier si les données de taux de croissance calculées pour une large gamme de la ressource testée suit une fonction croissante comme dans

la cinétique Monod. Si tel est le cas, les estimations de μ tracées contre les différentes conditions initiales de la ressource, peuvent être ajustées à (2.2); les paramètres μ_{max} et K_s sont donnés à l'aide d'une régression non linéaire avec la méthode des moindres carrés. Cette méthode est dite généraliste car elle permet de déterminer les phénomènes possibles d'activation ou d'inhibition de la vitesse de croissance par une ressource supposée limitante. Il peut arriver qu'une ressource soit activatrice et qu'elle devienne inhibitrice à des niveaux élevés (e.g. cinétique d'Haldane).

[4] Méthode 4 : intégration de l'équation différentielle

L'estimation des paramètres du modèle batch peut se faire par intégration numérique des équations différentielles du substrat et de la biomasse (2.5) selon un critère d'optimisation; les mesures initiales du substrat et de biomasse sont supposés connues. En d'autres termes, à partir de ces conditions initiales utilisées pour intégrer le système, les trajectoires de s et de x peuvent être obtenues numériquement par un solveur d'équation différentielle ordinaire (ODE) et sont comparées aux données expérimentales disponibles à l'aide des algorithmes sophistiqués d'optimisation. L'optimisation d'un critère caractérisant l'écart entre les valeurs expérimentales aux instants de mesure et les valeurs calculées en résolvant le système avec ODE (moindres carrés, par exemple) permettra d'obtenir les meilleures valeurs des paramètres. La capacité à obtenir un ensemble unique de paramètres optimaux compte tenu de la structure du modèle et de l'ensemble des données peut être évalué en comparant les résultats obtenus pour différentes conditions initiales des paramètres inconnus à déterminer (Y , μ_{max} et K_s). Pour garantir la tenue des propriétés qualitatives du modèle (c'est-à-dire la monotonie de la fonction de taux de croissance), les paramètres doivent être contraints à être positifs.

Cette méthode est dite généraliste car elle permet une application sur toute fonction de croissance et tout système dynamique.

Chaque méthode a ses avantages et ses limites. Les avantages et inconvénients, dans le cadre du modèle de Monod, sont résumés dans l'[Annexe C](#). Notons que la combinaison de plusieurs méthodes peut améliorer les résultats d'identification et de validation. Une combinaison des méthodes [3] et [4] est utilisé dans les travaux portant sur les interactions entre les espèces algales étudiées (cf. Chapitres 3 et 4).

Notons que les calibrations des paramètres des différents modèles considérés dans les travaux de cette thèse ont été réalisées avec la méthode des moindres carrés qui consiste à minimiser le critère J correspondant à la somme quadratique des déviations des mesures aux prédictions de $f(x; p)$ données par le modèle

$$J(p) := \sum_{i=1}^n (y_i - f(x_i, p))^2 \quad (2.13)$$

L'identifiabilité pratique du modèle a été testée avec une approche fondée sur la simulation intensive, qui consiste à lancer les programmes d'optimisation pour un grand nombre de conditions initiales. Si,

quelles que soient les conditions initiales des paramètres à identifier, l'algorithme converge vers les mêmes valeurs optimales de paramètres, on conclura alors à l'identifiabilité pratique du modèle. Si, par contre, plusieurs jeux de paramètres permettent d'obtenir une valeur proche du critère d'optimisation, on conclura alors que le modèle n'est pas identifiable. On pourra quand même retenir un jeu « optimal » de paramètres utilisables à des fins de simulation du système mais en gardant à l'esprit que ce jeu n'est pas unique. Cette approche a été implémentée sous Matlab où les données obtenues par les simulations sont comparées aux valeurs expérimentales disponibles à l'aide des fonctions d'optimisation de Matlab. L'appel de la fonction 'fmincon' permet de chercher les valeurs des paramètres en cherchant un minimum à partir d'une valeur de départ dans un espace à n dimensions par un ajustement des paramètres à optimiser selon le critère d'ajustement des moindres carrés qui est couramment utilisé. Plus la valeur renvoyée par ce critère est faible, plus le modèle permet de rendre compte des données expérimentales.

Après l'identification des paramètres, la validation constitue une étape essentielle qui se fait sur un jeu de données non utilisées pour cette identification. Cette étape est la plus importante du processus de modélisation car elle donne un sens à tout ce qui a été fait auparavant. C'est une tâche sans laquelle on ne peut pas garantir que le modèle prédit les phénomènes considérés et les comportements en photobioréacteur.

2.2 Mise en pratique des outils et étapes de la démarche de recherche

Cette thèse a mobilisé des approches expérimentales et des approches de modélisation mathématique pour appréhender au mieux les interactions au sein d'un assemblage algue-algue (*C. sorokiniana* et *S. pectinatus* isolées du milieu extérieur) et au sein d'assemblages algue-bactérie.

Grâce à l'observation du comportement qualitatif des deux espèces algales et la tendance de leurs pics comparés à ceux des bactéries en milieu extérieur, il a été possible de proposer des hypothèses sur les interactions entre i) algue-algues : facilitation ou compétition vis-à-vis de l'azote et de lumière disponible, ii) algue-bactérie : mutualisme ou commensalisme vis-à-vis des nutriments dans le milieu. Des expériences guidées par ces hypothèses permettant des analyses variées et complémentaires lors du suivi des bioréacteurs (azote, pH, DO, carbone particulaire, lumière, etc.), sont nécessaires pour caractériser la croissance des microalgues et conclure sur les interactions au sein des différentes co-cultures. De plus, une modélisation basée sur des hypothèses supplémentaires, comme par exemple les interactions paradoxales entre algue-bactérie à travers le phénomène d'exsudation, et appuyée par une analyse mathématiques du modèle a été également nécessaire pour comprendre le comportement de l'assemblage en fonction de la disponibilité des ressources (minérale et organique pour ce même exemple).

L'analyse des données de croissance recueillie des différentes expérimentations en mode batch a

suscité des réflexions sur les quatre méthodes ([1], [2], [3] et [4]) qui ont été proposées pour la caractérisation de la vitesse de croissance spécifique et sur leur application (cf. Paragraphe 2.1.2.3) pour choisir celles qui sont les mieux adaptées aux microalgues. À l'aide des approches de modélisation mathématique et de simulations numériques couplées à une confrontation aux données synthétiques, nous avons pu faire des comparaisons entre ces méthodes dans le cas d'une cinétique de type Monod (cf. Annexe C). En outre, ces réflexions ont conduit au choix d'une démarche qui a été appliquée dans les Chapitres 3 et 4. Cette démarche consiste, dans un premier temps, à utiliser la méthode [3] pour caractériser les cinétiques des espèces algales car elle est plus généraliste, rapide et efficace pour détecter les phénomènes d'inhibition par le substrat ou par la lumière. Ainsi, elle permet de proposer des expressions de croissance qui peuvent représenter les vitesses de croissance des espèces étudiées plus finement que ne le permet le Modèle de Monod. De plus, elle donne facilement plusieurs réplicats de taux de croissance une fois appliquée sur un suivi de croissance en microplaques.

Dans un second temps, les fonctions proposées pour décrire la vitesse de croissance spécifique des espèces en question sous les conditions des ressources testées sont validées en utilisant la méthode [4]. Cette dernière, étant plus flexible pour la calibration des modèles, permet aussi l'identification d'autres paramètres biologiques comme la mortalité et les rendements de conversion (le réajustement des valeurs de ces paramètres s'est avéré nécessaire pour approcher au mieux les données expérimentales obtenues en bassin extérieur cf. Chapitre 3).

La proposition de modèles et leurs confrontations aux mesures expérimentales récoltées du laboratoire ou avec un retour sur les données observées in situ (avec un couplage des méthodes [3] et [4]), ont permis de mettre en évidence les interactions au sein de l'assemblage algal, et de déterminer par simulations numériques les conditions théoriques qui optimisent la production de biomasse à l'échelle du laboratoire ou à l'échelle pilote (cf. Chapitres 3 et 4).

Une analyse comparative des méthodes de caractérisation de la croissance microbienne sera plus amplement développée en vue d'une publication sur les approches méthodiques liées à la croissance des microorganismes en bioréacteurs limités par une ressource.

Enfin, l'analyse et l'exploitation des nombreuses mesures de croissance entachées d'erreurs ont suscité un grand intérêt pour trouver comment tenir compte des fluctuations possibles rencontrées au cours des expérimentations (e.g. variations des conditions de cultures comme pH, température) (i.e. vérifiant (1.7)) pour permettre une prédiction dynamique par intervalles garantis (cf. Chapitre 1, point 1.4.1, Figure 1.14) qui englobent l'ensemble des situations similaires pouvant se reproduire à divers moments lors des expériences futures sur les mêmes microorganismes.

2.3 Répartition des activités de la thèse

Les temps consacrés aux différentes tâches réalisées au cours de la thèse (entre Montpellier et Sète) sont récapitulés (en pourcentage) dans le tableau 2.1 suivant

	1ère année	2ème année	3ème année et au delà
étude bibliographique (Montpellier & Sète)	40%	30%	30%
montage et suivi d'expériences (Sète)	50%	40%	10%
modélisation et analyse des modèles (Montpellier)	30%	40%	30%
analyse des données d'expérience et confrontation aux modèles (Montpellier)	30%	30%	40%
simulations numériques (Montpellier)	30%	35%	35%
rédaction et dissémination des résultats (Montpellier)	5%	20%	75%

TABLE 2.1 : Répartitions des diverses activités durant la préparation de la thèse

**ARTICLES PUBLIÉS, SOUMIS OU EN
PRÉPARATION :
RÉSULTATS ET DISCUSSIONS**

Demonstration of facilitation between microalgae to face environmental stress

Ce chapitre a été publié dans *Scientific Reports* en 2019.

Emna Krichen^{1,2,3}, Alain Rapaport², Émilie Le Floch¹ et Éric Fouilland¹

¹ : UMR MARBEC, Univ. Montpellier, CNRS, IFREMER, IRD, Sète, France

² : UMR MISTEA, Univ. Montpellier, INRAE, SupAgro, Montpellier, France

³ : Agence de l'environnement et de la Maîtrise de l'Energie, Angers, France

Résumé

Les interactions positives comme la facilitation jouent un rôle important pendant la colonisation biologique et la succession des espèces dans les environnements contraints ou changeant. Cependant, des preuves directes d'une telle interaction écologique dans les communautés microbiennes demeurent rares. En utilisant des microalgues d'eau douce isolées à partir d'un bassin d'algues à haut rendement algal traitant des eaux usées, nous avons étudié, avec des approches expérimentales et de modélisation, la facilitation directe entre deux souches de microalgues pendant la phase de colonisation. Nos résultats ont démontré que, sous des conditions chimiques extrêmes, une première colonisation par des microalgues est due à la croissance rapide d'espèces pionnières comme *Chlorella sorokiniana*, qui facilite la colonisation ultérieure des espèces spécialistes moins rapides comme *Scenedesmus pectinatus*. Les espèces pionnières ont rapidement épuisé l'azote ammoniacal total disponible, ce qui a favorisé les espèces spécialistes initialement inhibées par la toxicité de l'ammoniac. Cette dernière espèce a finalement dominé la communauté d'algues suivant le principe d'exclusion compétitive dans des conditions de faible teneur en éléments nutritifs. Nous montrons que les successions microbiennes ne sont pas seulement régulées par les conditions climatiques mais aussi par les interactions entre espèces en fonction de leur capacité à modifier leurs conditions de croissance. Nous suggérons qu'au sein des communautés microbiennes aquatiques, la facilitation est une interaction écologique qui peut être généralisée sous diverses situations de stress environnementaux.

Abstract

Positive interactions such as facilitation play an important role during the biological colonization and species succession in harsh or changing environments. However, the direct evidence of such ecological interaction in microbial communities remains rare. Using common freshwater microalgae isolated from a High Rate Algal Pond HRAP treating wastewaters, we investigated with both experimental and modeling approaches the direct facilitation between two algal strains during the colonization phase. Our results demonstrate that the first colonization by microalgae under a severe chemical condition arose from the rapid growth of pioneer species such as *Chlorella sorokiniana*, which facilitated the subsequent colonization of low growth specialists such as *Scenedesmus pectinatus*. The pioneer species rapidly depleted the total available ammonia nitrogen favoring the specialist species initially inhibited by free ammonia toxicity. This latter species ultimately dominated the algal community through competitive exclusion under low nutrient conditions. We show that microbial successions are not only regulated by climatic conditions but also by interactions between species based on the ability to modify their growth conditions. We suggest that facilitation within the aquatic microbial communities is a widespread ecological interaction under a vast range of environmental stress.

3.1 Introduction

One of the major challenges in microbial ecology is to understand the dynamics of communities of interacting species. Understanding the biological interactions and the time scales over which they occur is necessary to interpret the results of the directional succession process of communities' development in the natural environment and artificial ecosystems. In aquatic systems, microalgae are present in natural waters such as oceans, lakes, rivers, and ponds and play a prominent role in the marine and fresh-water ecosystems where they drive major ecosystem processes. Strong similarities exist between marine and freshwater phytoplankton ecology [88] when they face similar changes in growth conditions leading to temporal species succession. Abiotic forcing and biotic interactions can both result in successional trends in phytoplankton. The scientific discussion around the phytoplankton growth periodicity and succession has been dominated by the role of the environmental drivers including global climatic change (e.g. light, temperature, wind) [89, 270, 90, 271, 91] local hydrological variations [272, 273] biological disturbances such as species invasion [274], and chemical effects such as toxic pollutants, nutrient enrichment, or change in pH (see references [272, 275, 276, 91, 277]). On the other hand, the conditions governing phytoplankton growth over the seasonal change in plankton communities have mostly been discussed in the context of exploitative competition (e.g. [94]) or algae-grazer interactions (e.g. [80]).

The competition for limiting nutrients is an important factor explaining phytoplankton species temporal successions. In marine ecosystems, small-cell diatoms usually grow rapidly in the first stage after a strong nutrient enrichment because of their higher growth rates and are then followed by larger-cell diatoms and dinoflagellates, which are more likely to occur when nutrients are depleted [278, 279]. Similarly, the seasonal patterns of succession in freshwater ecosystems might be explained by the first occurrence of invasive small-sized species [280], which can be expected to continue to expand until they either run out of nutrient or light energy or are controlled by zooplankton grazing [281, 280]. These pioneer invasive species can be replaced by other phytoplankton species more prone to grow under nutrient depletion because of mixotrophy ability or mobility allowing them to exploit patches of nutrients not available to other microalgae [280].

The ability to colonize a specific habitat usually explains the dominance and succession under changes in environmental conditions. For instance, changes in the algal assemblage in natural biofilm communities have been reported in the context of ecological succession that may be related to the population's tolerance to the physical architecture of the developing mat or the resource limitations within the mat occurring as the biofilm develops [282].

Positive interactions (i.e. facilitation) between organisms can occur when one organism makes the local environment more favorable for another either directly (such as by reducing thermal, water or nutrient stress via shading or through nutritional symbioses) or indirectly (such as by removing competitors or deterring predators) [109]. Positive feedbacks are the main driving biotic mechanism in plant community succession, particularly under harsh environmental conditions including physical or biotic stresses [108] and are potentially important in aquatic systems influencing the dynamics of

populations and communities [282, 109]. However, fewer studies have discussed the role of positive interactions in aquatic microbial communities' organizations. During the biofilm development, it was suggested that early stages of diatoms succession follow the "facilitation" model outlined by Connell and Slatyer [283] when the extracellular mucilage production modified the physical biofilm characteristics and then enhanced the probability of successful immigration of some species more than others [284]. Similarly, it was suggested that algal mucilage and stalks within the biofilm facilitate periphyton development by encouraging cell surface adhesion and providing increased sites for colonization [285].

Phytoplankton can substantially change its surrounding conditions of growth by increasing pH due to the uptake of inorganic carbon during photosynthesis [253], decreasing transparency with the increase of biomass concentration [129] or depleting key nutrients. Hence, we suggest that this phytoplankton-driven environmental modification can provoke shifts in assemblages of species, thus leading to successions. We suppose that under highly polluted conditions, similar to strongly anthropized ecosystems, an assemblage of typical pioneer species will first develop because of their potential for rapid dispersal and growth. We hypothesize that species showing the fastest growth rates and the strongest stress tolerance to harsh environments will be able to grow under such conditions, making the ecosystem more favorable for species that are more competitive in stable growth conditions through ecological facilitation.

Previous results from a study investigating the biological succession within HRAPs used for wastewater treatment showed the growth of the rapid-growing species *Chlorella sp.* followed by the slow-growing and grazing-resilient species *Scenedesmus sp.* [6]. Similar successions have been observed in other studies using HRAPs as well [250, 85]. The successional trends of typical microalgal species growing in HRAPs have generally been interpreted as responses to predation and/or seasonal factors [286, 250]. Based on the previous observations of dominant species dynamics [6], we tested in this study the hypothesis that during the colonization phase of HRAPs supplemented with wastewaters, *Chlorella sp.* can modify its habitat and facilitate the growth conditions for *Scenedesmus sp.* by reducing the nutrient stress modulated by ammonia toxicity [287]. We suggest that microbial successions might not be regulated by climatic conditions only, but also through positive interactions between species facing external chemical stress. We conducted sets of laboratory experiments using the species molecularly identified as *C. sorokiniana* and *S. pectinatus* on isolates taken from the HRAP located in northern France during its colonization by *Chlorella sp.* and *Scenedesmus sp.* being both previously identified by microscopy [6]. The objectives of these experiments were to determine the inhibiting factor among ammonium ion NH_4^+ , pH and free ammonia NH_3 and to determine their respective effects on the growth rates of each species. Then, we used a modeling approach to test the magnitude of facilitation/competition on the two microalgae and, further, to explain the observed patterns in HRAP continuously supplemented with wastewater [6]. We also studied the resilience and succession times, providing informative proxies on the efficiency of the ecological facilitation and the successional trends depending on the initial populations' densities. Our results supported the

theoretical considerations of ecological facilitation between one tolerant and one sensitive organism to a gradient of resource toxicity/bioavailability.

3.2 Results and Discussion

Three sets of experiments (denoted SE1, SE2 and SE3) were performed *i)* to isolate the inhibitory effects of possible external factors such as high nitrogen concentrations or pH and *ii)* to demonstrate a facilitation interaction between two species. We then show how to exploit the experimental data using a mathematical modeling approach, providing new insights on the facilitation phenomenon.

3.2.1 No direct toxic effect of high NH_4^+ and pH on microalgae growth rates.

Chemical factors such as Total Ammonia Nitrogen TAN and pH can affect the rate and efficiency of photosynthesis of microalgae [288, 289, 290]. Negative effects of TAN (referring to nitrogen in two distinct forms: NH_4^+ and NH_3 on algal growth and physiology might occur and vary significantly within classes of microalgae and within species (see [203]). The photosynthesis of different species of marine diatoms was severely inhibited at TAN concentrations in the range of 0.5 to 11 mgN.L^{-1} (see [291, 292]). At low pH values (< 8), toxicity is likely associated with NH_4^+ , while at alkaline pH values (> 8), cell growth inhibition is rather due to NH_3 . During the first set of experiments SE1, the potential toxicity of high NH_4^+ was investigated for the two isolated algal species (molecularly identified as *C. sorokiniana* and *S. pectinatus*) when pH values were adjusted to 7.5 at 25 ° C. Hence, under such conditions, we ensure that 98% of TAN (ranging from 10 to 110 mgN.L^{-1}) was present as NH_4^+ form (see the relative proportion of NH_3 and NH_4^+ as a function of pH at 25 ° C [293]). Under this range of concentrations, no significant difference in the growth rates of *S. pectinatus* or *C. sorokiniana* was measured ($p > 0.05$, ANOVA from ANOCOVA test results for four observations; see Figure 3.1(a)). Therefore, the NH_4^+ form at such concentrations, typically found in wastewaters, did not affect the growth rates of both microalgae. Similarly, it was reported that species such as *Chlorella* are very tolerant to high TAN concentrations (max. 140 and 250 mgN.L^{-1} stated respectively in Collos and Harrison (2014) [203] and Tam and Wong (1996) [294]). However, Przytocka-Jusiak et al. (1977) [295] reported that cell division of *C. vulgaris* was inhibited at greater TAN concentrations ($> 300 \text{ mgN.L}^{-1}$). Studies performed on *S. acuminatus* showed that cell growth was inhibited only when NH_4^+ concentrations were higher than 200 mg.L^{-1} (see reference [296]). Interestingly, it has been previously reported that algal photosynthesis of *S. obliquus* was inhibited at TAN above 28 mgN.L^{-1} if the culture pH exceeded 8.0 (see reference [288]).

Because pH can vary during algal growth in ecosystems due to the rapid and large CO_2 consumption of microalgae, this might directly or indirectly affect algal growth rates. The optimal pH of many freshwater algae is about 8 (see reference [193]). The growth of many algal species is inhibited in waters at pH greater than 8 (reduction of productivity of *Chaetoceros sp.* and *Chlorella sp.* by 22 % when pH was raised from 8 to 9), while other species can grow well above pH 8 (e.g. *Amphora sp.*

and *Ankistrodesmus* sp. at pH 9 and 10, respectively) [297]. High pH conditions limit the availability of CO_2 while HCO_3^- dominates, and then algae cannot efficiently accumulate carbon and require a high supply of carbonates for maintaining photosynthetic activity [193] or reducing the affinity to free CO_2 [298, 299]. During the second set of experiments SE2, the direct effect of pH was tested using pH values ranging from 6 to 9 on algal growth under low initial TAN concentration of about 1 mgN.L^{-1} . As shown in Figure 3.1(b), the tested pH conditions had no significant effect on the growth rates measured for both species, *S. pectinatus* and *C. sorokiniana* ($p > 0.05$, ANOVA from ANOCOVA test results for three replicates and three observations). Then, similar to high values of NH_4^+ , the results did not support the hypothesis of a negative effect of high pH values on the growth rates of both studied species when cultured in medium containing 1 mgN.L^{-1} of TAN concentrations. Similarly, Azov and Goldman (1982) [298] suggested that pH did not play a role in the magnitude of inhibition but the degree of dissociation of nontoxic NH_4^+ to toxic NH_3 . In other words, the dissociation of TAN as a function of pH is the main determinant of how much NH_3 is available to inhibit photosynthesis. We suggest that NH_3 concentrations in SE1 and SE2 were likely too low ($< 2\text{ mg.L}^{-1}$) to exhibit algal growth inhibition. Therefore, the effect of a broader range of NH_3 concentrations was then tested on both species in the third set of experiments.

3.2.2 Evidence of species-dependent ammonia effect

NH_3 is considered the TAN's most toxic form for aquatic organisms [300]. The third set of experiments SE3 was then performed on the same algal isolates (*C. sorokiniana* and *S. pectinatus*) to test their growth under NH_3 concentrations ranging from 0.56 to 29.42 mgN.L^{-1} . The results for the growth rates of both isolates (represented in Figure 3.1(c)) showed that the growth rates of *C. sorokiniana* measured under the different NH_3 concentrations were similar ($p > 0.05$, ANOVA from ANOCOVA test results for three replicates and three observations). However, the growth rates of *S. pectinatus* were significantly different ($p < 0.05$, ANOVA from ANOCOVA test results for three replicates and three observations) with an important reduction in growth rates when NH_3 exceeded 8.7 mg.L^{-1} . Similarly, early works reported that NH_3 at concentrations greater than 15 mgN.L^{-1} and at pH values over 8 inhibited the photosynthesis and growth of *S. obliquus* [287, 298]. The resistance of *C. sorokiniana* to very high NH_3 concentrations (362 mg.L^{-1}) was previously reported [301], suggesting that species can also adapt their metabolism and becoming more tolerant to high NH_3 environments over time [295, 287].

In HRAPs initially supplemented with high TAN concentrations, NH_3 toxicity is therefore expected to be associated with elevated pH due to intense photosynthetic activity [287] and could cause the depletion of microalgae culture or promote replacement with other tolerant species to face the prevailing stress. This feature should be magnified considerably during the summer as the conversion between NH_4^+ and NH_3 is also temperature dependent [302].

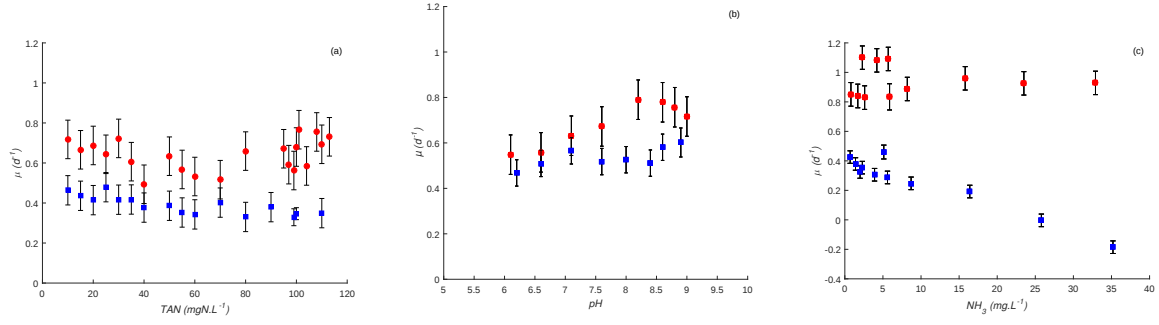


Figure 3.1: Growth rates from multiple comparisons on growth rate values estimated based on ANOCOVA analyses for *C. sorokiniana* (in red) and *S. pectinatus* (in blue) at different levels of
(a) TAN concentrations,
(b) pH conditions,
(c) NH_3 concentrations.

3.2.3 Evidence of facilitation interaction through a modeling approach

A modeling approach was used to identify the growth characteristics of both studied species to predict their dynamics when they are growing together. Based on nutrient dynamics monitored in the HRAP [6], we assumed that TAN was the sole limiting substrate driving the algal growth. Moreover, we considered that NH_3 would have a direct inhibitory effect on cell growth, whose fraction is given by the following expression:

$$f(pH, T) = \frac{1}{1 + 10^{pKa(T) - pH}}$$

with $pKa(T) = 0.09018 + \frac{2727.92}{T+273.15}$ (established within the temperature range of $0^\circ \text{C} - 50^\circ \text{C}$ and a pH range of 6.0 to 10.0 (see [302])).

As a first step, species growth rates were related to external TAN concentrations to calibrate one kinetic model, which could represent satisfactorily most of the data points of the previous test experiments obtained in both SE2 and SE3. The proposed model was inspired from Aiba-Edward's model [226] describing the substrate inhibition at high concentrations and consisting of a modified version of the Monod equation [181], but here it has a slightly different mathematical expression as explained below. While Monod kinetics assumed that only one nutrient limits the growth of cells, the model we propose here includes that a by-product of this limiting nutrient (free ammonia nitrogen $\text{NH}_3\text{-N}$) negatively affects cells growth as given by the following expression:

$$\mu(TAN, pH, T) = \hat{\mu} \frac{TAN}{k + TAN} e^{-\frac{TAN f(pH, T)}{k_i}} \quad (3.1)$$

where $\hat{\mu}$ is the maximum growth rate (d^{-1}), k is the affinity to substrate (mg.L^{-1}), k_i is the inhibition constant of $\text{NH}_3\text{-N}$ (mg.L^{-1}) and $f(pH, T)$ is defined above. This growth function provided

a good fit to experimental data describing the growth kinetics of the two species (see Figure 3.2). The identified kinetic parameters are given in Table 3. From the fit of this kinetic model to data, the species *S. pectinatus* showed a strong affinity for nitrogen with a greater $\frac{\hat{\mu}}{k}$ ratio than that obtained for *C. sorokiniana* (see also the comparison of the two species kinetics with a particular focus on low TAN concentrations in Figure 3.2(b)). In contrast, this latter species has a maximum growth rate (1.10 d^{-1}) much higher than that of *S. pectinatus* (0.63 d^{-1}). Consequently, *C. sorokiniana* would grow well at high TAN concentrations and would also tolerate high NH_3 concentrations as reported by its highest inhibition constant ($k_i = 79.82 \text{ mgNH}_3\text{-N.L}^{-1}$), while *S. pectinatus* would grow best at low TAN concentrations but would show a much faster decline in growth because of its high sensitivity to NH_3 toxicity represented by a low k_i ($2.25 \text{ mgNH}_3\text{-N.L}^{-1}$). Our results are in accordance with older chemostat experiments comparing *S. acutus* and *C. minutissima* under P-limited growth [303].

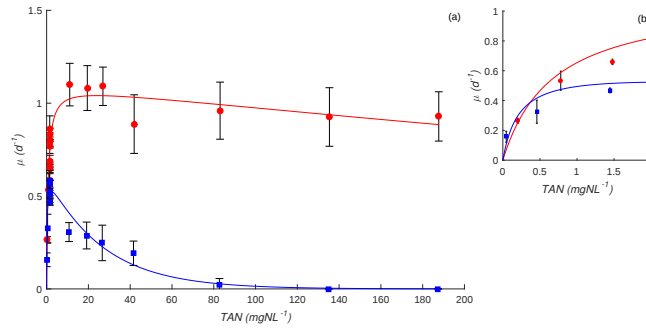


Figure 3.2: SE2 and SE3 data sets (full points) compared to the proposed kinetic model for *C. sorokiniana* (continuous red line) and *S. pectinatus* (continuous blue line) in (a), with a focus on low TAN concentrations in (b) (Data points are the mean of 3 replicate measurements of growth rate).

Parameter	<i>C. sorokiniana</i>	<i>S. pectinatus</i>
$\hat{\mu} \text{ (d}^{-1}\text{)}$	1.10	0.63
$k \text{ (mgN.L}^{-1}\text{)}$	0.68	0.22
$k_i \text{ (mgNH}_3\text{-N.L}^{-1}\text{)}$	79.82	2.25
$\frac{\hat{\mu}}{k}$	1.62	2.85
$J \text{ (least squares criterion)}$	0.08	0.04

Table 3.1: Calibration results on SE2 and SE3 growth data obtained in batch cultures.

The ecological succession of species presenting Monod- and Haldane- [223] kind growth functions have already been shown theoretically [7] but not yet experimentally. The Monod and Haldane kinetics were fitted to our data (results not shown). Their graphs closely resemble those given by (3.1), but with a higher least squares criterion J .

Knowing the growth performances of each species in the laboratory (Figure 3.3(a)), we proposed a predictive model to explore how the assemblage of the two species might react under a fixed pH (8.6) and temperature (25°C) in continuous culture to check if the hypothesis of ecological facilitation

is verified. We used the initial conditions of substrate and biomass and the operational conditions (dilution rate and input substrate concentration) encountered in the previous study on HRAPs [6]. The results of our simulations are summarized in Figure 3.3. These simulations revealed that *S. pectinatus* is unable to grow and is washed out because of the NH_3 toxicity when cultivated alone under high TAN and pH conditions (see Figure 3.3(b)). However, when both microalgae are introduced together under these latter conditions, *C. sorokiniana* grows rapidly first while the growth of *S. pectinatus* is inhibited because of high NH_3 . The rapid consumption of the nitrogen resource by *C. sorokiniana* induces low NH_3 and less nitrogen availability, favoring the growth of the competitive *S. pectinatus* but not *C. sorokiniana* (see Figure 3.3(c)). Therefore, the ecological facilitation between *C. sorokiniana* and *S. pectinatus* would be induced by NH_3 toxicity and would explain their succession. These results also support the empirical evidence in plant communities that the balance between facilitation and competition can shift along an environmental gradient, with facilitation being successively more important in harsh environments [109].

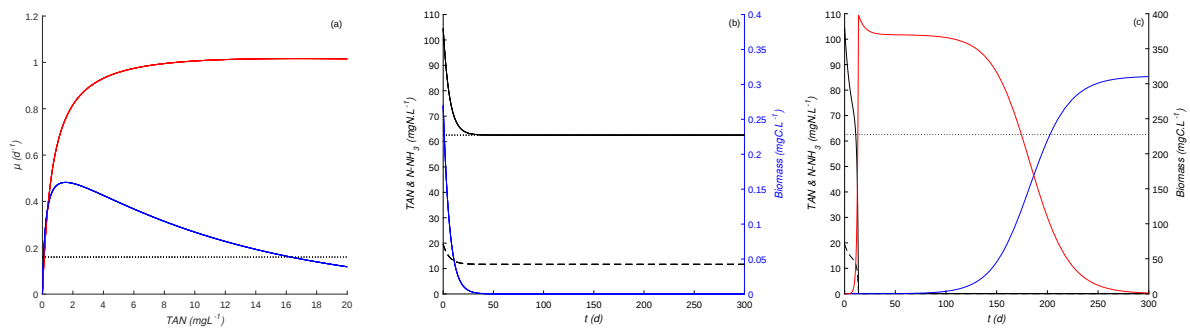


Figure 3.3: Simulation results obtained under a continuous supply with a high TAN concentration (dotted line in (b) & (c)) at a fixed dilution rate (dotted line in (a)).

(a) growth functions previously identified for *C. sorokiniana* (in solid red line) and *S. pectinatus* (in solid blue line),

(b) dynamics when *S. pectinatus* is cultivated alone,

(c) dynamics when *S. pectinatus* and *C. sorokiniana* are cultivated together.

In (b) and (c), the biomass variations over time are presented in blue for *Scenedesmus* sp. and in red for *Chlorella* sp. while the substrate variations are in solid black lines for TAN and in black dashed lines for NH_3 .

3.2.4 Importance of the initial populations densities on the degree of facilitation in simulated HRAP

Using the mathematical approach, we explored the influence of the initial densities of the studied species on some indicators of facilitation degree, which might be useful to further explore the optimization strategies for algal biomass production under high levels of ammonia stress in HRAP. There are different advantages to having a *Scenedesmus* dominance in an HRAP supplemented with wastewaters, as this species possesses a high affinity to nitrogen, is strongly resilient to predators [268], and its biomass can be easily harvested [304] and used for different purposes (e.g. lipid production [305]).

For these reasons, we proposed to study theoretically some proxies of the facilitation efficiency such as resilience and succession times to provide information on the time required for the development of *S. pectinatus* in the HRAP under the previously stated operating conditions.

We defined the resilience time as the duration for *S. pectinatus* to reach its initial biomass value under the presence of the toxic NH_3 concentrations. Moreover, because the succession of the two microalgae is required for maintaining *S. pectinatus* under high nutrient toxic levels, we also defined the succession time as the time for which the two species reach twice the same density level owing to the predominance of *S. pectinatus*. We plotted the iso-values of the resilience and succession times in the (A_1, A_2) plane, where A_1 , A_2 are the initial densities of each species (see Figure 3.4). These diagrams allow to see easily for which pairs of initial densities (A_1, A_2) one may expect low or high resilience or succession time (the shortest time is in blue, and the longest one is red). The diagram in Figure 3.4(a) shows that the resilience time is more affected by the initial biomass concentrations of *C. sorokiniana* than that of *S. pectinatus*. This contrasts with the succession time (in Figure 3.4(b)) which is more sensitive to the initial concentrations of *S. pectinatus*, especially when *C. sorokiniana* is initiated at concentrations values higher than 1 mgC.L^{-1} . Such simulation would be of interest in further control of the diversity within an HRAP supplemented with wastewaters, especially for managing the periods of dysfunction (e. g. sudden algal crash, variations in wastewaters inflow). For example, it could be suggested to increase the initial concentration of *C. sorokiniana* (at a concentration higher than 6 mg.L^{-1}) through bioaugmentation to ensure a rapid reduction of NH_3 toxicity and rapid development of *S. pectinatus* in a minimum of 25 days. On the other hand, the time needed for *S. pectinatus* predominance over *C. sorokiniana* will depend on the initial concentration of *S. pectinatus* and the higher the *S. pectinatus*'s initial concentration would be ($> 12 \text{ mg.L}^{-1}$) the faster the succession would occur (minimum of 80 days). Consequently, our theoretical results depicted with iso-value diagrams showed that the algal resilience and succession times within an intensive algal ecosystem are strongly dependent on the initial populations' densities that may be used to control algal production processes in HRAPs.

3.2.5 Validation of the ecological facilitation in real HRAP

The dynamics of the biomass of *Chlorella sp.* and *Scenedesmus sp.* and the TAN concentrations measured in HRAP operating from 28 April 2015 to 8 September 2015 in Northern France [6] were compared to model simulations (see Figure 5) using the growth functions parameters of *C. sorokiniana* and *S. pectinatus* represented in Table 3. We made few changes to the initial model by adding mortality terms and considering different yields parameters values from those determined experimentally (all regarded as unknown constants) thus, still keeping the set of equations as simple as possible. The mortality terms were added to take into account the grazing effect on each algal species in an indirect way given the presence of predators in the HRAP. Changes in yield coefficients was requested knowing that heterotrophic bacteria were also growing in the pond and consuming nitrogen. The estimated parameters of yield and mortality coefficients obtained from the comparison of the model

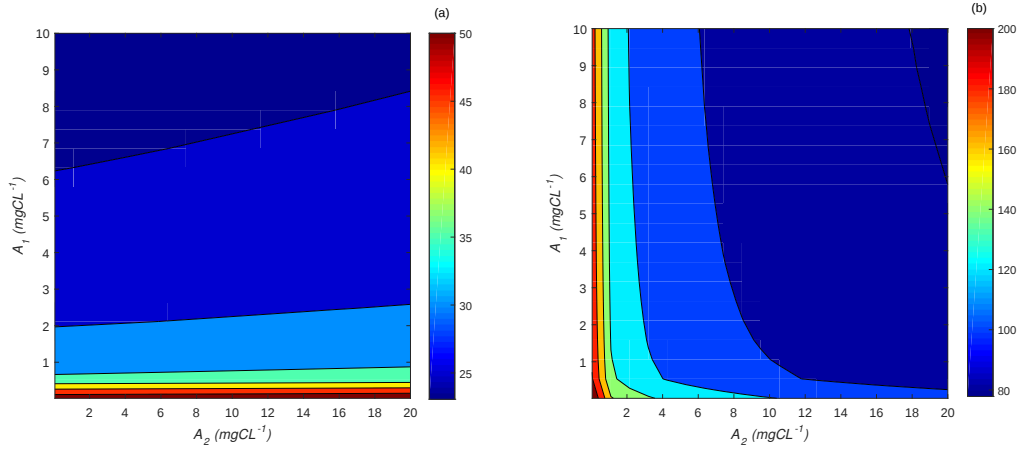


Figure 3.4: Isovalue diagrams: resilience time (a) and succession time (b) (in days) depending on the initial biomass densities of *C. sorokiniana* (A_1) and *S. pectinatus* (A_2) (in mgC.L⁻¹) under a continuous supply of a high nitrogen concentration.

dynamics with data from HRAP are presented in Table 4. Assuming that higher predation pressure corresponds to a higher mortality coefficient, our results suggest that *Chlorella sp.* was likely more sensitive to grazing than *Scenedesmus sp.* known to produce a grazer-morphological defense according to a previous study [268]. However, the washout of *Chlorella sp.* at the system steady-state is probably not due to high pressure by a high mortality coefficient but rather to competition with *Scenedesmus sp.* when the environment becomes depleted of the nitrogen resource, as demonstrated through the previous simulation results in Figure 3.3(c).

We noted that the estimated yields coefficients in laboratory chemostat experiments after three days at steady-state (i.e. 5.9 ± 0.7 gC/gN and 5.0 ± 0.6 gC/gN for *C. sorokiniana* and *S. pectinatus*, respectively) were higher than those identified in the HRAP (see Table 4), which may be explained by the presence of denitrifying bacteria producing N₂ subsequently lost through degassings [6].

In the HRAP, the first bloom of *Chlorella sp.* happened at high concentrations of NH₃ and has been replaced later by the bloom of *Scenedesmus sp.* (data in Figure 3.5(a)). The distribution of these species was consistent with our experimental and modeling results on the species *C. sorokiniana* and *S. pectinatus* (see Figure 3.3). This validates the importance of facilitation during the biological colonization of the HRAP under toxic levels of NH₃. These results confirmed our initial hypothesis that the colonization of hypertrophic ecosystems by the stress-tolerant *Chlorella sp.* is a prerequisite for the development of the sensitive *Scenedesmus sp.* to NH₃ toxicity. *Chlorella* is usually considered as an invasive phytoplankton or pioneer species because it maintains fast growth rates and assimilates resources with short generation times, and can dominate over slower-growing species [306, 307]. In contrast, *Scenedesmus* is considered an affinity specialist [303], and it can dominate in HRAPs over *Chlorella* and colonize the HRAP [6] at low and nontoxic nutrient levels. Therefore, based on the model confrontation to real data in HRAP, pioneer organisms (here *Chlorella*) can modify their

chemical environment by reducing ammonia toxicity, which can increase the fitness of the growth of sensitive and specialist organisms (here *Scenedesmus*).

Our study sheds a light on an ecological interaction within aquatic microbial communities that is rarely discussed in the literature, although it may explain ecological successions that occur without any visible external variations of growth conditions or mortality. Similarly to various types for macro-organisms [108], the ability of aquatic microorganisms to drastically modify their immediate environment would impact the growth of neighbors. Because microalgae can change their light environment when growing (i.e. light attenuation by algal biomass), the growth of photoinhibited algal species can be facilitated by the biomass of other algal species less sensitive to photoinhibition [129]. In a similar way, under toxic metal stress, it has been suggested that the growth of Cd-sensitive microalgal species may be promoted by Cd-tolerant microalgal species reducing Cd in the media to low levels [118]. Therefore facilitation within the aquatic microbial communities through the reduction of inhibiting factors is likely to be a widespread interaction applied for a large range of environmental stress.

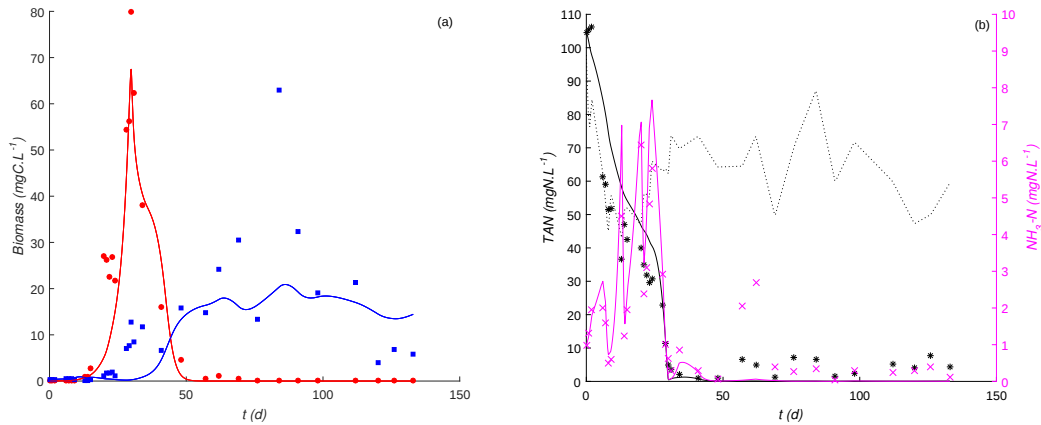


Figure 3.5: HRAP data points compared to the model prediction (in continuous lines) under a continuous supply of wastewater containing fluctuating concentrations of TAN (dotted black line).
(a) biomass variations over time of *Chlorella sp.* (in red) & *Scenedesmus sp.* (in blue),
(b) substrate variations over time of TAN (in black) & NH₃ (in magenta).

Parameter	<i>C. sorokiniana</i>	<i>S. pectinatus</i>
y^* (gC/gN)	2.81	0.30
m^* (d ⁻¹)	0.58	0.02
J (least squares criterion)	96.72	

Table 3.2: Calibration results on HRAP data.

3.3 Materials and Methods

3.3.1 HRAP experiment

The pre-existing data used in this study were obtained in HRAP of 1.9 m^3 working volume, continuously fed by pre-treated wastewaters (after screening and removing grit, sand, and grease) with a constant retention time of 6 days (see [6]). Algal blooms occurred naturally in the open pond without any algal inoculation. The period covered by this study was from 28 April 2015 to 8 September 2015. For the present study, we used the data obtained through analytical monitoring that was performed on the influent wastewater and on samples taken from the HRAP. They included water temperature, chemical analyses (TAN and pH), and the algal biomass of the two dominant algal species (*Chlorella sp.* and *Scenedesmus sp.*, which were identified by microscopy) estimated using cell count from flow cytometry and converted into carbon units.

3.3.2 Microalgae strains, cultivation conditions, and laboratory experiments

One Strain of freshwater microalgae *Chlorella sp.* and *Scenedesmus sp.* was isolated from the HRAP samples taken in October 2015. Individual strains were isolated in Z8 media [308]. The Z8 media was modified to $Z8NH_4$ by replacing all nitrogen forms with ammonium salt (NH_4Cl) as the sole source of nitrogen in the growth medium and by adding the HEPES buffer at 20 mM. The two species were maintained and cultivated under continuous light ($100\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$) and temperature (25°C). We performed three sets of experiments (SE1, SE2, and SE3) in batch reactors with a working volume of 40 mL. Each set was preceded by a pre-incubation phase in which the two species are preadapted to the fixed cultivation conditions in each set of experiments and providing sufficient fresh volumes for inoculations. The pre-incubations were performed either in continuous mode (in 2 L photobioreactors stirred at 300 rpm, one-sided illuminated at $130\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, before SE1) or in batch mode (in a shaken flask at 150 rpm of 200 mL, before SE2 and SE3). All batch experiments (in pre-incubation or in the three-test sets) were performed in laboratory incubators under a temperature set at $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, an orbital agitation at 150 rpm speed and an incident light intensity set at $50\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ in SE2 and SE3.

The first pre-incubation in continuous photobioreactors were performed to determine the yield constants and provide sufficient fresh volumes for later inoculation in batch culture. Thus, each strain was growing for about 15 days until the biomass stabilization, under a constant temperature of 25°C and a continuous supply of sterilized medium ($C : N : P$ ratio at about 1 : 34 : 1) at a fixed pH value of 7.5 and a fixed dilution rate (0.25 d^{-1}). After that, the growth of the two species was assessed in batch cultures (as described above) under different initial TAN concentrations ranging from 10 to 110 mg.L^{-1} keeping constant the concentrations of all other medium components. The pH value was maintained at 7.5 in all batch reactors of SE1.

In the second set of experiments SE2, prior to the experiment, the two species were pre-incubated in batch cultures for about 6 days in a sterilized medium of modified $Z8NH_4$ with a $C : N : P$ ratio

at about 88 : 2 : 1 and a pH set at 7.5. Then, SE2 experiments were performed (as described above) under different pH conditions initially adjusted to 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.4, 8.7, and 9.0 with NaOH or HCl while using a similar initial concentration of NH_4Cl of 2 mg.L⁻¹ that was supposed to be nontoxic for both microalgae strains.

Prior SE3, the 6-days pre-incubation of two species was performed in a sterilized medium of modified $Z8NH_4$ with a $C : N : P$ ratio at about 88 : 8 : 1 and a fixed pH value initially set at 8.6 (corresponding to the average value of pH measured in HRAP). Finally, in SE3, the growth of the two species was assessed in batch cultures under a large range of initial NH_4Cl from 1.2 to 187.7 mg.L⁻¹ keeping the pH at 8.6.

3.3.3 DNA isolation, PCR, and sequencing

Genomic DNA was extracted from a 10 mL sample filtered onto a 0.2 μ m membrane (PALL Supor 200 PES), using the standard phenol/chloroform method [309]. The 18S and ITS rDNA were amplified in PCR reactions using the Pfu polymerase (Promega) with the primers EAF3 (5'-TCGACAATCTGGTTGATCCTGCCAG-3') and ITS055R (5'-CTCCTTGGTCCGTGTTTCAAGACGGG-3') [310]. The PCR products were purified using the QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) and sequenced using two primers (V4 Forward: 5'-AATTCCAGCTCCAATAGCGTATAT-3' and ITS Forward: 5'-CCTTTGTACACACCGCCCGTCG-3') to target specifically the variable V4 region of the 18S rDNA and the ITS region. Sanger sequencing was performed at Eurofins Genomics (GATC services).

3.3.4 Sample analyses

The pH in each culture solution was determined daily (pH meter Symphony SP70P, VWR). For algal biomass estimation, samples were shaken to bring all the cells into suspension and subsamples were daily taken to measure absorbance. In SE1, the growth of algae was measured using optical density OD of the culture with a microplate reader (FLUOSTAR, BMG Labtech) at 650 nm. In SE2 and SE3, cell mass was measured by fluorescence (EX 450 nm, EM 680 nm) and OD at 650 nm, 730 nm, and 680 nm using a microplate reader (CHAMELEON, Hidex). Two different readers have been used due to a technical problem in CHAMELEON after the SE1 period.

In SE2 and SE3, subsamples were collected at the beginning and at the end of each experiment, for nutrient and biomass analysis. Samples were then filtered using *i)* 0.2 μ m Sartorius filters for measuring nutrients in filtrates and *ii)* pre-combusted AE filters for measuring carbon biomass onto filters. Ammonia nitrogen was measured with a spectrophotometric test kit (SpectroQuant, Merck Millipore) and orthophosphate phosphorus according to an optimized molybdenum blue method [311]. After drying the filters (24 h, 60 ° C), the particulate organic carbon representing mainly algal carbon biomass was analysed using an ANCA mass spectrometer (Europa Scientific).

3.3.5 Data Analysis

We performed the covariance analysis using the "aoctool" function of Matlab to compare significant differences in growth rates μ of algae after 48 h exposure at each tested condition. The technique required the grouped data of logarithm of the biomass $\ln(x)$ measured at time t (during the time period 0 to 48 h) for all tested condition. We modelled $\ln(x)$ as a linear function of t to determine whether the slope of the line, which represents an estimate of μ , varies among groups. Based on the model fit of the separate-lines model, the stats output structure from "aoctool" served as input to the multi-compare test "multcompare" function of Matlab, which allows for testing either slopes or intercepts.

3.3.6 Modeling procedures

The first identifications of the growth function parameters for the two species were performed by fitting the proposed kinetic model (3.1) to the assessed values of specific growth rate data obtained in SE2 and SE3 for which cultivation conditions are either identical or different but would not be disruptive of the growth rates except for the initial TAN concentration. The optimal growth parameters were calibrated by the "fmincon" function of Matlab optimization toolbox used in minimizing a mean square criterion $J = \sum_{i=1}^n (\mu_{i_{exp}} - \mu_{i_{sim}})^2$, where $\mu_{i_{exp}}$ and $\mu_{i_{sim}}$ are the normalized experimentally estimated and model generated values of growth rates at the i^{th} experimental condition, and n is the total number of estimated growth rates corresponding to the total number of tested conditions TAN concentrations in SE2 and SE3.

Secondly, we used the identified growth functions on (3.1) to simulate the following system (3.2) in order to explore the species dynamics under a fixed pH (8.6) and temperature (25 ° C) in a homogeneous continuous reactor.

$$\begin{cases} \dot{A}_1 &= (\mu_1(N) - D)A_1 \\ \dot{A}_2 &= (\mu_2(N) - D)A_2 \\ \dot{N} &= -\frac{1}{y_1}\mu_1(N)A_1 - \frac{1}{y_2}\mu_2(N)A_2 + D(N_{in} - N) \end{cases} \quad (3.2)$$

This set of equations gives the variations over the time of both algal biomass of *C. sorokiniana* and *S. pectinatus* (in mgC.L⁻¹) and substrate concentrations ($TAN = NH_3 + NH_4^+$) (in mgN.L⁻¹), denoted $A_1(t)$, $A_2(t)$ and $N(t)$, respectively. The growth functions $\mu_1(N)$ and $\mu_2(N)$ depend only on TAN (when $T = 25$ ° C and $pH = 8.6$, according to (3.1) and the parameters presented in Table 2), as the sole source of nitrogen supplied continuously at the fixed dilution rate $D = 0.16$ d⁻¹ and the constant concentration $N_{in} = 62.54$ mgN.L⁻¹ of wastewater encountered in the studied HRAP. The yield coefficients were taken equal to $y_1 = 5.93$ gC/gN and $y_2 = 4.98$ gC/gN for *C. sorokiniana* and *S. pectinatus*, respectively. These values were theoretically calculated from continuous photobioreactors experiments performed at pre-incubation for SE1 and given by $y_i = \frac{A_i^*}{N_{in} - N_i^*}$, where A^* and N^*

are respectively the algal biomass and nitrogen concentrations at steady-state). The system (3.2) was solved using "ode23t" differential equation solver using the following initial conditions of substrate and biomass: $N_0 = 104.50 \text{ mgN.L}^{-1}$, $A_{10} = 0.0123 \text{ mgC.L}^{-1}$ and $A_{20} = 0.2698 \text{ mgC.L}^{-1}$.

Under the same conditions as mentioned above, we theoretically studied the algal resilience and succession times as proxies of the facilitation efficiency for different initial biomass concentrations (in mgC.L^{-1}) ranging between $[0.0123, 10]$ and $[0.05, 20]$ for *C. sorokiniana* and *S. pectinatus*, respectively. The iso-value diagrams were obtained using the "contourf" plot of Matlab.

Third, we validated the hypothesis of ecological facilitation on real dynamics in HRAP. We used the whole dynamics simulated over the time from the given initial condition until the system was at a quasi steady-stat and we compared data to the following model equations (3.3) including terms of mortality m_1^* and m_2^* on A_1 and A_2 , respectively:

$$\begin{cases} \dot{A}_1 &= (\mu_1(N, pH, T) - D - m_1^*)A_1 \\ \dot{A}_2 &= (\mu_2(N, pH, T) - D - m_2^*)A_2 \\ \dot{N} &= -\frac{1}{y_1^*}\mu_1(N, pH, T)A_1 - \frac{1}{y_2^*}\mu_2(N, pH, T)A_2 + D(N_{in} - N) \end{cases} \quad (3.3)$$

In this new set of equations (3.3), we considered the variations over the time of N_{in} , pH, and T implemented into the model with interpolations performed between the real data points measured over time within the HRAP. We identified the unknown parameters (m_1^* , m_2^* , y_1^* , and y_2^*) of the dynamic model using "fmincon" function of Matlab optimization toolbox. The optimal parameters assuring the best fit to data were constrained to be positive and defined in predefined intervals of boundary values after 100 consecutive estimations. Mortality constants were estimated within the interval $[0, 1]$ (d^{-1}), while yields coefficients were supposed to be ranged between *i*) minimal values theoretically calculated during the period of the dominance of each species in the HRAP (i.e. $1.3 \pm 0.1 \text{ gC/gN}$ and $0.5 \pm 0.2 \text{ gC/gN}$ for *Chlorella sp.* and *Scenedesmus sp.*, respectively) and *ii*) maximal values identified in our laboratory chemostat experiments after three days at steady-state (i.e. $5.93 \pm 0.66 \text{ gC/gN}$ and $4.98 \pm 0.58 \text{ gC/gN}$ for *C. sorokiniana* and *S. pectinatus*, respectively). The mean squared error was used as the criterion function for the model parameters estimation and was calculated as the square root of the variance of the observations (of A_1 , A_2 , and N) and divided by the number of measurements.

Acknowledgements

We thank Elodie Lanouguère for microalgae isolation and cultivation, Ariane Atteia for identifying the microalgal strains, Martine Fortune for ammonia analyses, Patrick Raimbault for carbon content analyses, and Christine Felix for giving helping hand to experiments monitoring. We would also like to thank Bénédicte Fontez for assistance with statistical analyses, and Jérôme Harmand for fruitful comments and discussions during the MODEMIC research school on resource-consumer models

(21–25 September 2015). This study benefited from the HRAP demonstrators developed and operated by SAUR. This work was supported by the ADEME French Agency and the LabEx NUMEV incorporated into the I-Site MUSE funded by the French Research Agency (ANR) that have both funded the PhD grant of the first author. This study was also supported by the PHYCOVER project, which was funded by the French National Agency for Research (ANR-14-CE04-0011).

Author contributions statement

A. R, E. L. F, and E. F participated actively in conceiving the experiments, coordinated the research work, and critically revised the manuscript. E. K designed and conducted laboratory experiments, analyzed data, performed mathematical simulations, and wrote the manuscript.

Additional information

Competing interests: The author(s) declare no competing interests.

3.4 Principales contributions et perspectives sur les interactions algue–algue vis-à-vis de la ressource azotée

Ce travail avait pour but, outre l'étude des interactions algue–algue d'une manière globale, de comprendre une succession écologique observée dans un LHRA expérimental entre deux espèces de microalgues qui se développent classiquement dans des bassins utilisés pour le traitement des eaux usées urbaines en milieu extérieur. Une hypothèse de facilitation écologique entre les deux microalgues *C. sorokiniana* et *S. pectinatus* a été avancée vis-à-vis de la fluctuation de l'azote pour expliquer leur succession en bassin. Ce travail a associé des expérimentations et de la modélisation mathématique pour mettre en évidence le comportement des espèces en testant les hypothèses de facilitation via i) la réduction d'une inhibition due à toxicité de l'ammonium [203] ou ii) la toxicité de l'ammoniac [298]. Des cinétiques de croissance spécifiques a été établie et comparée entre les espèces. Une expression de cinétique, inspirée de [226], a été proposée pour décrire les données de taux de croissance, et identifier paramètres cinétiques appropriés pour chaque espèce. Cette expression a permis de tenir compte de la toxicité d'un sous-produit du substrat azoté, qui est l'ammoniac NH_3 , dont la teneur dépend de la température et du pH du milieu. Avec des paramètres différents en fonction de l'espèce, elle permet de représenter des cinétiques de type « Monod - Haldane » obtenues respectivement pour *C. sorokiniana* et *S. pectinatus* en fonction de l'azote. Ces résultats ont montré que l'espèce *C. sorokiniana* est plus résistante et rapide que *S. pectinatus* sous de fortes concentrations d'azote ammoniacal et pour des valeurs de $\text{pH} > 8$ (ce qui correspond à des concentrations en $\text{NH}_3 > 8.7 \text{ mgL}^{-1}$). Sous ces mêmes conditions, la croissance de *S. pectinatus* est inhibée. Cependant, elle présente une meilleure affinité pour l'azote.

La calibration du modèle de compétition de type « Monod - Haldane » [7] sur l'azote et sa validation sur des données du bassin en extérieur ont permis de démontrer une facilitation écologique qui se traduit par une « succession » de dominance permettant d'expliquer que *S. pectinatus* est plus performante pour abattre l'azote contenu dans les eaux usées, mais doit être aidée par *C. sorokiniana* pour s'installer et permettre de bonnes performances de dépollution.

S. pectinatus a démontré de meilleures performances pour consommer l'azote et le phosphore d'après nos résultats obtenus en photobioréacteurs opérés en mode continu. De plus, sa capacité à résister aux pressions prédatrices et de sa biomasse intéressante pour la production de lipides [268, 305, 304], rend encore plus opportune sa présence et stabilisation dans le bassin.

Des stratégies d'optimisation et de contrôle ont été explorées en utilisant le modèle calibré au laboratoire à l'aide de simulations numériques pour tester les conditions qui permettent de garder l'espèce (*S. pectinatus*) dans le système de production. Nous avons montré que les temps de résilience et de succession au sein du consortium (cultivé dans les conditions du bassin extérieur c'est-à-dire à la même vitesse et concentration d'apport en nutriments) dépendent des concentrations initiales des deux espèces algales. Le temps de résilience est défini comme étant le temps mis par *S. pectinatus* pour atteindre sa concentration initialement introduite, étant donné qu'elle décroît au début à cause de la

toxicité du milieu ; quant au temps de succession est défini comme le temps mis pour que les deux espèces aient la même concentration, ce qui en résulte une prédominance de *S. pectinatus*. Les résultats de prédictions ont été présentés sous forme de diagrammes donnant une idée sur le temps de facilitation nécessaire en fonction du couple de concentration des deux espèces initialement introduites dans le bassin.

Pour conclure, cette étude a démontré qu'une première colonisation s'opère grâce à une espèce pionnière, opportuniste et résistante (*C. sorokiniana*) qui présente une croissance rapide tout en réduisant la toxicité (fortes teneurs en ammoniac NH_3) des eaux à traiter. Dans ces nouvelles conditions, une autre espèce plus efficace peut se développer (car initialement inhibée par les fortes concentrations de NH_3) par facilitation écologique et finalement gagner la compétition (pour les faibles teneurs en azote résiduelles). Ce résultat montre que les successions observées lors de la colonisation naturelle d'un environnement initialement défavorable riche en ammoniac dans les bassins extérieurs à haut rendement algal ne sont pas régulées uniquement par les variations climatiques, mais aussi par les interactions entre les espèces présentes, à travers leur capacité de modifier leurs conditions de croissance. Une modélisation dynamique de ce phénomène écologique d'interaction positive observé dans le bassin extérieur étudié, a permis de prédire qu'il serait impossible de faire pousser *S. pectinatus* sous les mêmes conditions imposées par l'effluent (concentration et taux de dilution) si l'espèce *C. sorokiniana* n'est pas ajoutée initialement même en petite quantité (lors de l'inoculation du bassin). Sous ces conditions, il a été aussi possible de prédire le temps nécessaire pour qu'une facilitation s'opère sous la présence du stress chimique en fonction des concentrations initiales des deux espèces et de suggérer la possibilité de contrôler le système de production par bioaugmentation. Le principe de facilitation démontré dans cette étude peut être appliqué à d'autres espèces permettant à des microalgues de se développer dans un environnement initialement défavorable à leur croissance (e.g. riche en composés toxiques, turbide car riche en matière organique ou trop fortement exposé à la lumière). Ce même principe mérite donc d'être testé vis-à-vis de la disponibilité de la ressource lumineuse.

Les perspectives de ces travaux seraient de valider le modèle proposé sur un assemblage des deux espèces au laboratoire et en bassin extérieur afin de pouvoir contrôler la biomasse totale produite. Ce contrôle peut être couplé avec l'approche des observateurs « par intervalles » (cf. 1.4). Compte tenu des possibilités de contrôle sur les paramètres durant les phases transitoires, notamment quand les conditions deviennent défavorables à la croissance de *S. pectinatus* (e.g. apport soudain d'ammonium pouvant entraîner une chute de production), l'ajout de l'espèce facilitatrice devrait aider la culture à repartir plus vite. L'application d'un taux de dilution périodique pourrait aussi favoriser la coexistence des deux espèces, pouvant également protéger la culture. Une autre action possible serait d'installer un système de régulation du pH par injection du CO_2 permettant de maintenir l'ammoniac à des teneurs basses pour éviter l'inhibition. Dans ce cas, il est possible que le modèle nécessite un réajustement pour tenir compte des effets supplémentaires du CO_2 si ces derniers s'avèrent concluants au laboratoire.

A new kinetics model to predict the growth of micro-algae subjected to fluctuating availability of light

Ce chapitre a été soumis dans *Algal Research* en 2020.

Emna Krichen^{1,2,3}, Alain Rapaport², Émilie Le Floc'h¹ et Éric Fouilland¹

¹ : UMR MARBEC, Univ. Montpellier, CNRS, IFREMER, IRD, Sète, France

² : UMR MISTEA, Univ. Montpellier, INRAE, SupAgro, Montpellier, France

³ : Agence de l'environnement et de la Maîtrise de l'Energie, Angers, France

Résumé

La lumière est un facteur clé pour la croissance des microalgues dont l'optimisation est essentielle dans les systèmes de production à haut rendement algal. Plus la densité de la population de microalgues est élevée, plus la disponibilité de la lumière est réduite, entraînant une diminution de la vitesse de croissance à cause de l'effet d'auto-ombrage, tandis que la photoinhibition, pourrait s'avérer particulièrement plus importante lorsque la densité de la population est faible. Plusieurs modèles de la littérature ont été développés pour décrire ces phénomènes lumineux et prédire la croissance des microalgues, notamment en monoculture. À l'aide d'une expression simple utilisée pour décrire l'atténuation de la lumière, nous avons proposé et justifié une nouvelle fonction de croissance, qui tient compte à la fois des effets de photoinhibition et de photolimitation. Cette nouvelle expression, comparée avec les données expérimentales, permet de décrire la réponse des microalgues à une large gamme d'intensités lumineuses disponibles (insuffisantes ou fortes) pour les microalgues et dépend explicitement de l'intensité lumineuse incidente et de la concentration en biomasse algale. Cette expression est aussi simple que pratique pour des applications en photobioréacteurs de différentes tailles et géométries sous des conditions de non-limitation en nutriments. Elle s'étend naturellement aux cas de croissance multi-espèces et donne un modèle dynamique qui peut simuler des expériences en monoculture ainsi qu'en polycultures. L'étude du modèle de compétition pour la lumière a prédit une exclusion compétitive, qui a été aussi démontrée expérimentalement. Ce modèle ouvre de nouvelles perspectives pour le contrôle et l'optimisation des cultures mixtes de microalgues.

Abstract

Light is a key environmental factor for the growth of micro-algae, and optimizing the capture of light is critical for high efficiency production systems. As the density of the population of micro-algae increases, the availability of light decreases, leading to a reduction in the growth rate because of mutual shading, while other effects, such as photo-inhibition, might be especially frequent when the population density is low. Several models in the literature have been developed to take into account light phenomena and predict micro-algal growth, particularly in a mono-culture. With the help of a simple expression for the attenuation of the light, we propose and justify a new growth function that incorporates both photo-inhibition and photo-limitation. In agreement with the experimental data, this new formulation describes the micro-algal response to a wide range of situations of excessive or insufficient light intensities through an explicit dependence on both the incident light and the biomass concentration. While simple, the proposed expression can be satisfactorily applied to practical cases under nutrient replete conditions in photo-bioreactors with different sizes and geometries. It extends naturally to the growth of different species, providing a dynamic model which can simulate experiments in a mono-culture as well as in poly-cultures. The investigation of the competition for light-limited growth shows that the model predicts competitive exclusion, which has also been experimentally demonstrated. This leads to new perspectives for the control and optimization of mixed micro-algal cultures.

4.1 Introduction

The study of different aspects related to the behaviour of a micro-algae culture growing in an intensive culture system has gained renewed interest because of the wide fields of application of these photosynthetic microorganisms. Micro-algae are viable sources of biological compounds and constitute a renewable and environmental-friendly feed-stock [312]. Their intensive cultivation is used for the production of high-value bio-products and bio-fuels and also for the treatment of polluted waters. The selection of the appropriate micro-algae species and appropriate methods of culture is essential to guarantee the economic feasibility of the intensive production of micro-algae. *Chlorella* and *Scenedesmus* have been considered promising candidates for wastewater treatment ([313, 125]) and bio-fuel production ([313, 314, 315]), thanks to their maximum growth rates, biomass yields, and lipid and carbohydrate contents, which can reach high levels.

In a controlled culture system, the growth of micro-algae may be affected by a combination of environmental parameters, such as light intensity, photo-period, temperature, pH, and composition of the nutrients of the culture system. When nutrients are provided in sufficient quantities and the pH is maintained at its optimal value, the efficient use of light is essential to optimize and control the growth of an algal culture to ensure the success of industrial production processes, since the light regime and photo-period are critical components that directly affect the production of biomass ([316, 317, 318, 319]).

Several studies on the effects of light on the growth of micro-algae have been carried out based on experimental as well as theoretical approaches, using fundamental concepts for understanding the dynamic behaviour of light-limited cultures in photo-bioreactors or outdoor raceways. The proposed mathematical models of micro-algae share, in general, the common objective of having a growth rate as a function of the light irradiance received by micro-algae. According to the typical photosynthesis-irradiance curve (P–I curve), describing the response of the rate of photosynthesis to changes in the intensity of the light, three distinct light regimes are depicted. At low intensities, the photosynthesis rate of the algal cells is initially affected by photo-limitation and is usually proportional to the intensity of the light until reaching a saturation point at which the growth rate is at its maximum attainable value and the algae has become light saturated. Beyond this point, the growth rate is negatively affected due to photo-inhibition ([37, 36, 38]), defined as the degradation of key proteins at high light intensities, which causes a loss of photosynthetic yield and productivity. While photo-inhibition may appear on a short time scale under high irradiance, the response to changes in the long term average irradiance is usually referred to as photo-acclimation [320, 210]). This phenomenon is linked to the ability of cells to maximize their light absorption capacity under low light and to minimize energy flow under high light by various changes in pigmentation, macro-molecules (e.g. enzymes associated with photosynthesis and respiration), and cell morphology (e.g. cell volume, thylakoids stacking, and transparency) [53, 54, 55]. These two phenomena may affect the P–I curve dramatically [321, 322, 323]. The mathematical formulations of the effects of different light phenomena on photosynthesis

require more or less complex mechanistic models, depending on the study and the model's application scale.

In most of the studies, incident light is coming from above the algal culture growing in photo-bioreactors. For low-dense cultures it is often assumed that all micro-algae receive the same light intensity. Traditionally, the specific growth rate as a function of the light intensity (P-I curve) is assumed to follow a Monod-like function [181, 230, 324] or some other non-monotonic expression that accounts for photo-inhibition, such as a Haldane-like function [223, 325, 326] or the Steele function [234, 228]. However, modeling micro-algae growth in mass culture must consider the response of micro-algae to light intensity and the distribution of the light intensity in the medium. Because the biomass and other light-absorbing substances generate a light gradient in photo-bioreactors, the light intensity that micro-algae can face becomes a function of the depth and biomass concentration within the culture. Thus only micro-algae near the surface receive the light intensity at which the culture is illuminated, while micro-algae located in the darkest zone of the reactor may not receive any light. Light attenuation conditions are affected by biological and physical parameters such as biomass concentration and incident light flux. The light attenuation phenomenon is usually described by the Beer–Lambert law of light absorption [166, 180], according to which the light penetration decreases exponentially with increasing biomass concentrations. Despite the fact that most photo-bioreactor models rely on the Beer–Lambert law, which is based on the assumption that the light is not scattered in the medium, its use increases the inaccuracy in high-density cultures where multiple scattering events occur ([232, 240, 241, 242]). The local light availability can be calculated using complicated equations accounting for light absorption and scattering in the reactor. However, it is important to note that with more complications (in the expressions of the light distribution or in modeling growth at the cell level), they involve additional input parameters whose determination can be difficult, expensive, or time consuming. Moreover, a large number of parameters can lead to over-fitting, resulting in the model's being poor at predicting the actual trends. In practice, the biomass concentration and the instantaneous light intensity available in the culture medium can be easily monitored, allowing following the light attenuated throughout the cell cultivation period.

When accounting for the impact of light gradients, the average specific micro-algae growth rate can be expressed by summing the local growth rates determined through a biological model, depending on the local light intensities faced by micro-algae cells. This approach can be described using, for example, a Monod-like function coupled with the Beer–Lambert law for the light distribution [240]. Another approach is to describe the average growth rate through a biological model (for instance, the Monod function) that depends on the average light intensity received by the micro-algae (which can be described using the Beer–Lambert law) [228]. This approach assumes that the micro-algae in a well-mixed culture are, on average, exposed to the same light intensity and, therefore, have the same average growth rate [166]. Given that light use by micro-algae is closely related to light attenuation conditions in the bulk of cultivation systems, we evaluate in the present study the accuracy of modeling the algal growth rate as a function of the average attenuated light by cell density. We

used two species *C. sorokiniana* and *S. pectinatus*, as candidates for the biological model, growing in one-sided illuminated photo-bioreactors under nutrient replete conditions and constant temperature. The light attenuation inside the culture is assumed to be non-emitting and non-fluorescing, depending on two independent phenomena: (i) absorption by the pigments and (ii) scattering by the whole-cell mass [230]. This light phenomenon was approximated by the summation of the light intensity altered/shaped by the biomass through a simple equation of the form of Michaelis–Menten kinetics (as suggested by [327]), and the incident light intensity (measured perpendicularly to the light source on the boundary of the reactor) modified by the photo-bioreactor and its liquid content. This relationship was validated regardless of the value of the initial light intensity and was an adequate approach, able to cover a wide range of cell concentrations. We then develop a simple growth function explaining the experimental results of the response of the process-rate of the micro-algae to a broad range of incident light intensities and biomass concentrations. This new formulation can be considered one of the simplest modeling approaches to describe the behaviour of micro-algal cells in response to light phenomena.

This paper is organized as follows. The influence of the intensity of the incident light and the biomass density on the specific growth rates of the two micro-algae candidates (growing in batch cultures) is discussed in Sections 4.3.1 and 4.3.2, respectively, through comparisons of the data with classic kinetic models. The light attenuation equation is validated in Section 4.3.3 and then incorporated in a new growth formulation in Section 4.3.4, allowing the description of the experimental data sets obtained from the batch cultures. In Section 4.3.5, the validation of the new kinetic function is presented for the case of continuous light-limited photo-bioreactors using dynamic data for the biomass obtained in mono-cultures and poly-cultures. Finally, in Section 4.3.6, some cases of the outcome of competition for light are investigated through simulations of the validated multi-species dynamic model under different operating conditions of removal rates and periodic light supply, in continuous mode photo-bioreactors.

4.2 Materials and methods

4.2.1 micro-algae strains and pre-culture medium

The micro-algae were isolated in October 2015 from samples from the high rate algal pond (HRAP) located in the north of France and operated for processing urban wastewater [6, 328]. The isolated species were identified as *C. sorokiniana* and *S. pectinatus* by the Sanger sequencing method [328]. The species were systematically sub-cultured (sub-culturing of 10% of the inoculum at each cycle) in flasks separately in fresh medium Z8NH₄ (Z8 media [308] buffered with HEPES at 20 mM, enriched with ammonium salt (NH₄Cl) as the sole nitrogen source, and complemented with sodium carbonate (Na₂CO₃) to reach a C:N:P ratio of about 88:8:1), and maintained in laboratory incubators under continuous light (100 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$) and temperature 25°C.

4.2.2 Experimental procedure and cultivation conditions

For testing the effects of light on the growth of the biomass for each species, pre-incubations were carried on for 5-day batch cultures under a continuous light intensity of $100 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ in a 100 mL flask. Then, each species was diluted (by 2%, 3%, 7%, 10%, 13%, 20%, 27%, 33%, 40%, 47%, 53%, 60% in 40 mL flasks) with the relevant culture medium where the pH was maintained constant (at a value of 7.5) in order to test the influence of different biomass concentrations. The incubation of these cultures were carried on for 3-day batch culture in a type 96 microwell plate (Greiner CELLSTAR® 96 well plates), filled with the 12 different dilutions with 8 replicates (with a working volume of 250 μL per well) for each dilution. Nine identical microwell plates were prepared for each algal species, and then each of them was placed at a fixed position under nine fixed light intensities (from 0 to 900 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$) in four identical laboratory incubators (Panasonic MIR-154-PE) where the temperature was set at 25°C . The incident light intensities (from cool white Luxeon Rebel LEDs, Lumileds) were measured above and below each microwell plate filled with the culture medium using the scalar PAR sensor ULM 500 Walz.

Thus, a total of 108 combinations of transmitted light intensity and population density were used, including the 12 initial dilutions (equivalent to the diluted initial biomass) and 9 light intensities. The algal growth in the microwell plates was evaluated for each species by fluorescence measurements after 48 h of exposure to each different condition of both light and biomass concentration outlined above. The specific growth rates μ (d^{-1}) were determined on a total of three biomass measurements (at $t = 0$ h, $t = 24$ h and $t = 48$ h) using linear least-squares curve fitting on the supplied set of the logarithm of the biomass $\ln(x)$ and time t . These growth rates were used for identifying the growth model.

To visualize the changes in the shape of the light attenuation curves according to the cell densities of each species when exposed to several incident light intensities, we selected 9 batch cultures at different stages of growth (non-diluted cultures with different biomass concentrations). Each 40 mL flask reactor was placed under 8 light levels from cool white LEDs (Luxeon Rebel, Lumileds) delivered from the laboratory incubators (Panasonic MIR-154-PE). The light was measured at the centres of the flasks in a water solution with and without cells using the scalar PAR sensor ULM 500 Walz, while the biomass concentrations of each species were determined by optical density (OD_{650}) and were then converted to carbon units. Then, for each value of the biomass concentration, the light attenuated by the micro-algal cells can be found as the difference between the two measurements of the light (with and without cells).

Continuous culturing was carried out in two photo-bioreactors to follow the biomass of the strains over time (in mono-culture or poly-culture) under the same light condition provided by one-sided lighting (using several white fluorescent lamps) at $I_{in} = 165 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, and under different initial biomass conditions. These experiments were used to identify the growth model and for the biomass estimation. Each bioreactor consisted of an Erlenmeyer glass vessel of 2 L with double walls. Between these walls

was flowing water thermostatically controlled at 25°C (using Thermo Scientific and VWR circulating bath) allowing maintaining the inoculum temperature constant. The mineral substrate at non/limiting concentrations (10 L of sterilized and buffered Z8NH_4 culture medium) was introduced continually into the glass vessel at a constant flow by a dual Channel Precision Peristaltic Pump (Ismatec), while the excess of bioreactor liquid was collected in a glass bottle using the same pump, thus keeping the culture volume constant. The reactors were operated at a hydraulic retention time of 4 days (corresponding to a dilution rate of $D = 0.25 \text{ d}^{-1}$) maintained constant throughout the experiments. To ensure a perfect mixing within the bioreactor, each reactor was agitated at 300 rpm by means of a magnetic system. In addition, a bubbling aeration system was designed as follows: the air is sent into a bottle of water to trap the air particles, an aquarium pump system sends the moisture-saturated air into the culture medium, and then passes through a cannula connected to a transmitting filter of $0.2 \mu\text{m}$ to avoid over-pressure and to limit air contamination. The reactor also has a sampling cannula connected with a non-return valve to minimize the risk of contamination.

4.2.3 Analytical procedures

Batch cultures In the 3-day batch cultures, monitoring the growth of *C. sorokiniana* and *S. pectinatus* in the microwell plates was carried out daily by fluorescence measurements (EX 450 nm, EM 680 nm) and optical density OD at 650 nm, 730 nm, and 680 nm using a micro-plate reader (CHAMELEON, Hidex).

Continuous cultures In chemostat cultures, samples were collected for cell counts and dissolved nutrient analysis. The cell counts were performed in triplicate using an upright microscope (MOTIC BA310). The algal biomass was also monitored by OD at 650 nm using a micro-plate reader (FLUOSTAR, BMG Labtech) at 650 nm through 48 well plates filled daily with 1 mL of culture sample.

Carbon conversion The carbon content was determined as follows: 5-mL samples were filtered onto pre-combusted AE filters and stored at 80°C until the analysis. The filters were dried at 60°C for 24 h, pelleted, and analysed using an ANCA mass spectrometer (Europa Scientific).

Referring to batch experiments on the same studied species for different stages of growth with a working volume of 40 mL under different concentrations of ammonia, a continual light intensity ($100 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$) and a fixed temperature (25°C) [328], the OD at 650 nm (measured with CHAMELEON, Hidex) was found to be the best correlated with the Particulate Organic Carbon (POC) content of the cells determined for both species ($\text{POC} = 496.14 \text{ OD}_{650}$, $R^2 = 0.89$).

For the continuous cultures, several samples were collected from both the mono-culture and the poly-culture during chemostat monitoring. The obtained values of the POC allowed establishing a linear correlation between POC and OD_{650} (measured with FLUOSTAR, BMG Labtech) ($\text{POC} = 208.42 \text{ OD}_{650}$, $R^2 = 0.88$).

4.2.4 Model identification methods

First of all, we explored a range of nonlinear models that might be useful for characterizing the growth rate μ of the studied species according to some classical kinetic functions ($\mu(\cdot)$) from the literature depending on the following variables: the incident light I_{in} or the biomass x . Then we proposed a new kinetic function depending on both these two variables.

The optimal parameters of the growth functions used to explain the characteristics of the growth rates of the algal species (determined in microwell plates) were calibrated using the "fitnlm" function of Matlab, which estimates model parameters and delivers statistics.

To readjust the parameters of the proposed growth function using the data of the biomass of both species in mono-culture (in chemostat), we used the function "fmincon" of Matlab to minimize the least squares criterion:

$$\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^n \frac{(X_{exp_{ij}} - X_{sim_{ij}})^2}{n}$$
 where $k = 2$ and n is the number of observations of X_{exp} , and X_{sim} results from the numerical integration of the model (describing the time evolution of the biomass in continuous mode photo-bioreactors) by the "ode45" function of Matlab.

4.2.5 Statistical tests

Statistical results on the identified model parameters were delivered by the "fitnlm" function of Matlab (used to fit nonlinear regression models) and are given as param. $\pm$ SE with an associated p -value p for the significance of each regression parameter for n observations. The comparison between the parameters among species for the same growth model was ensured by the same function using the vector of all observations on μ (for both species) as a response variable, and the matrix of the model variable along with a dummy variable (which takes only the value 0 or 1 according to the species, thus indicating the absence or presence of some categorical effect that may be expected to shift the outcome of the parameter identification) as predictor variables [329]. This involved the need to add to each required parameter a coefficient multiplied by the dummy variable, thus constituting the new model formulation (used in the "fitnlm" function). Then, one can determine the significant differences between the parameters, according to the p -value p of these coefficients for $2n$ observations. The "anova1" function of Matlab (performing one-way analysis of variance) was used once to test the difference between the two species according to their efficiency to attenuate the light in flask reactors experiments (comparison on K_{hsx} parameter among the two species).

4.3 Results and discussion

4.3.1 Effects of the incident light on the specific growth rate of *C. sorokiniana* and *S. pectinatus* in batch monoculture

At very low levels of biomass, the average light intensity received by the culture is close to that reaching the reactor surface (i.e. incident light I_{in}), particularly for reactors with a small light path. Under these experimental conditions, one can ensure that all cells are exposed to the same light intensity I_{in} . In order to describe accurately the relationship, for each species, of the growth rate μ with I_{in} , we will use the results obtained experimentally in microwell plates from the lowest concentration of biomass ($1.1 \pm 0.1 \text{ mgC L}^{-1}$). We also considered close initial biomass (1.20 mgC L^{-1} and 1.04 mgC L^{-1} for *C. sorokiniana* and *S. pectinatus*, respectively) to compare the growth–light relationships of the two species.

The relationship between μ and I_{in} was first compared using a Monod-like kinetics, which assumes that only light limits the growth of the cells. Then we tested the Haldane- and Steele-like models, in which the light inhibition effect at high light intensities is included as well (see Figure 4.1). The expressions and parameters of the three kinetic functions obtained from comparison with the data are all summarized in Table 4.1.

Model $\mu(I)$	Param.	<i>C.</i>	<i>S.</i>	Stat. comp.
Monod	$\mu_m \text{ (d}^{-1}\text{)}$	$1.47^* \pm 0.07$	$1.24^* \pm 0.06$	**
$\frac{\mu_m I}{K_{sI} + I}$	$K_{sI} \text{ (}\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}\text{)}$	$74^* \pm 15$	$95^* \pm 18$	ns
Andrews–Haldane	$\mu_m \text{ (d}^{-1}\text{)}$	$3.15^* \pm 0.90$	$1.56^* \pm 0.32$	ns
$\frac{\mu_m I}{K_{sI} + I + \frac{I^2}{K_{iI}}}$	$K_{sI} \text{ (}\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}\text{)}$	$318^* \pm 136$	$151^* \pm 60$	ns
	$K_{iI} \text{ (}\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}\text{)}$	726 ± 382	2834 ± 2660	ns
Steele	$\mu_m \text{ (d}^{-1}\text{)}$	$1.44^* \pm 0.03$	$1.13^* \pm 0.03$	**
$\mu_m \left(\frac{I}{I_m} e^{(1 - \frac{I}{I_m})} \right)$	$I_m \text{ (}\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}\text{)}$	$489^* \pm 20$	$489^* \pm 27$	ns

Table 4.1: Summary and comparison of the kinetic parameters, estimated from growth data collected during microplate incubations for *C. sorokiniana* and *S. pectinatus*, using Monod, Haldane, and Steele kinetics. The results are represented as param. $\pm$ SE, $n = 64$; the statistical comparison was assessed on $2n$ observations.

* significant regression parameter at $p < 0.05$ ($n = 128$),

** significant difference between the parameters of the two species at $p < 0.05$ ($n = 128$),

ns non-significant difference between the parameters of the two species at $p > 0.05$ ($n = 128$).

The results show that, over the tested range of incident light intensities, the Monod-like model seems to fit the data of *S. pectinatus* far better than those of *C. sorokiniana*, whose growth appears to be inhibited at high light levels (root mean squared error RMSE= 0.159 for *S. pectinatus* < 0.195 for

C. sorokiniana). The determined values of the parameters when using the Monod function to explain the growth rate data of *S. pectinatus* are in line with the results of experiments in previous work performed on the species *Scenedesmus caribeanus*, which was found to reach a maximum growth rate μ_m of 1.44 d^{-1} and a half-saturation constant K_{sI} of $68 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ [330] ($\mu_m = 1.2 \pm 0.1 \text{ d}^{-1}$ and $K_{sI} = 95 \pm 18 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ in this study).

The reduction in the growth rates of *C. sorokiniana* observed for $I_{in} > 450 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ suggests its sensitivity to photo-inhibition. This is confirmed by the smaller RMSE obtained when comparing its experimental and simulated data using either the Haldane (RMSE = 0.173) or Steele (RMSE = 0.183) models, both of which have non-monotonic curves which can describe the photo-inhibition phenomenon. The decline in the growth rate of *C. sorokiniana* due to photo-inhibition at high light intensities was also reported in previous studies (at a light intensity of about $250 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ and for temperatures $\geq 22^\circ\text{C}$) [167].

According to the Steele model, both species reach their maximum specific growth rates around an average intensity of $489 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, which is supposed to be the optimal light condition under the stated conditions of biomass concentration and temperature.

From Table 4.1, *C. sorokiniana* showed the higher maximum specific growth rates compared to those obtained with *S. pectinatus* using either the Monod or Steele kinetics. However, no significant difference was observed between the two species in terms of their affinity to light intensities. This implies that the species' affinities may be similar, or the experimental protocols in this study did not allow determining any difference.

The Haldane-like model provided the lowest RMSE (RMSE = 0.173 for *C. sorokiniana* and RMSE = 0.158 for *S. pectinatus*) compared with the other two models, thus making it more suitable to represent the data despite the sensitivity of its inhibition constant K_{iI} .

According to the model predictions, it appears that *C. sorokiniana* was able to grow more rapidly than *S. pectinatus* when incident light intensities ranged between 100 and $1000 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (see Figure 4.1). Under the stated experimental conditions, *S. pectinatus* was more resistant than *C. sorokiniana* to photo-inhibition. This is in agreement with previous experiments, showing *S. quadricauda* with lower photo-inhibition sensitivity than *C. sorokiniana* under light intensities of about $1000 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ [331]. Then, it is expected that the growth rate of *S. pectinatus* will exceed that of *C. sorokiniana* under light intensities higher than $1000 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

From all these observations, it can be seen that the intensity of the incident light can have different effects on the growth of different species of micro-algae. When one species is cultivated under high light intensities and at a low biomass concentration or a reduced light path, photo-inhibition is likely to occur ([332]). In the case of significant photo-damage, the specific growth rate can be reduced drastically, as shown by several studies ([332, 333]). In poly-culture, the light intensity can favor or disadvantage the growth of one algal species compared to another, depending on its sensitivity to light.

Our results suggest that in a mixed culture of the two studied species, *C. sorokiniana* may out-compete *S. pectinatus* under moderate light intensities, but may itself be out-competed by *S. pectinatus* under high light conditions. However, the interactions between these two species may change according to the dynamics of their respective biomass during the algal cultivation. Therefore, the interaction between the incident light and the population density was further investigated.

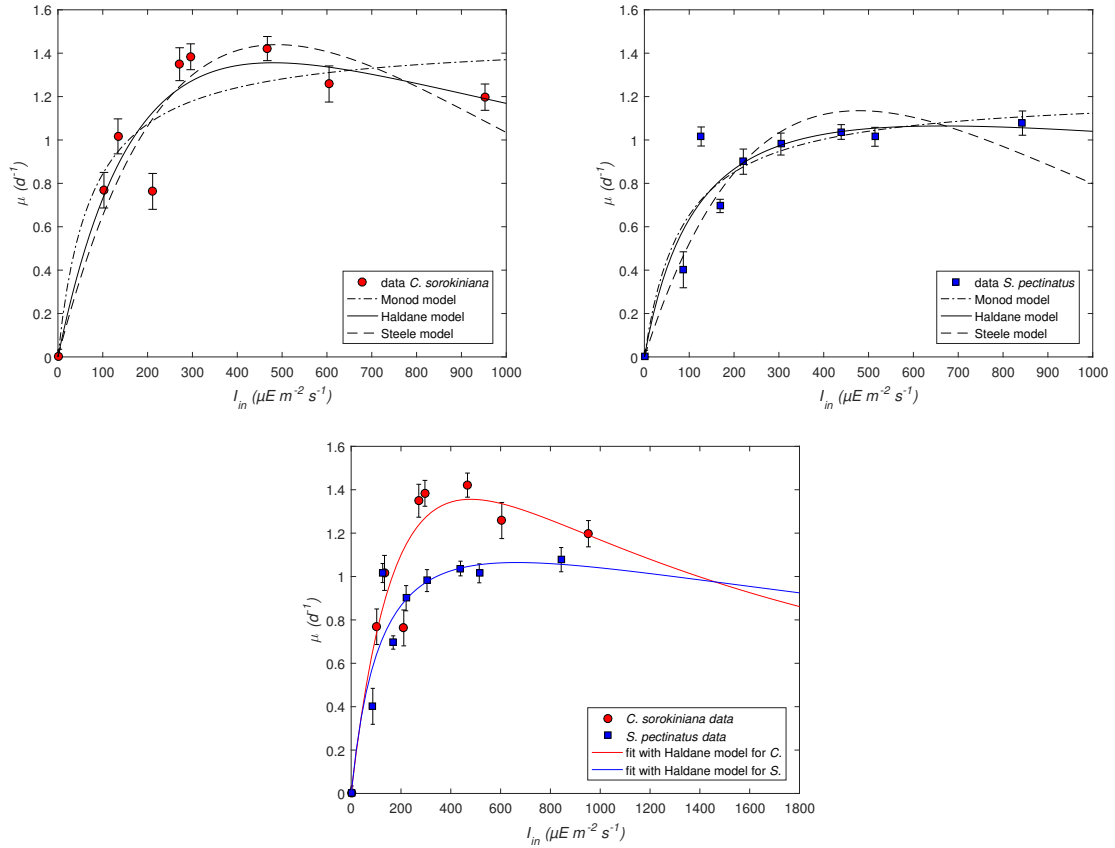


Figure 4.1: The growth–light relationship for *C. sorokiniana* and *S. pectinatus* obtained by the comparison of the growth data, collected from microplate incubations, with the kinetic functions of Monod, Haldane, and Steele. The data of growth rates are reported as means with standard deviations of 8 replicate measurements obtained at an initial biomass concentrations around 1.1 ± 0.1 mgC L⁻¹ for both species.

4.3.2 Effects of the density of the biomass on the growth rates of *C. sorokiniana* and *S. pectinatus* in batch mono-culture

The influence of different biomass levels on the growth of *C. sorokiniana* and *S. pectinatus* was studied. A set of batch tests was performed in micro-well plates exposed to 12 initial biomass concentrations between 0.5 and 35 mgC L⁻¹. We here show the data obtained under a fixed incident light ($467 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ and $439 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ for the cultures of *C. sorokiniana* and *S. pectinatus*, respectively) for which both species showed maximal growth rates, as described in Section 4.3.1.

Model $\mu(x)$		Param.	C.	S.	Stat. comp.
Exponential declining shape	de-	a	$1.52^* \pm 0.03$	$1.02^* \pm 0.009$	**
$ae^{(-bx)}$		b	$0.06^* \pm 0.002$	$0.036^* \pm 0.001$	**
Contois [182]		$A = \mu_m$	$1.75^* \pm 0.03$	$1.1^* \pm 0.01$	**
$\frac{A}{1+Bx}$		$B = K/I$	$0.14^* \pm 0.01$	$0.07^* \pm 0.002$	**

Table 4.2: Summary and comparison of the kinetic parameters, estimated from growth data collected during microplate incubations for *C. sorokiniana* and *S. pectinatus*, depending on biomass density. The results are represented as param. $\pm$ SE, $n = 96$; the statistical comparison was assessed on $2n$ observations.

* significant regression parameter at $p < 0.05$,

** significant difference between the parameters of the two species at $p < 0.05$.

Two classic models were adjusted to the experimental data: a generic model of an exponential declining shape and a model inspired by the density-dependent growth kinetic of Contois, both depending on the biomass density, affecting negatively species specific growth rates. The models' expressions and parameters are summarized in Table 4.2.

Figure 4.2 shows the kinetic data of *C. sorokiniana* against those of *S. pectinatus* as functions of the initial biomass concentrations. We recall that all the biomass concentrations (in carbon units) were determined using the same conversion factor. This factor was obtained by the linear correlations between OD and POC measurements at different time courses using the data both for mono-culture and for poly-culture of *C. sorokiniana* and *S. pectinatus* (cf. Section 4.2.3). Having the same correlation factor suggests an equivalent total pigment content per biomass unit and a similar absorption capacity per biomass unit regardless of the species. This may be explained by the fact that the green algae *Chlorella* and *Scenedesmus* have similar light absorption spectra [334], and have experienced similar environmental conditions. We assume that for a given level of biomass concentration, one may compare the kinetic of a particular species with others of equivalent absorbing proprieties and have a priori predictions of the outcome of competition based on mono-culture information. However, this will not be systematically possible in case of significant differences in species characteristics, which may lead to more complex spectral aspects that can substantially affect the outcomes of competition for light. As shown in Figure 2, the growth rates of the two studied cultures decreased sharply with increasing biomass levels in microplates. The maximal growth rate was obtained for low biomass concentrations. Under this condition, cell sedimentation and subsequent areas of strong light absorption were likely to be reduced, leading to optimal light absorption in the culture system. The decrease of growth rates with increasing biomass densities is likely to be related to light attenuation and cell distribution in the culture volume. Without excluding it, a growth limitation by CO_2 is unlikely because the culture medium was supplemented with high HCO_3^- and the growth rates were determined within the first 48h of incubation, thus excluding any substrate limitation. A similar trend in declining

growth in dense algal culture has been reported for *Scenedesmus sp.* and *Chlorella sp.* due to attenuation of the light [330]. Moreover, previous studies reported that the growth of micro-algae *Chlorella sp.* was low under insufficient or excessive light intensities ([335], [336]), which is also confirmed by our results. Table 4.2 shows that there is a significant difference between the species' specific growth rates, as stated in Section 4.3.1.

The change in the species' growth performances with the culture density suggests that at non-inhibiting incident light intensities, *C. sorokiniana* growth is more efficient than *S. pectinatus* at low biomass levels ($< 5\text{mg.L}^{-1}$). At intermediate levels of biomass (between 5 and 30mg.L^{-1}), the growth of both species was similar. However, under higher biomass densities, *S. pectinatus* grew more rapidly than *C. sorokiniana* (as shown in Figure 4.2).

Assuming that the competing species for light have similar behavior in light absorption, their specific growth rates may depend on the light absorbed by the sum of their biomass independent of its composition and in the same way as in monoculture (this hypothesis was further tested by modelling and confrontation with the experimental data). This suggests that in the case of poly-culture, *S. pectinatus* may perform well at high biomass densities despite the relatively low growth rates usually observed, because this species can out-compete light-limited species under low light. However, *C. sorokiniana* may perform better under clear waters and compete more effectively at moderate light conditions but may lose its advantage as the culture density increases over time. Consequently, the biomass level within a culture is a key factor that can explain the predominance of one species over another when growing together under non-inhibiting light conditions.

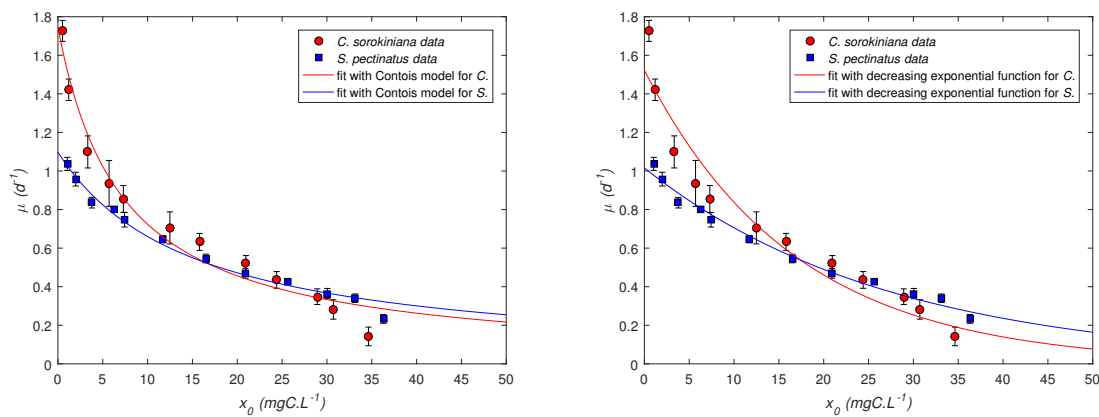


Figure 4.2: The growth–biomass density relationship for *C. sorokiniana* and *S. pectinatus* obtained from microplate incubations. The data of growth rates are reported as means with standard deviations of 8 replicate measurements obtained under a continuous incident light intensity of $467\ \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ for *C. sorokiniana* and $439\ \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ for *S. pectinatus*.

4.3.3 Modeling the light attenuation within cultures

Light attenuation had significant effects on micro-algae growth. For a one-sided illuminated photo-bioreactor with a fixed light intensity I_{in} , the photo-synthetically active light is a maximum near the liquid boundary in front of the light supply and decreases on passing through the water column. In addition to the effect of the depth, and the reflection and refraction at the interfaces boundaries, the absorption of the biomass when it is at high concentrations can induce light limitation within a well-mixed photo-bioreactor. Because of the high pigment content of micro-algae, light is strongly absorbed as it penetrates the culture depth. Under well-mixed conditions, we assumed that i) the individual cells are not stationed exclusively in the light or dark zones of the culture but exposed, on average, to the same light condition in the culture with respect to the instantaneous cell concentration x ii) the average micro-algal growth rate is closely related to light attenuation conditions in a given bulk of cultivation system. iii) the light attenuation by micro-algal species I_{attx} is defined as the light dissipated by the summation of both absorption and scattering and given as a function of the biomass concentration

$$I_{attx}(I_{in}, x) = \alpha I_{in} \frac{x}{x + K_{hsx}} \quad (4.1)$$

where α (%) is the percentage of the maximum effective light available for the growth of the micro-algae and K_{hsx} (biomass unit) is the half-saturation constant of the biomass concentration x (biomass unit).

The parameter α indicates the part of the light that remains inaccessible for growth (due to non-micro-algal components such as reactor walls and its liquid content). The parameter K_{hsx} reflects the interplay between the effects of absorption and scattering by the micro-algal species, closely linked to both size and distribution of the cells in a given culture volume.

The expression (4.1) was validated in well-mixed batch reactors (flasks of 40 mL) illuminated at several initial light intensities I_{in} for both studied strains using cultures at different stages of growth (corresponding to different biomass concentration obtained at different incubation times t_f). The light irradiance profiles were determined by plotting the light attenuation ($I_{t_0} - I_{t_f}$) measured at the centres of the flask reactors (I_{t_0} without biomass and I_{t_f} with biomass at t_f) against the biomass concentrations (measured by OD₆₅₀ and then converted to mgC L⁻¹).

As shown in Figure 4.3, the higher is I_{in} , the greater is I_{attx} . The light curve tends towards the irradiance value αI_{in} measured at the centre of the reactor when filled with only the culture medium. The shape of the obtained graphs appears to be similar to that of the Monod function and was then used to describe the light attenuation phenomenon.

We defined the total light attenuation I_{att} within a photo-bioreactor as the summation of the light attenuation by biomass I_{attx} (including both absorption and scattering) and the light modified by the reactor and its liquid content $I_{att0} = I_{in}(1 - \alpha)$, as summarized in the following expression:

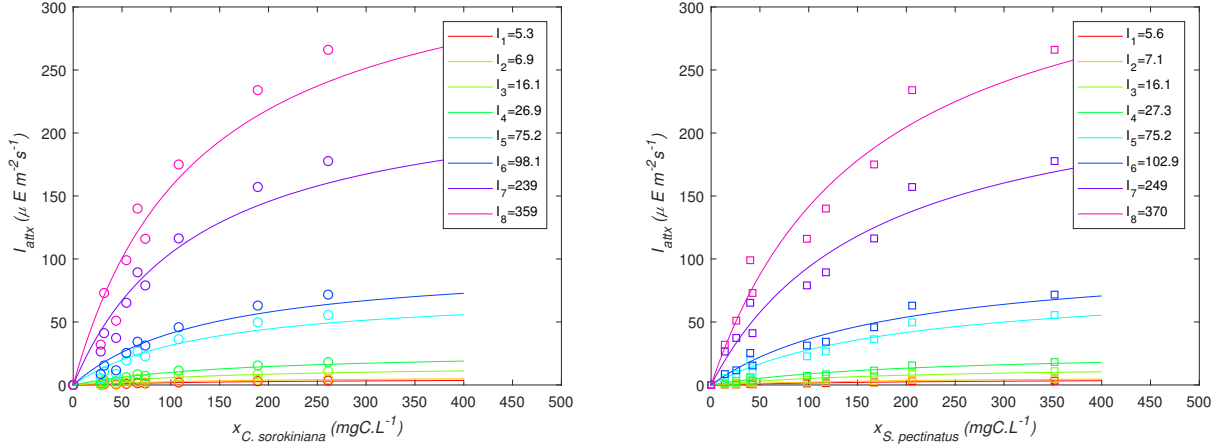


Figure 4.3: Simulation of the attenuated light model I_{attx} compared to data obtained in monocultures of *C. sorokiniana* and *S. pectinatus* growing in flasks at different stages of growth and biomass concentrations.

$$I_{att}(I_{in}, x) = I_{att0} + I_{attx} = I_{in} \left(1 - \alpha \left(1 - \frac{x}{x + K_{hsx}} \right) \right) \quad (4.2)$$

The parameter α can be interpreted as a characteristic of the photo-bioreactor. This parameter may be estimated with an experimental test carried out with the culture device filled with the culture medium before inoculation. Consequently, the contribution of the reactor and its liquid content to the attenuation of I_{in} can be given by the absorbed light $I_{in} - I_{out}$ (both measured perpendicularly to the light source on either side of the reactor) divided by I_{in} . Then, $\beta = 1 - \alpha$ represents the percentage of the light unavailable for algal growth, and depends on the wall and depth of the reactor, the transparency of the culture medium, and also the geometry and material of the reactor (such as the reflection and refraction of the light through the walls and at the interface with the medium, which may differ).

For all tested values of I_{in} , the model (4.1) fits well the measured data for both strains (Figure 4.3) with different values of K_{hsx} (ANOVA test $p < 0.05$; $K_{hsx} = 155 \pm 25 \text{ mgC L}^{-1}$ for *C. sorokiniana* and $K_{hsx} = 201 \pm 33 \text{ mgC L}^{-1}$ for *S. pectinatus*; (param. $\pm$ SE, n: [8 8])). This suggests that *C. sorokiniana* can attenuate light more effectively than *S. pectinatus*. These differences between the observed values of K_{hsx} among the species is probably due to light scattering, which is size- and shape-dependent [?]. At equal biomass concentration, a small number of voluminous cells (such as *Scenedesmus* growing in four celled colonies of 20 μm length) would attenuate less light than small cells at a much larger number (as is the case for the spherical microalgae *Chlorella*, with a cell diameter between 2 and 3 μm). Therefore, The K_{hsx} parameter reflects the interplay between both absorption and scattering of the light and may also be related to metabolic processes that are probably size- and species-dependent [?].

4.3.4 Coupling the photo-inhibition and photo-limitation effects in micro-algal growth kinetics

Based on the previous results, we suppose that the micro-algae growth is affected by both photo-inhibition and photo-limitation, suggesting that a good kinetic model would depend on I_{in} and x . Thus we looked for one model which can represent all the experimental data, by trying to find a function that could relate μ to I_{att} . Although the curve shapes of the growth rates plotted against I_{att} resemble the classical Monod-, Haldane-, or Steele-type functions (see the experimental data for μ in Figures 4.4 and 4.5 for *C. sorokiniana* and *S. pectinatus*, respectively), there were no unique sets of parameters that could explain all the experimental data sets. However, one can compute the correlations between the individual parameters identified from one experiment to another. The most remarkable correlation observed for any tested type of kinetics was between μ_m and the tested x condition, when taking μ_m as a decreasing function of x . Thus, we propose the following expression:

$$\mu_m(x) = \bar{\mu}\alpha \left(1 - \frac{x}{x + K_{hsx}}\right) = \bar{\mu} \left(\alpha - \frac{I_{attx}}{I_{in}}\right) \quad (4.3)$$

where $\bar{\mu}$ is the maximal value of the species' specific growth rate.

We built the following kinetic model using (4.2) and (4.3)

$$\mu(I_{in}, x) = \mu_m(x) \frac{I_{att}(I_{in}, x)}{K_{sI_{att}} + I_{att}(I_{in}, x)} \left(1 - \frac{I_{att}(I_{in}, x)}{I_0}\right) \quad (4.4)$$

with $K_{sI_{att}}$ the half-saturation constant of attenuated light ($\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$) and I_0 the light intensity ($\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$) for which μ takes the value of 0 for any large enough value of x .

With this model we implicitly consider that the inequality

$$I_0 > (1 - \alpha)I_{in} \quad (4.5)$$

is fulfilled (otherwise no growth is possible). Then, we consider the number

$$\bar{x} := \begin{cases} K_{hsx} \frac{I_0 - (1 - \alpha)I_{in}}{I_{in} - I_0} & \text{if } (1 - \alpha)I_{in} < I_0 < I_{in} \\ +\infty & \text{if } I_0 \geq I_{in} \end{cases}$$

which defines a threshold on the biomass level under which growth is possible. Finally, the model writes

$$\mu(I_{in}, x) = \begin{cases} \mu_m(x) \frac{I_{att}(I_{in}, x)}{K_{sI_{att}} + I_{att}(I_{in}, x)} \left(1 - \frac{I_{att}(I_{in}, x)}{I_0}\right), & x < \bar{x} \\ 0, & x \geq \bar{x} \end{cases} \quad (4.6)$$

under Hypothesis (4.5).

The Appendix gives the mathematical analysis of the monotonicity of expression (4.4) with respect to x . We show that, over the interval $(0; \bar{x})$, the function μ is either decreasing, or increasing and then decreasing with respect to x (see μ as a function of x in Figures 4.4 and 4.5 where I_{in} is fixed with $I_{in} \leq I_0$).

As shown in Figures 4.4 and 4.5, the highest growth rates are obtained with the lowest biomass concentration related to lower light attenuation conditions, which induces a higher light amount received per cell. The effect of light on growth rates was less pronounced at high biomass concentrations than at low concentrations. Interestingly, the greater is the initial biomass concentrations, the higher is the light photo-inhibition despite the high light attenuation by the cells. This suggests that at initial high biomass concentrations, algal cells are responding to high incident light as low light-adapted cells [?]. Therefore, the proposed growth function can indirectly describe algal-cells adaptation to rapidly changing lighting conditions. The model (4.6) allows describing both the light inhibition effect and the light attenuation effect, and applies to a broad range of incident light intensities (0–1000 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$) and biomass densities (0–35 mgC L^{-1}). The model parameters were identified for each species and are presented in Table 4.3.

Param.	C.	S.	Stat. comp.
α	$0.75^* \pm 0.03$	$0.81^* \pm 0.03$	ns
$\bar{\mu}$ (d^{-1})	$3.25^* \pm 0.20$	$1.75^* \pm 0.08$	**
$K_{sI_{att}}$ ($\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	$52^* \pm 6$	$26^* \pm 3$	**
K_{hsx} (mgC L^{-1})	$9.89^* \pm 0.31$	$17.07^* \pm 0.53$	**
I_0 ($\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	$1068^* \pm 41$	$1836^* \pm 168$	**

Table 4.3: Summary and comparison of the new model parameters used in the modeling of *C. sorokiniana* and *S. pectinatus* growth depending on both incident light intensity and biomass density (in microwell plates). The results are represented as param. $\pm$ SE, $n = 864$; the statistical comparison was assessed on $2n$ observations.

* significant regression parameter at $p < 0.05$,

** significant difference between the parameters of the two species at $p < 0.05$,

ns non-significant difference between the parameters of the two species at $p > 0.05$.

All the estimated parameters show that there are significant differences between the species, except for α . We recall that α is a characteristic parameter of the reactor that reflects the contribution of the culture device in the attenuation of I_{in} . Then, it is suggested that this parameter is probably the same in the microwell plates and the maximum effective light available for micro-algae growth always equals αI_{in} . For the maximal value of the species' specific growth rate, the greater $\bar{\mu}$, estimated for *C. sorokiniana*, shows its ability to grow faster than *S. pectinatus* when growing conditions are favorable, as suggested in Sections 4.3.1 and 4.3.2 in microwell plates experiments. Moreover, the greater I_0 , found for *S. pectinatus*, demonstrates its strongest resistance to high light intensities, which supports our previous results in Section 4.3.1. We note that the half-saturation constants $K_{sI_{att}}$ for the two species were also different. Similarly, the significant difference of K_{hsx} between the two species

reflects different responses to the attenuation effect, as stated above (see Section 4.3.3). However, we notice that the value of K_{hsx} identified for microwell plate cultures was not of the same order of magnitude as that for flask cultures (cf. Section 4.3.3). This may be explained by the spatial heterogeneity effect related to mixing. In fact, the cells initially suspended in the small volume of few micro-litres ($250\ \mu\text{L}$) in the microwell plates tend to accumulate at the bottom of the well, which is not the case for the instantaneous measurement of the light in a perfectly mixed flasks ($40\ \text{mL}$). This may result in a significant density inhibitory effect on μ_m (following equation (4.3)) caused by the high spatial heterogeneity, thereby explaining the small value obtained for K_{hsx} in micro-plates. Then, K_{hsx} will increase with the degree of mixing when the same culture device is considered. In addition, we observed higher values of K_{hsx} for *S. pectinatus* compared to *C. sorokiniana*, whether in microplate or flasks. This is probably due to the differences in shapes and sizes of the cells between the two species. Having the same biomass concentration, a small number of voluminous cells (such as *S. pectinatus*) would attenuate less light than small cells at a much larger number (as is the case for *C. sorokiniana*). Therefore, K_{hsx} would be related to both the species' bio-volumes and the mixing.

We note that different trends are found when comparing the microalgal growth rates using the relevant values of K_{hsx} previously identified for each culturing device (microplates and flasks). The model predicts a drastic reduction of microalgal growth in microwell plates leading to a division of the highest growth rate by a factor of 5 for *C. sorokiniana* and 3 for *S. pectinatus*, at a density of $35\ \text{mgC L}^{-1}$ and $I_{in} = 450\ \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (cf. Figures 4.2, 4.4, and 4.5). However, the decline becomes insignificant (division factor of only 1.25 and 1.1 for *C. sorokiniana* and *S. pectinatus*, respectively) in flasks under the same conditions (taking the same growth parameters of Table 4.3 except for K_{hsx}). These outcomes support that the lack of mixing and the subsequent heterogeneous cell settlement at the bottom of microwell plates may explain such discrepancies.

The new kinetic function (4.6) highlights the interactions between the incident light and the population density. It reflects the effect of the availability of light, and describes different phenomena that may occur during algal cultivation, such as photo-inhibition (following exposure to high light intensities at low biomass concentrations) and photo-limitation (under insufficient light conditions), or, more likely, other mechanisms such as cell distribution within water volume. This model requires a limited number of strain-specific parameters and allows comparisons of species growth performances and optimization of the operational parameters of algal cultures. Its simplicity makes it a valuable tool that can be integrated into any type of photo-bioreactor geometry and can apply to a microwell plate (as shown here) or to Erlenmeyer photo-bioreactor (as shown below). Such a growth function also offers a tool for simulating and predicting the potential production rate in poly-culture of different species in algal mass culture systems under light fluctuations (as further explored).

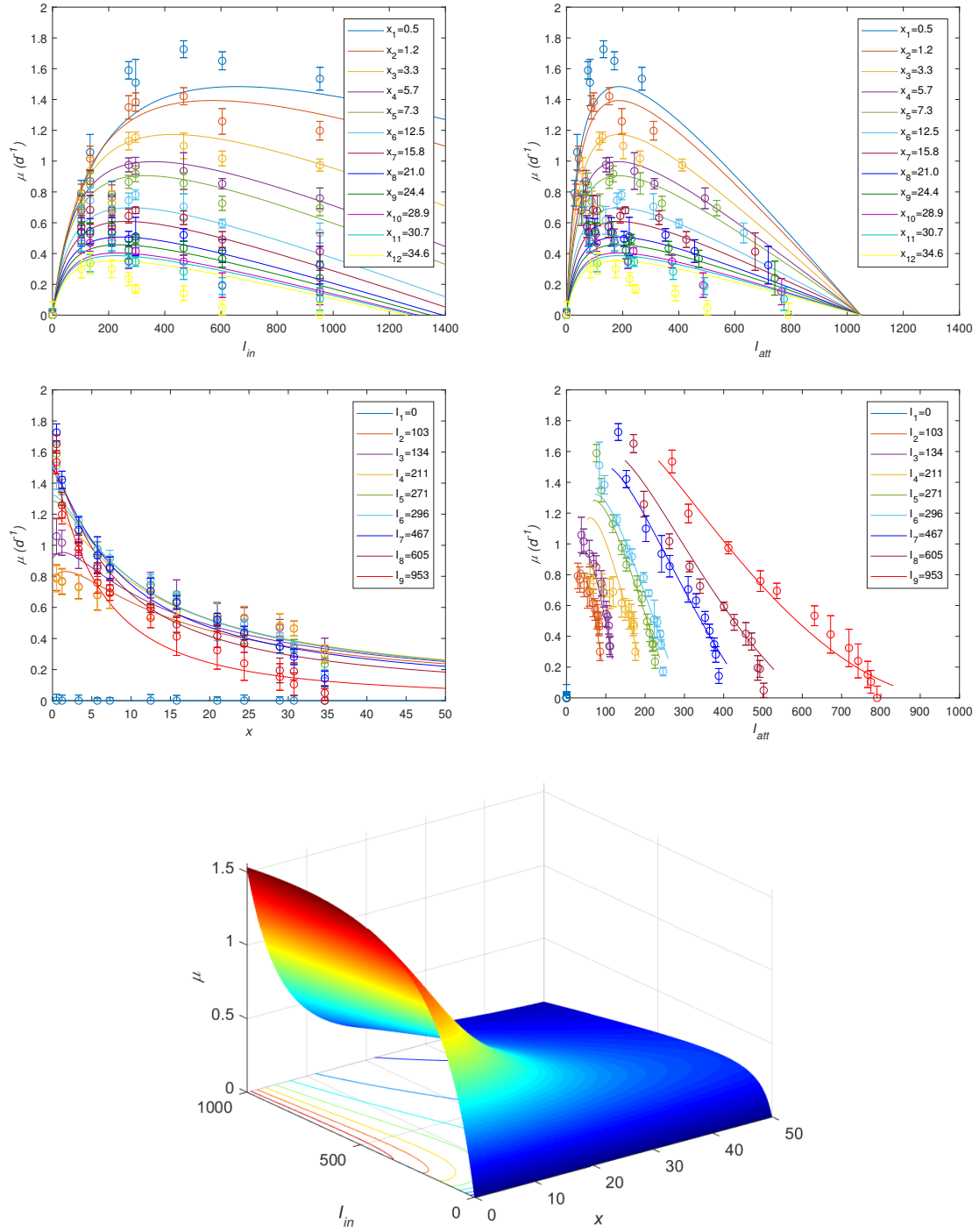


Figure 4.4: The effect of incident light intensities I_{in} (μEm⁻²s⁻¹) and the biomass densities x (mgC L⁻¹) on the growth of *C. sorokiniana* in microwell plates. The data of growth rates are reported as means with standard deviations of 8 replicate measurements.

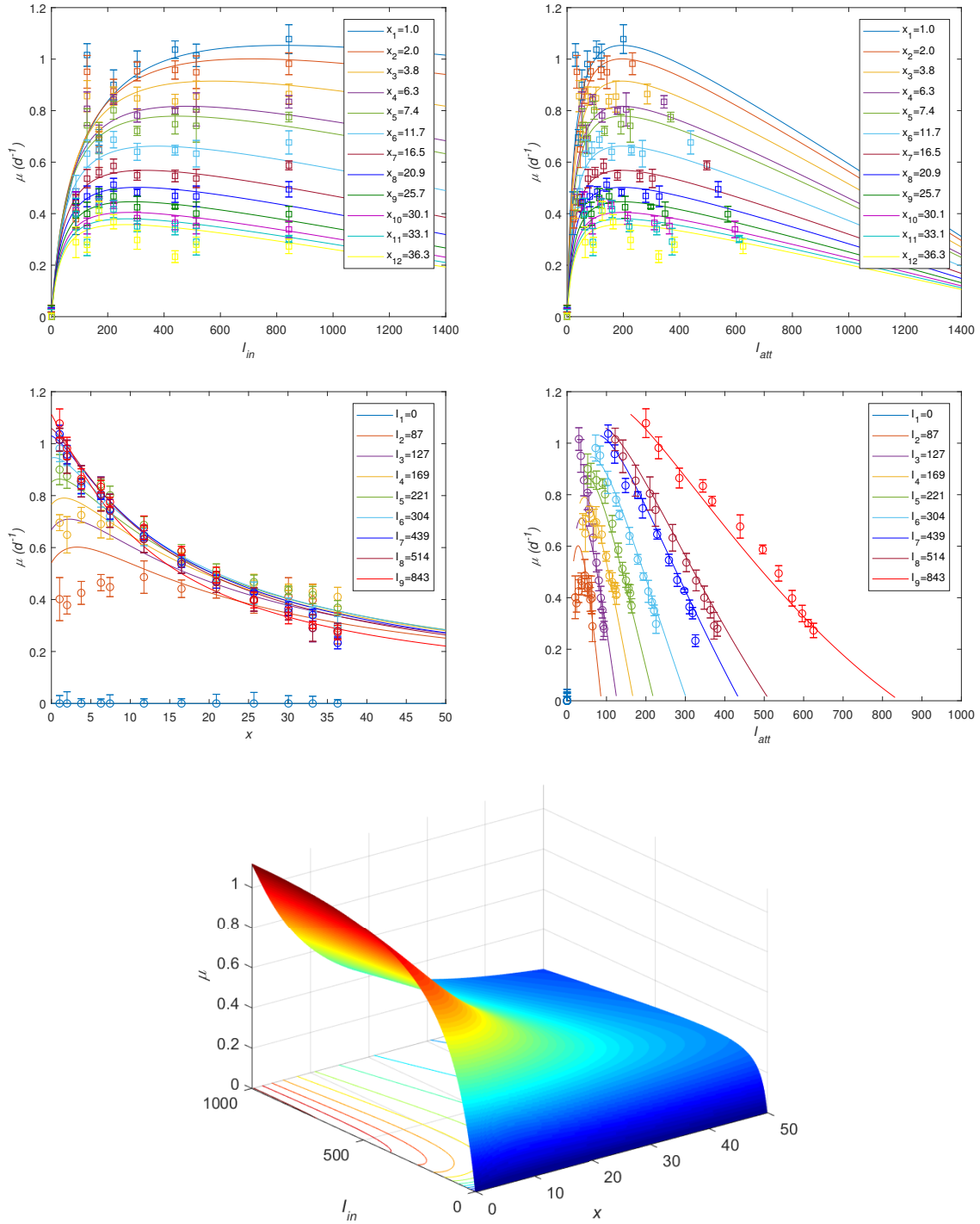


Figure 4.5: The effect of incident light intensities I_{in} (μE m⁻² s⁻¹) and the biomass densities x (mgC L⁻¹) on the growth of *S. pectinatus* in microwell plates. The data of growth rates are reported as means with standard deviations of 8 replicate measurements.

4.3.5 Model calibration and extension for poly-culture predictions in continuous mode photo-bioreactors

We considered the data of species growing in mono-culture (in an Erlenmeyer photo-bioreactor exposed to continual I_{in}) to compare them to the data generated by the growth kinetics derived by the

proposed growth function (4.6) for growth limited by light. We first need the usual mass balanced model to describe the time evolution of the biomass concentration [172] using the proposed kinetic function $\mu(\cdot)$ from (4.6) for a fixed intensity of incident light I_{in} .

$$\dot{x} = (\mu(I_{in}, x) - D)x \quad (4.7)$$

In any case, when D is such $0 < D < \mu(I_{in}, 0)$, the system admits an unique positive equilibrium x^* which belongs to $(0, \bar{x})$, and that is globally symptomatically stable (see Appendix).

The simulations of this model for each species grown in mono-culture are presented in Figure 4.6 against the data of biomass (from OD₆₅₀ measurements being converted to mgC L⁻¹) obtained under continuous mode cultures, using the same kinetic parameters represented in Table 4.3 except for α and K_{hsx} . These two parameters are likely to vary considerably depending on the operating conditions. Then, they were both re-identified for model calibration, depending on the culture device being used. α which depends on the culture device, was found to be equal to 0.44, while K_{hsx} , apparently sensitive with regard to mixing, was equal to 14 and 52 mgC L⁻¹ for *C. sorokiniana* and *S. pectinatus*, respectively. The parameters $\bar{\mu}$, $K_{sI_{att}}$ and I_0 , considered as characteristic parameters of the species, were held the same (as given in Table 4.3).

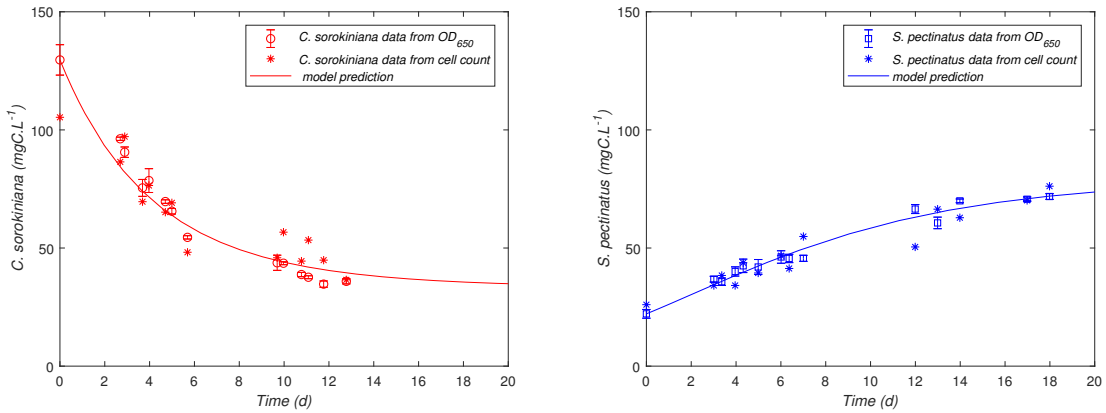


Figure 4.6: Simulation of chemostat model using the new kinetic function compared to biomass data (means with standard deviations of 3 replicate measurements of OD₆₅₀ and cell count converted to mgC L⁻¹) tracked in mono-cultures of *C. sorokiniana* and *S. pectinatus* under similar conditions of incident light intensity $I_{in} = 165 \pm 5 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ and dilution rate $D = 0.25 \pm 0.02 \text{ d}^{-1}$ (in Erlenmeyer photo-bioreactors).

In the second step, we sought to validate our growth function (4.6) on another data set. So, we used the experimental data of biomass (from cell count measurements being converted to mgC L⁻¹) tracked over time in the same Erlenmeyer photo-bioreactor but inoculated with a culture of a mixture of the species. This required an extension of the model to multi-species growths.

Let us recall that the model initially proposed to study the effect of light attenuation on the growth of a monoculture is based on a density-dependence relationship where the biomass concentration

x is given by a measure of OD. We assume that the two studied species have similar absorption capacities per unit of biomass, whether in monoculture or polyculture, based on the 'average' linear correlation between OD and the carbon content of the cells (cf. Section 4.2.3). This proposal has been justified by the fact that the species in this study belong to the same family and have experienced similar environmental conditions. Thus, we implicitly suppose that the effect of light attenuation on the species' specific growth rate depends on the incident light I_{in} and the total biomass, whatever the composition of this biomass. In other words, this hypothesis means that for a value y measured by OD, specific growth rate $\dot{x}_i/x_i$ (when the species i is present) would be identical for all pairs of non-zero values (x_1, x_2) such as $x_1 + x_2 = y$ (with x_i representing the values that would be measured by the same OD device in the species's mono-cultures). Consequently, under these assumptions, an extension of the model to multi-species growths could be given by the following system of differential equations, which depend on the same parameters applied in mono-cultures

$$\begin{cases} \dot{x}_1 = (\mu_1(I_{in}, x_1 + x_2) - D)x_1 \\ \dot{x}_2 = (\mu_2(I_{in}, x_1 + x_2) - D)x_2 \end{cases} \quad (4.8)$$

Let us underline that these kinetics are coupled here (but differently than the usual interaction terms, such as in the generalized Lotka–Volterra models), and taking into account the nonlinear functions μ_i .

The system (4.8) was used to test the assumptions made in the case of a poly-culture on experimental data by considering the same kinetic parameters obtained in mono-culture to simulate and see what the results will be. The superposition of the data on the predictions of model (4.8) in Figure 4.7 allows a satisfactory description of the dynamics of the different concentrations of the two species. However, it takes a long time to see *S. pectinatus* stabilizing and *C. sorokiniana* washed out.

The experiments in continuous photo-bioreactors appear to be satisfactorily explained by the proposed kinetic function when applied in monoculture and polyculture, but more experiments would be necessary for a further validation of the model.

Let us note that the assumptions leading to establishing (4.8) might be questionable when considering species with significantly different characteristics (such as the type of pigments that they contain) or in case of using other types of measurement of biomass (such as dry matter). Both situations will require the re-identification of parameters, and the system (4.8) can be generalized by considering a weighting into the calculation of the effect of the presence of another species, leading to the following system

$$\begin{cases} \dot{x}_1 = (\mu_1(I_{in}, x_1 + \gamma_{2/1}x_2) - D)x_1 \\ \dot{x}_2 = (\mu_2(I_{in}, \gamma_{1/2}x_1 + x_2) - D)x_2 \end{cases} \quad (4.9)$$

where $\gamma_{j/i}$ and $\gamma_{i/j}$ are the equivalence parameters between species according to their biomass characteristics. However, this approach needs to be validated on new experimental data that could be the matter of future work.

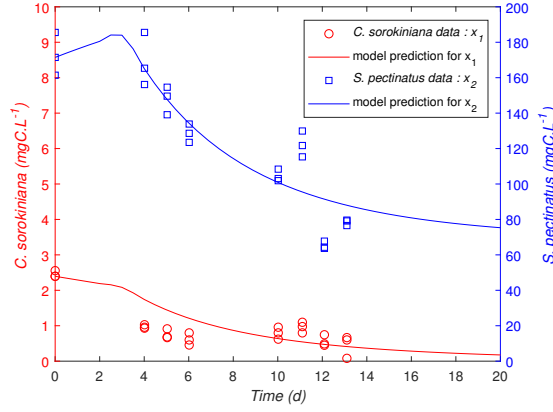


Figure 4.7: Validation of the chemostat model using the new kinetic function on biomass data (3 replicate measurements of cell count converted to mgC L^{-1}) tracked in species assemblage of *C. sorokiniana* and *S. pectinatus* under a fixed incident light intensity $I_{in} = 165 \pm 5 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ and a piece-wise constant dilution rate $D = 0.11 \text{ d}^{-1}$ for $t < 2.74$; then $D = 0.25 \pm 0.02 \text{ d}^{-1}$ (in Erlenmeyer photobioreactors).

4.3.6 Prediction of the possible outcomes of the competition for light availability in continuous mode photo-bioreactors under periodic light conditions

While competitive exclusion is more likely to occur at the laboratory scale [337], the coexistence of species is observed in both natural and artificial ecosystems and may play an important role in the resilience of cultivation systems or even in reducing the risk of extinction under particular conditions [338, 339]. In this section, we discuss three possible outcomes of the multi-species model, including the possibility of species coexistence, through theoretical prediction under periodic light, as a more realistic growth condition. The different situations were corroborated by some simulations (presented in Figure 4.8) obtained using the growth characteristics previously validated for *C. sorokiniana* (species 1) and *S. pectinatus* (species 2) in an Erlenmeyer photo-bioreactor (see Section 4.3.5), but under different operating conditions (as stated in Table 4.4).

We recall that the specific growth rate of each species in the multi-species model (4.8) is influenced by the total biomass density of both species contributing together to attenuate the available light within the photo-bioreactor. Thus, the expressions for μ_1 and μ_2 in the assemblage depend on the total biomass $x_1 + x_2$ instead of x_i only, leading to the model (4.8) that couples the growth of each species. However, for constant incident light I_{in} , one can easily see that coexistence at steady state is generically impossible, because it would need to have very particular values of D such that the graphs of μ_1 and μ_2 intersect with a common value exactly equal to D . Indeed, this model satisfies the

Competitive Exclusion Principle in a very similar way to the classical multi-species chemostat model, for which the common resource is a limiting substrate [172] (to be replaced here by the total biomass). Considering the biomass at steady state in monoculture, denoted by x_i^* , which satisfies the equation $\mu_i(x_i^*) = D$ (recall from the Appendix that in any case, for any D such that $0 < D < \mu(I_{in}, 0)$, the dynamics (4.7) admits a unique positive equilibrium, that is globally attractive and stable on the positive domain), the winner of the competition is the species with the largest x_i^* . This competitive exclusion was observed experimentally under constant light in Section 4.3.5 (see Figure 4.7). We note that *S. pectinatus* won the competition, reaching a value at steady state x_2^* which verifies $\mu(x_2^*) = D$, as predicted by the competitive exclusion principle.

Let us now consider a periodic $I_{in}(\cdot)$ as a time-varying function. The competitive exclusion principle no longer applies. When the input nutrient fluctuates with time (with variable input concentration or variable input flow rate), it is known that species coexistence is possible [173, 340, 341]. Let us see that a similar phenomenon can occur when the incident light is fluctuating (even though the dependency in I_{in} is non-linear, unlike D).

We consider first mono-cultures under periodic light:

$$\dot{x}_i = (\mu_i(I_{in}(t), x_i) - D)x_i, \quad i = 1, 2 \quad (4.10)$$

It is easy to see that when the condition

$$C_i := \int_t^{t+T} (\mu_i(I_{in}(\tau), 0) - D) d\tau > 0$$

is fulfilled, the washout solution $x_i = 0$ is repelling, and that the scalar dynamics (4.10) admits a unique positive periodic solution $\tilde{x}_i(\cdot)$ (see, for example, the simulations in Figures 4.8(A), 4.8(C), 4.8(E) and 4.8G, corresponding to mono-cultures obtained under different operating conditions given in Table 4.4), which is asymptotically attractive for any initial condition with $x_i(0) > 0$ (as μ_i is decreasing with respect to x_i).

Now, consider the co-culture under periodic light:

$$\begin{cases} \dot{x}_1 = (\mu_1(I_{in}(t), x_1 + x_2) - D)x_1 \\ \dot{x}_2 = (\mu_2(I_{in}(t), x_1 + x_2) - D)x_2 \end{cases} \quad (4.11)$$

the asymptotic solutions with the absence of one species, which are $(\tilde{x}_1(\cdot), 0)$ and $(0, \tilde{x}_2(\cdot))$, are both repelling for the dynamics (4.11) when conditions

$$C_{21} := \int_t^{t+T} (\mu_2(I_{in}(\tau), \tilde{x}_1(\tau)) - D) d\tau > 0 \quad (4.12)$$

$$C_{12} := \int_t^{t+T} (\mu_1(I_{in}(\tau), \tilde{x}_2(\tau)) - D) d\tau > 0 \quad (4.13)$$

are both fulfilled. This argumentation that demonstrates the coexistence of species is often used in the mathematical theory of the chemostat, see for instance [340, 341]. Let us give some insight into these quantities. When a single species i settles, its concentrations converge with time towards an unique periodic solution $\tilde{x}_i(\cdot)$ as previously recalled. When this periodic solution is reached (or almost reached), consider at time t an invasion by the other species $j \neq i$ with a small concentration $x_j(t)$. From equations (4.11), one can see that the time derivative $\dot{x}_j$ is small when x_j is small. Therefore, if the invasion is such that $x_j(t)$ is sufficiently small, x_j remains small during the time period T , and consequently, the concentration x_i is very little impacted while x_j remains small. Then, one can assume that $x_i(\cdot)$ remains close to the periodic solution $\tilde{x}_i(\cdot)$ on the time interval $[t, t + T]$, and the dynamics of x_j can be approximated by

$$\dot{x}_j(\tau) = (\mu_j(I_{in}(\tau), \tilde{x}_i(\tau)) - D)x_j(\tau), \quad \tau \in [t, t + T]$$

whose solution is given by the expression

$$x_j(t + T) = x_j(t) \exp \left(\int_t^{t+T} (\mu_j(I_{in}(\tau), \tilde{x}_i(\tau)) - D) d\tau \right) = x_j(t) \exp(C_{ji})$$

If $C_{ji} < 0$, one has thus $x_j(t + T) < x_j(t)$ and one can iterate this calculation on the next time interval $[t + T, t + 2T]$ and so on. We conclude that the species j cannot grow. In contrast, when $C_{ji} > 0$, species j grows, and its concentration cannot remain close to 0. We conclude that species j settles in the ecosystem. If the symmetric condition $C_{ij} > 0$ is fulfilled for species i , we conclude that neither concentration x_i, x_j can approach 0. Then, there is necessarily the coexistence of species. This case was illustrated by the example E_1 in Table 4.4 and the corresponding simulation presented in Figure 4.8 (B). By testing multiple values of operating conditions, simulation results show that coexistence is possible, although not systematic. The values of C_{21} and C_{12} can be interpreted as the ‘specific invasion speed over one period’ and their sign reflects the ability of one species to invade the ecosystem (with small initial density) when the other species is already settled in the periodic regime. Moreover, the magnitudes of C_{12} and C_{21} provide information about the reactivity of the ecosystem to an invasion: the more positive C_{ji} is, the faster is the invasion by the species j , and conversely the more negative C_{ji} is, the faster species j is eradicated by the system.

Let us underline the necessity to have the growth functions μ_i alternating its dominance depending on the light to have these two conditions verified. If not, one has for instance $\mu_1(I_{in}(t) - x) > \mu_2(I_{in}(t) - x)$ for any t and any $x > 0$, which implies

$$\int_t^{t+T} (\mu_1(I_{in}(\tau), \tilde{x}_1(\tau)) - D) d\tau = 0 > \int_t^{t+T} (\mu_2(I_{in}(\tau), \tilde{x}_1(\tau)) - D) d\tau = C_{21}$$

Ex.	Parameter				Test condition				Outcome	Fig.
	T (d)	D (d ⁻¹)	I_{min} ($\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	I_{max} ($\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	C_1	C_2	C_{21}	C_{12}		
E1	8	0.427	340	1510	0.68	0.16	0.001	0.02	coexist.	4.8(A,B)
E2	12	0.45	52	280	2.43	0.13	-0.62	1.97	1 wins	4.8(C,D)
E3	10	0.25	400	900	4.57	2.60	0.89	-1.05	2 wins	4.8(E,F)
E4	1	0.16	0	700	0.19	0.09	0.03	-0.05	2 wins	4.8(G,H)

Table 4.4: Some illustrative examples of the possible outcomes of the multispecies model using different operational conditions of dilution rate D and periodic illumination (taking I_{min} and I_{max} over the period T). The test conditions C_1 and C_2 are computed on species 1 (*C. sorokiniana*) and species 2 (*S. pectinatus*) in monoculture, while C_{12} and C_{21} are given for assemblages. The other parameters are taken to be: $\alpha = 0.4$; For species 1 : $\bar{\mu} = 3.25 \text{ d}^{-1}$, $K_{sI_{att}} = 52 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, $K_{hsx} = 52 \text{ mgC L}^{-1}$, and $I_0 = 1068 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$; For species 2 : $\bar{\mu} = 1.75 \text{ d}^{-1}$, $K_{sI_{att}} = 26 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, $K_{hsx} = 26 \text{ mgC L}^{-1}$, and $I_0 = 1836 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

and then $C_{21} > 0$ cannot be fulfilled and species 2 cannot invade the system when species 1 is present (see example E_2 in Table 4.4 and the corresponding simulation in Figure 4.8 (D)). Conversely, species 1 cannot invade a culture with species 2 when $C_{12} < 0$ (see examples E_3 and E_4 in Table 4.4 and the corresponding simulations for the assemblages in Figures 4.8 (F) and 4.8 (H)). These results show that the coexistence or exclusion of one species or the other are possible depending on the operating conditions $I_{in}(\cdot)$ and D .

We note that the chosen values of the parameters in examples E_1 , E_2 and E_3 in Table 4.4 are easy to implement at the laboratory scale for operating indoor photo-bioreactors. We propose that the model can also apply to outdoor cultures. For such a case, we considered in E_4 (in Table 4.4) more appropriate conditions for the light for simulating the light–dark cycles, which may be given with an illumination fluctuating between $I_{min} = 0$ and an average value I_{max} (at about $700 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ [6, 162]) over a period T of one day. Under these latter conditions, the model (4.11) theoretically predicted a competitive exclusion in favor of *S. pectinatus*, as shown in Figure 4.8(H). The predominance of *Scenedesmus* predicted by the simulation reproduces the experimental observations of several studies [342, 85, 6, 328, 162].

One can notice in Figure 4.8 that during the transients, the densities of both species increase (or decrease) simultaneously before one of them reaches a stage from which it declines. This is qualitatively different from the transients of the exclusion obtained with the classical model of competition on an abiotic resource (such as limited substrate) described by the usual growth functions [341, 172, 328]. This feature could be a matter for future research to discriminate which kind of exclusion (due to light or substrate) is dominant, and when.

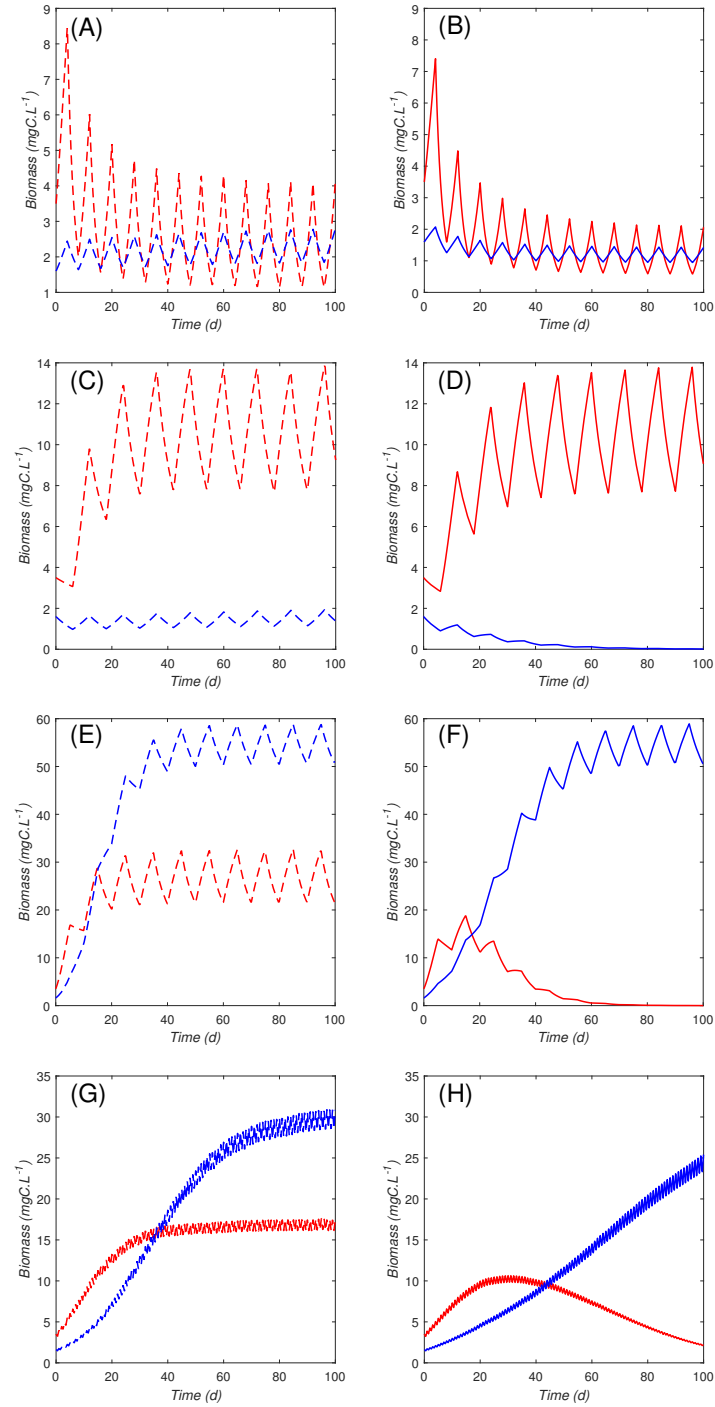


Figure 4.8: Some illustrative simulations obtained in continuous mode photo-bioreactors exposed to periodic illumination in mono-culture (first column A, C, E and G) and in assemblage (second column B, D, F and H) for species 1 (*C. sorokiniana*) (in red) and species 2 (*S. pectinatus*) (in blue) according to the examples of operational conditions stated in Table 4.4.

4.4 Conclusion

Light inhibition and attenuation appear to have significant effects on the growth of micro-algae. The presented results show that the reduction of species growth rates was mainly attributed to high cell densities, which reduce the penetration of light into the culture, but may protect cells from photo-inhibition when exposed to high light levels. *S. pectinatus* demonstrated better performances than *C. sorokiniana* at insufficient or excessive light availability, while *C. sorokiniana* was able to achieve faster growth under non-inhibiting light levels in clearer waters. We have shown that the newly developed kinetic model, depending on both the incident light and the biomass densities through the attenuated light model, can describe the simultaneous effects of photo-inhibition and photo-limitation and predict the biomass production in mono-culture and species assemblage. The use of modeling and experimental approaches allows the characterization of the species and the proper model identification for estimating the biomass production under different operating conditions and assessing the optimal operational parameters, which is of great benefit for the evaluation of a small or large scale algal mass culture, particularly in poly-culture systems.

This new model offers various possible future applications, such as its use for automatic monitoring of the instantaneous biomass concentration through light measurements within the reactor, or even the effective optimization of the incident light intensities, in addition to possible control (playing with the light availability in indoor cultures or shadowing in outdoor culture). The control of the incident light, the dilution rate, and the choice of initial biomass for the optimization of productivity in poly-culture will need further investigation.

Appendix: study of the behavior of the function μ

We study the monotonicity of the function μ with respect to x , for a fixed given value of $I_{in} > 0$. For this purpose, let us posit

$$X := I_{att}(I_{in}, x) = I_{in} \left(1 - \alpha \left(1 - \frac{x}{x + K_{hsx}} \right) \right)$$

(where $\alpha \in (0, 1)$ and $K_{hsx} > 0$). One can straightforwardly see that X is an increasing function of $x \geq 0$, that takes values in $[I_{in}(1 - \alpha), I_{in}]$. Then, the function μ can be expressed as a function of X as follows

$$\mu(I_{in}, x) = \tilde{\mu}(X) := A(X)B(X) \quad (4.14)$$

with

$$A(X) = \bar{\mu} \left(1 - \frac{X}{I_{in}} \right) \left(1 - \frac{X}{I_0} \right), \quad B(X) = \frac{X}{K_{sI_{att}} + X}$$

(where $I_0 > 0$ and $K_{sI_{att}} > 0$). Remind that one has $(1 - \alpha) < I_0 < I_{in}$ in the model. The validity domain of the expression (4.14) is for X such that $\mu(X) \geq 0$, that is for $X \in \mathcal{D} := [I_{in}(1 - \alpha), I_0]$,

or equivalently for x such that

$$x \leq \bar{x} := K_{hsx} \frac{I_0 - (1 - \alpha)I_{in}}{I_{in} - I_0}$$

(for value of x above $\bar{x}$, we consider that μ is equal to 0). Note that the function A is convex quadratic and decreasing non-negative on $\mathcal{D}$, and that B is a concave increasing function. Furthermore, one can easily check that the function B satisfies $B''' > 0$. By Leibniz rule, one get

$$\tilde{\mu}'''(X) = 3A''(X)B'(X) + 3A'(X)B''(X) + A(X)B'''(X) > 0, \quad X \in \mathcal{D}$$

Therefore, $\tilde{\mu}$ can change its concavity on $\mathcal{D}$ only from concave to convex. If $\tilde{\mu}$ is convex on $\mathcal{D}$, it has to be decreasing on $\mathcal{D}$ because I_0 is the first zero. Otherwise, it is concave at $I_{in}(1 - \alpha)$. Then, it is decreasing on $\mathcal{D}$ or there exists $\bar{X} \in (I_{in}(1 - \alpha), I_0)$ such that $\tilde{\mu}$ is increasing on $(I_{in}(1 - \alpha), \bar{X})$ and decreasing on $(\bar{X}, I_0)$.

In any case, for any D such that $0 < D < \tilde{\mu}(I_{in}(1 - \alpha)) = \mu(I_{in}, 0)$, the dynamics

$$\dot{x} = (\mu(I_{in}, x) - D)x$$

admits an unique positive equilibrium, that is globally attractive and stable on the positive domain.

Acknowledgements

We thank Patrick Raimbault for carbon content analyses, Tatiana Linhart for cell count, and Axelle Menard for giving a helping hand to experiments monitoring. We would also like to thank Bénédicte Fontez for assistance with statistical analyses.

This work was supported by the ADEME French Agency and the LabEx NUMEV incorporated into the I-Site MUSE funded by the French Research Agency (ANR) that have both funded the Ph.D. grant of the first author. This study was also supported by the PHYCOVER project, which was funded by the French National Agency for Research (ANR-14-CE04-0011).

Statement of informed consent, human/animal rights

No conflicts, informed consent, human or animal rights applicable.

4.5 Principales contributions et perspectives sur les interactions algue–algue vis-à-vis de la ressource lumineuse

Parmi les paramètres environnementaux pouvant influencer et contrôler grandement la production au sein des cocultures algales, la lumière est l'un des plus importants et des plus complexes à contrôler à l'intérieur d'un photobioréacteur car il est soumis aux effets d'auto-ombrage (réduisant la disponibilité de la lumière) et de photoinhibition.

Afin de mieux comprendre les interactions au sein du consortium algal étudié vis-à-vis de la variation de la lumière, nous avons associé des expérimentations menées au laboratoire et la modélisation mathématique pour étudier l'influence de la fluctuation de la lumière disponible dans la culture sur la croissance des espèces-modèles *C. sorokiniana* et *S. pectinatus* en conditions d'autotrophie. Une nouvelle fonction de croissance synthétique, qui permet de décrire la sensibilité des microalgues aux phénomènes d'inhibition et d'atténuation par la lumière, a été proposée. Cette expression mathématique relativement simple dépendant à la fois de la lumière incidente I_{in} et de la biomasse de la population algale x . Sa formulation repose sur la lumière atténuée I_{att} dont l'expression a été inspirée de [327]. Elle permet de prédire avec précision la diversité des données acquises séparément pour les deux espèces en faisant intervenir cinq paramètres biologiques qui sont faciles à interpréter et à déterminer au laboratoire.

Appliqué sur des photobioréacteur éclairés d'un seul côté et basé sur des mesures de la lumière moyenne atténuée I_{att} qui permet d'englober lumière directe, réfléchie, diffusée à l'extérieur et dans la culture, le modèle proposé dans cette étude pourrait éviter des biais importants pouvant être rencontrés avec une application de la loi de Beer–Lambert dans des milieux denses. L'application de ce modèle sur des photobioréacteurs (en modes batch et continu) de différentes tailles et géométries a permis de montrer une certaine flexibilité d'application, comme l'ont démontré les expériences en laboratoire. Cette souplesse lui donne la possibilité d'application dans des bioréacteurs bien mélangés en milieu extérieur. Ce modèle permettra aussi de suivre la biomasse via la mesure de la lumière dans le réacteur.

A l'aide d'une approche simple, l'application de ce modèle a permis de décrire les phénomènes lumineux clés impactant la croissance des deux espèces algales cultivées en monoculture. L'espèce *S. pectinatus* s'est montrée plus performante que *C. sorokiniana* sous les conditions lumineuses extrêmes, ce qui peut expliquer sa présence en bassin sous des conditions de faible lumière disponible dans les milieux très turbides comme les eaux usées. Ces résultats rejoignent ceux de plusieurs autres études [330, 125, 335, 336].

Ce nouveau modèle pourrait avoir un champ d'application plus large et être utilisé lorsqu'il y a plusieurs espèces de microalgues en culture. Nous avons présenté dans cette étude le cas de deux espèces soumises à des conditions de lumière incidente périodique $I_{in}(t)$ (cf. au modèle (4.11)). Ce modèle dynamique de coculture algale a été validé au laboratoire pour une valeur de I_{in} constante et non

inhibante (cf. 4.7). Il a permis de prédire la production de biomasse (en monoculture ainsi qu'en polyculture) et l'exclusion compétitive entre les deux espèces algales. Toutefois, nous avons montré à l'aide de simulations numériques que la coexistence des deux espèces est possible avec une lumière périodique.

Sous les conditions opératoires du bassin extérieur (taux de dilution constant) et des conditions de lumière plus réalistes (lumière incidente périodique ($T = 1j$) variant entre deux valeurs $I_{min} = 0$ (nuit) et une valeur moyenne $I_{max} = 700 \mu E m^{-2}s^{-1}$ calculée pendant la période diurne de la journée sur les cinq premiers mois de fonctionnement du bassin), le modèle (4.11) prédit théoriquement une exclusion compétitive, en faveur de l'espèce *S. pectinatus* (voir Figures (G), (H) sur 4.8). Une comparaison qualitative de ces dynamiques avec celles obtenues par simulation du modèle de compétition sur l'azote (proposé dans le Chapitre 3), montre que bien que les deux modèles soient basés sur des ressources limitantes différentes, leurs résultats qualitatifs sont asymptotiquement similaires. Cependant, ce n'est pas le cas pour les phases transitoires qui sont singulièrement différentes. Dans le premier cas d'exclusion compétitive par le substrat, la biomasse de l'espèce inhibée décroît, tandis que celle de l'autre espèce augmente, puis se reproduit plus tard lorsque son concurrent s'approche du lessivage (cf. Chapitre 3). Cependant, dans le second cas de compétition pour la lumière, les biomasses respectives des deux espèces augmentent ensemble au début en profitant de la lumière disponible jusqu'à ce qu'une espèce devienne plus favorisée avec la diminution de la disponibilité de la lumière, et l'autre perd sa capacité de compétition et finit par être lessivée. Ces observations confirment que la ressource limitante pourrait façonner le déroulement de la compétition et suggèrent que la propriété qualitative de chaque modèle (sur la phase transitoire) permettrait théoriquement de distinguer la cause d'exclusion dans le cas des bassins extérieurs (par l'azote ou bien par la lumière).

Par ailleurs, le modèle de compétition pour la lumière disponible n'a pas révélé les mêmes interactions démontrées par un effet positif de *C. sorokiniana* sur la croissance de *S. pectinatus*. Cependant, en matière d'amélioration de la production algale totale, il a été constaté, à l'aide de simulations (résultats non présentés), que la polyculture peut être plus ou moins avantageuse que la monoculture en fonction de la valeur de I_{max} et du moment final de l'intégration du système (4.11) à deux espèces. Par exemple, en utilisant la même quantité initiale de biomasse, la production totale de l'assemblage a été plus élevée par rapport aux monocultures pour $I_{max} = 700 \mu E m^{-2}s^{-1}$ pendant un temps de culture de 150 jours. Un autre exemple, obtenu avec $I_{max} = 400 \mu E m^{-2}s^{-1}$, a montré que la coculture devient particulièrement avantageuse par rapport à *S. pectinatus*, par contre *C. sorokiniana* cultivée seule, permet une meilleure production dans les mêmes conditions.

Quoique les campagnes expérimentales en photo bioréacteurs continus semblent expliquées par le modèle de compétition pour la lumière, de nouvelles expériences seraient nécessaires pour le valider. Une perspective de ce travail serait de valider le modèle en bassin extérieur sur une coculture de *C. sorokiniana* et de *S. pectinatus* (espèce efficace et adaptée aux conditions extrêmes de lumière avec une meilleure capacité épuratoire et résistance aux prédateurs), et contrôler sa biomasse au cours du temps avec un ajustement du taux de dilution sous des conditions où la turbidité de l'alimentation

serait maintenue à une valeur constante. Dans ce cas, il serait possible de coupler les effets de lumière et ceux de l'azote évoqués dans le premier chapitre. Cette hypothèse sera intéressante pour revisiter les données du bassin extérieur en couplant les deux modèles proposés (azote et lumière) dans le but d'avoir un modèle mieux adapté aux conditions de cultures extérieures.

Les modèles proposés dans cette thèse demeurent essentiellement exploratoires des interactions entre deux espèces algales et demandent à être complétés et généralisés. Une validation exhaustive d'un modèle applicable aux cultures intensives nécessiterait des études sur d'autres interactions inévitables en bassins ouverts comme la prédation ou le parasitisme, suggérant d'intégrer d'autres compartiments biologiques aux modèles que nous avons proposé. Ce qui nécessite donc d'étudier à quelle mesure ces nouvelles interactions (négatives) impacteront la facilitation entre les deux espèces algales et la production en biomasse totale pour pouvoir prédire ces effets et proposer des stratégies de régulation robustes des systèmes plus complexes. Une autre extension possible du modèle serait d'incorporer l'effet de la température [9] et d'étudier les interactions en fonction de la variation de ce facteur connu pour impacter grandement la croissance algale, en vue de tester le potentiel de la coculture à améliorer la résistance aux fluctuations brutales de ce facteur environnemental comme suggéré dans [76, 135, 147].

Modeling algal-bacterial interactions under algal exudation

Ce chapitre est en cours de préparation.

Emna Krichen^{1,2,3}, Alain Rapaport¹ et Éric Fouilland²

¹ : UMR MISTEA, Univ. Montpellier, INRAE, SupAgro, Montpellier, France

² : UMR MARBEC, Univ. Montpellier, CNRS, IFREMER, IRD, Sète, France

³ : Agence de l'environnement et de la Maîtrise de l'Energie, Angers, France

Résumé

Dans les écosystèmes naturels et les systèmes de production industrielle, les microalgues vivent avec les communautés bactériennes en établissant des relations écologiques à travers l'exsudation algale de matière organique dissoute, essentielle à la production bactérienne dans des conditions dépourvues en carbone. Une situation paradoxale se manifeste lorsque les microalgues stimulent leurs compétiteurs bactériens pour les nutriments inorganiques, en particulier dans le cas où la matière organique dissoute libérée par les microalgues est pauvre en éléments essentiels tels que l'azote ou le phosphore. Nous supposons que, les dynamiques des deux espèces sont contrôlées par la compétition pour les nutriments limitant leur croissance respectives. Nous supposons qu'en présence du carbone organique dissous (COD), la consommation bactérienne du nutriment minéral peut affecter la biomasse algale et sa dynamique. Nous étudions i) le comportement dynamique de ces microorganismes en interaction et à quelle mesure l'apport du carbone supplémentaire par exsudation algale peut générer des associations écologiques stables ii) à quel point les facteurs abiotiques, comme la vitesse d'apport en nutriments, peuvent affecter leurs interactions. Nous proposons un modèle de microalgues et de bactéries en croissance dans un chémostat où les nutriments minéraux (N ou P) et le COD sont fournis à un taux de dilution constant. Nous supposons que la croissance des microalgues est limitée uniquement par la ressource nutritive minérale, alors que la croissance bactérienne dépendra à la fois des ressources minérale et organique. Compte tenu de l'effet de l'excrétion de microalgues du COD et de la capacité compétitrice pour les éléments minéraux essentiels, nous montrons la possibilité d'avoir une coexistence stable avec des transitoires oscillants.

Abstract

In natural ecosystems or industrial production systems, microalgae live together with bacterial communities and establish ecological relationships through microalgae exudation of dissolved organic matter, which is an essential source supporting bacterial production, particularly when carbon is lacking. The paradoxical situation in which microalgae stimulate their bacterial competitors for inorganic nutrients is promoted when the dissolved organic matter released by microalgae is lacking essential nutrients such as nitrogen or phosphorus. We assume that the dynamics are controlled by the competition for the nutrients, limiting their growth. We suppose that the consumption of the limiting inorganic nutrient (ammonium nitrogen (N) or phosphorus (P)) by bacteria when the dissolved organic carbon (DOC) is available may affect the biomass and the dynamics of microalgae. We thus investigate i) the possible behavior of the dynamics of these interacting microorganisms and whether the additional consideration for extracellular carbon released by microalgae can generate stable ecological associations, and ii) to which points the abiotic pressures, such as the rate of nutrients supply, will affect their interactions. We propose a chemostat-type microalgae-bacterial model in which the mineral nutrients (N or P) and DOC are supplied at a constant dilution rate. We assume that microalgae growth is limited only by the mineral nutrient, while bacterial growth depends on both mineral and organic nutrients. Considering the effect of microalgae excretion of DOC and bacterial ability to compete for essential mineral nutrients, we show the possibility of having stable coexistence with oscillating transients.

5.1 Introduction

Nutrient availability is among factors influencing ecological interactions between microorganisms and is the main responsible factor for populations diversity and structure in aquatic systems. Nitrogen (N) and phosphorus (P) are essential nutrients for the growth of primary producers (micro-algae) and heterotrophic decomposers (bacteria), which are both controlling nutrient cycling in aquatic systems. The production of organic materials in aquatic systems plays an important role in forging some communities under particular conditions of the surrounding environment or growth stage and may be provoked by typical processes such as sloppy feeding by predators, cell death, lytic viral infections, recycling of material or micro-algae exudation. The process of extracellular release of dissolved organic carbon matter (i.e. exudates) by micro-algae in an ecosystem has been recognized as a major provider of essential carbon resource for bacterial energy supply in addition to inorganic nutrients (N and P) whose scarcity might restrain their growth [150], [343], [344] [345], [346]. When primary productions are the main carbon source, heterotrophic bacteria largely depend on the release of photo-synthetically fixed organic carbon that is overproduced during micro-algae growth[150] and are good competitors for the inorganic nutrients that are also required for micro-algae proliferation. The formation of this organic carbon matter is often modeled proportionally to the build-up of micro-algae nitrogen or phosphorus biomass. The simple formulation assumes the extracellular release as a proportion of primary production [347], while other formulations consider various means for linking the release to biomass and nutrient status [348]. More complex formulations combine more than one processes. For instance, [349] represent a loss to the dissolved organic matter pool by two excretion functions: an active excretion of a fixed proportion of uptake and a nutrient-stress-related excretion, while in [350] the model combines micro-algae acclimation to nitrogen stress, carbon over-consumption, exudation and coagulation of dissolved organic carbon. Models simulations using sophisticated formulations for the exudation process are not usually so different from simplified models in terms of prediction and fit [351], but make the system more difficult to analyze mathematically and grasp the underlying mechanisms. In laboratory experiments as well as in natural ecosystems, interactions between algae and bacteria might shift from net commensalism or mutualism to net competition depending on environmental conditions including nutrient availability and shifting of nutrient limitation or differential inputs of nutrients [352]. The hypothesis of carbon overflow during limitation by one or more essential nutrients leads to the suggested paradoxical situation in which micro-algae stimulate their bacterial competitors for inorganic nutrients [150], [151], [56], [152]. In this case, the relationship was considered as commensalism [151]. Nonetheless, the possibility of mutualism involving reciprocal benefits to micro-algae and DOC-associated bacteria through inorganic phosphorus was also described in [154] when micro-algae was limited by phosphorus and light. From laboratory experiments, [153] assume that this paradox did not apply to N deficiency and that at such situation both algae and bacteria can benefit from each other thanks to higher bacteria remineralization rates for ammonium than for phosphorus. We investigate theoretically the magnitude of the impact of the micro-algae exudates on both heterotrophic bacteria and micro-algae dynamics and the influence of

changing nutrient inputs (N or P and DOC) supply on interactions. The model consists of four differential equations of interacting components consisting of micro-algae, bacteria, inorganic nutrient, and a dissolved organic carbon resulting from a functional micro-algae exudation. We consider ammonium nitrogen (or phosphorus) as the common limiting nutrient for micro-algae and bacteria, while the dissolved organic carbon is limiting only the bacterial growth. Both essential nutrients reach the chemostat at a constant dilution rate.

The paper is organized as follows. Section 5.2 presents the model and its hypotheses. Section 5.3 studies the existence of the equilibriums, while section 5.4 analyses their stability. Then, Section 5.5 discusses the results and Section 5.6 shows numerical simulations. All the proofs are given in the Appendix.

5.2 Model description and hypotheses

For investigating ecological interactions, continuous cultures (i.e. chemostat) are used as an idealization of natural ecosystem (such as water columns in oceans or temperate lakes) and artificial ecosystem (such as in intensive algal system production), particularly under measurable parameters, and tractable mathematics. As the ability to understand the link between reasonable assumptions and model outputs decreases rapidly with model complexity, we propose here a simplistic model to check its ability to give explanations for alternatives of observable behavior and to drive fundamental proprieties from a minimum set of assumptions.

The model represents the dynamics of one algal strain and bacterial community in a chemostat. It consists in four functional differential equations of interacting components consisting of algae (a), bacteria (b), inorganic nutrient (n), and labile dissolved organic carbon (c) as given by the following system:

$$\left\{ \begin{array}{l} \dot{a} = (\mu_a(n) - e(n) - D)a \\ \dot{b} = (\mu_b(c, n) - D)b \\ \dot{c} = (C_{in} - c)D + Ke(n)a - Y_b^c \mu_b(c, n)b \\ \dot{n} = (N_{in} - n)D - Y_a^n \mu_a(n)a - Y_b^n \mu_b(c, n)b \end{array} \right. \quad (5.1)$$

where D , N_{in} and C_{in} are the dilution rate, the inlet inorganic nutrient (ammonium or phosphorus), and the inlet labile organic carbon concentration, respectively. The parameters Y_a^n and Y_b^n are conversion constants for the inorganic nutrient, respectively for algae and bacteria while Y_b^c is the conversion yield for carbon consumption by bacteria. Let us underline that this model is different from the classical resources-consumers models of the literature with two resources and two consumers (see [353, 354]), because here the first consumer (the algae) produces the resource c essential for the

growth of the second consumer (the bacteria).

The functions μ_a and μ_b are the specific growth rates of algae and bacteria, respectively. The algal growth is assumed to be limited by the inorganic nutrient n according to a function μ_a , while the bacterial growth is assumed to be limited by both organic substrate and inorganic nutrient according to a function μ_b of the prevailing concentrations of inorganic nutrient n and dissolved organic carbon c . moreover, we assume that there is no inhibition effect in the growths under large concentrations of the resources (or at least for the range of values of c and n that we consider). This leads to consider the following hypotheses on the functions μ_a and μ_b .

Hypothesis H1. The function μ_a is monotonic increasing with respect to n with $\mu_a(0) = 0$.

A typical instance of such function often found in the literature is the Monod function:

$$\mu_a(n) = \mu_a^{max} \frac{n}{K_a^n + n} \quad (5.2)$$

in which μ_a^{max} is the maximum specific growth rate of algae, K_a^n is the half-saturation constant (at which μ_a equals $\mu_a^{max}/2$).

Hypothesis H2. The function μ_b is monotonic increasing with respect to each variable c and n when both of them are not null, and is null if c or n is equal to zero.

It is often expressed as the product of two Monod-type expressions:

$$\mu_b(c, n) = \mu_b^{max} \frac{c}{K_b^c + c} \frac{n}{K_b^n + n} \quad (5.3)$$

in which μ_b^{max} is the maximum specific growth rate of bacteria while K_b^n and K_b^c are half-saturation constants for inorganic nutrient and the dissolved carbon, respectively.

We model the dissolved organic matter as a dynamic flux depending on the nutritional status and the growth rate of micro-algae rather than a constant fraction of algal biomass. We admit that the surplus of the organic material produced by micro-algae is excreted mainly in carbon form. Following [151],[355], we propose that the excretion rate of organic material is proportional to the difference between nutrient-saturated and nutrient-limited growth rate by considering the maximum specific algal rate μ_a^{max} and the current value of the growth rate $\mu_a(n(t))$ as approximations of the maximum carbon assimilated during the photosynthesis and the carbon used in growth, respectively.

Hypothesis H3. The specific release rate of exudate is formulated as

$$e(n) = \alpha(\mu_a^{max} - \mu_a(n)) \quad (5.4)$$

where $\alpha \in [0, 1]$ is a parameter which reflects the ability of algae to produce exudates instead of

growth.

This assumption results in a higher rate of exudation under inorganic nutrient deficiency. We consider that the extracellular organic matter is proportional to e and micro-algae biomass and that the rejection flux of this released matter fed directly the labile dissolved organic carbon pool c [356]. We also suppose that this organic matter is composed of a passive portion and an active one, that will be given by the quantity $Ke(n)$, (with K is a coefficient between 0 and 1). This quantity is the only fraction that can be consumed exclusively by heterotrophic bacteria.

5.3 Study of steady-states

We analyze the possible equilibria (a^*, b^*, c^*, n^*) of the system (5.1) for general growth function μ_a , μ_b and then give explicit expressions for the functions (5.2) and (5.3). All the proofs are given in the Appendix.

One can first notice that the *washout steady state*

$$E_0 = (0, 0, C_{in}, N_{in}) \quad (5.5)$$

always exists. Let us characterize now the steady-states where only algae or bacteria is present.

Proposition 1. *If $D < \mu_b(C_{in}, N_{in})$, then there exists a unique equilibrium with bacteria persistence and micro-algae leaching*

$$E_b = (0, b^*, c_b^*, n_b^*) \quad (5.6)$$

where $b^* > 0$ is the unique solution of

$$\mu_b(C_{in} - Y_b^c b, N_{in} - Y_b^n b) = D \quad (5.7)$$

and $c_b^* = C_{in} - Y_b^c b^* > 0$, $n_b^* = N_{in} - Y_b^n b^* > 0$. If $D \geq \mu_b(C_{in}, N_{in})$, there is no equilibrium with $a^* = 0$ and $b^* > 0$.

Corollary 1. *For the specific expression (5.3) of the function μ_b , b^* can be expressed as a root of the second order polynomial $Ab^2 + Bb + C = 0$ with*

$$\begin{aligned} A &= (\mu_b^{max} - D)Y_b^c Y_b^n \\ B &= D(Y_b^c K_b^n + Y_b^n K_b^c) + (D - \mu_b^{max})(Y_b^c N_{in} + Y_b^n C_{in}) \\ C &= \mu_b^{max} C_{in} N_{in} - D(K_b^c + C_{in})(K_b^n + N_{in}) \end{aligned}$$

Under the condition $D < \mu_b(C_{in}, N_{in})$, we know from Proposition 1 that there exists a unique root on $(0, b)$. Moreover, one has $A > 0$ and $C > 0$. The polynomial $Ab^2 + Bb + C = 0$ admits thus two positive roots and b^* is necessarily the smallest one, otherwise there would exist another one on

$(0, \underline{b})$.

Proposition 2. *If $D < (1 + \alpha)\mu_a(N_{in}) - \alpha\mu_a^{max}$, then there exists a unique equilibrium with micro-algae persistence and bacteria leaching*

$$E_a = (a^*, 0, c_a^*, n_a^*) \quad (5.8)$$

where $n_a^* > 0$ is the unique solution of

$$\mu_a(n) = \frac{D + \alpha\mu_a^{max}}{1 + \alpha} \quad (5.9)$$

with

$$a^* = \frac{(1 + \alpha)D}{Y_a^n(D + \alpha\mu_a^{max})}(N_{in} - n_a^*) > 0$$

and

$$c_a^* = C_{in} + \frac{K\alpha(\mu_a^{max} - D)}{Y_a^n(D + \alpha\mu_a^{max})}(N_{in} - n_a^*) \geq C_{in} \quad (5.10)$$

If $D \geq (1 + \alpha)\mu_a(N_{in}) - \alpha\mu_a^{max}$, there is no equilibrium with $a^* > 0$ and $b^* = 0$.

Corollary 2. *For the specific expression (5.2) of the function μ_a , one gets the expression*

$$n_a^* = K_a^n \frac{\alpha\mu_a^{max} + D}{\mu_a^{max} - D}$$

Proposition 3. *If $D < (1 + \alpha)\mu_a(N_{in}) - \alpha\mu_a^{max}$, let $n_a^* > 0$ be the unique solution of (5.9). If D satisfies moreover the condition*

$$\mu_b\left(\min\left(C_{in} - \frac{Y_b^c}{Y_b^n}(N_{in} - n_a^*), 0\right), n_a^*\right) < D < \mu_b(c_a^*, n_a^*) \quad (5.11)$$

where c_a^* is given in (5.10), then there exists an equilibrium with coexistence of micro-algae and bacteria

$$E_{ab} = (a_b^*, b_a^*, c_{ab}^*, n_a^*) \quad (5.12)$$

where $c_{ab}^* > 0$ is the unique solution of

$$\mu_b(c, n_a^*) = D \quad (5.13)$$

and $a_b^* > 0, b_a^* > 0$ are given by

$$a_b^* = \frac{D(1 + \alpha)(Y_b^c(N_{in} - n_a^*) - Y_b^n(C_{in} - c_{ab}^*))}{K\alpha Y_b^n(\mu_a^{max} - D) + Y_a^n Y_b^c(\alpha\mu_a^{max} + D)},$$

$$b_a^* = \frac{K\alpha(\mu_a^{max} - D)(N_{in} - n_a^*) + Y_a^n(\alpha\mu_a^{max} + D)(C_{in} - c_{ab}^*)}{K\alpha Y_b^n(\mu_a^{max} - D) + Y_a^n Y_b^c(\alpha\mu_a^{max} + D)}$$

If $D \geq (1 + \alpha)\mu_a(N_{in}) - \alpha\mu_a^{max}$ or if the condition (5.11) is not fulfilled, there does not exist any equilibrium with coexistence of micro-algae and bacteria.

Corollary 3. With the specific expressions (5.2), (5.3) of the functions μ_a and μ_b , one gets the expressions

$$n_a^* = K_a^n \frac{\alpha\mu_a^{max} + D}{\mu_a^{max} - D},$$

$$c_{ab}^* = \frac{K_b^c D}{\mu_b^{max} \frac{n^*}{K_b^n + n^*} - D} = \frac{DK_b^c (K_b^n (\mu_a^{max} - D) + K_a^n (\alpha\mu_a^{max} + D))}{K_a^n (\alpha\mu_a^{max} + D) (\mu_b^{max} - D) - DK_b^n (\mu_a^{max} - D)}$$

and condition (5.11) amounts to check that parameters of the model are such that

$$\begin{aligned} C_{in} - \frac{Y_b^c}{Y_b^n} \left(N_{in} - K_a^n \frac{\alpha\mu_a^{max} + D}{\mu_a^{max} - D} \right) \\ < \frac{DK_b^c (K_b^n (\mu_a^{max} - D) + K_a^n (\alpha\mu_a^{max} + D))}{K_a^n (\alpha\mu_a^{max} + D) (\mu_b^{max} - D) - DK_b^n (\mu_a^{max} - D)} \\ < C_{in} + \frac{K\alpha(\mu_a^{max} - D)}{Y_a^n (\alpha\mu_a^{max} + D)} \left(N_{in} - K_a^n \frac{\alpha\mu_a^{max} + D}{\mu_a^{max} - D} \right) \end{aligned}$$

5.4 Stability analysis

Under the conditions of existence of the various equilibriums given in Section 5.3, we study here their stability. All the proofs are given in the Appendix. We begin to show that solutions of system (5.1) are bounded.

Lemma 1. The non-negative domain $\mathbb{R}_+^4$ is invariant by any forward solution of system (5.1), which moreover converges exponentially to the sub-set

$$H := \left\{ (a, b, c, n) \in \mathbb{R}_+^4, a + \left(\frac{Y_b^c}{K} + \frac{Y_b^n}{Y_a^n} \right) b + \frac{c}{K} + \frac{n}{Y_a^n} = z^* \right\}$$

where

$$z^* := \frac{C_{in}}{K} + \frac{N_{in}}{Y_a^n}.$$

Let us first study the stability of the wash-out steady-state.

Proposition 4. When $D < \max((1 + \alpha)\mu_a(N_{in}) - \alpha\mu_a^{max}, \mu_b(C_{in}, N_{in}))$ the wash-out equilibrium E_0 is a saddle, and its stable manifold is

- $\{0\} \times \{0\} \times \mathbb{R}^2$ if $D < \min((1 + \alpha)\mu_a(N_{in}) - \alpha\mu_a^{max}, \mu_b(C_{in}, N_{in}))$
- $\{0\} \times \mathbb{R}^3$ if $D > \mu_b(C_{in}, N_{in})$
- $\mathbb{R} \times \{0\} \times \mathbb{R}^2$ if $D > (1 + \alpha)\mu_a(N_{in}) - \alpha\mu_a^{max}$

When $D > \max((1 + \alpha)\mu_a(N_{in}) - \alpha\mu_a^{max}, \mu_b(C_{in}, N_{in}))$, E_0 is a stable node.

We focus now on the stability of equilibrium with micro-algae or bacteria alone.

Proposition 5. Assume that the inequality $D < \mu_b(C_{in}, N_{in})$ is fulfilled. Then the equilibrium E_b with bacteria persistence and micro-algae leaching given by Proposition 1 is

1. locally exponentially stable if $D > \mu_a(n_b^*) - e(n_b^*)$,
2. a saddle when $D < \mu_a(n_b^*) - e(n_b^*)$, with a stable manifold $\mathcal{S}(E_b)$ of dimension 3.

Proposition 6. Assume that the inequality $D < (1 + \alpha)\mu_a(N_{in}) - \alpha\mu_a^{max}$ is fulfilled. Then the steady-state E_a with micro-algae persistence and bacteria leaching given by Proposition 2 is

1. a locally exponentially stable equilibrium if $D > \mu_b(c_a^*, n_a^*)$,
2. a saddle equilibrium when $D < \mu_b(c_a^*, n_a^*)$, with a stable manifold $\mathcal{S}(E_a)$ of dimension 3.

The analytical study of stability of the coexistence equilibrium appears to be quite complicated because of the expression of the Jacobian matrix in dimension 4. However, playing with the particular structure of this matrix (see the proof of Proposition 7 in Appendix), we can provide sufficient conditions for the stability of this equilibrium.

Proposition 7. Assume that E_{ab} exists for $\alpha = 0$. Then, for any $\alpha > 0$ sufficiently small, the four equilibria E_0 , E_a , E_b , E_{ab} exist with E_0 , E_a unstable and E_{ab} locally exponentially stable.

Note that under these conditions of Proposition 7, the equilibrium E_b could be stable or unstable. However, its stability is not changed when α is modified (see Proposition 5).

Remark 1. The proof of Proposition 7 shows that the eigenvalues of the Jacobian matrix at the equilibrium E_{ab} are $-D$ and the ones of the polynomial $\lambda^3 + p_2\lambda^2 + p_1\lambda + p_0$, where p_0 , p_1 , p_2 are defined in (5.19). From the Cardan formulas, this polynomial has roots with imaginary parts exactly when the condition $4P^3 + 27Q^2 > 0$ is verified, where $P = p_1 - \frac{p_2^3}{3}$, $Q = \frac{2p_2^3}{27} - \frac{p_1p_2}{3} + p_0$. Therefore, when the equilibrium E_{ab} exists and is exponentially stable, trajectories converging to E_{ab} present oscillations under this condition.

5.5 Discussion

Results of Sections 5.3 and 5.4 allow to draw the following conclusions.

- When D is large enough, the wash-out E_0 is the unique equilibrium, which is then globally exponentially stable (see Propositions 1, 2, 3 and 4).
- When D is not too large, both equilibria E_a , E_b exist (cf Propositions 1 and 2), but not necessarily E_{ab} if C_{in} is large and D small (cf condition (5.11) of Proposition 3).

- When E_{ab} exists (cf conditions of Proposition 3), then E_a exists and is necessarily unstable (by Propositions 2 and 6). However E_b does not necessarily exist, because condition (5.11) of Proposition 3 could be satisfied and not the one of Proposition 1 when c_a^* defined in (5.10) is larger than C_{in} .
- When N_{in} is large enough and D not too large, then condition (5.11) is verified and four equilibria exist (cf Propositions 1, 2 and 3).

5.6 Numerical simulations

We investigate through numerical simulations the magnitude of the impact of the micro-algae exudates on both heterotrophic bacteria and micro-algae dynamics and the influence of changing nutrient inputs supply on interactions. Such conditions can be encountered in natural ecosystems impacted by anthropogenic inputs or in more productive systems where inorganic nutrient limitation is becoming increasingly important.

We selected from literature two sets of parameters as detailed in Table 5.1 for the inorganic nutrients nitrogen ($N-NH_4^+$) and phosphorus ($P-PO_4$).

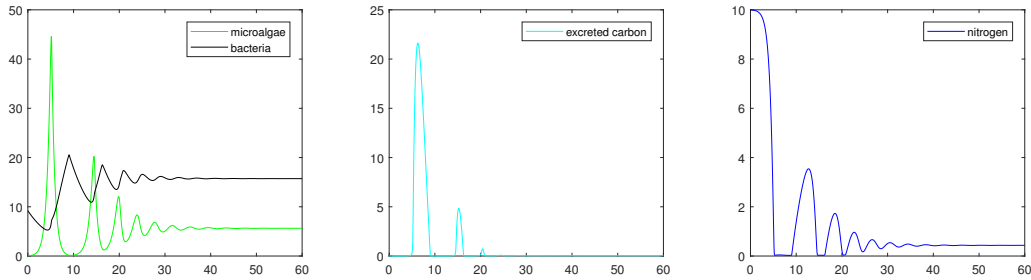


Figure 5.1: Simulation under nitrogen limitation for $T_f = 60$, $D = 0.15$, $C_{in} = 0$, $N_{in} = 10$, $A_0 = 0.05$, $B_0 = 9.20$, $C_0 = C_{in}$, $N_0 = N_{in}$, $K = 0.8$, and $\alpha = 1$.

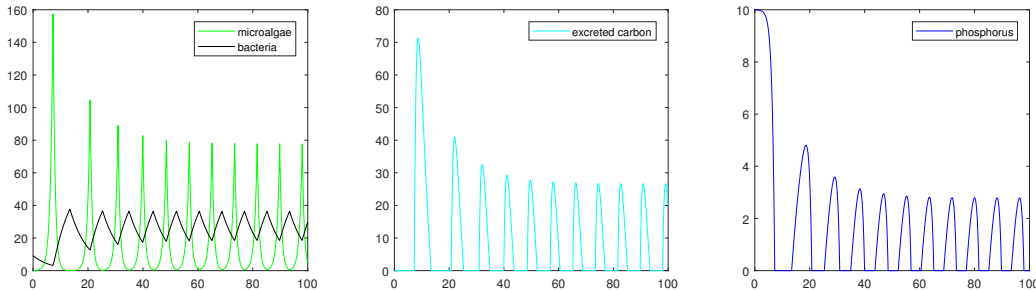


Figure 5.2: Simulation under phosphorus limitation for $T_f = 100$, $D = 0.15$, $C_{in} = 0$, $N_{in} = 10$, $A_0 = 0.05$, $B_0 = 9.20$, $C_0 = C_{in}$, $N_0 = N_{in}$, and $\alpha = 1$.

Table 5.1: Summary of the model parameters employed in two cases of inorganic nutrient limitation (N or P)

State variables		N limitation	P limitation	Unit
a	algal biomass			mgL^{-1}
b	bacterial biomass			mgL^{-1}
c	ambient dissolved organic carbon			mgL^{-1}
n	ambient concentration of inorganic nutrient			mgL^{-1}
Algal parameters				
μ_a^{max}	maximum specific growth rate	1.6320 [357]	1.26 [358]	d^{-1}
K_a^n	half-saturation constant for inorganic nutrient assimilation	0.3607 [357]	0.005 [359]	mgL^{-1}
Y_a^n	conversion yield for inorganic nutrient	0.1764 [360]	0.0630 [361]	$g.g^{-1}$
Bacterial parameters				
μ_b^{max}	maximum specific growth rate	1.5520 [357]	4.45 [358]	d^{-1}
K_b^c	half-saturation constant of DOC	0.2500 [362]	0.4024 [358]	mgL^{-1}
K_b^n	half-saturation constant for inorganic nutrient assimilation	0.0896 [357]	0.0004 [358]	mgL^{-1}
Y_b^c	conversion yield for carbon	1.4149 [360]	1.4149 [360]	$g.g^{-1}$
Y_b^n	conversion yield for inorganic nutrient	0.2331 [360]	0.1622 [363, 364]	$g.g^{-1}$
Other parameters				
K	percentage of labile DOC	0-1	0-1	
Operational conditions				
D	dilution rate			d^{-1}
C_{in}	inlet DOC concentration			mgL^{-1}
N_{in}	inlet inorganic nutrient concentration			mgL^{-1}
A_0	initial algal biomass			mgL^{-1}
B_0	initial bacterial biomass			mgL^{-1}
C_0	initial DOC concentration			mgL^{-1}
N_0	initial inorganic nutrient concentration			mgL^{-1}

Appendix

To lighten the writing, we shall denote μ'_{bc} and μ'_{bn} for the partial derivative of μ_b with respect to c and n respectively.

Proof of Proposition 1

We consider the sub-system of (5.1) with $a = 0$:

$$\begin{cases} \dot{b} = (\mu_b(c, n) - D)b \\ \dot{c} = (C_{in} - c)D - Y_b^c \mu_b(c, n)b \\ \dot{n} = (N_{in} - n)D - Y_b^n \mu_b(c, n)b \end{cases} \quad (5.14)$$

from which one observes the property

$$\frac{d}{dt}(Y_b^c b + c) = D(C_{in} - (Y_b^c b + c)), \quad \frac{d}{dt}(Y_b^n b + n) = D(N_{in} - (Y_b^n b + n))$$

Therefore, any equilibrium of (5.14) satisfies $Y_b^c b^* + c^* = C_{in}$ and $Y_b^n b^* + n^* = N_{in}$. Then, from the first equation in (5.14), one obtains that an equilibrium $b^* > 0$ has to verify $\mu_b(c^*, n^*) = D$, that is $F(b^*) = D$, with

$$F(b) := \mu_b(C_{in} - Y_b^c b, N_{in} - Y_b^n b)$$

Clearly, F is a decreasing function on $(0, \underline{b})$ with $F(0) = \mu_b(C_{in}, N_{in}) > F(\underline{b}) = 0$ and $\underline{b} := \min(C_{in}/Y_b^c, N_{in}/Y_b^n)$. Therefore there exists an equilibrium with $b^* > 0$ exactly when $F(0) > D$ and it is then unique. Moreover one has $b^* < \underline{b}$, which implies $c^* = C_{in} - Y_b^c b^* > 0$ and $n^* = N_{in} - Y_b^n b^* > 0$, the pair (c^*, n^*) being thus uniquely defined.

Proof of Proposition 2

We consider the sub-system of (5.1) with $b = 0$:

$$\begin{cases} \dot{a} = (\mu_a(n) - e(n) - D)a \\ \dot{c} = (C_{in} - c)D + Ke(n)a \\ \dot{n} = (N_{in} - n)D - Y_a^n \mu_a(n)a \end{cases} \quad (5.15)$$

From the first equation of (5.15), one obtains that an equilibrium with $a^* > 0$ imposes to have $\mu_a(n^*) - e(n^*) = D$ that is $G(n^*) = D$ with $G(n) := (1 + \alpha)\mu_a(n) - \alpha\mu_a^{max}$. From the last equation, one obtains that an equilibrium with $a^* > 0$ imposes to have $n^* < N_{in}$. G being an increasing function with $G(0) < 0$ one concludes that a solution of $G(n) = D$ with $n < N_{in}$ exists exactly when $D < G(N_{in})$ and is then unique. The value of a at steady state is then uniquely defined by the linear equation $D(N_{in} - n^*) - Y_a^n \frac{D + \alpha\mu_a^{max}}{1 + \alpha} a^* = 0$.

Finally, from the second equation of (5.15) one has

$$c^* = C_{in} + \frac{Ke(n^*)a^*}{D} = C_{in} + \frac{K\alpha(\mu_a^{max} - D)}{D(1 + \alpha)}a^*$$

and replacing a^* by its expression, one obtains c^* as a function of n^* .

Proof of Proposition 3

Consider an equilibrium of system (5.1) with $a^* > 0$ and $b^* > 0$. From the first equation of (5.1), one gets that n^* is a positive solution of (5.9), and it verifies $n^* < N_{in}$ from the last equation of (5.1). There exists a such solution exactly when $D < (1 + \alpha)\mu_a(N_{in}) - \alpha\mu_a^{max}$, and it is then unique.

From the second equation of (5.1), c^* has to be a positive solution of the equation $\mu_b(c, n^*) = D$. If it exists, then it is unique.

With the two last equations of (5.1) at steady-state, one obtains that (a^*, b^*) has to be a solution if the linear system of equations

$$\underbrace{\begin{bmatrix} -K\alpha\frac{\mu_a^{max}-D}{1+\alpha} & DY_b^c \\ Y_a^n\frac{\alpha\mu_a^{max}+D}{1+\alpha} & DY_b^n \end{bmatrix}}_M \begin{bmatrix} a \\ b \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} D(C_{in} - c^*) \\ D(N_{in} - n^*) \end{bmatrix} \quad (5.16)$$

where the matrix M is such that

$$\det(M) = -D \left(K\alpha Y_b^n \frac{\mu_a^{max} - D}{1 + \alpha} + Y_a^n Y_b^c \frac{\alpha\mu_a^{max} + D}{1 + \alpha} \right)$$

is negative under the condition $D < (1 + \alpha)\mu_a(N_{in}) - \alpha\mu_a^{max}$. Therefore, there exists a unique solution to the system (5.16) given by the expressions

$$\begin{aligned} a^* &= -\frac{D^2}{\det(M)} (Y_b^c(N_{in} - n^*) - Y_b^n(C_{in} - c^*)) \\ b^* &= -\frac{D}{\det(M)} \left(K\alpha\frac{\mu_a^{max} - D}{1 + \alpha}(N_{in} - n^*) + Y_a^n\frac{\alpha\mu_a^{max} + D}{1 + \alpha}(C_{in} - c^*) \right) \end{aligned}$$

which are both positive when c^* fulfills the following inequalities

$$C_{in} - \frac{Y_b^c}{Y_b^n}(N_{in} - n^*) < c^* < C_{in} + \frac{K\alpha(\mu_a^{max} - D)}{Y_a^n(\alpha\mu_a^{max} + D)}(N_{in} - n^*) \quad (5.17)$$

Note that the condition $D < (1 + \alpha)\mu_a(N_{in}) - \alpha\mu_a^{max}$ implies $D < \mu_a^{max}$, so that inequalities in (5.17) are compatible. Then, the right inequality in (5.11) guarantees exactly the existence of c^* solution of $\mu_b(c, n^*) = D$ that satisfies the right inequality in (5.17). Finally, condition (5.17) is equivalent to

condition (5.11), and one obtains the expressions of a^* and b^* stated in the proposition.

Proof of Lemma 1

To prove that the positive orthant $\mathbb{R}_+^4$ is forward invariant, we show that each face $x_i = 0$ ($i \in \{1 \dots 4\}$) cannot be crossed from the positive orthant, that is

$$\{x_i = 0, x_j \geq 0, j \neq i\} \Rightarrow \dot{x}_i \geq 0, \quad i = 1 \dots 4$$

where $x = (a, b, c, n)^\top$:

- $a = 0 \Rightarrow \dot{a} = 0$
- $b = 0 \Rightarrow \dot{b} = 0$
- $c = 0 \Rightarrow \dot{c} = C_{in}D + K(e(n)a) > 0$
- $n = 0 \Rightarrow \dot{n} = N_{in}D > 0$

Consider now the variable

$$z(t) = a(t) + \left(\frac{Y_b^c}{K} + \frac{Y_b^n}{Y_a^n} \right) b(t) + \frac{c(t)}{K} + \frac{n(t)}{Y_a^n} \quad (5.18)$$

From equations (5.1), one obtains its dynamics as

$$\dot{z} = D(z^* - z)$$

whose solutions converge exponentially to z^* . This amounts to have any solution $(a(t), b(t), c(t), n(t))$ converging exponentially to H when t tends to $+\infty$.

Proof of Proposition 4

Let us write the Jacobian matrix J_0 of the dynamics at E_0

$$J_0 = \begin{bmatrix} \mu_a(N_{in}) - e(N_{in}) - D & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \mu_b(C_{in}, N_{in}) - D & 0 & 0 \\ K e(N_{in}) & -Y_b^c \mu_b(C_{in}, N_{in}) & -D & 0 \\ -Y_a^n \mu_a(N_{in}) & -Y_b^n \mu_b(C_{in}, N_{in}) & 0 & -D \end{bmatrix}$$

Its eigenvalues are $\mu_a(N_{in}) - e(N_{in}) - D$, $\mu_b(C_{in}, N_{in}) - D$, $-D$, $-D$. When at least one of them is positive, E_0 is a saddle with a stable manifold $\mathcal{S}(E_0)$ of dimension 2 or 3.

The hyperplane $H_{ab} = \{0\} \times \{0\} \times \mathbb{R}^2$ is invariant and the dynamics of (5.1) on H_{ab} is

$$\begin{cases} \dot{c} = (C_{in} - c)D \\ \dot{n} = (N_{in} - n)D \end{cases}$$

whose solutions converge asymptotically to (C_{in}, N_{in}) . When $D < \mu_a(N_{in}) - e(N_{in})$ and $D < \mu_b(C_{in}, N_{in})$, the stable manifold $\mathcal{S}(E_0)$ is of dimension 2 and is thus H_{ab} .

The hyperplane $H_a = \{0\} \times \mathbb{R}^3$ is invariant and the dynamics of (5.1) on H_a is given by

$$\begin{cases} \dot{b} = (\mu_b(c, n) - D)b \\ \dot{c} = (C_{in} - c)D - Y_b^c \mu_b(c, n)b \\ \dot{n} = (N_{in} - n)D - Y_b^n \mu_b(c, n)b \end{cases}$$

From the two last equations, one obtains that the sub-domain $\{c \leq C_{in}, n \leq N_{in}\}$ is attractive and on this one one has $\dot{b} \leq (\mu_b(C_{in}, N_{in}) - D)b$. Therefore, when $D > \mu_b(C_{in}, N_{in})$ any solution of the dynamics on H_a converges asymptotically to $(0, C_{in}, N_{in})$. When moreover $D < \mu_a(N_{in}) - e(N_{in})$, $\mathcal{S}(E_0)$ is of dimension 3 and is thus H_a .

The hyperplane $H_b = \mathbb{R} \times \{0\} \times \mathbb{R}^2$ is invariant and the dynamics of (5.1) on H_b is given by

$$\begin{cases} \dot{a} = (\mu_a(n) - e(n) - D)a \\ \dot{c} = (C_{in} - c)D + Ke(n)a \\ \dot{n} = (N_{in} - n)D - Y_a^n \mu_a(n)a \end{cases}$$

From the last equation, one gets that any solution on H_b converges to the sub-domain $\{n \leq N_{in}\}$ but on this last one one has $\dot{a} \leq (\mu_a(N_{in}) - e(N_{in}) - D)a$ and therefore when $D > \mu_a(N_{in}) - e(N_{in})$, any solution on H_b converges asymptotically to $(0, C_{in}, N_{in})$. When moreover $D < \mu_b(C_{in}, N_{in})$, $\mathcal{S}(E_0)$ is of dimension 3 and is thus H_b .

Proof of Proposition 5

Following the proof of Lemma 1, one can write the system (5.1) in coordinates (z, a, c, n) , where z is defined in (5.18), which presents the cascade structure

$$\begin{cases} \frac{dz}{dt} = D(z^* - z) \\ \frac{d}{dt} \begin{bmatrix} a \\ c \\ n \end{bmatrix} = F_b(z, a, c, n) \end{cases}$$

Consequently, the eigenvalues of E_b are $-D$ and the ones of the Jacobian matrix J_b of the map $G_b(a, c, n) := F_b(z^*, a, c, n)$ at $(0, c^*, n^*)$. Let us define for convenience the number

$$\gamma := \left(\frac{Y_b^c}{K} + \frac{Y_b^n}{Y_a^n} \right)^{-1}.$$

A straightforward computation, where the variable b has been replaced by $\gamma \left(\frac{C_{in}-c}{K} + \frac{N_{in}-n}{Y_a^n} - a \right)$ in the (a, c, n) -dynamics, gives a Jacobian matrix J_b of the form

$$J_b = \left[\begin{array}{c|cc} \mu_a(n^*) - e(n^*) - D & 0 & 0 \\ \hline & * & \\ & * & M \end{array} \right]$$

with the following elements of the 2×2 sub-matrix M :

$$\begin{aligned} M_{11} &= -D + Y_b^c \left(\frac{\gamma}{K} \mu_b(c^*, n^*) - \mu'_{bc}(c^*, n^*) b^* \right) \\ M_{12} &= Y_b^c \left(\frac{\gamma}{Y_a^n} \mu_b(c^*, n^*) - \mu'_{bn}(c^*, n^*) b^* \right) \\ M_{21} &= Y_b^n \left(\frac{\gamma}{K} \mu_b(c^*, n^*) - \mu'_{bc}(c^*, n^*) b^* \right) \\ M_{22} &= -D + Y_b^n \left(\frac{\gamma}{Y_a^n} \mu_b(c^*, n^*) - \mu'_{bn}(c^*, n^*) b^* \right) \end{aligned}$$

The eigenvalues of the matrix J_b are $\mu_a(n^*) - e(n^*) - D$ and the ones of the matrix M , whose trace and determinant are as follows.

$$\begin{aligned} tr &= -D + \mu_b(c^*, n^*) \gamma \left(\frac{Y_b^c}{K} + \frac{Y_b^n}{Y_a^n} \right) - (Y_b^c \mu'_{bc}(c^*, n^*) + Y_b^n \mu'_{bn}(c^*, n^*)) b^* \\ det &= D^2 + D \left((Y_b^c \mu'_{bc}(c^*, n^*) + Y_b^n \mu'_{bn}(c^*, n^*)) b^* - \mu_b(c^*, n^*) \gamma \left(\frac{Y_b^c}{K} + \frac{Y_b^n}{Y_a^n} \right) \right) \\ &\quad + Y_b^c Y_b^n \left(\frac{\gamma}{K} \mu_b(b^*, n^*) - \mu'_{bc}(c^*, n^*) b^* \right) \left(\frac{\gamma}{Y_a^n} \mu_b(c^*, n^*) - \mu'_{bn}(c^*, n^*) b^* \right) \end{aligned}$$

Taking into consideration that one has $\mu_b(c^*, n^*) = D$ at steady state E_b and the expression of γ , one obtains

$$\begin{aligned} tr &= -(Y_b^c \mu'_{bc}(c^*, n^*) + Y_b^n \mu'_{bn}(c^*, n^*)) b^* < 0 \\ det &= D (Y_b^c \mu'_{bc}(c^*, n^*) + Y_b^n \mu'_{bn}(c^*, n^*)) b^* \\ &\quad - D \frac{Y_b^c \mu'_{bc}(c^*, n^*) \frac{Y_b^n}{Y_a^n} + Y_b^n \mu'_{bn}(c^*, n^*) \frac{Y_b^c}{K}}{\frac{Y_b^c}{K} + \frac{Y_b^n}{Y_a^n}} b^* \\ &\quad + Y_b^c Y_b^n \left(\frac{\gamma^2}{Y_a^n K} D^2 + \mu'_{bc}(c^*, n^*) \mu'_{bn}(c^*, n^*) b^{*2} \right) > 0 \end{aligned}$$

The 2×2 sub-matrix is thus Hurwitz. Finally, the equilibrium E_b has $-D$ and $\mu_a(n^*) - e(n^*) - D$ as eigenvalues, and the other ones have negative real part. Therefore, the sign of $\mu_a(n^*) - e(n^*) - D$ determines the nature of the equilibrium E_b .

Proof of Proposition 6

We proceed in a similar way to the proof of Proposition 5. Here, we write the system (5.1) in coordinates (z, b, c, n) , where z is defined in (5.18), which presents the cascade structure

$$\begin{cases} \dot{z} = D(z^* - z) \\ \frac{d}{dt} \begin{bmatrix} b \\ c \\ n \end{bmatrix} = G_a(z, b, c, n) \end{cases}$$

The eigenvalues of E_a are thus $-D$ and the ones of the Jacobian matrix J_a of the map $F_a(b, c, n) = G_a(z^*, b, c, n)$ at $(0, c^*, n^*)$. A straightforward computation, where a has been replaced by the quantity $a = \frac{C_{in}-c}{K} + \frac{N_{in}-n}{Y_a^n} - \left(\frac{Y_b^c}{K} + \frac{Y_b^n}{Y_a^n} \right) b$ in the (b, c, n) -dynamics, gives a matrix of the form

$$J_a = \left[\begin{array}{c|cc} \mu_b(c^*, n^*) - D & 0 & 0 \\ \hline \star & -D - e(n^*) & Ke'(n^*)a^* - \frac{K}{Y_a^n}e(n^*) \\ \star & \frac{Y_a^n}{K}\mu_a(n^*) & -D - Y_a^n\mu'_a(n^*)a^* + \mu_a(n^*) \end{array} \right]$$

The eigenvalues of the matrix J_a are $\mu_b(c^*, n^*) - D$ and the ones of the lower-right 2×2 sub-matrix M . Using the property $\mu_a(n^*) - e(n^*) - D = 0$ that is satisfied at steady state E_a^* , one obtains

$$\begin{aligned} tr(M) &= -D - Y_a^n\mu'_a(n^*)a^* < 0 \\ det(M) &= (D + e(n^*))(Y_a^n\mu'_a(n^*)a^* - e(n^*)) - \mu_a(n^*)(Y_a^n e'(n^*)a^* - e(n^*)) \\ &= Y_a^n\mu_a(n^*)a^*(\mu'_a(n^*) - e'(n^*)) > 0 \end{aligned}$$

We conclude that $-D$ and $\mu_b(c^*, n^*) - D$ are eigenvalues of E_a and all the other eigenvalues have negative real part. This ends the proof.

Proof of Proposition 7

Let us write the Jacobian matrix J_{ab} at steady state E_{ab} (when it exists)

$$\left[\begin{array}{cccc} 0 & 0 & 0 & (\mu'_a(n_a^*) - e'(n_a^*))a_b^* \\ 0 & 0 & \mu'_{bc}(c_{ab}^*, n_a^*)b_a^* & \mu'_{bn}(c_{ab}^*, n_a^*)b_a^* \\ Ke(n_a^*) & -Y_b^c D & -D - Y_b^c \mu'_{bc}(c_{ab}^*, n_a^*)b_a^* & Ke'(n_a^*)a_b^* - Y_b^c \mu'_{bn}(c_{ab}^*, n_a^*)b_a^* \\ -Y_a^n \mu_a(n_a^*) & -Y_b^n D & -Y_b^n \mu'_{bc}(c_{ab}^*, n_a^*)b_a^* & -D - Y_a^n \mu'_a(n_a^*)a_b^* - Y_b^n \mu'_{bn}(c_{ab}^*, n_a^*)b_a^* \end{array} \right]$$

Replacing the first column $L1$ by $L1 + Ke(n_a^*)/(Y_b^c D)L2$ where $L2$ is the second column of J_{ab} , one obtains an anti-triangular matrix of same rank, whose determinant is given by the product of the main anti-diagonal entries, which are all non-null (the function $\mu_a - e$ is increasing and therefore its derivative is non null). Therefore the matrix J_{ab} has no null eigenvalue. Note that this matrix

possesses a particular structure

$$J_{ab} = \begin{bmatrix} 0 & T \\ A & B \end{bmatrix}$$

where T, A, B are 2×2 matrices. Therefore, any (non-null) eigenvalue λ of J_{ab} and associated eigenvector $X = (X_1, X_2)^\top$, where X_1, X_2 are in $\mathbb{R}^2$, satisfy

$$TX_2 = \lambda X_1, \quad (AT + \lambda B - \lambda^2 I_2)X_2 = 0$$

where I_2 denotes the identity matrix if dimension 2. We deduce that the eigenvalues λ of J_{ab} are exactly the solutions of

$$\det(AT + \lambda B - \lambda^2 I_2) = 0$$

One obtains easily the expression of the entries of the matrix $M(\lambda) = AT + \lambda B - \lambda^2 I_2$ as follows

$$\begin{aligned} M_{11}(\lambda) &= -Y_b^c D\mu'_{bc}(c_{ab}^*, n_a^*)b_a^* - \lambda(D + Y_b^c \mu'_{bc}(c_{ab}^*, n_a^*)b_a^*) - \lambda^2 \\ M_{12}(\lambda) &= Ke(n_a^*)(\mu'_a(n_a^*) - e'(n_a^*))a_b^* - Y_b^c D\mu'_{bn}(c_{ab}^*, n_a^*)b_a^* \\ &\quad + \lambda(Ke'(n_a^*)a_b^* - Y_b^c \mu'_{bn}(c_{ab}^*, n_a^*)b_a^*) \\ M_{21}(\lambda) &= -Y_b^n D\mu'_{bc}(c_{ab}^*, n_a^*)b_a^* - \lambda Y_b^n \mu'_{bc}(c_{ab}^*, n_a^*)b_a^* \\ M_{22}(\lambda) &= -Y_a^n \mu_a(n_a^*)(\mu'_a(n_a^*) - e'(n_a^*))a_b^* - Y_b^n D\mu'_{bn}(c_{ab}^*, n_a^*)b_a^* \\ &\quad - \lambda(D + Y_a^n \mu'_a(n_a^*)a_b^* + Y_b^n \mu'_{bn}(c_{ab}^*, n_a^*)b_a^*) - \lambda^2 \end{aligned}$$

One can see that $(D + \lambda)$ can be factorized in M_{11} and M_{21} , that is on the first column of $M(\lambda)$. Therefore $-D$ is an eigenvalue of J and the other eigenvalues λ are solutions of $\det(N(\lambda)) = 0$ where $N(\lambda) = M(\lambda)diag(\lambda + D, 1)^{-1}$ (when $diag(d_1, d_2)$ denotes the diagonal matrix with entries d_1, d_2 in the main diagonal). One has then

$$\begin{aligned} N_{11}(\lambda) &= -\lambda - Y_b^c D\mu'_{bc}(c_{ab}^*, n_a^*)b_a^* \\ N_{12}(\lambda) &= Ke(n_a^*)(\mu'_a(n_a^*) - e'(n_a^*))a_b^* - Y_b^c D\mu'_{bn}(c_{ab}^*, n_a^*)b_a^* \\ &\quad + \lambda(Ke'(n_a^*)a_b^* - Y_b^c \mu'_{bn}(c_{ab}^*, n_a^*)b_a^*) \\ N_{21}(\lambda) &= -Y_b^n D\mu'_{bc}(c_{ab}^*, n_a^*)b_a^* \\ N_{22}(\lambda) &= -Y_a^n \mu_a(n_a^*)(\mu'_a(n_a^*) - e'(n_a^*))a_b^* - Y_b^n D\mu'_{bn}(c_{ab}^*, n_a^*)b_a^* \\ &\quad - \lambda(D + Y_a^n \mu'_a(n_a^*)a_b^* + Y_b^n \mu'_{bn}(c_{ab}^*, n_a^*)b_a^*) - \lambda^2 \end{aligned}$$

and obtains finally $\det(N(\lambda)) = \lambda^3 + p_2\lambda^2 + p_1\lambda + p_0$ with

$$\begin{cases} p_0 = D\mu'_{bc}(c_{ab}^*, n_a^*)b_a^*(\mu'_a(n_a^*) - e'(n_a^*))a_b^*(Y_b^c Y_a^n \mu_a(n_a^*) + Y_b^n K e(n_a^*)) \\ p_1 = Y_a^n \mu_a(n_a^*)(\mu'_a(n_a^*) - e'(n_a^*))a_b^* + Y_b^n D\mu'_{bn}(c_{ab}^*, n_a^*)b_a^* \\ \quad + D\mu'_{bc}(c_{ab}^*, n_a^*)b_a^*(Y_b^c D + (Y_b^c Y_a^n \mu'_a(n_a^*) + Y_b^n K e'(n_a^*))a_b^*) \\ p_2 = D + Y_a^n \mu'_a(n_a^*)a_b^* + Y_b^n \mu'_{bn}(c_{ab}^*, n_a^*)b_a^* + Y_b^c D\mu'_{bc}(c_{ab}^*, n_a^*)b_a^* \end{cases} \quad (5.19)$$

One has $p_0 > 0$ and $p_2 > 0$ (remind that $\mu_a - e$ is an increasing function). From the Routh-Hurwitz criterion, the roots λ are all with negative real parts exactly when the condition $p_1 p_2 > p_0$ is satisfied.

Let us now consider the particular case $\alpha = 0$, for which the function e is identically null, and assume that equilibrium E_{ab} exists (i.e. conditions of Proposition 3 are satisfied for $\alpha = 0$). Then, one has

$$\begin{cases} p_1 > D\mu'_{bc}(c_{ab}^*, n_a^*)b_a^* Y_b^c Y_a^n \mu'_a(n_a^*)a_b^* \\ p_2 > D = \mu_a(n_a^*) \end{cases} \\ \Rightarrow p_1 p_2 > D\mu'_{bc}(c_{ab}^*, n_a^*)b_a^* Y_b^c Y_a^n \mu'_a(n_a^*)a_b^* \mu_a(n_a^*) = p_0$$

Equilibrium E_{ab} is thus stable. Note that when $\alpha = 0$, condition (5.11) implies the existence of the equilibrium E_b , according to Proposition 1 (because one has $c_a^* = C_{in}$ from (5.10)). Moreover, the condition of Proposition 3 implies also the existence of the equilibrium E_a , according to Proposition 2. Finally, condition (5.11) implies that E_a is unstable by Proposition 6. We conclude by continuity of the various expressions with respect to α .

5.7 Principales contributions et perspectives sur la modélisation de l'effet des exsudats des microalgues sur les interactions algue–bactérie

L'observation du bassin expérimental en extérieur aux périodes de forte production algale a montré une synchronisation des pics de bactéries avec les pics de microalgues [6], ce qui a suggéré la possibilité d'interactions de type mutualisme ou commensalisme entre les deux communautés. Afin de mieux comprendre la nature des relations interspécifiques entre les espèces algales isolées du bassin et leur consortia bactérien respectifs, des expérimentations ont été réalisées au cours d'un stage [365]. Une élimination sélective de la croissance algale a été assurée par l'utilisation d'un inhibiteur de la biosynthèse des protéines (cycloheximide) chez les deux espèces algales *C. sorokiniana* et *S. pectinatus* cultivées en monoculture dans des cultures batch avec les bactéries qui leur sont associées. Le suivi journalier de l'abondance des cellules algales a montré une décroissance algale à une certaine concentration de l'inhibiteur (25 mgL^{-1}) alors que la croissance de la communauté bactérienne associée à chaque microalgue a été favorisée par cette inhibition. Par rapport au témoin (sans ajout d'inhibiteur), la plus forte croissance bactérienne observée dans les conditions d'arrêt de la croissance des micro-algues peut être expliquée par la consommation de la matière organique résultante de la forte inhibition ou de la mortalité des cellules algales, étant la seule ressource carbonée disponible pour les bactéries dans le milieu de culture. Ainsi, ces expériences n'ont pas permis de mettre en évidence une interaction de type mutualisme entre les micro-algues isolées et la communauté bactérienne. Au contraire, les bactéries semblent se développer plus rapidement lors de l'inhibition ou de la mort des microalgues, suggérant une interaction de type antagoniste ou saprophyte.

Toutefois, il existe de nombreuses études (e.g. [366, 367]) qui montrent que l'exsudation algale est favorisée en condition de stress. La littérature suggère que le stress induit par une carence en nutriments stimule les microalgues à libérer des composés organiques dissous à l'extérieur de la cellule afin de maintenir son intégrité. Ces exsudats peuvent servir comme ressource nutritive pour les bactéries qui leur sont associées, et notamment comme médiateur dans la compétition algues-bactéries sur la ressource minérale commune pouvant limiter leur croissance dans les procédés de traitement des eaux. Afin de mieux comprendre les interactions commensalisme vs compétition entre micro-algues et bactéries qui mènent à la situation paradoxale où les microalgues favorisent ses compétiteurs, nous avons proposé d'étudier le comportement de l'assemblage algue–bactérie sous ces hypothèses à l'aide d'un modèle mathématique relativement simple (5.1). Ce modèle représente une interaction indirecte entre algue–bactérie à travers le nutriment inorganique n commun (azote ou phosphore). Le modèle (??) tient compte d'une variable supplémentaire c pour représenter le carbone organique dans le milieu de culture. Elle inclut les exsudats libérés par les micro-algues. L'exudation du carbone organique est supposée être proportionnelle à l'écart entre le taux de croissance maximum et le taux de croissance effectivement réalisé par la microalgue. Il s'agit d'une approximation respective du carbone maximum assimilé lors de la photosynthèse et du carbone utilisé pour la croissance. La vitesse d'ex-

sudation serait donc conditionnée par l'état nutritionnel et la vitesse de croissance en admettant que le surplus de matière organique produite par les microalgues lors de la photosynthèse sera excrété. Nous supposons que la croissance algale est décrite par une fonction de Monod sur le nutriment minéral n considéré et que la croissance bactérienne est donnée par le produit de deux fonctions de Monod sur deux ressources : organique c et minérale n .

Une première étude du modèle dynamique a été réalisée au cours de la thèse prenant en compte ce phénomène a montré la possibilité d'oscillations des densités des populations algales et bactériennes au cours du temps, endogènes au modèle (pour des valeurs des paramètres du modèle cohérentes avec les données de la littérature sur l'azote (cf. Figure 5.1) et sur le phosphore (Figure 5.2)). Ceci représente une possible explication des phénomènes oscillatoires observés expérimentalement et non dus aux variations temporelles de lumière. Ces résultats ont motivé l'étude théorique de ce modèle. L'étude des équilibres du modèle (??) et les analyses de stabilité ont permis de conclure que si D est assez grand, l'équilibre de lessivage $E_0 = (0, 0, C_{in}, N_{in})$ (i.e. sans biomasse) est alors un équilibre unique. De plus, E_0 est globalement exponentiellement stable. Lorsque D n'est pas assez grand, les deux équilibres $E_a = (a^*, 0, c_a^*, n_a^*)$ (i.e. sans bactéries) et $E_b = (0, b^*, c_b^*, n_b^*)$ (i.e. sans microalgues) existent. Par contre, si C_{in} est grand et D est petit, l'équilibre E_{ab} de coexistence des microalgues avec les bactéries n'existe pas forcément. En outre, si E_{ab} existe, alors E_a existe également et il est nécessairement instable, ce qui montre la robustesse de l'installation des bactéries. Cependant, E_b n'existe pas forcément. En effet, une certaine condition bien définie sur D et qui peut-être satisfaite, mais pas la condition sur l'existence de E_b lorsque c_a^* (à une valeur bien définie) est plus grand que C_{in} . Ceci montre que les bactéries ne peuvent pas croître en l'absence des microalgues. Enfin, si N_{in} est assez grand et D n'est pas assez grand alors la condition de coexistence est vérifiée et les quarts équilibres existent.

Ce travail a permis de montrer que les microalgues peuvent coexister avec des bactéries, voire faciliter leur croissance étant donné que sous une certaine condition bien définie sur le taux de dilution, les bactéries ne peuvent pas se développer en l'absence des microalgues. De plus, il est possible d'avoir des oscillations des densités des populations algales et bactériennes au cours du temps endogène au modèle pour des valeurs de paramètres cohérents avec la littérature.

Une perspective de ce travail serait de considérer l'effet de la reminéralisation des composés organiques par les bactéries sur les exsudats ou débris cellulaires en considérant des termes de mortalité sur les compartiments biologiques, et réinjecter de la ressource minérale qui devient biodisponible dans le système et utilisable par les microalgues (cf. [368]) ou encore ajouter des termes de maintenance et réétudier de nouveau le système.

Une autre perspective de ce travail serait de valider le modèle avec des données réelles au laboratoire. Pour ce faire, nous avons réfléchi à un dispositif de culture alimenté en continu : chimostat équipé d'une membrane pour séparer les microalgues des bactéries. La réflexion théorique est décrite dans l'Annexe D.

About frame estimation of growth functions and robust prediction in bioprocess modeling

Ce chapitre a été publié dans *Journal of Process Control* en 2019.

Emna Krichen^{1,2,3}, Alain Rapaport¹ et Éric Fouilland²

¹ : UMR MISTEA, Univ. Montpellier, INRAE, SupAgro, Montpellier, France

² : UMR MARBEC, Univ. Montpellier, CNRS, IFREMER, IRD, Sète, France

³ : Agence de l'environnement et de la Maîtrise de l'Energie, Angers, France

Résumé

Nous avons abordé ici le problème de la détermination d'un encadrement fonctionnel d'un ensemble de points de données expérimentaux en vue de réaliser des prédictions robustes qui varient au cours du temps, ce qui est d'une importance cruciale pour la surveillance des bioprocédés. Nous avons proposé une méthode qui fournit des limites fonctionnelles garanties, au lieu d'un ensemble de valeurs de paramètres pour des fonctions de croissance comme les fonctions classiques de Monod ou d'Haldane qui sont couramment utilisées dans la modélisation de la croissance microbienne. Nous avons illustré l'application de la méthode d'encadrement avec des simulations de bioréacteurs en mode batch et continu sur des données de croissance générées artificiellement ainsi que sur des données réelles. Nous avons présenté également deux extensions de la méthode en ajoutant de la flexibilité dans son application et en discutant de son efficacité à fournir des estimations d'état garanties.

Abstract

We address the problem of determining functional framing from experimental data points in view of robust time-varying predictions, which is of crucial importance in bioprocess monitoring. We propose a method that provides guaranteed functional bounds, instead of sets of parameters values for growth functions such as the classical Monod or Haldane functions commonly used in bioprocess modeling. We illustrate the applicability of the method with bioreactor simulations in batch and continuous mode, as well as on real data. We also present two extensions of the method adding flexibility in its application, and discuss its efficiency in providing guaranteed state estimations.

6.1 Introduction and motivations

Interval analysis has recently gained a lot of popularity for the robust estimation of state variables in dynamical models. Bioprocesses are typically subject to various kind of variations or disturbances which are not always easy to model [159, 369]. The idea to determine or compute bounds for uncertain systems is not new [370, 371, 372], but a recent renewed focus has been brought to estimate with intervals state variables or parameters from real-time observations, despite uncertainties on the dynamics [373, 374, 375, 376, 377]. In situations for which the usual random representations (based on probability measures, Gaussian processes, white noise...) are not appropriate or cannot be justified for modeling the perturbations, interval observers give a simple and attractive alternative [258]. Instead of (non-robust) single-valued observers or stochastic filters which both provide single estimates expected to represent average values (provided that hypotheses on the randomness are satisfied), interval observers give a set of plausible trajectories and/or parameters [258, 378, 379, 380, 381]. Typically, for a given deterministic model

$$\frac{dX}{dt} = F(t, X), \quad X \in \mathbb{R}^n, \quad (6.1)$$

where some terms of the map F are badly known or subject to fluctuations, and an observation vector

$$Y(t) = G(t, X(t)) \in \mathbb{R}^p \quad (6.2)$$

that is assumed to be available at any time t , the interval approach consists in designing two estimators, a “lower” and a “upper” ones, of the form

$$\frac{dX^-}{dt} = F^-(t, X^-, Y(t)), \quad \frac{dX^+}{dt} = F^+(t, X^+, Y(t)), \quad (6.3)$$

when the dynamics F is monotone [341, 382], or in a coupled form

$$\frac{dX^-}{dt} = F^-(t, X^-, X^+, Y(t)), \quad \frac{dX^+}{dt} = F^+(t, X^-, X^+, Y(t)) \quad (6.4)$$

when F is non monotone (applying Muller’s Theorem, see [370, 259, 378]). In this formulation, X^- , X^+ are vectors in $\mathbb{R}^n$ which provide a guaranteed framing of the solutions $X(\cdot)$ of (6.1) in the following sense

$$\begin{aligned} & \{X_i^-(0) \leq X_i(0) \leq X_i^+(0), (i = 1 \cdots n)\} \\ & \implies \{X_i^-(t) \leq X_i(t) \leq X_i^+(t), (i = 1 \cdots n)\}, \quad t > 0 \end{aligned} \quad (6.5)$$

This approach is well suited to “slow” processes or dynamics with long transients, such as bioprocesses, because it guarantees bounds during the transients. It has been successfully applied to several models of bioprocesses [258, 383, 384, 12, 385, 386, 387, 388, 389, 390]. A possible drawback of this approach is that it could provide quite conservative bounds that could be then uninforma-

tive for practitioners. However, in recent years, much progress has been made to improve the width of the guaranteed intervals, playing with different structures of the systems [391, 392, 393, 394] (there exist also several results for the class of linear dynamics), changes of coordinates [395, 380], considerations of bundles of observers [396, 397] or with the help of purely numerical methods [398, 376, 375, 386, 378, 399] based on interval analysis [400, 374].

In mass balance models for bioprocesses [159, 165], the most critical uncertainty is primarily found on the specific growth functions of the micro-organisms, often denoted by $\mu(\cdot)$. Consider for instance the classical chemostat model [172]

$$\frac{dX}{dt} = F(t, X) := \begin{bmatrix} \mu(t, X)X_1 - D(t)X_1 \\ -\frac{1}{r}\mu(t, X)X_1 + D(t)(X_2^{in} - X_2) \end{bmatrix} \quad (6.6)$$

where X_1, X_2 denote the concentrations of biomass and substrate, respectively. The dilution rate $D(\cdot)$, the input substrate concentration X_2^{in} and the yield factor r , are supposed to be known. Several contributions among the ones cited previously have considered that the effective growth functions $\mu(\cdot)$ depends on time and on the substrate concentration $s = X_2$ in an unknown manner, but are bounded by two “extreme” functions $\mu^-(\cdot), \mu^+(\cdot)$ so that the inequalities

$$\mu^-(s) \leq \mu(t, s) \leq \mu^+(s), \quad s \geq 0 \quad (6.7)$$

are fulfilled at time t , whatever could be the values of the variable s . Robust state estimations can then be derived from the knowledge of $\mu^-(\cdot)$ and $\mu^+(\cdot)$ (instead of $\mu(\cdot)$), designing the maps F^-, F^+ in (6.3)-(6.4), as illustrated in [260, 261, 12]. However, one may wonder how to obtain these functional bounds from experimental data. Let us underline that it is particularly relevant to make a good choice of the functions μ^-, μ^+ as it impacts on the width of the frame (6.5). Take as an example the class of Monod growth functions

$$\mu(s) = \frac{\mu_{max}s}{K_s + s} \quad (6.8)$$

for which uncertainty is typically on the parameters μ_{max} and K_s . In the context of state or parameter estimation, several studies have focused on developing techniques to improve the computational efficiency when fitting models to measurement data, assuming arbitrary but bounded error distribution [401, 402, 403, 404, 405, 406]. Central of these approaches is overcoming convergence to local optima and inferring joint confidence intervals or regions [401, 407, 405]. It consists then in obtaining either parameter intervals $[\mu_{max}^-, \mu_{max}^+], [K_s^-, K_s^+]$ in $\mathbb{R}_+$ or a region of $\mathbb{R}_+ \times \mathbb{R}_+$.

Differently from these techniques of guaranteed parameters estimations, the approach we propose here revolves around a functional framing. In fact, it is no longer a matter of looking for a set of parameters, but rather ensuring that there would exist functions $\mu(\cdot)$ (depending on time in an unknown way) that guarantee that experimental data can be generated by a functional frame. This amounts to look for functional intervals $[\mu^-(\cdot), \mu^+(\cdot)]$ within a given class of functions. Although we shall

consider classes of functions described by parameters, such as μ_{max} and K_s for the Monod functions, we shall simply look for two functions $\mu^-(\cdot)$, $\mu^+(\cdot)$ belonging to this class. Each of them will be characterized by a pair of parameters (μ_{max}^-, K_s^-) , (μ_{max}^+, K_s^+) , but this does not mean that we shall consider that the unknown $\mu(\cdot)$ is a Monod function with unknown parameters (μ_{max}, K_s) belonging to a particular subset. We rather state that the unknown growth function is *any* function $\mu(\cdot)$ verifying the condition (6.7). In particular $\mu(\cdot)$ is not necessarily a Monod function. Moreover, let us underline that one does not have to impose $\mu_{max}^+ > \mu_{max}^-$, $K_s^+ < K_s^-$ to obtain inequalities (6.7) for a given interval of plausible values of s (see also Remark 6.2.1 below). To our knowledge, the question of determining functional intervals from experimental data in this way has not been yet addressed in the literature. Functional bounds rather than a parameter set appears to be well suited to the method of interval estimators in the context of bioprocesses.

The purpose of the present work is to propose a generic method to fit two models (an “upper” and a “lower” one) that wrap data within lower and upper functions $\mu^-(\cdot)$ and $\mu^+(\cdot)$ instead of a single average $\mu(\cdot)$. To avoid too conservative bounds, we also introduce some flexibility in the application of the method for choosing the framing quality, either considering different upper and lower classes of growth functions, or forcing to have tightened bounds across the data sets, or both. We illustrate our framing method on synthetic data generated by random Monod [169] or Haldane [223] growth functions, this latter one including the effect of substrate inhibition. Then, we compute time-varying predictions through numerical simulations of batch and continuous operating mode, providing bounded state estimations. As recalled previously, we mainly target situations for which the usual statistical hypotheses (reproducibility, uniform distribution of samples, unbiased noise...) are not necessarily met to justify the usual identification methods (least-squares, coefficient of determination, confidence intervals, maximum likelihood... see for instance [408, 409]). The approach we propose is purely geometrical and does not rely on any statistical property, even though there are some similitude with least-square methods in the choice of the fitting criterion.

The paper is organized as follows. In Section 6.2, we present the method in a general framework and its theoretical justification (Propositions 6.2.1 and 6.2.2). In Section 6.3, we provide two extensions of the method. Then, Section 6.4 is dedicated to the application of the method to the framing of growth curves and its use for robust state predictions. Finally, we illustrate and discuss the approach using numerical data and simulations for two types of growth processes (batch and continuous modes) in Section 6.5 with an application on real data in Section 6.6. We end by a conclusion and some perspectives.

6.2 Presentation of the method

We describe here the method in a general setting of an unknown scalar function $f : x \mapsto y = f(x)$, to be bounded by two functions f^- , f^+ , given a set of n experimental measurements

$$\mathcal{S} := \{(x_i, y_i)\}_{i \in \{1, \dots, n\}}.$$

We consider a class $\mathcal{C}$ of functions (also denoted by f for convenience) parameterized by a vector of parameters $p \in P$, where P is a subset of $\mathbb{R}^m$:

$$\mathcal{C} := \bigcup_{p \in P} \{f(\cdot, p) : \mathbb{R} \mapsto \mathbb{R}\} \quad (6.9)$$

and require the following regularity conditions.

Assumption 1. *The set P is a compact subset of $\mathbb{R}^m$. The map f is continuous with respect to (x, p) in $\mathbb{R} \times P$.*

Most of the time, the set P of parameters is simply a cartesian product of intervals.

A frame of $\mathcal{S}$ by functions in $\mathcal{C}$ is determined by a pair $(p^-, p^+) \in P^2$ that satisfies the constraints

$$f(x_i, p^-) \leq y_i \leq f(x_i, p^+), \quad i = 1 \dots n. \quad (6.10)$$

Remark 6.2.1. *In bounded error estimation problems (see for instance [401, 402]), one usually looks for a subset $\hat{P} \subset P$ of parameters such that one has*

$$|f(x_i, p) - y_i| \leq e, \quad i = 1 \dots n, \quad p \in \hat{P},$$

where $e > 0$ is some tolerance. Then, for a sufficiently large e , the set

$$\{(x, f(x, p)) ; p \in \hat{P}, x \in \mathbb{R}\}$$

may contain all the data points (x_i, y_i) . Notice that the subset $\hat{P}$ has no reason to be a product of intervals. Take for instance the Monod functions (6.8) and assume that data points are contained exactly between the graphs of $\mu^-(s) = \frac{s}{1+s}$ and $\mu^+(s) = \frac{2s}{2+s}$. Then, the set of parameters (μ_{max}, K_s) such that one has $\mu^-(s) \leq \mu(s) \leq \mu^+(s)$ for any $s > 0$ is not of the form $[\mu_{max}^-, \mu_{max}^+] \times [K_s^-, K_s^+]$ but is a line segment: $\{(\mu_{max}, K_s) ; \mu_{max} \in [1, 2], K_s = \mu_{max}\}$. However, the determination of $\hat{P}$ can be quite difficult when the monotony of f with respect to a parameter changes with x : consider for instance the class of Hill or Moser functions as an extension of the Monod functions [410]:

$$\mu(s) = \frac{\mu_{max} s^\alpha}{K_s + s^\alpha}, \quad \mu_{max} > 0, \quad \alpha \geq 1,$$

and data exactly framed by $\mu^-(s) = \frac{s^2}{1+s^2}$ and $\mu^+(s) = \frac{2s}{1+s}$. Here, we do not look for a subset $\hat{P}$, but only to two functions f^- , f^+ in the set $\mathcal{C}$ such that the frame (6.10) is fulfilled.

Our objective is to propose a fast and reliable method to obtain tight frames, taking into consideration that n could be large. Typically, one may face data from experiments conducted in different conditions, each of them with triplicates or more. This could easily lead to hundreds of measurements, as it is the case with microwell plate batch cultures which are quite popular in microbiology. However, we do not impose any restriction of considering small n . One may look for the tightest frames, considering a *measure* of the frames as

$$D(p^-, p^+) := \sum_{i=1}^n (f(x_i, p^+) - f(x_i, p^-))^2 \quad (6.11)$$

and the optimization problem

$$\min\{D(p^-, p^+) ; (p^-, p^+) \in P^2 \text{ satisfying (6.10)}\}. \quad (6.12)$$

This is a non-linear optimization problem with $2n$ non-linear constraints. Such problems are classically addressed considering $2n$ Karush-Kuhn-Tucker multipliers $\lambda_i^- \geq 0$, $\lambda_i^+ \geq 0$ ($i = 1 \dots n$) and the objective function

$$D(p^-, p^+) + \sum_{i=1}^n \lambda_i^- (f(x_i, p^-) - y_i) + \sum_{i=1}^n \lambda_i^+ (y_i - f(x_i, p^+))$$

(see for instance [411]). When n is large, the determination of $2n$ multipliers could be computationally heavy. This why we propose here another approach.

For each $p \in P$, we define the non-negative functions

$$L(p) = \sum_{i=1}^n \min(y_i - f(x_i, p), 0)^2, \quad U(p) = \sum_{i=1}^n \max(y_i - f(x_i, p), 0)^2. \quad (6.13)$$

Note that $L(p) = 0$ amounts to say that the graph of the function $f(\cdot, p)$ is below $\mathcal{S}$. Similarly $U(p) = 0$ amounts to say that the graph of the function $f(\cdot, p)$ is above $\mathcal{S}$. For a pair (p^-, p^+) , the sum $L(p^-) + U(p^+)$ measures the quality of the framing of the set $\mathcal{S}$ by the graphs of the functions $f(\cdot, p^-)$ and $f(\cdot, p^+)$, in the following sense. If a pair (p^-, p^+) satisfies

$$L(p^-) + U(p^+) \leq \epsilon^2 \quad (6.14)$$

with $\epsilon \geq 0$, then one has

$$f(x_i, p^-) - \epsilon \leq y_i \leq f(x_i, p^+) + \epsilon, \quad i = 1 \dots n \quad (6.15)$$

For $\epsilon = 0$, the constraint (6.10) is satisfied and we shall say that the frame is exact. For $\epsilon > 0$, we shall say that the frame is ϵ -approximate. In practice, one may be satisfied by an ϵ -approximate frame, provided that ϵ is small enough. For a given $\epsilon > 0$, one looks for the best ϵ -approximate frames minimizing the function D , given by pairs $(p^{*-}, p^{*+}) \in P^2$ such that $D(p^{*-}, p^{*+}) = D_\epsilon^*$ where

$$D_\epsilon^* := \min\{D(p^-, p^+) ; L(p^-) + U(p^+) \leq \epsilon^2, ; (p^-, p^+) \in P^2\}. \quad (6.16)$$

This is again a non-linear constrained optimization problem, that can be addressed with a penalty method, or with Karush-Kuhn-Tucker multipliers [411] (for this non-linear constraint, one may have also to deal with constraints qualification even when the set P is described by a set of independent inequality constraints). Due to the particular structure of the problem, we propose a slightly different approach considering a multiplicative parameter of the cost and not of the constraint, as it is usually made. This brings some properties, as it will be shown in next Lemma 6.2.1 and Proposition 6.2.1, on which our method relies. Indeed, this approach brings also some flexibility in his application, that will be seen later in Section 6.3 and illustrated in Section 6.5. For a given positive number γ , we then consider the criterion

$$J(p^-, p^+, \gamma) := L(p^-) + U(p^+) + \gamma D(p^-, p^+) \quad (6.17)$$

and associate the optimization problem

$$(\mathcal{P}_\gamma) : \quad J^*(\gamma) := \min\{J(p^-, p^+, \gamma) ; (p^-, p^+) \in P^2\}. \quad (6.18)$$

Note that $\mathcal{P}_\gamma$ is an unconstrained problem, simpler to solve than problem (6.16), and we shall consider it for different values of $\gamma > 0$. As the function J is continuous w.r.t. (p^-, p^+) and P is a compact set, the minimum in $J^*(\gamma)$ exists for any γ .

We consider now assumptions guaranteeing the existence of non trivial frames of the data by functions in $\mathcal{C}$. First, we assume that the class $\mathcal{C}$ is rich enough to wrap all the data.

Assumption 2. *There exists $(p^-, p^+) \in P^2$ such that (6.15) is fulfilled for $\epsilon = 0$.*

We shall consider cases for which all the data do not belong exactly to the graph of single function in $\mathcal{C}$ (otherwise the classical least-square method would do the job, providing best pairs with $p^{*-} = p^{*+}$).

Assumption 3. *There does not exist $p \in P$ such that one has $y_i = f(x_i, p)$ for any $i \in \{1, \dots, n\}$.*

Let us first show that the optimization problem (6.18) generalizes the classical least-square method in the following way. Denote the classical least-square criterion by

$$J_{LS}(p) := \sum_{i=1}^n (y_i - f(x_i, p))^2$$

and define the number

$$J_{LS}^* := \min\{J_{LS}(p) ; p \in P\}.$$

Lemma 6.2.1. *Under Assumptions (1)-(2)-(3), one has*

$$\lim_{\gamma \rightarrow +\infty} J^*(\gamma) = J_{LS}^*. \quad (6.19)$$

Proof. Notice that $\gamma \mapsto J^*(\gamma)$ is non decreasing, as the family of functions $(J(\cdot, \cdot, \gamma))$ is non-decreasing w.r.t. γ , and is bounded from above by J_{LS}^* . Therefore the limit of $J^*(\gamma)$ when γ tends to $+\infty$ exists.

Consider a sequence of optimal pairs (p_n^{*-}, p_n^{*+}) for $\gamma = n$. As P is compact, the sequence converges when $n \rightarrow +\infty$, up to a sub-sequence, to a certain $(p_\infty^{*-}, p_\infty^{*+}) \in P^2$ such that $J(p_\infty^{*-}, p_\infty^{*+}, \infty) = \lim_{\gamma \rightarrow +\infty} J^*(\gamma)$. This implies that one has necessarily $D(p_\infty^{*-}, p_\infty^{*+}) = 0$, that is $f(x_i, p_\infty^{*-}) = f(x_i, p_\infty^{*+})$ for any $i = 1 \cdots n$. Consequently, one has $J(p_\infty^{*-}, p_\infty^{*+}, \infty) \geq J_{LS}^*$ and we obtain that equality (6.19) is verified. $\square$

Remark 6.2.2. *It may happen that the data set $\mathcal{S}$ is too poor or that the class $\mathcal{C}$ is over-parameterized. We shall say that $\mathcal{S}$ is rich enough for $\mathcal{C}$ when the property*

$$\{f(x_i, p_a) = f(x_i, p_b) ; i = 1 \cdots n\} \Rightarrow p_a = p_b \quad (6.20)$$

is fulfilled (which amounts to require the model $\{y = f(x, p); p \in P\}$ to be identifiable). Under this last condition, any converging sequence of optimal pairs (p_n^{-}, p_n^{*+}) for γ_n satisfies $p_\infty^{*-} = p_\infty^{*+}$, i.e. the optimal frames converge when $\gamma \rightarrow +\infty$ to single curves, solutions of the least-square optimization.*

We give now properties on which the method we propose to obtain functional framing is based.

Proposition 6.2.1. *Under Assumptions 1-2-3, consider for any $\epsilon > 0$ the set*

$$\Gamma_\epsilon := \{\gamma \geq 0 ; Q_\epsilon \neq \emptyset\} \quad (6.21)$$

where

$$Q_\epsilon(\gamma) := \{(p^-, p^+) \in P^2 ; J^*(\gamma) = J(p^-, p^+, \gamma), L(p^-) + U(p^+) \leq \epsilon^2\}. \quad (6.22)$$

Then, the following properties are satisfied for any $\epsilon > 0$.

1. Γ_ϵ is a closed interval $[0, \gamma_\epsilon^*]$ with $0 < \gamma_\epsilon^* < +\infty$.
2. For any pair (p^{*-}, p^{*+}) in $Q_\epsilon(\gamma_\epsilon^*)$, one has

$$D(p^{*-}, p^{*+}) \leq D(p^-, p^+), \forall (p^-, p^+) \in Q_\epsilon(\gamma), \forall \gamma < \gamma_\epsilon^*.$$

3. For any pair (p^{*-}, p^{*+}) in $Q_\epsilon(\gamma_\epsilon^*)$, one has the estimate

$$D(p^{*-}, p^{*+}) - D_\epsilon^* \leq \frac{\epsilon^2 - L(p^{*-}) - U(p^{*+})}{\gamma_\epsilon^*}. \quad (6.23)$$

Moreover, if there exists a unique pair (p^{*-}, p^{*+}) realizing the minimum of $J(p^-, p^+, \gamma)$ among (p^-, p^+) in P^2 , then one has necessarily $D(p^{*-}, p^{*+}) = D_\epsilon^*$ with $L(p^{*-}) + U(p^{*+}) = \epsilon^2$.

Proof. Let γ_1, γ_2 be two positive numbers with $\gamma_1 < \gamma_2$. Consider pairs $(p_1^-, p_1^+), (p_2^-, p_2^+)$ such that $J^*(\gamma_1) = J(p_1^-, p_1^+, \gamma_1)$ and $J^*(\gamma_2) = J(p_2^-, p_2^+, \gamma_2)$. One can write

$$\begin{aligned} J^*(\gamma_2) = J(p_2^-, p_2^+, \gamma_2) &\leq J(p_1^-, p_1^+, \gamma_2) \\ &= J^*(\gamma_1) + (\gamma_2 - \gamma_1)D(p_1^-, p_1^+) \\ &\leq J(p_2^-, p_2^+, \gamma_1) + (\gamma_2 - \gamma_1)D(p_1^-, p_1^+) \end{aligned}$$

from which one obtains

$$J(p_2^-, p_2^+, \gamma_2) - J(p_2^-, p_2^+, \gamma_1) \leq (\gamma_2 - \gamma_1)D(p_1^-, p_1^+)$$

or equivalently

$$(\gamma_2 - \gamma_1)D(p_2^-, p_2^+) \leq (\gamma_2 - \gamma_1)D(p_1^-, p_1^+).$$

This shows the following property

$$\left. \begin{array}{l} \gamma_1 < \gamma_2 \\ J^*(\gamma_1) = J(p_1^-, p_1^+, \gamma_1) \\ J^*(\gamma_2) = J(p_2^-, p_2^+, \gamma_2) \end{array} \right\} \Rightarrow D(p_1^-, p_1^+) \geq D(p_2^-, p_2^+) \quad (6.24)$$

that shall be useful in the following.

For convenience, let us define the sub-sets

$$Q_\epsilon := \{(p^-, p^+) \in P^2 ; L(p^-) + U(p^+) \leq \epsilon^2\}.$$

Thanks to Assumptions 1 and 2, Q_ϵ is a non-empty compact set for any non-negative ϵ (including 0). Then the numbers

$$D_\epsilon^* := \min\{D(p^-, p^+) ; (p^-, p^+) \in Q_\epsilon\}$$

are well defined. Moreover, by Assumption 3, D_ϵ^* is positive for any $\epsilon \geq 0$.

1. We begin by showing that for any $\epsilon > 0$, the set Γ_ϵ contains at least one positive element. For any

$\epsilon > 0$, consider $\gamma = \epsilon^2/D_0^*$ and $(p_0^-, p_0^+) \in Q_0$ (i.e. such that $D(p_0^-, p_0^+) = D_0^*$). One has

$$J^*(\gamma) \leq J(p_0^-, p_0^+, \gamma) = \gamma D_0^* = \epsilon^2$$

and any pair (p^-, p^+) realizing $J^*(\gamma)$ verifies then

$$L(p^-) + U(p^+) + \gamma D(p^-, p^+) \leq \epsilon \quad \Rightarrow \quad L(p^-) + U(p^+) \leq \epsilon^2$$

that is $(p^-, p^+) \in Q_\epsilon(\gamma)$, from which we deduce that γ belongs to Γ_ϵ .

We show now that Γ_ϵ is an interval containing 0. Let $\gamma > 0$ belonging to Γ_ϵ and (p^-, p^+) a pair realizing $J^*(\gamma)$ with $L(p^-) + U(p^+) \leq \epsilon^2$. Take $\gamma' \in [0, \gamma]$ and let (p'^-, p'^+) be a pair realizing $J^*(\gamma')$. One can write

$$\begin{aligned} J^*(\gamma') = L(p'^-) + U(p'^+) + \gamma' D(p'^-, p'^+) &\leq L(p^-) + U(p^+) + \gamma' D(p^-, p^+) \\ &\leq \epsilon^2 + \gamma' D(p^-, p^+) \end{aligned}$$

or equivalently

$$L(p'^-) + U(p'^+) \leq \epsilon^2 + \gamma' (D(p^-, p^+) - D(p'^-, p'^+)).$$

From property (6.24), we have $D(p^-, p^+) \leq D(p'^-, p'^+)$, which demonstrates that the pair (p'^-, p'^+) belongs to $Q_\epsilon(\gamma')$, that is γ' belongs to Γ_ϵ .

Now we show that the upper bound $\gamma_\epsilon^* = \sup \Gamma_\epsilon$ belongs to Γ_ϵ . Let γ_n be an increasing sequence converging to γ_ϵ^* and (p_n^-, p_n^+) a sequence of pairs in Q_ϵ realizing $J^*(\gamma_n)$. For any $(p^-, p^+) \in P^2$, one has

$$J(p_n^-, p_n^+, \gamma_n) \leq J(p^-, p^+, \gamma_n), \quad \forall n.$$

As Q_ϵ is a compact set, there exists a sub-sequence, also noted (p_n^-, p_n^+) , which converges to a certain (p^{*-}, p^{*+}) in Q_ϵ . By continuity of the function J , one obtains that the inequality

$$J(p^{*-}, p^{*+}, \gamma_\epsilon^*) \leq J(p^-, p^+, \gamma_\epsilon^*)$$

is fulfilled for any $(p^-, p^+) \in P^2$, which shows that the pair (p^{*-}, p^{*+}) realizes $J(\gamma_\epsilon^*)$, and thus γ_ϵ^* belongs to Γ_ϵ . This proves the point 1.

2. The point 2. is a direct consequence of the property (6.24).

3. Consider a pair $(p_\epsilon^-, p_\epsilon^+)$ in P^2 such that $D(p_\epsilon^-, p_\epsilon^+) = D_\epsilon^*$. One has then

$$J^*(\gamma_\epsilon^*) \leq J(p_\epsilon^-, p_\epsilon^+, \gamma_\epsilon^*) = \epsilon^2 + \gamma_\epsilon^* D_\epsilon^*$$

Therefore, any pair (p^{*-}, p^{*+}) in $Q_\epsilon(\gamma_\epsilon^*)$ verifies

$$L(p^{*-}) + U(p^{*+}) + \gamma_\epsilon^* D(p^{*-}, p^{*+}) \leq \epsilon^2 + \gamma_\epsilon^* D_\epsilon^*$$

or equivalently the inequality (6.23).

Take a decreasing sequence γ_n converging to γ_ϵ^* , and pairs (p_n^-, p_n^+) in P^2 such that $J^*(\gamma_n) = J(p_n^-, p_n^+, \gamma_n)$ for any n . One has necessarily $L(p_n^-) + U(p_n^+) > \epsilon$ and can write

$$J^*(\gamma_n) = L(p_n^-) + U(p_n^+) + \gamma_n D(p_n^-, p_n^+) \leq J(p_\epsilon^-, p_\epsilon^+, \gamma_n) \leq \epsilon^2 + \gamma_n D_\epsilon^*$$

or equivalently

$$\gamma_n (D(p_n^-, p_n^+) - D_\epsilon^*) \leq \epsilon^2 - (L(p_n^-) + U(p_n^+)) < 0.$$

Therefore, one has $D(p_n^-, p_n^+) < D_\epsilon^*$ for any n . Consider a sub-sequence of (p_n^-, p_n^+) converging to a certain (p^{*-}, p^{*+}) . It necessarily satisfies $L(p^{*-}) + U(p^{*+}) \geq \epsilon^2$ and $D(p^{*-}, p^{*+}) \leq D_\epsilon^*$ by continuity of the functions L , U and D . As previously, one can show that (p^{*-}, p^{*+}) is a maximizer of $J^*(\gamma_\epsilon^*)$. As we know that there exists a maximizer of $J^*(\gamma_\epsilon^*)$ in Q_ϵ , we deduce that when the maximizer of $J^*(\gamma_\epsilon^*)$ is unique, it has to verify $L(p^{*-}) + U(p^{*+}) = \epsilon^2$ and by property (6.23), it has also to realize $D(p^{*-}, p^{*+}) = D_\epsilon^*$. $\square$

The properties of the set Γ_ϵ given in Proposition (6.2.1) leads to the following method for the search of tight ϵ -approximate frames.

Proposition 6.2.2. *Consider that Assumptions 1-2-3 are fulfilled. Take $\epsilon > 0$ such that $\epsilon < \frac{J_{LS}^*}{\sqrt{n}M}$, where $M := \max_{i=1 \dots n} \max_{p \in P} |y_i - f(p, x_i)|$, and define the number*

$$\bar{\gamma}_\epsilon = \frac{1}{2} \frac{J_{LS}^*}{J_{LS}^* - \sqrt{n}M\epsilon} \quad (6.25)$$

Then the procedure of a dichotomy search

provides an estimation of $\gamma_\epsilon^ \in [\gamma^-, \gamma^+]$ with $\gamma^+ - \gamma^- < 2^{-n} \bar{\gamma}_\epsilon$.*

Proof. Let us show that $\bar{\gamma}_\epsilon$ is an upper bound of the number γ_ϵ^* given by Proposition (6.2.1). Remark first that having $p^- = p^+ = p$ gives $J(p, p, \gamma) = J_{LS}(p)$ whatever is γ . Let $\tilde{p}$ be a solution of the least-square fitting, that is $\tilde{p}$ satisfying $J_{LS}(\tilde{p}) = J_{LS}^*$. As $\mathcal{S}$ does not belong to the graph of a single

Algorithm 1 Estimation of $\gamma_\epsilon^\star$

Require: $n > 1$

```
1:  $\gamma^- \leftarrow 0, \gamma^+ \leftarrow \bar{\gamma}_\epsilon$ 
2: for  $k = 1 \dots n$  do
3:    $\gamma \leftarrow \frac{\gamma^- + \gamma^+}{2}$ 
4:   let  $p^-, p^+$  be such that  $J(p^-, p^+, \gamma) = J^\star(\gamma)$ 
5:   if  $L(p^-) + U(p^+) > \epsilon^2$  then
6:      $\gamma^+ \leftarrow \gamma$ 
7:   else
8:      $\gamma^- \leftarrow \gamma$ 
9:   end if
10: end for
11: return  $\gamma^-, \gamma^+$ 
```

function in $\mathcal{C}$ (Assumption 3), one has $J_{LS}^\star > 0$. Let $\gamma \in \Gamma_\epsilon$ and $(p^-, p^+) \in Q_\epsilon(\gamma)$. One can write

$$\begin{aligned} J_{LS}^\star = J(\tilde{p}, \tilde{p}, \gamma) &\geq J^\star(\gamma) = J(p^-, p^+, \gamma) \\ &\geq \gamma D(p^-, p^+) \\ &= \gamma \sum_{i=1}^n \left((f(x_i, p^+) - y_i) + (y_i - f(x_i, p^-)) \right)^2 \\ &= \gamma \sum_{i=1}^n (y_i - f(x_i, p^+))^2 + (y_i - f(x_i, p^-))^2 \\ &\quad + 2 (f(x_i, p^+) - y_i) (y_i - f(x_i, p^-)) \end{aligned}$$

and thus

$$\begin{aligned} J_{LS}^\star &\geq \gamma (J_{LS}(p^-) + J_{LS}(p^+)) \\ &\quad + 2\gamma \sum_{i=1}^n (f(x_i, p^+) - y_i) (y_i - f(x_i, p^-)) \\ &\geq 2\gamma \left(J_{LS}^\star + \sum_{i=1}^n (f(x_i, p^+) - y_i) (y_i - f(x_i, p^-)) \right). \end{aligned}$$

In this last summation, consider the subset I of indices i for which

$$(f(x_i, p^+) - y_i) (y_i - f(x_i, p^-)) < 0.$$

For $i \in I$, let $\eta_i = \max(y_i - f(x_i, p^+), 0) + \max(f(x_i, p^-) - y_i, 0)$ and one has then

$$(f(x_i, p^+) - y_i) (y_i - f(x_i, p^-)) > -M\eta_i$$

where the numbers η_i satisfy $\sum_{i \in I} \eta_i^2 \leq \epsilon^2$. One obtains then the lower bound

$$\sum_{i=1}^n (f(x_i, p^+) - y_i) (y_i - f(x_i, p^-)) \geq -M \sum_{i \in I} \eta_i \geq -M\sqrt{n}\epsilon$$

from which one deduces that the number γ has to satisfy the inequality

$$J_{LS}^* \geq 2\gamma(J_{LS}^* - \sqrt{n}M\epsilon)$$

or equivalently $\gamma \leq \bar{\gamma}_\epsilon$.

Finally, due to the property of Γ_ϵ being an interval $[0, \gamma_\epsilon^*]$ (cf Proposition 6.2.1), the dichotomous algorithm 1 converges to γ_ϵ^* with a guaranteed lower bound at any iteration step. $\square$

Our method consists then in an iteration of the unconstrained problem $\mathcal{P}_\gamma$ for different positive values of γ to obtain an approximation of γ_ϵ^* , accordingly to Proposition 6.2.2. Note that Proposition 6.2.1 guarantees the positivity of γ_ϵ^* only when ϵ is positive. Our method is thus fundamentally based on ϵ -approximate frames (for $\epsilon = 0$, one may have $\gamma_0^* = 0$ and all frames realize $J^*(0) = 0$). In practice, for a small positive value of ϵ , the algorithm starts with an upper bound $\bar{\gamma}_\epsilon$ close to $1/2$ and a few iterations are enough to obtain an accurate approximation of the value of γ_ϵ^* for a reasonably small value of ϵ . For this approximate value of γ_ϵ^* , one then gets from the optimization problem $\mathcal{P}_{\gamma_\epsilon^*}$ a maximizer (p^{*-}, p^{*+}) . If $L(p^{*-}) + U(p^{*+}) = \epsilon^2$, then the frame is optimal (i.e. $D(p^{*-}, p^{*+}) = D_\epsilon^*$), accordingly to Proposition 6.2.1. If the optimal solution of $\mathcal{P}_{\gamma_\epsilon^*}$ is not unique, one may have $L(p^{*-}) + U(p^{*+}) < \epsilon^2$ but expression (6.23) of Proposition 6.2.1 gives then an estimation of its sub-optimality. Note that the method is robust with respect to the performances of the optimization technique used to solve the problem $\mathcal{P}_\gamma$ or the choice of the number of iterations in the algorithm. If it provides a sub-optimal solution (for the value of $D(\cdot)$), it always generate an ϵ -approximate frame. We shall see on concrete cases in Section 6.5 that this method turns out to be fast and efficient, with a simple implementation.

Remark 6.2.3. For any pair (p^-, p^+) in $Q_\epsilon(\gamma_\epsilon^*)$, we can also measure the width of the frame by the area delimited by the graphs of the functions $f(\cdot, p^+)$ and $f(\cdot, p^-)$:

$$A(p^-, p^+) := \int_{\min_i x_i}^{\max_i x_i} (f(x, p^+) - f(x, p^-)) dx. \quad (6.26)$$

This allows one to associate to the class of functions $\mathcal{C}$ an "adequacy" value

$$V_\epsilon(\mathcal{C}) := \min \{A(p^-, p^+) ; (p^-, p^+) \in Q_\epsilon(\gamma_\epsilon^*)\}$$

and to compare the adequacy of each class. For two classes $\mathcal{C}_1, \mathcal{C}_2$ of functions, we shall say that $\mathcal{C}_1$ gives a better ϵ -approximate framing of the set $\mathcal{S}$ than the class $\mathcal{C}_2$ when one has $V_\epsilon(\mathcal{C}_1) < V_\epsilon(\mathcal{C}_2)$.

This will be illustrated in Section 6.5.

6.3 Extensions of the method

The extensions we present here bring some additional flexibility to the method, in terms of choice of the class of functions and width of frames. For simplicity of the presentation, we have not incorporated them in the presentation of the overall method. Both extensions are illustrated in Section 6.5.

6.3.1 Framing with different upper and lower classes

There is no a priori reason to impose that upper and lower functions in the frame (6.10) are sought among the same class of functions. Typically, one may face growth inhibition or not, depending on the experiments. One can then choose a family of uninhibited growth models for the upper class, and inhibited ones for the lower class (this is illustrated in Section 6.5 with Monod and Haldane functions). Therefore, we can consider without loss of generality two classes

$$\mathcal{C}^- := \bigcup_{p \in P^-} \{f^-(\cdot, p) : \mathbb{R} \mapsto \mathbb{R}\}, \quad \mathcal{C}^+ := \bigcup_{p \in P^+} \{f^+(\cdot, p) : \mathbb{R} \mapsto \mathbb{R}\}$$

instead of the single class $\mathcal{C}$ considered in (6.9). Here, P^- and P^+ are two subsets of $\mathbb{R}^{m^-}$ and $\mathbb{R}^{m^+}$, such that Assumption 1 is fulfilled for P^- , f^- , and P^+ , f^+ . The dimension m^- is not necessarily equal to m^+ . In Section 6.5, we shall see that this allows one to consider less parameters altogether.

In short, we do not give here the corresponding assumptions and statement, as it simply consists in replacing $P \times P$ by $P^- \times P^+$ in Assumption 2 and Propositions 6.2.1, 6.2.2 of Section 6.2. We shall also consider that Assumption 3 is verified for both P^- and P^+ .

6.3.2 Relaxing with one or more points out of the frame

In practice, the frames provided by Proposition 6.2.1 might be too conservative as it considers all the experimental data. Practitioners might want to have tightened bounds, allowing to have one or several points unwrapped. They could of course choose themselves which point(s) to be withdrawn and relaunch the method on a smaller data set. We show here how to extend in a simple way the method to have this done in a systematic way, i.e. as an automatic method choosing which data point(s) can be forgotten to obtain tightened bounds, depending on the maximal number of points that one accepts to be unwrapped. The idea of relaxing with one or more points out of the frame has been also considered in algorithms such as GOMNE [412] (see also Section 6.3.3 in [374]).

Let $j \in \{1, \dots, n-1\}$ and denote by $\mathcal{I}_n^j$ the set of subsets $I \subset \{1, \dots, n\}$ with $\text{card } I \leq j$. As an extension of the optimization problem (6.16) considered in Section 6.2, we consider the family of

problems for $j = 1 \cdots n - 1$

$$D_\epsilon^{*j} := \min \left\{ D^I(p^-, p^+); L^I(p^-) + U^I(p^+) \leq \epsilon^2, (p^-, p^+) \in P^2, I \in \mathcal{I}_n^j \right\}$$

where

$$D^I(p^-, p^+) := \sum_{i \notin I} (f(x_i, p^+) - f(x_i, p^-))^2$$

and

$$L^I(p) := \sum_{i \notin I} \min(y_i - f(x_i, p), 0)^2, \quad U^I(p) := \sum_{i \notin I} \max(y_i - f(x_i, p), 0)^2.$$

When n is large, these are computationally heavy problems, due to the combinatorics of $\mathcal{I}_n^j$. Instead, we propose to simply relax the constraint (6.14) by

$$\exists I \in \mathcal{I}_n^j, \quad L^I(p^-) + U^I(p^+) \leq \epsilon^2 \quad (6.27)$$

while keeping the same criterion (6.18) defined with all $i \in \{1 \cdots n\}$. We then look for the largest γ such that a solution (p_j^-, p_j^+) of problem $\mathcal{P}_\gamma$ satisfies the constraint (6.27) for a given $j > 0$. Of course, this optimization problem does not guarantee that the pair (p_j^-, p_j^+) provides the minimal value of D_ϵ^{*j} , differently to what is proved in Proposition 6.2.1 for the set $Q_\epsilon(\gamma_\epsilon^*)$. However, we shall see that this is a simple and effective method to obtain tight frames excluding j data points (although non-optimal). This leads to the Algorithm 2 below (simply adding the step 5 below).

Algorithm 2 Estimation of γ_ϵ^* with j unwrapped points

Require: $n > 1$

```

1:  $\gamma^- \leftarrow 0, \gamma^+ \leftarrow \bar{\gamma}_\epsilon$ 
2: for  $k = 1 \cdots n$  do
3:    $\gamma \leftarrow \frac{\gamma^- + \gamma^+}{2}$ 
4:   let  $p^-, p^+$  be such that  $J(p^-, p^+, \gamma) = J^*(\gamma)$ 
5:   remove the  $j$  largest terms in the summation  $L(p^-) + U(p^+)$ 
6:   if  $L(p^-) + U(p^+) > \epsilon^2$  then
7:      $\gamma^+ \leftarrow \gamma$ 
8:   else
9:      $\gamma^- \leftarrow \gamma$ 
10:  end if
11: end for
12: return  $\gamma^-, \gamma^+$ 
```

Then pairs (p_j^-, p_j^+) obtained with j unwrapped points provide then a sensitivity of the framing with respect to the number of unwrapped points. Typically, one may choose the number j of unwrapped points depending on the gain on the value $D(p_j^-, p_j^+)$ which measures the frame width. This will be illustrated in Section 6.5.

6.4 Application to the framing of growth curves

The knowledge of the growth functions is very useful in microbiology to predict the evolution of micro-organisms and the performances of the bioprocesses, with models such as (6.6):

$$\begin{cases} \dot{x} &= \mu(s)x - Dx \\ \dot{s} &= -\frac{1}{r}\mu(s)x + D(s_{in} - s) \end{cases} \quad (6.28)$$

where x and s stand here for the biomass and substrate concentrations, respectively. Typically, experiments to determine the unknown growth function $\mu(\cdot)$ are drawn as follows.

- either in batch culture i.e. with $D = 0$. Experiments consist in choosing different values s_i of initial substrate concentration $s(0) = s_i$ and computing the value $\mu_i = \frac{d}{dt} \ln(x(t))|_{t=0}$, measuring the time variation of $x(\cdot)$. Data points (s_i, μ_i) are then expected to belong to the graph of the unknown function $\mu(\cdot)$.
- either in continuous culture i.e. with $D > 0$ (assumed to be constant or slowly varying). Experiments consist in choosing different values D_i of D and wait the system to be at a quasi-steady state (x^*, s^*) . Then, the data point $(s_i, \mu_i) = (s^*, D_i)$ is expected to belong to the graph of the unknown function $\mu(\cdot)$.

While the chemostat experiments are quite time-consuming (but various experiments conducted in the past under different conditions can be collected together, which is in the spirit of the present approach), batch cultures can be easily performed in microwell plate with automatic measurements, so that a reasonably rich data set can be acquired. With the set of data points (s_i, μ_i) , one usually conducts a non-linear regression to adjust the parameters of a growth model with least-square criterion [411], such as for instance the Monod growth function (6.8), or the Haldane one

$$\mu(s) = \frac{\hat{\mu}s}{K + s + s^2/K_i}. \quad (6.29)$$

describing the effect of growth inhibition for large concentrations of substrate. However, it has been underlined that the usual R-squared determination coefficient is not appropriate to measure the quality of the adjustment in this non-linearity context [413]. More importantly, reproducibility and environmental fluctuations (such as pH, temperature, light...) from one experiment to another one are common issues in microbiology.

Here, we shall consider that the experiments have been sufficiently numerous to have faced the various possible kinds of fluctuations, so that future utilization of the micro-organisms might be subject to similar fluctuations or combinations of them occurring at various unknown times (this hypothesis is important to justify the framing approach, that we illustrate on synthetic data in the next section).

Let us now show how one can use the lower and upper functions $\mu^-(\cdot)$, $\mu^+(\cdot)$ to obtain guaranteed

predictions of $x(\cdot)$ and $s(\cdot)$. Assume that yield coefficient r , dilution rate D (possibly time-varying) and initial condition (x_0, s_0) of model (6.28) are known. Then, one can easily show that the variable $z(t) = x(t) + rs(t)$ is solution of $\dot{z} = D(rs_{in} - z)$. Therefore, one has

$$z(t) = rs_{in} + (x_0 + rs_0 - rs_{in})e^{-Dt}, \quad t \geq 0. \quad (6.30)$$

We distinguish now the predictions of $x(t)$ and $s(t)$.

1. Prediction of $x(t)$. From $s(t) = \frac{1}{r}(z(t) - x(t))$, one obtains that $x(\cdot)$ is solution of the (non-autonomous) scalar differential equation:

$$\dot{x} = \mu\left(\frac{1}{r}(z(t) - x)\right)x - Dx$$

Then, following [259, Th. VIII, p. 95], a frame $x^-(t) \leq x(t) \leq x^+(t)$ is obtained for any $t \geq 0$ when $x^-(\cdot), x^+(\cdot)$ are solutions of

$$\begin{cases} \dot{x}^- = \mu^-\left(\frac{1}{r}(z(t) - x^-)\right)x^- - Dx^-, & x^-(0) = x_0 \\ \dot{x}^+ = \mu^+\left(\max\left(\frac{1}{r}(z(t) - x^+), 0\right)\right)x^+ - Dx^+, & x^+(0) = x_0 \end{cases} \quad (6.31)$$

2. Prediction of $s(t)$. Similarly, one has $x(t) = z(t) - rs(t)$ and $s(\cdot)$ solution of the scalar dynamics

$$\dot{s} = -\frac{1}{r}\mu(s)(z(t) - rs(t)) + D(s_{in} - s)$$

which gives a frame $s^-(t) \leq s(t) \leq s^+(t)$ where $s^-(\cdot), s^+(\cdot)$ are solutions of

$$\begin{cases} \dot{s}^- = -\frac{1}{r}\mu^+(s^-)(z(t) - rs^-) + D(s_{in} - s^-), & s^-(0) = s_0 \\ \dot{s}^+ = -\frac{1}{r}\mu^-(s^+)\max(z(t) - rs^+, 0) + D(s_{in} - s^+), & s^-(0) = s_0 \end{cases} \quad (6.32)$$

Remark that uncertainties on the initial condition $(x_0, s_0) \in [x_0^-, x_0^+] \times [s_0^-, s_0^+]$ can be also incorporated in the framing, considering

$$z^-(t) = rs_{in} + (x_0^- + rs_0^- - rs_{in})e^{-Dt}, \quad z^+(t) = rs_{in} + (x_0^+ + rs_0^+ - rs_{in})e^{-Dt}$$

instead of $z(t)$ in systems (6.31)-(6.32) and initialization $x^-(0) = x_0^-, x^+(0) = x_0^+, s^-(0) = s_0^-, s^+(0) = s_0^+$.

6.5 Numerical illustrations

In this section, we test the framing method on numerical data and illustrate on synthetic data (for which the fluctuating trajectories are known) how the method provides state estimation with guaran-

teed intervals. We proceed as follows.

1. We first generate a set of growth curves μ , by random sampling in the class of Monod (6.8) or Haldane (6.29) functions, accordingly to uniform distributions of their parameters on given intervals. This provides a random set $\mathcal{R}$ of parameters. Each curve represents the growth in a plausible environment.
2. For each growth curve μ , we generate a sequence of points $(s_i, \mu_i)_i$ where $(s_i)_i$ is a random increasing sequence (with given bounds between two consecutive elements), and μ_i is the value $\mu(s_i)$ corrupted by a bounded uniform noise. The sequence $(s_i, \mu_i)_i$ represents a plausible set of measurements of an experiment in a fixed environment. Besides, we have added a small number of outliers that could represent measurement errors as this can happens punctually in biology. Outliers have been generated by uniform drawing outside the amplitude of considered noises. Gathering the sequences of points for all the generated curves provides a set $\mathcal{S}$ of "synthetic" data.
3. We apply our framing method to the data set $\mathcal{S}$ for determining the best lower and upper functions $\mu^-(\cdot)$, $\mu^+(\cdot)$ for a given ϵ accuracy (cf Proposition 6.2.1), with ϵ small.
4. We use the functions $\mu^-(\cdot)$, $\mu^+(\cdot)$ to compute time varying intervals $[x^-(\cdot), x^+(\cdot)]$, $[s^-(\cdot), s^+(\cdot)]$ for the concentrations $x(\cdot)$, $s(\cdot)$, as solutions of equations (6.30)-(6.31)-(6.32).
5. We simulate the dynamical model (6.28) where the function $\mu(\cdot)$ changes at random times following an exponential distribution. At each of these times, the function μ is drawn uniformly among functions (6.8) or (6.29) with parameters within $\mathcal{R}$. This represents plausible changes in environments with time. We then compare (in the transients) the solution $x(\cdot)$, $s(\cdot)$ with the lower and upper estimates provided in the previous step.

We have also computed the average growth function (provided by the classical least squares method) and its corresponding trajectory to appreciate its position within the intervals. The optimization problem $\mathcal{P}_\gamma$ has been solved numerically with the `fmincon` function of `Matlab` software (without constraint). The bounds for the search of pairs (p^-, p^+) have been chosen

- for the Monod expression: with $\mu_{\max} \in [0.2, 2]$, $K_s \in [0, 0.2]$, while the generated curves have been drawn within $\mu_{\max} \in [0.1, 1.8]$ and $K_s \in [0.1, 0.2]$,
- for the Haldane expression: with $\bar{\mu} \in [0.2, 2]$, $K \in [0, 0.2]$, $K_i \in [0, 6]$, while the generated curves have been drawn within $\bar{\mu} \in [0.1, 1.8]$, $K_s \in [0.1, 0.2]$ and $K_i \in [0, 10]$.

The maximal amplitude of noise has been chosen to be equal to 10% of the measurement value, and outliers have been generated within an interval three times larger. Outliers represent 10% of the data. For the simulations of random times of changes of the growth function, the rate parameter of the exponential distribution has been chosen to be 10 times the time horizon. The algorithm of

Proposition 6.2.2 has been performed for $\epsilon = 10^{-3}$, starting with an upper bound $\gamma^+ = 1/2$. Twenty iterations were more than enough to obtain a tight framing ($\epsilon = 10^{-6}$ with 40 iterations have tested and have given very similar results).

6.5.1 Example of a batch process

We have generated randomly ten growth curves (see Fig. 6.1, left) and one hundred data corrupted with noise (see Fig. 6.1-right).

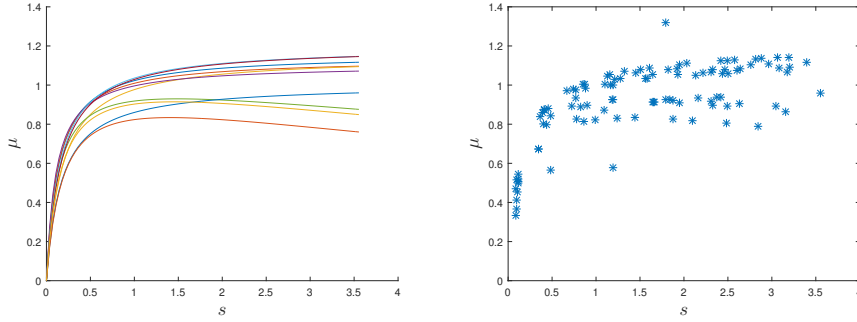


Figure 6.1: Growth curves randomly generated (left) and random data points (s_i, μ_i) corrupted with noise (right).

We have wrapped all the data points among the class of Monod functions, using the method exposed in Section 6.2, which gives the functions μ^- , μ^+ whose graphs are depicted on Fig. 6.2-left. In addition, the graph of the growth curve $\bar{\mu}$ determined by the usual least-square method is plotted in dashed line. To show the convergence of the method, Fig. 6.3 depicts the frames obtained for γ^+ at each

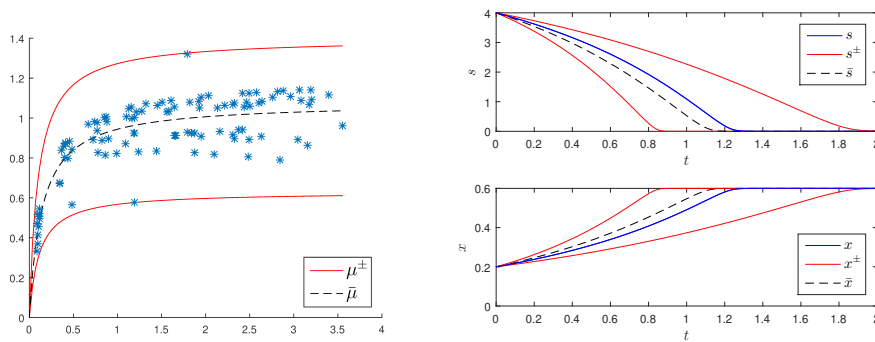


Figure 6.2: Wrapping of the data (left) and dynamical simulation (right).

iteration of Algorithm 1 of Proposition 6.2.2 (remind that γ^+ represents an "inner" estimation of the frame). One can see that the frame obtained at the first iteration is close to the least-square solution (in accordance with Lemma 6.2.1), and the frames are almost identical after only 12 iterations. Indeed, we found that it is enough to stop the algorithm when the upper estimate γ^+ gives a solution (p^-, p^+) of problem $\mathcal{P}_{\gamma^+}$ with $D(p^-, p^+)$ close to ϵ^2 .

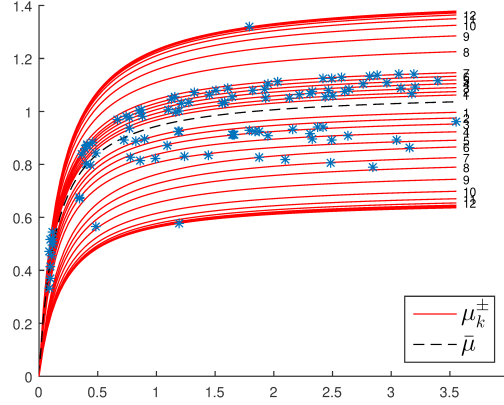


Figure 6.3: Convergence of the method. Functions μ_k^- , μ_k^+ are obtained with pairs (p_k^-, p_k^+) solutions of problem $\mathcal{P}_{\gamma^+}$ at the k -th iteration of Algorithm 1.

We have then simulated a trajectory of the model (6.28) in batch mode (i.e. for $D = 0$) with a growth $\mu(\cdot)$ changing randomly with time, along with the solutions of the frame dynamics (6.31)-(6.32) (see Fig. 6.2-right). The value of the yield coefficient r has been kept equal to 0.1. One can notice that the trajectory provided by the average growth $\bar{\mu}$ (in dashed line) is not centered in the trajectories frame. This is due to the non-linearity of the dynamics. This shows the interest of the information provided by the guaranteed interval approach, differently to confidence intervals of the least-square method that are centered on the trajectory generated by the average growth.

One may want to relax the growth frame considering that some data points are potentially outliers. For this purpose, we have applied the extension of the method presented in Section 6.3 for different values of j , the number of unwrapped points. On Fig. 6.4, one can observe the reduction obtained on the value of $D(p_j^{*-}, p_j^{*+})$ with the pair (p_j^{*-}, p_j^{*+}) provided by Algorithm 2 for j unwrapped points (remind that $D(p_j^{*-}, p_j^{*+})$ is a measure of the frame width). This gives insights on the geometrical distribution of the data points. For this data set, it can be seen that withdrawing only three points (among one

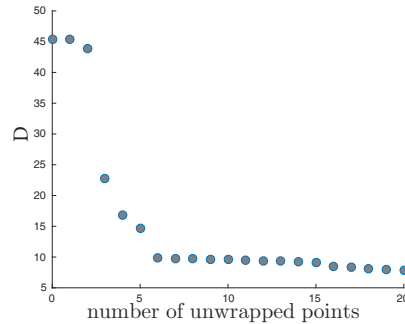


Figure 6.4: Sensitivity of $D(p_j^{*-}, p_j^{*+})$ (where (p_j^{*-}, p_j^{*+}) is given by Algorithm 2) with respect of the number j of data points allowed to be unwrapped.

hundred) reduces significantly the frame width. Indeed, the algorithm gave the same sequence of

frames as shown in Fig. 6.3 up to the ninth iteration, which provides a frame that excludes exactly three data points, represented in Fig. 6.5-left. In Fig. 6.5-right one can appreciate the shrinking of the trajectories frame in the transients.

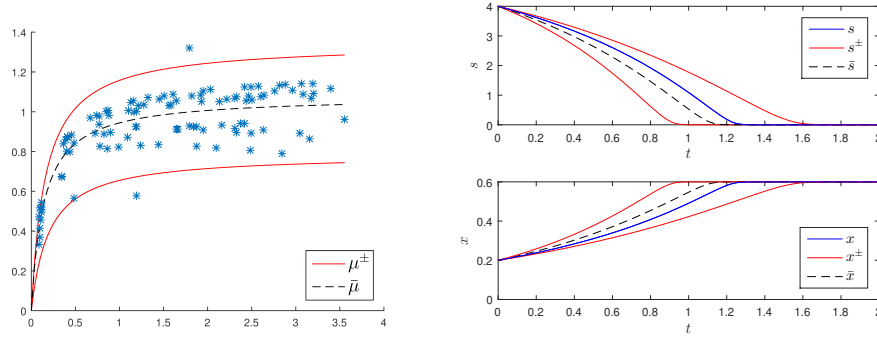


Figure 6.5: Data wrapping (left) and corresponding simulation (right) allowing three data points to be out of the frame.

Guaranteed estimations of transients are of primer importance in industrial applications. In the batch process, the asymptotic value of the biomass x is known, equal to $x_\infty = x_0 + r s_0$ according to (6.30), but guaranteed intervals allow to estimate the time necessary to reach a given level of production $x_l < x_\infty$.

We have also tested the method on a data set with a limited number of experimental points. On Fig. 6.6-left, data has been generated from three possible curves with a total of ten measurements. The wrapping obtained with all data is depicted in red, and in green when excluding one data point. On Fig. 6.6-right, one can see a dynamical simulation of the system, with the frames obtained with the two different wrappings. Although the green wrapping is quite close to the red one, the true trajectory of the system does not belong to the frame generated by the green wrapping. Indeed, when there are few points, it is more likely to obtain a growth curve that lies on the boundary of the set of experimental points, and then the frame is less robust to the relaxation with unwrapped points. Notice that in this case, the least-square estimation is quite far from the true trajectory (and also far from the center of the intervals). This example shows the possible limitations of the method with small data sets: the frame obtained with all the data does always contain the true trajectory but could be quite conservative, and relaxed ones could be unsatisfactory.

6.5.2 Example of a continuous process

We have generated another set of random growth curves and random data (see Fig. 6.7).

As previously, we have wrapped all the data points in between the graphs of two functions μ^- , μ^+ among the class of Monod growth functions, depicted on Fig. 6.8-left (the average growth determined by the least-square criterion is plotted in dashed line). We have then considered the model (6.28)

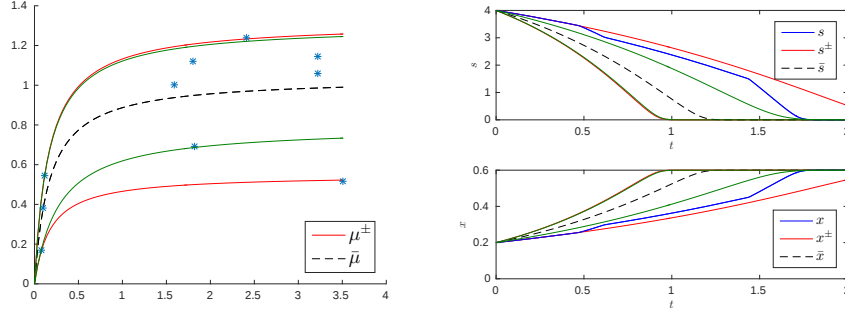


Figure 6.6: Data wrapping (left) and simulation (right) with only ten experimental data points (in red: with all the data; in green: with exclusion of one point).

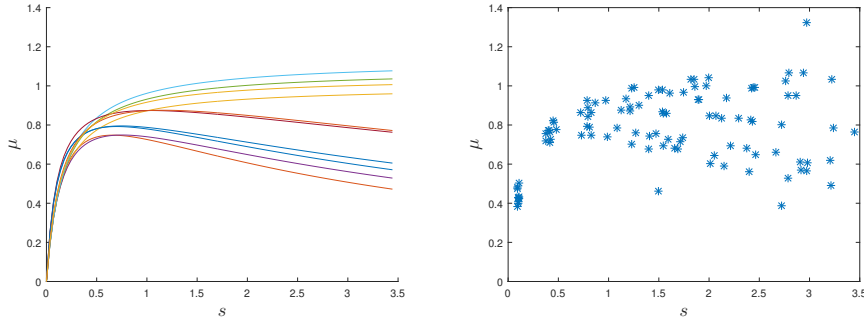


Figure 6.7: Growth curves randomly generated (left) and random data points (s_i, μ_i) corrupted with noise (right).

in continuous mode for the input parameters $D = 0.7$ and $s_{in} = 4$ (with the same yield coefficient $r = 0.1$). Fig. 6.8-right shows a trajectory for a growth $\mu(\cdot)$ changing randomly with time, lying inside the guaranteed time-varying intervals computed with the functions μ^- , μ^+ .

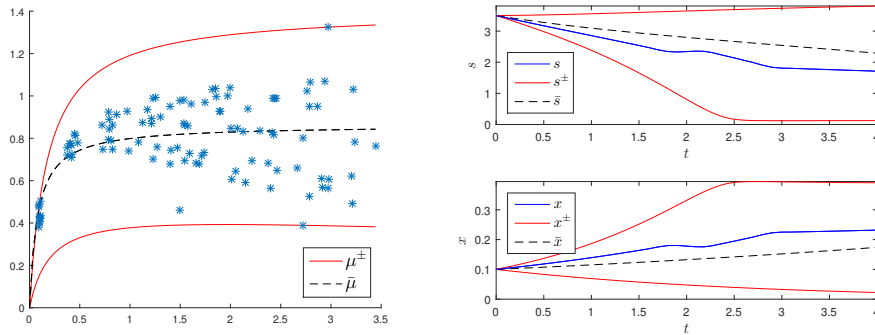


Figure 6.8: Wrapping with Monod growth functions (left) and associated dynamical simulation (right)

To illustrate the flexibility of the method presented in Section 6.3, we have also looked for lower functions μ^- in the class of Haldane functions (6.29), allowing thus non-monotonic growth curves (see Fig. 6.9). The area criterion (6.26) gives an improvement of the fitting (2.66 instead of 3.01). However, this does not reduce too much the trajectories frame as this concerns only small values of

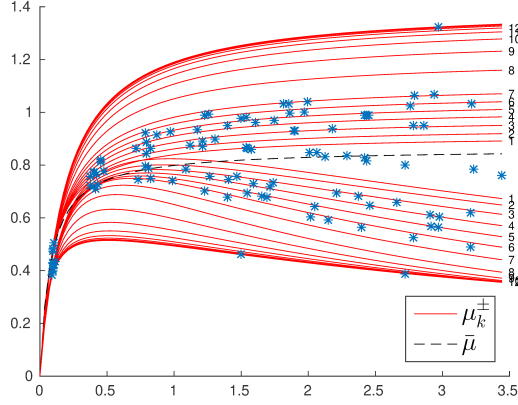


Figure 6.9: Convergence of the method. Functions μ_k^-, μ_k^+ are obtained with pairs (p_k^-, p_k^+) solutions of problem $\mathcal{P}_{\gamma^+}$ at the k -th iteration of Algorithm 1.

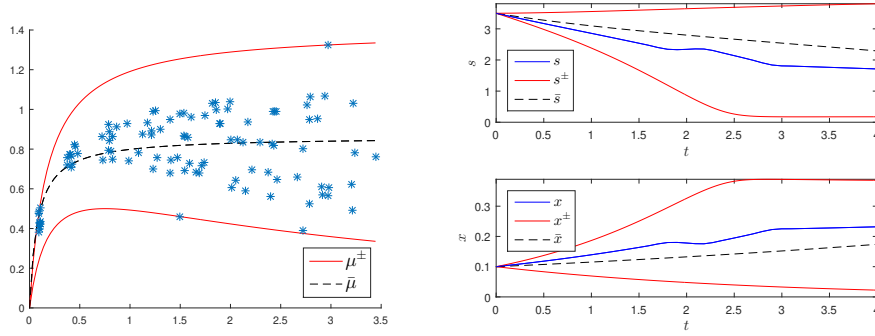


Figure 6.10: Wrapping with Monod and Haldane growth functions (left) and associated simulation (right)

s (see Fig. 6.10-right). Also, we have applied the extension of the method (Algorithm 2) allowing some data points to be unwrapped. Fig. 6.11 gives insights on the data and shows how many points need to be withdrawn to obtain tighter frames. For height unwrapped data points, one can observe a

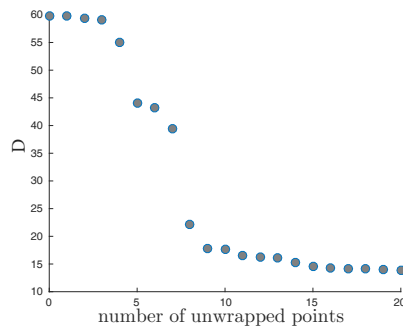


Figure 6.11: Sensitivity of $D(p_j^{*-}, p_j^{*+})$ (where (p_j^{*-}, p_j^{*+}) is given by Algorithm 2) with respect of the number j of data points allowed to be unwrapped.

significant shrinking of the growth frame (see Fig. 6.12-left) as well as the trajectories frame in the

transients (see Fig. 6.12-right).

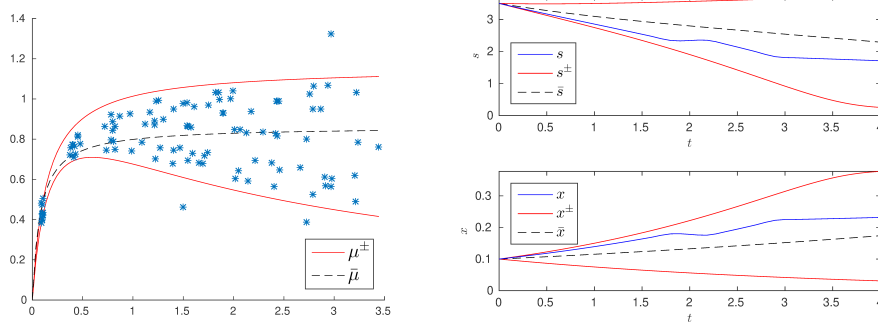


Figure 6.12: Data wrapping (left) and corresponding simulation (right) allowing height data points to be out of the frame.

Here also, one can see that the framing method is a relevant tool to obtain safe transients estimates, while the use of the least-square method is more questionable in the context of unpredictable variations.

Of course, better trajectories frames could be obtained when on-line measurements are available, using "interval observers" as recalled in the introduction.

To illustrate the use of the growth framing in such a context, we have considered a situation where the substrate concentration alone is measured in the output flow rate of the reactor and the initial biomass is unknown (assuming that a rough interval could be provided). Fig. 6.13 shows simulations of the interval observer proposed in [12] with the same trajectory as previously simulated, with and without measurement noise. This shows the interest of having dynamic measurements, in particular, to estimate with accuracy the final biomass production.

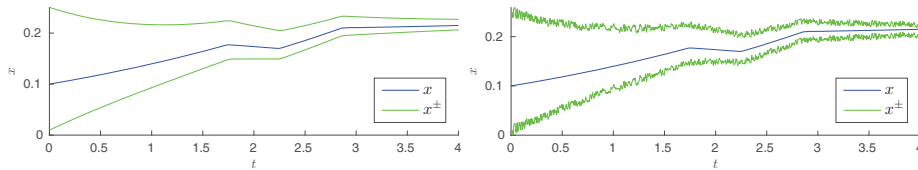


Figure 6.13: Bounds on the biomass concentration obtained with the observer proposed in [12] with gains $G_1 = 1$, $G_2 = -10$ without measurement noise (left) and with a 10% uniform noise (right).

6.6 Illustration on real data

In this section, we apply our method on real data obtained from laboratory experiments. The experiments were conducted in batch microalgae cultures of 40ml working volume at fixed initial conditions of substrate s_0 and biomass x_0 , under a fixed temperature of 25°C and under different pH conditions (from 6 to 9). The biomass was tracked daily, either by optical density (at 650nm) or by fluorescence (EX 450nm, EM 680nm), and then converted into carbon unit, while the substrate TAN (Total

Ammonia Nitrogen) concentrations were measured with a spectro-photometric test kit. This experimental procedure allowed to test a significant number of growth rates depending on the chosen initial condition of $s(0) = s_i$ (for a set of values s_i) while x_0 was kept constant. The growth rates have been estimated by the determination of the slopes of $t \log x(t)$ at initial time, from the measure of the variation of $x(\cdot)$ during the time period 0 to 48h. The data set comprises 88 data points obtained by aggregating the results of different series of experiments carried out on the same microalgae species (*Chlorella sorokiniana*) under different ranges of TAN [328], with replicates. The yield factor r was determined from the available data of both substrate and biomass concentrations (s_f, x_f) measured at the end of growth with a few experiments, by the expression $\frac{x_f - x_0}{s_0 - s_f}$, providing a total of 37 data points.

From the data analysis, we found that uncertainties appear to be within both growth rates and yield factors, along the range of environmental conditions and tested substrate concentrations. Thus, we propose a double application of our framing method for the two data sets before exploiting the model with intervals simulations in batch culture. For the micro-algae growth rates data set, the fluctuations in measurements can be due to the different pH or to measurement errors. We choose to apply our framing method using the class of Monod functions (6.8) for the upper and lower bounds μ^- and μ^+ . For yields data set, uncertainties faced were common to low concentrations, which may be explained by the presence of dissolved organic nitrogen (not measured in these experiments) that can be consumed by micro-algae when the mineral nitrogen s_0 is depleted. From a quick glance at the data, we found the following class of functions to be appropriate to wrap yield data: $r(s) = -A \ln(s) + B$ (with parameters A and B such that r is positive on the domain of considered s) and provide the upper and lower functions r^- and r^+ .

To obtain guaranteed predictions of $x(\cdot)$ and $s(\cdot)$, we consider the model (6.28) with the parameter $D = 0$ and with a variable yield $r = r(s)$, that is

$$\begin{cases} \dot{x} &= \mu(s)x \\ \dot{s} &= -\frac{\mu(s)x}{r(s)} \end{cases} \quad (6.33)$$

From equations (6.33), one has $\dot{x} + r(s)\dot{s} = 0$. Thus, we can write $\dot{x} = -r(s)\dot{s} = \frac{d}{dt}R(s(t))$, where the function R is defined as follows:

$$R(s) = \int_0^s r(\sigma) d\sigma.$$

Note that R is an increasing function as long as r is positive. Therefore, the frame $r^-(\cdot) \leq r(\cdot) \leq r^+(\cdot)$ gives $R^-(s) \leq R(s) \leq R^+(s)$.

Let $z = R(s) + x$, then one has $\dot{z} = 0$ and the parameter z is framed by

$$z^- := R^-(s_0) + x_0 \leq z \leq z^+ := R^+(s_0) + x_0 \quad (6.34)$$

Applying Muller's Theorem [370] on system (6.33), taking into consideration that the frame on the function $R(\cdot)$ gives also the inequalities

$$z^- - R^+(s) \leq x(t) \leq z^+ - R^-(s),$$

leads to the following dynamics

$$\begin{cases} \dot{x}^- = \mu^-(s^-)x^-, & x^-(0) = x_0 \\ \dot{x}^+ = \mu^+(s^+)x^+, & x^+(0) = x_0 \\ \dot{s}^- = -\frac{\mu^+(s^-)}{r^-(s^-)} \min(x^+, z^+ - R^-(s^-)), & s^-(0) = s_0 \\ \dot{s}^+ = -\frac{\mu^-(s^+)}{r^+(s^+)} \max(x^-, z^- - R^+(s^+)), & s^+(0) = s_0 \end{cases} \quad (6.35)$$

which ensures that the frames of $s^-(t) \leq s(t) \leq s^+(t)$ and $x^-(t) \leq x(t) \leq x^+(t)$ are fulfilled.

Figure 6.14 shows the results when wrapping all the data. Due to the double uncertainty on μ and r , the dynamical bounds are quite conservative. However, allowing the method to select 70 % of the data shows a significant reduction of the frame width in Fig. 6.15-down, compared to Fig. 6.14-down where 100 % of data points are wrapped. Tables 6.1 and 6.2 gather all the corresponding parameters estimates of the growth and yield functions respectively, where $\hat{\mu}$ and $\hat{r}$ were obtained using the least square method and μ^-, μ^+ and r^-, r^+ by applying our framing method. Finally, we have noticed that the dynamical data can break the simulated boundaries when the method excludes more than 50 % of the data points.

parameters interval search	$\mu_{max} (d^{-1})$ [0, 5]	$K_s (mgN.L^{-1})$ [0, 10]	wrapped data points (%)
$\hat{\mu}$	0.90	0.34	100
μ^-	0.65	5.55	100
μ^+	1.23	0.46	100
μ^-	0.78	0.35	70
μ^+	1.11	0.46	70

Table 6.1: Parameters estimates for the growth function

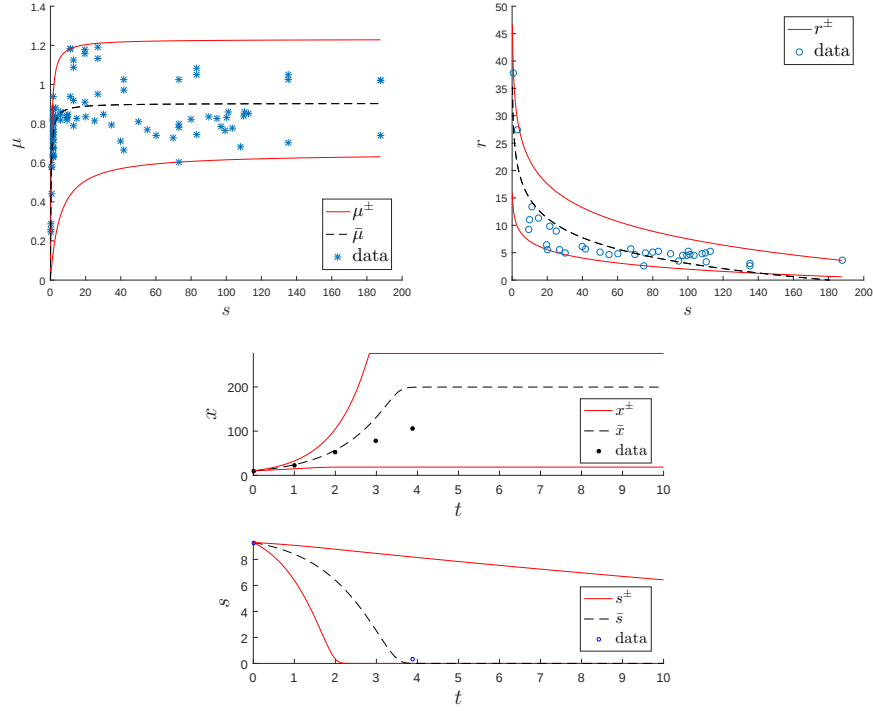


Figure 6.14: Wrapping 100% of data of micro-algae growth rates (left up) and 100% yields data (right up) and associated dynamical simulation in batch culture, along with data points (down)

parameters interval search	A [0, 100]	B [0, 200]	wrapped data points (%)
$\hat{r}$	5.14	26.71	100
r^-	2.22	12.21	100
r^+	6.23	36.23	100
r^-	3.26	17.03	70
r^+	6.30	34.29	70

Table 6.2: Parameters estimates for the yield function

6.7 Conclusion and perspectives

We have proposed a geometrical method for the construction of functional frames from experimental data points and applied it to microbial growths, which are often the major source of variability in bioprocesses for robust predictions. Our approach consists in computing a sequence of simple unconstrained optimization problems, allowing flexibility in the choice of upper and lower classes of functions and the number of data points that could be unwrapped. Let us underline that it does not consist in determining a set (or intervals) of parameters values in a class of functions, but rather in wrapping the data in between the graphs of two functions without requiring any particular shape of the unknown growth function (that could moreover change with time). However, the growth functions may depend on other variables, such as biomass concentration in the Contois model, or could

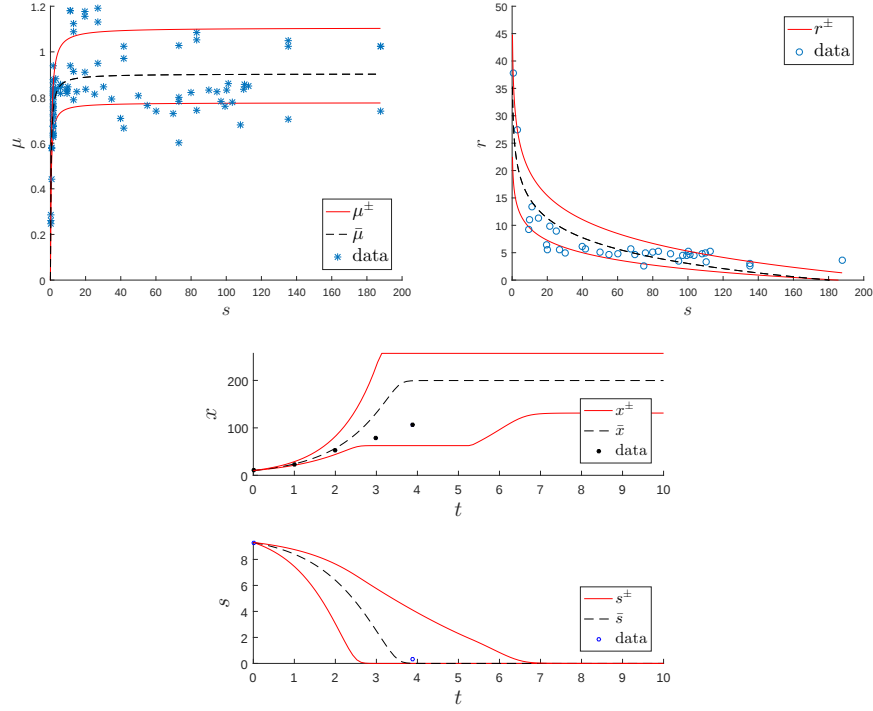


Figure 6.15: Wrapping 70% of data of micro-algae growth rates (left up) and 70% yields data (right up) and associated dynamical simulation in batch culture, along with data points (down)

be multi-valued, such as in the Droop model where the nutrient uptake function $\rho(\cdot)$ has to be identified concomitantly to the growth rate function $\mu(\cdot)$. Extensions of the method for these multi-valued contexts might be the matter of a future work.

Acknowledgments

This work was supported by the LabEx NUMEV incorporated into the I-Site MUSE funded by the French Research Agency (ANR), and the ADEME French Agency. This study was also supported by the PHYCOVER project, which was funded by the French National Agency for Research (ANR-14-CE04-0011).

6.8 Principales contributions et perspectives sur l'utilisation d'une collection de données de croissance spécifique pour obtenir des prédictions robustes « par intervalles » en bioréacteurs

La cinétique biologique dans les modèles de croissance n'est généralement pas connue avec précision, étant donné la complexité des réactions biologiques. Les variabilités entre expériences et les fluctuations non contrôlées pouvant survenir dans les expériences (comme une légère variation de pH ou de température), ne permettent pas en général de valider les hypothèses sous-jacentes de la statistique traditionnelle (donnant lieu à l'utilisation du R^2 , d'intervalles de confiance, etc.).

Un recul sur la masse de données expérimentales de taux de croissance spécifique et sur l'incertitude entachée aux ajustements a conduit à l'idée de proposer une méthode d'identification robuste des paramètres de croissance à l'aide d'un encadrement compatible avec les données. Cette idée consiste à délimiter l'incertitude sur la fonction de croissance $\mu(\cdot)$ à l'aide d'une méthode qui génère deux bornes fonctionnelles pour encadrer les données de croissance. Cette approche se base sur l'encadrement des solutions des systèmes différentiels, principalement utilisées dans le cadre des observateurs « par intervalles ».

Notre méthode génère deux courbes de croissance (μ^- et μ^+) au lieu d'une courbe « moyenne » et d'une variance, dont la justification ne peut pas toujours être obtenue rigoureusement. Notons qu'il ne s'agit pas de déterminer un ensemble (ou des intervalles) de valeurs de paramètres dans une classe de fonctions, mais plutôt à envelopper les données géométriquement entre deux fonctions sans nécessiter de forme particulière de la fonction de croissance inconnue (qui pourrait d'ailleurs changer avec le temps). Le principe de la méthode, les hypothèses et les propriétés permettant d'obtenir un cadrage fonctionnel des données ont été présentés dans ce travail. Nous avons démontré que la stratégie proposée est une généralisation de la méthode des moindres carrés. Un algorithme a été mis au point pour permettre de trouver le bon cadrage et les paramètres des fonctions (supérieure et inférieure) recherchées en s'appuyant sur différents jeux de données.

La méthode a été développée et appliquée sur des données synthétiques de vitesse de croissance bruitées, dans un premier temps. Ces données ont été générées à partir d'un ensemble aléatoire de paramètres des fonctions de croissance de type Monod/Haldane en supposant que les expériences ont été suffisamment nombreuses pour avoir fait face aux divers types de fluctuations possibles, de sorte qu'une utilisation future des mêmes micro-organismes pourrait être soumise à des fluctuations similaires se produisant à divers moments de manière inconnue. La méthode a été ensuite utilisée pour produire des estimations « par intervalles » (e.g. évolution de la population au cours du temps), à l'aide des techniques d'observateurs à intervalles garantis. Les estimations obtenues en utilisant la méthode sur l'ensemble des points de mesures des diverses expériences (dont certains pourraient être aberrants ou entachés d'erreurs de mesure) peuvent s'avérer très conservatrices. Nous montrons que la méthode présente une certaine souplesse dans le choix des classes supérieures et inférieures des fonctions enveloppe, ainsi que sur le nombre de points aberrants qui pourraient être écartés si

l'encadrement donné se trouve très conservateur.

Dans un deuxième temps, la méthode a été illustrée sur des données réelles obtenues en batch avec l'espèce *C. sorokiniana* en croissance sur l'azote (voir Chapitre 6). Les données expérimentales ont nécessité une double application de la méthode sur les ensembles de données de taux de croissance et de coefficient de conversion (i.e. rendement).

Cette étude a permis de proposer une méthode d'encadrement géométrique des points expérimentaux par des bornes fonctionnelles, qui a été appliquée sur des données de croissance des microorganismes ; leur cinétique étant souvent la principale source de variabilité des bioprocédés. Notre approche consiste à calculer des problèmes d'optimisation simples et sans contrainte, permettant une flexibilité dans le choix des classes de fonctions (inférieure et supérieure) choisies ainsi que sur nombre de données pouvant être encadrées. Sachant que la fonction de croissance peut varier au cours du temps et revisiter de manière aléatoire les situations déjà rencontrées expérimentalement, l'utilisation de la méthode permet d'obtenir des estimations par intervalles « garantis en tout temps » sur les variables d'état du système dynamique considéré. Une perspective de ces travaux serait donc d'appliquer cette approche pour avoir des prédictions garanties en cocultures.

Conclusion générale

Rappel de la problématique

Le développement et la mise en œuvre de procédés de culture algale permettant à la fois la bioremédiation d'effluents (liquides ou gazeux) et une production de biomasse stable et économiquement viable présentent plusieurs verrous à lever, notamment en culture ouverte à grande échelle sujette à la variation des facteurs environnants. Remplir ces deux fonctions représente un des objectifs majeurs pour la mobilisation et la valorisation de la bioressource algale pour sa conversion en produits chimiques (chimie verte), en matériaux et en bioénergie et pour garantir une économie circulaire avec moins de pression sur l'environnement.

Nous avons introduit dans cette thèse l'importance de l'inspiration des symbioses au sein des écosystèmes naturels pour adopter une stratégie de développement durable à l'échelle industrielle ; la nature des interactions entre les microorganismes est un sujet de recherche actuellement dynamique et prometteur pour l'amélioration des performances de la production algale à grande échelle. Si la complexité et l'importance des interactions au sein des polycultures sont aujourd'hui reconnues par la communauté de l'écologie microbienne, l'approche de cultures basées sur des assemblages d'espèces a encore fait l'objet de peu de travaux et nécessite d'être renforcée par des outils de modélisation permettant de prédire comment les espèces réagiront face aux fluctuations des conditions environnantes afin de pouvoir sélectionner les assemblages d'espèces les plus adaptées en fonction des conditions imposées par le lieu de production. La modélisation mathématique des microorganismes a fait l'objet de nombreux travaux. Cependant, les modèles proposés sont à des échelles de complexité différentes et sont rarement validés sur des assemblages d'espèces d'intérêt. Nous avons montré dans notre état de l'art la diversité des relations (négatives et positives) au sein d'un écosystème ainsi que le potentiel des interactions entre algue–algue et algue–bactérie à influencer sur la productivité et la stabilité des systèmes de production, dont la compréhension est souvent limitée par la complexité et la sensibilité accrue de ces interactions aux fluctuations de l'environnement, rendant difficiles la prédiction, l'optimisation et le contrôle de procédés de bioremédiation et de production algale en milieu ouvert extérieur.

Spécificité de notre démarche

Pour mieux comprendre les interactions au sein de la communauté microbienne complexe diversifiée qui assure principalement l'assimilation des éléments nutritifs comme le carbone, l'azote et le phosphore dans les bassins ouverts alimentés par des eaux usées, notre démarche a consisté à s'inspirer d'observations de leurs dynamiques en bassins pour tenter de répondre à la question suivante : *peut-on mettre en évidence des interactions positives entre algue–algue ou algue–bactérie en fonction de la fluctuation des ressources qui pourraient améliorer les performances des systèmes de production ?* Pour pouvoir prédire et optimiser les fonctions attendues (production de biomasse et épuration)

des polycultures en milieu extérieur ouvert sujettes aux variations des conditions climatiques, nous avons cherché à appréhender à la fois la complexité des situations pouvant être observées dans des écosystèmes artificiels soumis aux fluctuations environnementales réelles, mais aussi la diversité des modèles mathématiques sur l'écologie des populations. Ainsi, nos travaux se sont inspirés à la fois des hypothèses écologiques issues d'observations sur des dynamiques d'espèces dominantes d'un bassin extérieur de lagunage à haut rendement algal LHRA alimenté par des eaux usées et soumis aux conditions réelles fluctuantes, et de l'étude du comportement qualitatif de différents modèles mathématiques.

Les approches expérimentales en bassins alimentés par des eaux usées à l'échelle-pilote ont représenté un outil d'exploration des phénomènes qui s'opèrent naturellement dans un milieu nouveau, difficile et fluctuant, impliquant des espèces d'intérêt qui sont généralement bien adaptées aux conditions locales spécifiques. Le principe de notre démarche de recherche a consisté à proposer des modèles, mener des expériences pour répondre aux hypothèses (observation bassin vs simulations de modèles) et faire des allers-retours entre les deux jusqu'à trouver les modèles les mieux adaptés et les valider. Ces modèles devraient permettre par la suite de déterminer les conditions biotiques (espèces opportunistes vs espèces spécialistes) et abiotiques (qualité et vitesse de l'apport des nutriments) qui optimisent la production algale et la robustesse de différents microorganismes en assemblage et permettent le contrôle des systèmes de production par la proposition de stratégies de régulation robustes.

La démarche suivie dans les Chapitres 3 et 4 visant à explorer les interactions algue-algue se distingue des approches purement expérimentales ou théoriques. Les expérimentations à l'échelle du laboratoire sur les espèces locales isolées (*C. sorokiniana* et *S. pectinatus*) ont permis de tester les hypothèses spécifiques sur la facilitation écologique entre algue-algue en fonction de la fluctuation des facteurs principaux qui pourraient limiter leur croissance en bassin (azote et lumière). Des réponses sur l'influence des facteurs testés sur la croissance des espèces isolées ont été ainsi apportées grâce à la mise en place et le suivi de dispositifs expérimentaux complémentaires en mode batch et continu. Ces expériences spécifiques ont permis la caractérisation de chacune des espèces étudiées en fonction de la ressource limitante testée et la compréhension de leurs dynamiques au cours du temps lorsqu'elles sont cultivées seules ou en assemblage. En matière de statistiques et de modélisation, des résultats de différences significatives ont été obtenus sur les constantes des cinétiques choisies ou proposées pour décrire les données expérimentales acquises sur la phase exponentielle des monocultures sous différentes conditions expérimentales en mode batch, ce qui a permis de caractériser les espèces. L'intégration de ces cinétiques dans les modèles dynamiques a permis ensuite de calibrer voire valider des modèles en monoculture et en coculture de ces espèces en mode batch ou continu, à l'échelle du laboratoire ou pilote à travers des confrontations des modèles aux données expérimentales disponibles. Des modèles relativement simples ont été proposés et ont permis de déterminer par simulation numérique certaines conditions théoriques qui permettent d'optimiser la production algale.

Bien qu'il soit délicat de répondre avec précision à la question de recherche posée sur les interactions algue-bactérie, i) à cause de la complexité et la diversité des communautés bactériennes présentes et

la variabilité des conditions environnementales en bassins extérieurs et, dans un deuxième temps, ii) à cause des résultats expérimentaux non concluants en laboratoire (tests d'inhibition sélective visant à mettre en évidence la nature des interactions entre les algues et leur consortia bactériens), la démarche théorique suivie dans le Chapitre 5 s'est avérée pertinente. Même si nous n'avons pas réalisé un retour sur les expériences, les simulations numériques et l'analyse mathématique, basées sur un modèle simplifié par rapport aux modèles existants (e.g. [414]), ont permis de dégager des hypothèses plus robustes sur les comportements possibles et testables en laboratoire entre les populations algue–bactérie ainsi que les conditions théoriques qui les régissent en chimostat.

Enfin, admettant que des estimations dynamiques par intervalles dans les modèles de bilan de matière pour les bioprocédés sont intéressantes pour garantir en tout temps l'encadrement des variables, mais nécessitent de connaître les caractéristiques de croissance des microorganismes (source d'incertitude la plus critique) pouvant être bornées par deux fonctions connues, nous avons cherché à savoir *comment obtenir des bornes fonctionnelles à partir de données expérimentales* ?

Le Chapitre 6 s'est appuyé sur les travaux de [257, 258] (techniques d'« observateurs par intervalles ») et sur des réflexions menées autour des aspects méthodologiques d'identification des fonctions de croissance et notamment sur l'incertitude entachée aux ajustements qui ont conduit à la proposition d'une méthode pouvant être naturellement utilisés pour produire des estimations garanties.

Peut-on mettre en évidence des interactions positives entre algue–algue ou algue–bactérie en fonction de la disponibilité des ressources qui pourraient améliorer les performances des systèmes de production ?

Facilitation pour contrer un stress chimique et forte compétition pour la lumière disponible.

Notre étude s'est basée sur les données préexistantes issues du suivi microbiologique d'une colonisation algale qui s'est opérée naturellement par une succession de deux micro-algues (*C. sorokiniana* et *S. pectinatus*) en bassin extérieur LHRA alimenté en mode continu par des eaux usées urbaines. Nous avons montré que *C. sorokiniana* (espèce opportuniste) est dotée d'une vitesse spécifique maximale de croissance plus importante que celle de *S. pectinatus* et d'une meilleure résistance aux fortes concentrations d'ammoniac (toxique), pouvant ainsi expliquer sa croissance rapide en bassin malgré la présence de ce stress chimique. La forte sensibilité de *S. pectinatus* aux teneurs élevées de l'ammoniac, ne lui permettait pas de pousser initialement dans le bassin extérieur. Nous avons également montré que cette espèce (spécialiste) possède une meilleure affinité pour l'azote à des concentrations non toxiques de son sous-produit (ammoniac) ainsi qu'une capacité d'adaptation qui lui permet de croître sous des conditions de faibles lumières disponibles comme dans le cas des procédés des eaux usées turbides. Ceci explique qu'elle se trouve nettement favorisée dans le bassin extérieur au détriment de *C. sorokiniana* qui a facilité son installation en réduisant la toxicité du milieu, mais en perdant ensuite son pouvoir compétitif et en finissant par être lessivée.

Deux modèles ont été proposés pour expliquer les interactions possibles entre ces deux espèces algales

vis-à-vis du substrat et ensuite de la lumière disponible.

Dans le Chapitre 3, nous avons proposé un modèle de compétition de type Monod-Haldane basé sur les travaux de [7]. Ce modèle a été réajusté pour caractériser plus finement l'effet d'inhibition par les teneurs en ammoniac comme un sous-produit toxique du substrat (azote ammoniacal) et pour s'approcher au mieux des conditions extérieures, et a permis de démontrer une facilitation écologique en reproduisant les dynamiques des deux espèces telles qu'observées en bassin extérieur. Des résultats théoriques ont été proposés à l'aide de simulations numériques du modèle calibré au laboratoire, sur le temps nécessaire pour la prédominance de l'espèce (spécialiste) la plus performante via la facilitation sous des conditions initiales qui inhibent sa croissance, en fonction de sa concentration initiale et de celle de l'espèce facilitatrice.

Dans le Chapitre 4, notre démarche a permis de proposer un nouveau modèle de compétition pour la lumière qui tient compte des effets des phénomènes d'inhibition et d'auto-ombrage rencontrés pendant la culture en photobioréacteur au laboratoire. Ce nouveau modèle repose sur une nouvelle fonction de cinétique relativement simple dont les paramètres sont faciles à interpréter et à déterminer au laboratoire. Le modèle, validé au laboratoire sur une coculture des espèces algales en question, a permis de prédire la production en biomasse algale en fonction de la densité totale et de l'intensité lumineuse incidente sous des conditions de non limitation en nutriments. Une exploration du comportement théorique du modèle à l'aide de simulations numériques, a montré qu'il vérifie le principe d'exclusion compétitive, sous une lumière continue, en faveur de l'espèce qui peut atteindre la plus grande valeur de biomasse à l'équilibre, contrôlée par le taux de dilution. De plus, une coexistence des espèces est possible lorsque l'intensité lumineuse est apportée avec un régime périodique sous certaines conditions de lumière et du taux de renouvellement.

Contrairement au premier modèle proposé sur la ressource nutritive, les simulations numériques du modèle de compétition pour la lumière n'ont pas permis de montrer une facilitation entre ces deux vis-à-vis des fluctuations lumineuses ; les deux espèces peuvent se développer indépendamment l'une de l'autre (aucune espèce n'a été favorisée en la présence de l'autre).

Toutefois, il a été possible de reproduire des dynamiques de succession des deux espèces lorsque l'une d'elles élimine l'autre à plus ou moins brève échéance, en suivant un comportement qualitatif singulièrement différent de celui observé avec le modèle de compétition (de type Monod-Haldane) sur le substrat. Le modèle de compétition pour la lumière peut donc être employé pour expliquer une partie de l'interaction algue-algue en bassin, sachant qu'il n'a pas été possible de le calibrer sur les mêmes données (du bassin extérieur) qui ont été utilisées pour calibrer le modèle de compétition pour l'azote. Il est possible de l'implémenter dans le premier modèle de compétition sur l'azote afin d'avoir un modèle mieux adapté aux cultures extérieures.

Facilitation écologique au service de la bioremédiation par les microalgues. Notre démarche a démontré l'importance du suivi des proliférations algales dans un milieu naturel ou artificiel anthro-

pisé, pour isoler des assemblages d'espèces performantes et évaluer leur potentiel sous différentes conditions au laboratoire pour proposer des outils de prédiction et des chemins d'exploitation et de régulation possibles lors d'une culture ultérieure de ces assemblages dans des bassins extérieurs (cf. Chapitre 3).

Cette démarche peut donc être appliquée pour sélectionner d'autres consortia d'espèces et identifier leur capacité à réagir face aux fluctuations extérieures les plus critiques à travers des outils de prédiction adéquats. Notre étude suggère que l'utilisation d'un assemblage constitué de microalgues locales issues d'un bassin ouvert, adaptées aux conditions des milieux extérieurs, peut présenter une résilience vis-à-vis de la variabilité de la qualité et la quantité de la ressource nutritive et que les dynamiques d'une culture extérieure ne sont pas régulées uniquement par les fluctuations climatiques, mais aussi par des interactions entre les espèces présentes. Nous avons donc mis en lumière les interactions écologiques au sein des communautés microbiennes aquatiques qui sont rarement abordées dans la littérature, même si elles peuvent expliquer des successions écologiques qui se produisent sans variations externes visibles des conditions de croissance ou de mortalité. Comme pour divers types de macro-organismes [108], la capacité des microorganismes aquatiques à modifier leur environnement aurait un impact sur la croissance des voisins. Comme les microalgues sont capables de modifier considérablement leurs conditions de croissance environnante au cours du temps en augmentant le pH pendant la photosynthèse [253], en consommant des nutriments ou en réduisant la concentration d'un toxique [118] ou encore en diminuant la transparence de l'eau avec l'augmentation de la concentration de biomasse [129]; de nouvelles conditions peuvent s'offrir pour d'autres espèces algales plus performantes pouvant devenir plus favorisées. En outre, certains micro-organismes (bactéries nitrifiantes et dénitrifiantes, microalgues de type colonisateurs) peuvent se développer rapidement dans les eaux très riches en matières organiques, cation métallique, pesticides, ammoniac, etc. tout en réduisant l'effet toxique de ces composés. Ils permettent ainsi à des microalgues, moins tolérantes vis-à-vis de ces composés, mais plus résilientes vis-à-vis des prédateurs, de se développer [6]. Par conséquent, la facilitation au sein des communautés microbiennes aquatiques peut être généralisée et s'appliquer sur un spectre étendu d'effets de stress environnementaux. Ce phénomène écologique dynamique d'interaction positive qui peut s'opérer naturellement entre espèces ou des communautés présentes sous un environnement stressant, est ainsi prometteur pour proposer des stratégies permettant de protéger les cultures contre des contaminants chimiques ou biologiques indésirables des effluents industriels. Ce nouveau mode d'association se présente comme une alternative à la culture algale monospécifique plus sensible aux pressions extérieures (inhibition, prédation). Il en résulterait une culture plus fiable qui assure une production algale plus résiliente et plus stable, ce qui est aujourd'hui le verrou majeur au développement industriel de la filière algale.

Ce principe peut également être appliqué en écologie des sols pour la mise en œuvre de pratiques agroécologiques dans une perspective d'amélioration de l'efficacité d'utilisation des éléments minéraux (production améliorée et pertes réduites) [415, 416].

Coexistence et facilitation possibles dans l'assemblage algue–bactérie. Dans le chapitre 5, un modèle de dimension quatre a été élaboré pour étudier l'association des microalgues et des bactéries hétérotrophes à travers le phénomène d'exsudation et la consommation d'une ressource minérale commune. Les simulations numériques ont montré la possibilité d'une coexistence dans un chémostat s'accompagnant de régimes oscillants sur toutes les variables d'états non dus aux variations temporelles de lumière ou de la vitesse d'apport des nutriments, ce qui a motivé l'analyse mathématique du modèle. Ce modèle a décrit une interaction indirecte entre algue–bactérie à travers un substrat inorganique commun (azote ou phosphore) en tenant compte d'une variable supplémentaire sur le carbone labile provenant des exsudats de l'algue (excrétée au cours de la croissance) et pouvant être apporté avec la ressource minérale au système par l'alimentation maintenue à un taux constant. L'étude théorique de ce modèle plus simple que le modèle proposé dans [414], s'est avérée pertinente et a permis d'étudier et définir les situations dans lesquelles le système donne différents équilibres et d'analyser leur stabilité. Ces analyses ont montré l'unicité de l'équilibre de coexistence et la robustesse de l'installation des bactéries ; l'équilibre sans bactéries étant instable. Une facilitation s'opère lorsque, sous des conditions qui font que les bactéries ne peuvent pas croître seules, l'ajout de microalgues leur permet de s'installer.

Conclusions et perspectives sur les modèles proposés pour décrire les interactions. Bien qu'il soit difficile en toute généralité de prédire les interactions face à la complexité et la variabilité des systèmes de cultures extérieurs, les modèles proposés dans les Chapitres 3, 4 et 5 ont permis de mieux appréhender certaines interactions observées dans le milieu extérieur ou au laboratoire. Ces modèles ont permis de donner une réponse à la manière dont différentes populations peuvent réagir face à la fluctuation des ressources qui sont des facteurs clés affectant la production et la composition spécifique des polycultures. Toutefois, les relations étudiées au sein des assemblages algue–algue et algue–bactérie doivent être validées au laboratoire et en bassin extérieur. En particulier, les interactions entre algue–bactérie nécessitent d'être explorées plus finement avec la mise en place de dispositifs expérimentaux plus appropriés (réacteurs à membrane en mode continu).

Les modèles proposés dans cette thèse sont prometteurs pour répondre à des problèmes d'optimisation et de contrôle des cocultures algales compte tenu des possibilités d'actions sur les conditions de culture et sur la diversité. Nous avons notamment proposé d'étudier des stratégies permettant de contrôler la facilitation et le temps de succession entre deux espèces algales en fonction de leurs concentrations dans l'inoculum initial (cf. Chapitre 3). Ceci suggère l'importance d'une bioaugmentation pour éviter la chute de la production à cause d'apports soudains de l'azote à fortes concentrations. Sachant que l'espèce facilitatrice finit par être lessivée sous des conditions d'alimentation continue, une perspective serait d'étudier la possibilité de maintenir cette espèce à un niveau bas pour qu'elle puisse réagir face à un apport soudain d'azote à forte concentration, en appliquant un taux de dilution périodique, pouvant favoriser la coexistence de différentes populations [417, 418, 419]. Une autre perspective serait de contrôler la biomasse algale en ajustant le pH (étant un facteur important

pour déterminer la toxicité de l'azote) par une injection du CO₂ d'origine industrielle, ce qui pourrait soutenir la croissance algale et la bioremédiation.

Sous des conditions de non limitation et non inhibition des ressources, le contrôle de la biomasse algale avec le modèle proposé dans le Chapitre 4, serait possible par l'ajustement de l'intensité lumineuse, la période ou le taux de dilution. En milieu extérieur, la production peut-être contrôlée en ajustant le taux de dilution en fonction de l'intensité lumineuse naturelle [242].

Une autre manière possible d'améliorer les performances des polycultures, serait d'étudier leur croissance dans bioréacteurs inter-connectés. Par exemple, une configuration en série peut favoriser la coexistence [420]. Ainsi, les modèles de compétition proposés pourraient être étudiés dans le cadre de plusieurs chémostats interconnectés (en parallèle ou en série) dans le but d'améliorer les performances de tels systèmes, selon le type de configuration choisi.

Les modèles proposés dans cette thèse représentent des outils de compréhension et de prédiction des mécanismes clés au sein des polycultures complexes, pouvant être exploités pour stabiliser la production algale en milieu extérieur et ouvrant par ailleurs de nombreuses perspectives d'amélioration et d'extension.

Les modèles proposés dans les Chapitres 3 et 5, se sont basés sur des hypothèses simples (modèles de type-Monod). La simplicité des modèles est requise car elle permet de limiter le nombre de paramètres à identifier et de simplifier l'analyse mathématique. Toutefois, ces travaux peuvent être revisités avec une croissance algale de type-Droop en ajoutant une variable supplémentaire sur le quota cellulaire [209] et voir son effet sur les interactions et les dynamiques, notamment durant les phases transitoires. Sur la base des connaissances acquises de la présente étude, les outils proposés sont prometteurs pour gérer la complexité des milieux extérieurs, cependant ils doivent être validés en bassin extérieur et réajustés si nécessaire. Nous pensons que ces modèles constituent des briques de base, dans la mesure où les mécanismes décrits par ces modèles permettent de contrôler les fonctions recherchées (épuration et production de biomasse), pour l'élaboration de nouveaux modèles de polycultures plus généralistes et plus complexes. Ceux-ci peuvent intégrer l'effet de plusieurs facteurs sur la croissance algale (comme l'azote, la lumière, la température et le CO₂) ou comporter des compartiments biologiques supplémentaires (comme les prédateurs), en fonction de leur degré d'importance sur les procédés. Ces nouveaux modèles demanderont une compréhension globale des interactions positives et négatives ainsi qu'une validation exhaustive. Une perspective serait de comparer les performances d'épuration/production par différentes communautés présentes y compris des microalgues avec différentes capacités de résistance aux faibles températures, à la prédation ou autres facteurs de stress, dans le but de proposer des stratégies de contrôle en fonction des contraintes extérieures imposées (e.g. baisse de température, forte prédation, stress chimique). Le contrôle par l'ajout de consortium d'espèces algale convenable devrait permettre des performances épuratoire et de production de biomasse sur l'année.

Peut-on utiliser des données de cinétique de croissance pour générer des bornes fonctionnelles, utilisables dans les estimations ensemblistes par intervalles garantis ?

Nous avons proposé dans le Chapitre 6 une nouvelle méthode d'estimation fonctionnelle « par intervalles » à partir des données produisant deux courbes de croissance (au lieu d'une seule courbe « moyenne » et d'une variance, dont la justification ne peut pas toujours être obtenue rigoureusement). Cette méthode s'appuie sur un encadrement géométrique des données, sans hypothèse statistique avec un « réglage » permettant de détecter et oublier des points aberrants. Nous avons montré que ces intervalles peuvent être alors naturellement utilisés pour produire des estimations « par intervalles » de l'évolution de populations au cours du temps. L'application de cette nouvelle méthode d'encadrement sur des données de vitesse de croissance recueillies de différentes expériences a permis des prédictions dynamiques (en monocultures) par intervalles garantis dont la largeur dépend du choix des fonctions de croissances et du nombre de points qu'elles encadrent. Cette méthode peut s'appliquer également en polycultures, mais les encadrements dynamiques peuvent s'avérer assez conservateurs. Une perspective de ce travail serait donc d'appliquer la méthode sur les modèles de compétition à deux espèces algales (cf. Chapitre 3 et Chapitre 4) et prédire en fonction de l'amplitude des intervalles, la robustesse de reproduction des plages possibles de coexistence ou de dominance sur les phases transitoires. Les modèles proposés (sur l'azote ou sur la lumière) pourraient être combinés avec certaines mesures physiques au sein d'un algorithme d'observation d'état pour permettre d'élaborer un capteur logiciel qui fournit une bonne estimation des états du système et particulièrement de ceux qui ne sont pas mesurés par des capteurs physiquement installés sur le dispositif expérimental ou obtenus à l'issue de longues et coûteuses analyses. Par exemple, il peut s'agir de l'estimation de la concentration en biomasse de chacune des espèces qui ne sont obtenues que par des mesures hors ligne et à faible fréquence de mesure, ce qui est incompatible avec la mise au point d'un système de commande et de régulation de ces deux variables. La validation du capteur logiciel pourrait se faire en utilisant des données des capteurs (e.g. O_2 dissous, pH, intensité lumineuse, densité optique) permettant l'obtention d'un maximum de mesures en temps réel. Ceci permettra la proposition de démarches pour la commande de la culture de microalgues en milieu extérieur et une prédiction garantie sur l'évolution des deux espèces ainsi que le substrat à l'aide des techniques d'observateurs par intervalles. Une loi de commande pourrait être mise au point et devrait être validée expérimentalement en milieu extérieur.

Annexe A

High biomass density promotes density-dependent microbial growth rate

Cet annexe comporte un article finalisé et publié au cours de la thèse dont les travaux ont été valorisés à l'issue d'un stage qui a eu lieu au LBE de Narbonne en 2014. Ce stage, à caractère assez fondamental, avait pour but de concevoir, monter, suivre un réacteur biologique continu (chémostat) et d'analyser les données recueillies (incluant non seulement des paramètres classiques de suivi de bioréacteurs mais également des données moléculaires) pour la caractérisation de la structure du taux de croissance des microorganismes. Ces travaux ont permis aussi de proposer des modèles alternatifs susceptibles d'expliquer de manière satisfaisante les données observées par le biais de la modélisation des données générées. L'hypothèse de départ était qu'une forte concentration de biomasse entraînait l'apparition d'une densité-dépendance, c'est-à-dire une décroissance de la vitesse spécifique de croissance. Ce papier a été publié dans *Biochemical Engineering Journal* en 2018.

Emna Krichen^{2,3}, Jérôme Harmand¹, Michel Torrijos¹, Jean Jaques Godon¹, Nicolas Bernet¹, Alain Rapaport²

¹ : LBE, Univ Montpellier, INRA, 11100 Narbonne, France

² : UMR MISTEA, Univ. Montpellier, INRAE, SupAgro, Montpellier, France

³ : UMR MARBEC, Univ. Montpellier, CNRS, IFREMER, IRD, Sète, France

Résumé

Décrire les interactions entre une population et ses ressources qu'elle utilise est un sujet de recherche en microbiologie et en écologie des populations. Quand il y a peu de ressources disponibles pour des individus d'une population nombreuse, l'encombrement peut entraîner un effet dépendant de la densité qui peut se traduire par un feed-back négatif de la densité de l'organisme sur le processus de consommation des ressources. Dans cet article, nous étudions la vitesse de croissance des écosystèmes microbiens aérobies par deux séries d'expériences réalisées dans des cultures bien mélangées en mode continu. En utilisant un taux de dilution constant, mais des concentrations de substrat d'entrées différentes dans chaque expérience, la biomasse et la concentration du substrat ont été mesurées à l'état d'équilibre afin de confronter leur valeur avec celles obtenues théoriquement par le modèle mathématique classique du chimostat en utilisant soit l'approche de dépendance de la vitesse spécifique de croissance en substrat ou en densité. Les structures des communautés microbiennes et des flocs ont été contrôlées afin d'interpréter les résultats obtenus. Les expériences confirment que la densité-dépendance de la vitesse de croissance peut résulter soit d'une concentration élevée de biomasse, soit de la structuration de cette biomasse en flocs, et nous avons montré qu'une nouvelle famille de fonctions de croissance paramétrée, proposée dans cet article, convient mieux aux données expérimentales que les fonctions de croissance de Monod ou de Contois.

High biomass density promotes density-dependent microbial growth rate

E. Krichen^{a,c,d,*}, J. Harmand^b, M. Torrijos^b, J. J. Godon^b, N. Bernet^b, A. Rapaport^c

^a U. Montpellier, LabexNumev, 34095 Montpellier, France

^b LBE, INRA, 11100 Narbonne, France

^c MISTEA, Univ Montpellier, INRA, Montpellier Supagro, 34060 Montpellier, France

^d MARBEC, Univ Montpellier, CNRS, IFREMER, IRD, 34203 Sète, France

* Corresponding author. Email address: emna.krichen@supagro.inra.fr

ABSTRACT

Describing the interactions between a population and its resources is a research topic in both microbiology and population ecology. When there are fewer resources for the individuals in a large population, the overcrowding can lead to a density-dependent effect which is reflected by a negative feedback of the organism density on the consumption process. In this paper, we investigate the growth rate of an aerobic microbial ecosystem by two series of experiments performed in continuous agitated cultures. Using a constant dilution rate, but different input substrate concentrations in each experiment, the biomass and substrate concentration were measured at steady state to confront their values with those obtained theoretically from the well-known mathematical model of the chemostat using either resource or density-dependent kinetics. The structures of both flocs and microbial communities were monitored in order to interpret the results. The experiments confirm that density-dependent growth-rate can result either from a high concentration of biomass or from the structuration of this biomass into flocs and we have shown that a new parametrized family of growth functions, that we proposed in this paper, suits better the experimental data than Monod or Contois growth functions.

Keywords

Density-dependent growth rate, microbial ecosystem, mass balance models, flocculation, microbial ecosystem structure

Nomenclature

μ_{max} maximum specific growth rate, (/day)

CSTR Continuous Stirred Tank Reactor

D dilution rate, (/day)

COD chemical oxygen demand, (gO₂L⁻¹)

FSD floc size distribution

HRT hydraulic residence time, (day)

J mean square criterion

K_s half-saturation constant, (g/L)

PCR Polymerase Chain Reaction

Q_{in} input flow rate, (l/day)
 Q_{out} output flow rate, (l/day)
 RPM rotation per minute
 s^* substrate concentration at steady state, (g/L)
 $SE1$ first series
 $SE2$ second series
 S_{in} input substrate concentration, (g/L)
 SS suspended solids, (g/L)
 $SSCP$ Single Strand Conformation Polymorphism
 V reactor volume, (L)
 x^* biomass concentration at steady state, (g/L)
 Y Yield, (%)

1. INTRODUCTION

The study of predator-prey interactions has been the object of intense researches for several years. As in many subfields of ecology, the science behind predator-prey investigations has been driven by theory, including important advances in mathematical models as tools for understanding and predicting the functioning of ecosystems (*cf.* Wade *et al.*, 2016). Predator-prey models have been studied mathematically since the publication of the Lotka-Volterra equations in 1920 and 1926 based on the hypothesis of resource (prey)-dependence where the functional response of the predator (*i.e.* number of prey captured per predator per unit of time) is a function of the absolute prey density noted $g(N)$. This hypothesis was questioned by R. Aridity and L. Ginzburg in the 1990s (see Aridity and Ginzburg, 1990 or their recent book on density-dependence, Aridity and Ginzburg, 2012), who proposed a specific case of density-dependence, named ratio-dependence, where the prey capture rate is a function of the ratio of the prey density over predator density noted $g(N/P)$.

In microbiology, researchers have often faced similar problems in describing the growth-rate of microorganisms growing on substrates or in the study of competition through resource depletion. The modelling of the functional response, also named the microbial specific growth rate or the reaction kinetics was lifted at the same time in theoretical ecology and in microbial ecology. It is particularly interesting to notice that several models, developed in these two disciplines independently, and thus bearing different names, propose in fact the same growth rate expressions (Jost, 2000). In other words, the same mathematical functions are used to describe micro as well as macro-organisms growth. The latter being more difficult to handle than microbes, the microbiology has appeared since a few years as a field, particularly suited to study questions of general ecology (Jessup and Kassen, 2004). If we exclude complex mechanisms such as inhibition, functions describing the growth rate of microorganisms can be classified into two main classes, depending whether they involve only the resource (substrate or nutrient) concentration in the medium

containing the culture, as in the case of the Monod model (Monod, 1950) or both substrate and biomass (or predator) densities as in the case of the Contois model (Contois, 1959). In fact, what is of relative importance with respect to a pure culture (both models have very similar predictions for pure cultures) becomes very important for complex ecosystems in the sense Monod-like models predict extinction of all species in competition on a single substrate, but one (this well-known property is called the competitive exclusion principle and has been studied in ecology from the 1950s, *cf.* for instance Hardin, 1960) while Contois-like models allow coexistence of several species (*cf.* for instance Lobry and Harmand, 2006).

If we consider Monod functions, for a constant feed rate, the chemostat theory predicts that the equilibrium should only depend on the dilution rate D and be independent of the input substrate concentration S_{in} (on the condition that this latter one is large enough to supply enough resource for the micro-organisms to grow). This prediction was tested by varying dilution rates and influent substrate concentration and letting the chemostat reaching its steady state while measuring the effluent substrate concentration s^* (Jost, 2000). However, it was only verified for pure cultures. When working with mixed cultures (such as in wastewater treatment or fermentation processes) or using a multicomponent substrate, it is well known that the effluent concentration do not depend only on the dilution rate, but also on the concentration of substrate S_{in} in the influent (Grady *et al.* 1972, Grady and Williams 1975, Elmaleh and Ben Aim 1976, Daigger and Grady 1977). The independence of the growth rate at steady state with respect to S_{in} in the chemostat has been questioned, following experimental observations since 1959 by Contois, Yoshinori (1963) by including the ratio s/x in the expression of the growth rate instead of the absolute value of available substrate and thus emerging an effect of density-dependence. On the latter, the question of the mechanisms at the origin of this phenomenon can be questioned.

In the present work, we investigate whether a high density of biomass can generate density-dependent growth rate as proposed in Harmand and Godon (2007), and formalized in Lobry and Harmand, (2006). We therefore propose experiments in a chemostat or *CSTR* (Continuous Stirred Tank Reactor) followed by a macroscopic modelling approach and a study of the proposed models to determine what type of growth rate is the most appropriate to explain the experimental data. The novelty with respect to the literature lies in the fact we have followed not only substrate and biomass densities but also monitored microbiology of the complex ecosystem used together with the structure of the biomass. Our results show that density-dependent kinetics may emerge not only from a high density, but also from the structuration of the biomass in flocs.

The paper is organized as follows. We first describe the experiments we performed in chemostat with the different parameters we monitored, we recall the qualitative predictions that can be done

from the assumptions on the microbial growth rate at the scale of the whole biomass and we describe the method of the models identification. Then, we show and analyse the results at the light of the monitored parameters and of the modelling approach before some conclusions and perspectives are drawn.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Experimental setup and experiment

The experimental work is divided into two consecutive series of experiments applied in a chemostat device: a first series, named SE1, with increasing substrate step-loads and a second series SE2 where these loads were applied decreasingly. A hydraulic retention time of 24 h was maintained constant throughout the experiments.

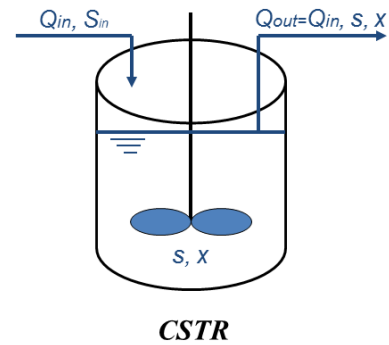
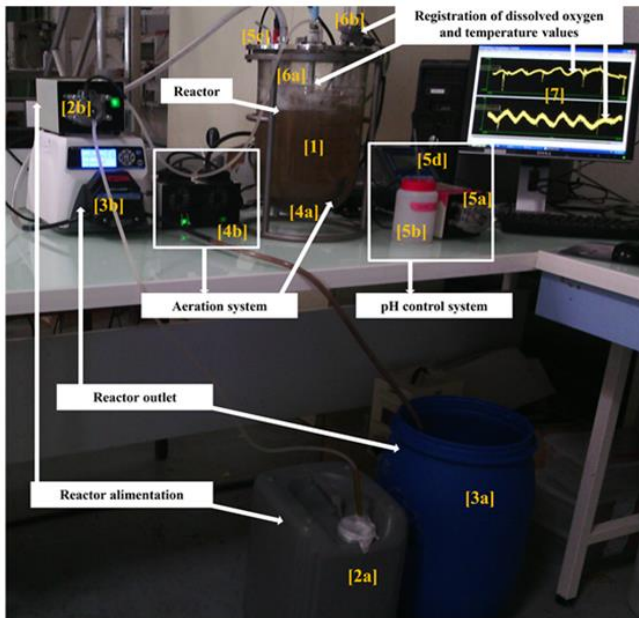


Figure1: Experimental setup

All experiments were carried out in the same continuous biological reactor (Fig. 1). The reactor consisted of a glass vessel (noted [1] on Figure 1) inoculated with constant total volume of 6.8 L of biomass x obtained from a return sludge pump of the activated sludge of the treatment plant of Narbonne (handling approximately 60000 EH). The substrate s used to feed the reactor is red wine (Bag-In-Box of 5L, Winery: Club des Sommeliers, Grapes: Cabernet Sauvignon, Wine Region: Pays d'Oc, France) whose initial pH (potential of hydrogen) and COD_t (total chemical oxygen demand) are 3.82 and 250.3 gO₂L⁻¹ respectively. The choice of this substrate is based on the fact that wine is a highly biodegradable substrate. The input substrate concentration S_{in} is daily prepared (7 L), stored in a feed tank [2a] except during weekends where it is stored in a larger tank of 21 L. The reactor was fed continuously and the S_{in} step changes were done by diluting the red wine with

water. The $COD/N/P$ ratio was adjusted with $NH_4H_2PO_4$ and NH_4Cl in order to equal 200/5/1. The organic loading rate was changed each time the equilibrium was established for a given concentration S_{in} .

The substrate was introduced into the glass vessel by a 16mm diameter pipe and a pump (5 RPM, type Master flex) [2b] with an input flow rate $Q_{in} = 4.6$ ml/min. Moreover, the excess of bioreactor liquid was collected in a can [3a], using another pump Q_{out} [3b]. During experiments *SE1*, a continuous pump was used to maintain the useful volume V constant in the reactor, which implied Q_{out} to equal the input flow rate. Following technical problems (the tendency of biomass to accumulate in the reactor and the corking of the withdrawal cannula), this pump has been replaced by a programmable pump (type Master flex L / S model 77200-60), early in the second series of experiments. This pump operated in discontinuous mode at the maximum withdrawal rate of 280ml/min. It was scheduled for a 3 minutes period for 2.5 hours. The withdraw of excess liquid occurred rapidly through a larger diameter pipe.

The reactor was equipped with an aeration system (a series of air diffusers for aquarium [4a] and two vacuum pumps Millivac [4b]) used to send air into the culture medium and to ensure a perfect mixing within the bioreactor. For the series of experiments *SE2*, the bioreactor was also equipped with a pH control system (a pump [5a] allowed a NaOH solution [5b] with a concentration of 5% to circulate in the system, a pH probe [5c] was immersed in the reactor and was connected to a pH controller [5b]). Finally, oxygen and temperature were followed along the experiments using sensors ([6a] & [6b]) allowing on-line measurements. All the measured variables were stored in a computer [7] thanks to the Odin-Silex acquisition and control system¹. Specific conditions for all experiments are reported in Table 1.

Table 1: Experimental conditions and reactor monitoring

	<i>SE1</i>	<i>SE2</i>
Reactor	Continuous	Continuous
Substrate concentration S_{in}	1, 2 and 4 g/L	8, 6, 4, 2 and 1 g/L
Initial biomass concentration and dilution	Low concentration (2.58 g/L) obtained after a four-fold dilution with water	High concentration (11.93 g/L), obtained without any dilution after elimination of supernatant
Sludge characteristics	Bad settling	Good settling
HRT	24 h	24 h
Sampling place	Outlet of the reactor	Directly in the reactor
Adding of $NaHCO_3$ in S_{in}	-	Only for high loads: $S_{in} = 8, 6$ and 4 g/L
pH control system	-	
Other measurements	Microbial fingerprinting Microscopic observation	Microbial fingerprinting Granulometry monitoring

¹<https://team.inria.fr/biocore/fr/software/odin/>

2.2. Analytic monitoring

Various variables were measured daily (excepting the weekends) during the experiments. The pH was measured with a pH-meter (brand of probe: Mettler Toledo transmitter 2100e + probe 405 DPAS-SC-K8S/225). After centrifugation of samples (15 min at 15000 RPM), the supernatant samples were collected and the *COD* measured (micro-method: (kits Hach) spectrophotometer AQUA LYTIC). Biomass samples were collected and the concentrations of suspended solids *SS* and volatile suspended solids *VSS* were determined according to standard methods. In the present study, it is estimated that *SS* are equivalent to *VSS*. In other words, we assumed that the mineral fraction was negligible in such a way *SS* is considered to measure biomass. *COD* was chosen to quantify the substrate concentration. For *SE1*, microscopic observations were carried out by a microscope OLYMPUS DP 80. For *SE2*, LS200 laser granularity was used to determine the floc size distribution *FSD* of the biomass material in the reactor and in the outlet.

For all experiments, a sample from the reactor was put into two screw microtubules of 2ml which were then centrifuged for 10 minutes at full speed using a benchtop centrifuge. The supernatant was then removed and the pellet was stored at - 20 °C. For each experiment at a constant S_{in} , at least 3 samples were selected for molecular biology analyses: one at the starting of experiment, an intermediate or more (according to the duration of the experience) while the system was not yet stabilized and one at the end when the equilibrium is established in the system. To perform a molecular analysis, samples were processed as follows: passing the Cell Lysis and removal of inhibitors, purification (rapid method), DNA extraction (using the QIAamp DNA Mini Kit) and verification with Nano Quant (Micro-plate Reader I-MET-0078 V1), DNA PCR amplification of the V3 region of the 16S rRNA gene (*cf.* Gévaudan *et al.*, 2011) and, finally the analysis of diversity by Single Strand Conformation Polymorphism *SSCP* using the analyzer (3130 Genetic analyzer). To interpret the *SSCP* results, in addition to the *SSCP* profiles obtained for different samples selected, the Simpson indices were computed. These indices were calculated by an algorithm implemented in the software *Statfingerprint*.

2.3. Equilibrium for Monod- and Contois-type kinetics in classical chemostat model

The classical chemostat model is a deterministic set of differential equations allowing to simulate the variations over the time of both substrate and biomass concentrations (denoted $s(t)$ and $x(t)$, respectively) in a homogeneous continuous reactor from initial conditions $s(0)$, $x(0)$ (*cf.* Harmand *et al.*, 2017). Together with the corresponding experimental setup, a mathematical model has been proposed by both Monod and Novick and Szilard in the fifties (*cf.* Monod, 1950 or Novick and Szilard, 1950) and consists in the following set of equations:

$$\begin{cases} \frac{dx}{dt} = (\mu(\cdot) - D)x \\ \frac{ds}{dt} = -\frac{\mu(\cdot)}{Y}x + (S_{in} - s)D \end{cases} \quad (1)$$

It should be noticed that this model does not include mortality terms. If mortality may play an important role in microbial dynamics when grown in batch mode as in Al-Qodah *et al.* (2007), it can often be neglected when working in continuous mode as long as D is large enough. Indeed, at most, mortality is usually considered to be less than 10% of maximum growth in complex environmental microbial ecosystems. Here, since the hydraulic retention time is very short (24h), mortality was neglected.

Depending on the expression of the function $\mu(\cdot)$, the predictions of this model with respect to the steady state of the chemostat considerably vary (*cf.* Harmand *et al.*, 2017). In particular, if $\mu(\cdot)$ depends only on the substrate concentration s , *i.e.* if $\mu(\cdot) = \mu(s)$, the equilibrium of the system (1) is defined as the solution of the following set of equations:

$$\begin{cases} 0 = (\mu(s^*) - D)x^* \\ 0 = -\frac{\mu(s^*)}{Y}x^* + (S_{in} - s^*)D \end{cases} \quad (2)$$

The Monod equation *cf.* Monod, 1950 is a substrate-dependent kinetic where the equation relating μ and s as is known as follows:

$$\mu(s) = \mu_{max} \frac{s}{s + K_s} \quad (3)$$

where μ_{max} is the maximum specific growth rate and K_s is the half-saturation constant.

Under the assumption that μ is a *monotonously increasing function* of s , such that $\mu(0) = 0$ (as, for instance, in the well-known Monod function), and excluding the trivial solution $x^* = 0$ which corresponds to the *washout* of the reactor, we recall two important qualitative results (in the sense they do not depend on model parameters) about the equilibrium of the system (1).

The substrate concentration value at steady state s^* depends only on D (providing $D < \mu(S_{in})$). In particular, since μ is a monotonous function, the steady state s^* can be determined uniquely from the equation $s^* = \mu^{-1}(D)$, when this quantity is well defined (*i.e.* $D < \mu_{max}$) and is less than S_{in} (otherwise the washout is the only equilibrium of the system).

From (2), we have then $x^* = Y(S_{in} - s^*) = Y(S_{in} - \mu^{-1}(D))$.

Now, consider that $\mu(\cdot)$ depends not only on s , but also on x (*i.e.* it is *density-dependent*): it is then written as $\mu(\cdot) = \mu(s, x)$. In addition, a very common assumption is that $\mu(s, x)$ is increasing with s , but decreasing with x (*cf.* for instance Lobry and Harmand, 2006). An example of such kinetics is

the well-known Contois function (*cf.* Contois, 1959) where the μ equation can be written in the following form:

$$\mu(s, x) = \mu_{max} \frac{s}{s + K_s x} \quad (4)$$

The computation of the steady state of the system (1) then necessitates solving the following system where the two equations of the system (1) are explicitly coupled by μ through its dependence on both state variables:

$$\begin{cases} 0 = (\mu(s^*, x^*) - D)x^* \\ 0 = -\frac{\mu(s^*, x^*)}{Y}x^* + (S_{in} - s^*)D \end{cases} \quad (5)$$

The following qualitative results can then be established:

- The steady state value of both substrate and biomass concentrations now depends on both the dilution rate D and the input substrate concentration S_{in} .
- Since $\mu(s, x)$ is an increasing function of s^* but a decreasing function of x , a simple reasoning allows one to establish that both s^* and x^* are increasing functions of S_{in} :

If we consider the *Contois-type kinetic* (4), x^* will be an increasing function of S_{in} (recall D is fixed). At steady state, we have $z^* = \frac{x^*}{Y} + s^* = S_{in}$. If S_{in} increases, the asymptotic value of z^* also increases. At any steady state, one has $\mu(s^*, x^*) = \mu(s^*, Y(S_{in} - s^*)) = D$.

Differentiating with respect to S_{in} , one obtains: $\frac{\partial \mu}{\partial s} \frac{\partial s^*}{\partial S_{in}} + Y \frac{\partial \mu}{\partial x} - Y \frac{\partial \mu}{\partial x} \frac{\partial s^*}{\partial S_{in}} = 0$.

As $\frac{\partial \mu}{\partial s} - Y \frac{\partial \mu}{\partial x}$ is a positive number, one can write: $\frac{\partial s^*}{\partial S_{in}} = \frac{-Y \frac{\partial \mu}{\partial x}}{\frac{\partial \mu}{\partial s} - Y \frac{\partial \mu}{\partial x}} > 0$. Thus, when S_{in} increases, either x^* or s^* – or both values – increase and higher S_{in} , higher x^* and s^* .

These qualitative properties of the model (1) with respect to its steady state are summarized in Table 2 depending on the mathematical properties of $\mu(\cdot)$.

Table 2: Dependence of the equilibrium with respect to D and S_{in} for Monod- and Contois-type kinetics

Kinetics	$\frac{\partial \mu}{\partial s}$	$\frac{\partial \mu}{\partial x}$	Dependence of s^*	Dependence of x^*
Monod-type ²	+	NC	D	S_{in}
Contois-type ³	+	-	D and S_{in}	D and S_{in}

These simple qualitative results are at the origin of the present work. As already suggested in the literature, we propose to investigate whether density-dependent growth rate can emerge from high

²The term “Monod- type kinetics” defines any kinetics which is increasing with respect to s (s being its only argument)

³The term “Contois-type kinetics” defines any kinetics which is increasing with respect to s but which decreases with x (s and x being its only arguments)

biomass density. This hypothesis originates from the fact that it would rather be the ratio s/x which conditions growth rate instead of the absolute value of available resource only (*i.e.* s), *cf.* Arditi and Ginzburg, 2012.

Working with a continuous system operating at equilibrium, we proposed here to perform steady-state experiments at different increasing input substrate concentrations as described above in 2.1. The reasoning is based on the fact that - for a *Contois-like growth rate* - the equilibria in x and s depend both on S_{in} and D while - in the case of a *Monod-like growth rate* - the equilibria in x is only affected by S_{in} and the equilibria in s is only affected by D (*cf.* Table 2). In the actual paper, we propose to vary S_{in} while keeping D constant. Thus, whatever the growth rate is, we will observe increasing values for x^* . In other words, higher is S_{in} , the higher is x^* . If the same equilibrium is observed for s^* for both low and high S_{in} , *i.e.* for low as well as for high biomass concentrations, we will conclude that high biomass densities are not the origin of density-dependent growth rates. On the converse, *i.e.* if S_{in} has a significant influence on s^* , it will be concluded that density-dependence may emerge from high biomass densities.

2.4. Model Identification methods

For the data sets that will be obtained from our experiments, ideally, a single model should be searched for in such a way its predictions at equilibrium with the different substrate concentrations tested are in accordance with all experiments. However, with such an approach, our attempts were not successful. As discussed in next sections, S_{in} had a very important influence on the structure of the microbial ecosystem. As a consequence, it was rather decided to develop one model with its specific parameters for each experiment (*i.e.* as many models as experimental sets).

For the parameter optimization, the function “fmincon” of the MATLAB® software was used in minimizing a mean square criterion J . Finally, the value of the criterion, normalized by the number of measurement points, was used to evaluate the quality of each model. In a first attempt, initial conditions (*i.e.* the initial values of biomass and substrate concentrations at the beginning of each experiment) were considered as unknowns. However, proceeding that way the number of parameters to be identified was increased, leading to very high uncertainties in the identified parameters. It was thus decided to consider the first measurements of each experiment as known initial conditions, reducing thus the number of parameters to be identified. In total, five optimizations were performed corresponding to the five series of data points. For each optimization, the practical identifiability of models (capacity of obtaining a unique set of optimized parameters given the structure of the model and the data set) was assessed by comparing the results obtained

for different sets of initial conditions for the parameters. In addition, to guarantee the qualitative properties of candidate models to hold (*i.e.* the monotony of growth rate functions), the parameters were constrained to be positive.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Raw data analysis and yield determination

The data sets *SE1* and *SE2* are plotted in Figures 2 & 3 and the equilibrium values for each set of experiment and for each S_{in} are presented in Table 3.

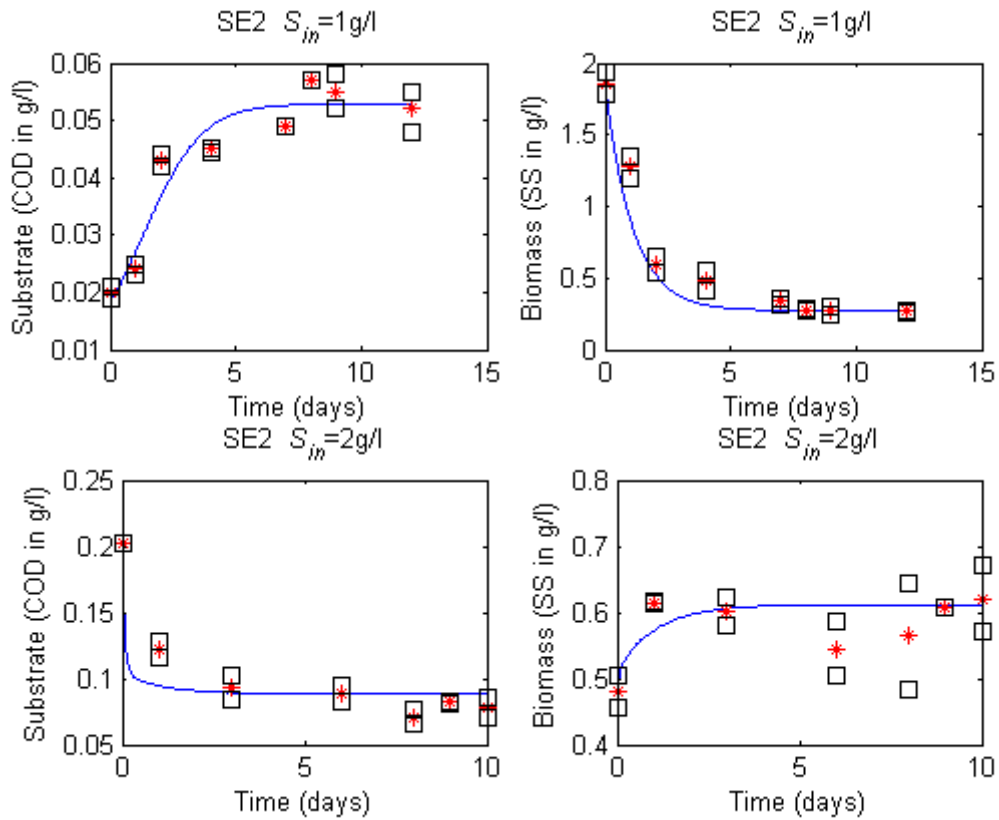


Figure 2: *SE1* data sets compared to the model prediction (continuous blue line), (*) is the mean of ($\square$) duplicate measurements of substrate (COD in g/L) and biomass (SS in g/L) in the culture medium under substrate limitation conditions

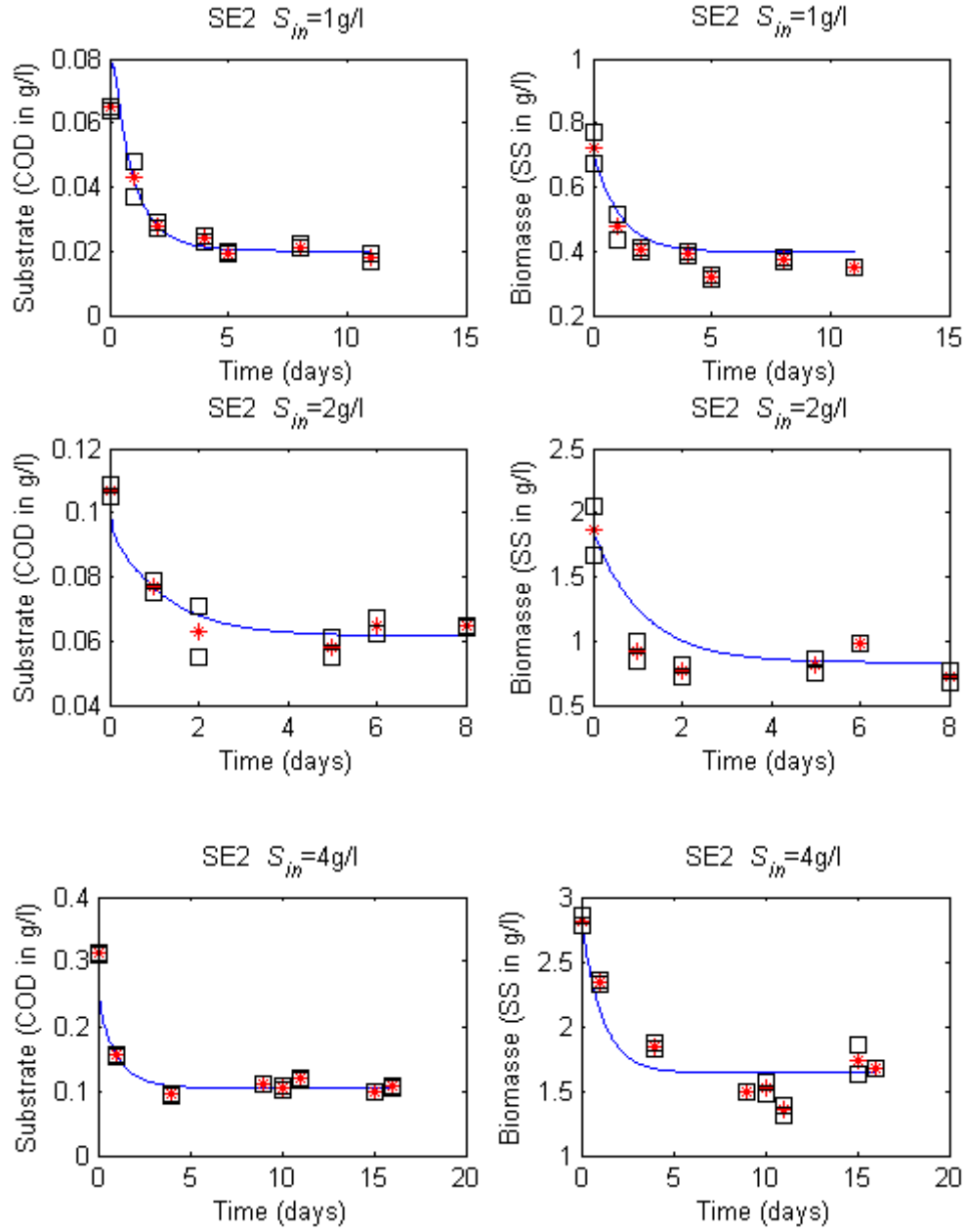


Figure 3: SE2 data sets compared to the model prediction (continuous blue line), (*) is the mean of ($\square$) duplicate measurements of substrate (COD in g/L) and biomass (SS in g/L) in the culture medium under substrate limitation conditions

Table 3: Equilibrium values for SE1 and SE2

	SE1		SE2		
S_{in} (g/L)	0.92	1.95	3.93	2.00	0.95
x^* (g/L)	0.27	0.61	1.71	0.84	0.35
s^* (g/L O_2)	0.06	0.08	0.10	0.06	0.02
$ \Delta s^* $ (g/L)	0.03		0.04		0.04
s^*/x^*	0.20	0.13	0.06	0.07	0.06
$ \Delta(s^*/x^*) $	0.07		0.01		0.02

We observe from Table 3 that equilibrium values for the substrate are different for all experiments. In addition, all s^*/x^* ratios at equilibrium are also different. In other words, following the theoretical qualitative results recalled in the Material & Methods section, neither a pure *Monod-type* nor a pure *Contois-type kinetics* can explain the data. However, one may also notice that the differences between substrate equilibrium are smaller within *SE1* conditions than within *SE2* (0.025 compared to 0.040 or 0.042). Differences between equilibrium ratios s^*/x^* are more important for *SE1* than for *SE2* supporting the fact that kinetics followed by the ecosystem during *SE1* is closer from a resource-dependent kinetics while it is closer from a density-dependent kinetics during *SE2*.

Conversion yields can be computed from Table 3 data and are reported in Table 4. A first observation is that the yield is smaller for *SE1* than for *SE2*. A second observation is that it is correlated to S_{in} : higher S_{in} higher the yield.

Table 4: Conversion yields

Data set	SE1		SE2			
S_{in} (g/L)	0.92	1.95	7.56	3.93	2.00	0.95
Y^* (g/g)	0.32	0.33	0.46	0.46	0.43	0.38
Y^{**} by series (g/g)	0.32		0.43			

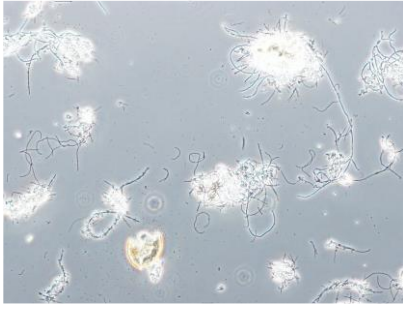
* equal to $x^*/(S_{in} - s^*)$.

** equal the slope of the plot between x^* versus $(S_{in} - s^*)$.

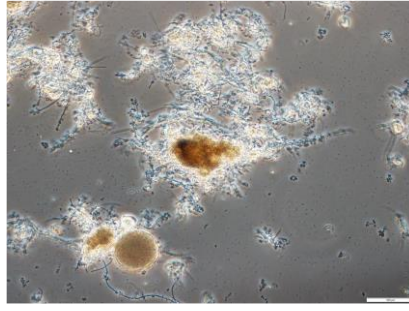
It is usually considered that 0.6 is the maximum yield for aerobic processes. For wastewater treatment processes, a net yield (including mortality) of 0.3 to 0.5 are commonly used (Grady, 1999). Obviously, the values for the yield identified here are within this range.

3.2. Microscopic observations

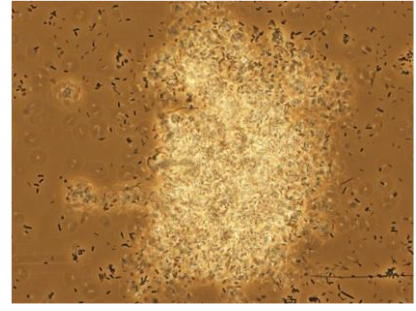
Microscopic observations were realized for *SE1* with increasing substrate step-loads. After the dilution of sludge and before beginning feeding, dense, well enough structured and broken flocs are observed. These flocs of bacteria are associated with several filamentous with few free bacteria found in a clear and clean interstitial liquid (*cf.* Figure 4, MO-1). After 3 days of continuous feeding with the solution of wine at input concentration $S_{in} = 1$ g/L, flocs became denser and are associated to some filaments (*cf.* Figure 4, MO-2). By increasing the feeding concentration to 2 g/L, the observed flocs are denser and denser and we note the presence of several free bacteria which soak in the dark interstitial liquid (*cf.* Figure 4, MO-3). According to those observations, we notice that higher S_{in} , denser the flocs.



(MO-1) Diluted sludge before feeding



(MO-2) After 3 days of feeding with
 $S_{in} = 1 \text{ g/l}$

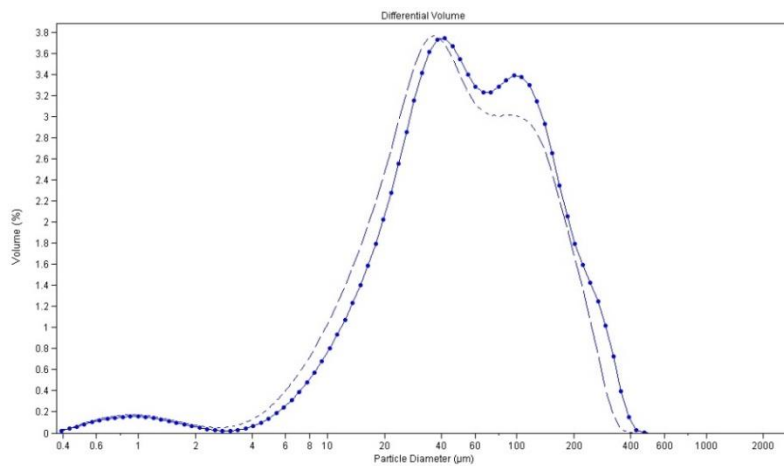


(MO-3) At the equilibrium state of
 $S_{in} = 2 \text{ g/L}$

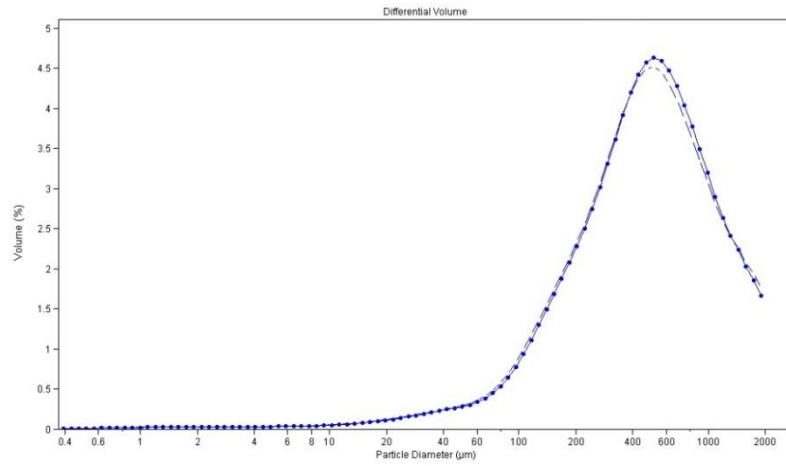
Figure 4 : Microscopic observations

3.3. Floc size distribution

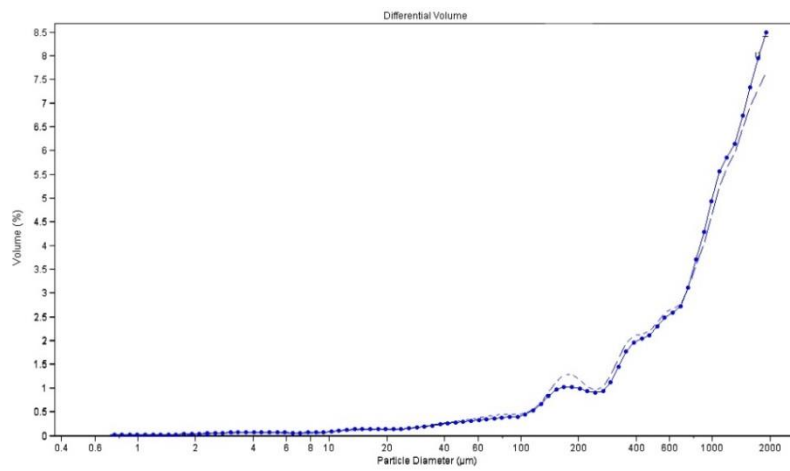
The analyses of the grading distribution of the biomass were realized only for SE2 with decreasing substrate step-loads. Successive *FSD* 1, 2, 3 and 4 (*cf.* Figure 5) represent the results of the size grading in the reactor (in continuous lines) and at the outlet (dashed lines) for the different loads $S_{in} = 8, 4, 2$ and 1 g/L , respectively. For all the loads, the *FSD* in the reactor and in its outlet were very similar. A very small proportion of free bacteria of lower size than $10 \mu\text{m}$ is present with $S_{in} = 8 \text{ g/L}$ and 4 g/L . For $S_{in} = 8 \text{ g/L}$, besides the small percentage in volume of bacteria (0.2 %), small flocs of $40 \mu\text{m}$ (3.7 %) and bigger flocs with sizes between 100 and $200 \mu\text{m}$ (3.4 %) are present. The *FSD* shows that there is a spatial heterogeneity in the reactor. From SE2 data available at $S_{in} = 4, 2$ and 1 g/L , only big flocs are present in the reactor. The observed peak of the *FSD* is more and more “moved towards the right” by reducing the feed concentration S_{in} (for $S_{in} = 2$ and 1 g/L , the mean size of the flocs is greater than $2000 \mu\text{m}$). This means that the flocculation is more and more important by lowering the load.



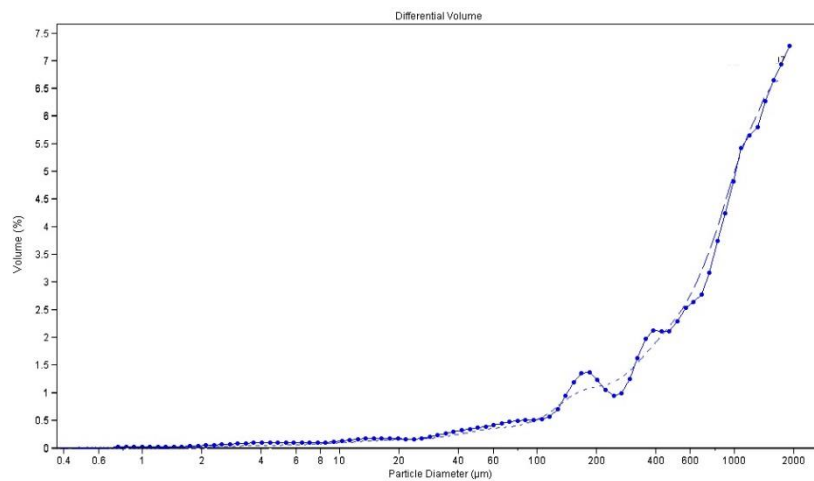
(FSD-1) *FSD* at the equilibrium state obtained at $S_{in} = 8 \text{ g/L}$



(FSD-2) FSD at the equilibrium state obtained at $S_{in} = 4$ g/L



(FSD-3) FSD at the equilibrium state obtained at $S_{in} = 2$ g/L



(FSD-4) FSD at the equilibrium state obtained at $S_{in} = 1$ g/L

Figure 5: Floc size distribution

3.4. Microbial communities' structure and diversity

The result of the molecular biology obtained by *SSCP* allows us to monitor the microbial structural evolution of the ecosystem. The question of interest here is: does this structure depend on the levels of the input substrate concentration?

Table 5 shows that Simpson indices are similar for all samples except for points P01 and P02 (corresponding to initial ecosystems for *SE1* and *SE2*, respectively) that are themselves very similar (*cf.* Figure 6). The number of peaks visible in Figure 6 for P01 and P02 is important, which highlights a high complexity of the initial ecosystems (recall the inoculum is sludge of a wastewater treatment plant).

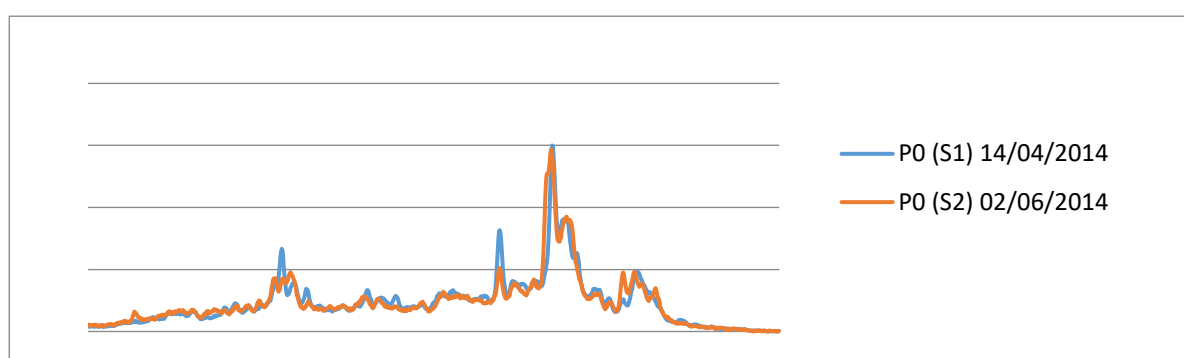


Figure 6: Profiles SSCP of starting points P01 & P02 samples

Table 5: Simpson diversity indices 'SIMPS' and number of the SSCP peaks estimated by Statfingerprint software for position points: *P0* (at the starting), *inter* (before the system stabilization) and *end* (at the equilibrium)

	S_{in}	Position	Sample	Number of Peaks of the SSCP	$-\log(\text{SIMPS})$	$1 - \text{SIMPS}$
SE1	1 g/L	<i>P0</i>	14-04-14	32	5.03	0.99
		<i>inter</i>	20-04-14	11	2.74	0.94
		<i>end/P0</i>	28-04-14	19	3.40	0.97
	2 g/L	<i>inter</i>	06-05-14	28	4.48	0.99
		<i>end/P0</i>	16-05-14	9	1.97	0.86
	4 g/L	<i>inter</i>	22-05-14	17	3.60	0.97
		<i>end/P0</i>	28-05-14	20	3.44	0.97
SE2	8 g/L	<i>P0</i>	02-06-14	38	6.04	1.00
		<i>inter</i>	06-06-14	16	3.35	0.96
		<i>end/P0</i>	16-06-14	16	3.16	0.96
	6 g/L	<i>inter</i>	20-06-14	10	2.34	0.90
		<i>end</i>	26-06-14	17	2.24	0.89
	4 g/L	<i>P0</i>	27-06-14	16	2.33	0.90
		<i>inter</i>	30-06-14	21	3.18	0.96
		<i>inter</i>	04-07-14	20	2.97	0.95
		<i>inter</i>	11-07-14	21	2.01	0.87
		<i>inter</i>	17-07-14	7	1.92	0.85
		<i>end/P0</i>	23-07-14	16	2.10	0.88
	2 g/L	<i>inter</i>	28-07-14	16	2.98	0.95
		<i>end/P0</i>	31-07-14	23	3.32	0.96
	1 g/L	<i>inter</i>	02-08-14	18	2.03	0.87
		<i>inter</i>	06-08-14	34	3.85	0.98
		<i>inter</i>	11-08-14	25	3.64	0.97
		<i>end</i>	13-08-14	38	4.03	0.98

The Simpson indices of these two initial points (*cf.* Table 5) are greater than all the others. Thus we observe a reduction of the diversity, what is in compliance with what can be expected in a chemostat in which the slowest species should be washed out if they evolve freely in the system. Observing the SSCP profiles, we notice that the transitions are quite fast after input concentration changes. It is why we concentrate on large trends and only variations between initial and final points are analysed for each input substrate concentration.

If we suppose that each peak of an SSCP profile represents one species, the most important peaks represent corresponding dominant species. It is noticed that major operational taxonomic units (OTU) are never the same at the beginning and at the end of an experiment. Although the initial

points P01 and P02 are very similar (*cf.* Figure 6), we notice also that dominant species for identical input substrate concentrations S_{in} ($S_{in} = 1, 2, 4$ g/L), whether it is by increasing or by decreasing the load, are different (*cf.* Figure 7). In other words, community structures are not resilient. Each input substrate concentration seems to select a different microbial community. The structure of communities in the chemostat was dynamic. This can be explained by the fact that we work in open conditions. Since the reactor is not sterile, it is permanently inoculated and possibly invaded by bacterial communities present in the liquid feed and/or in the aeration. Furthermore, the presence of predators and virus in the system, even if abiotic and biotic parameters are constant, can also explain dynamics in the ecosystem. The quite high diversity which maintains in the reactor can be explained by the structuration of the microbial community into flocs that become larger and larger over the time as shown by *FSD*.

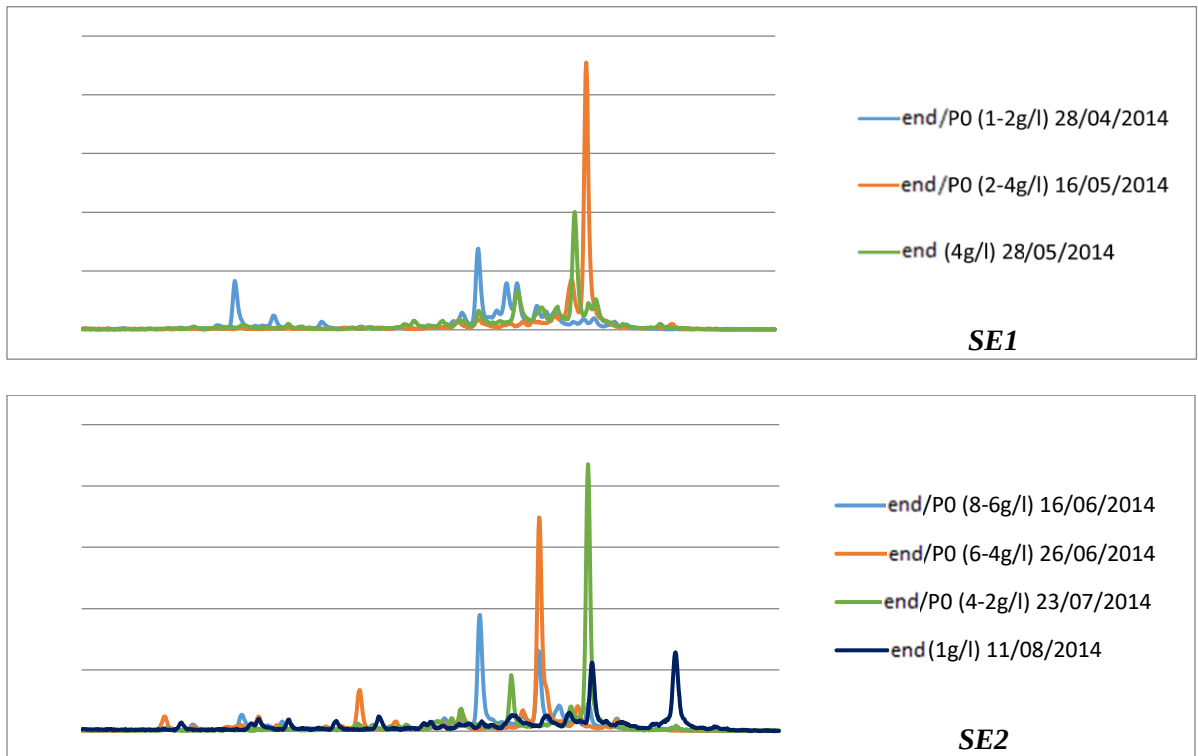


Figure 7: SSCP of the final points for all the experiments

By analyzing the results of molecular biology, several questions arise in terms of modelling. It is useful to know *i)* if populations that are different for each input substrate concentration can be compared and *ii)* if it is necessary to look for a global model for aerobic microbial ecosystems that have the same history but do not have the same behaviour at a given input concentration. In a first attempt, we tried to model, predict and compare what models can explain the experimental data. These trials led to results that are confirmed by molecular biology analyses: the concentration of S_{in} strongly affects the structure of the population at all loads. In particular, a very limited number of

species seems to take over but these are never the same. In other terms, the microbial ecosystem obtained over a given load is very different than that obtained for another load. This result fully justifies modelling experiments separately one from each other. In other words, a different model is used for each S_{in} concentration. Since species are not the same at each load, a single model for all data is insufficient. The fact that communities change according to each input substrate concentration, justifies the fact that the parameters of the models must be re-identified. This is the approach we have adopted to get the identification results for both $SE1$ and $SE2$ and the results of which are presented in the next section.

3.5. Modelling results - confrontation to data

To formalize our argument, a classical modelling approach was followed. It consisted in identifying the parameters of a number of resource- and density-dependent kinetics models using the data generated by the experiments performed in a continuous biological reactor. From a mathematical point of view, the candidate growth rate function in the model was increasing with respect to the substrate concentration and decreasing with respect to the biomass. Since we worked with a highly biodegradable substrate, the measured substrate concentrations were very low. In such a situation, it is well known that the parameters of the Monod model (3) are not identifiable (only the rate at the origin, that is the ratio of μ_{max} over K_s Monod parameters, can be identified (*cf.* for instance Dochain and Vanrolleghem, 2001)). Thus, we propose to modify the expressions of the candidate growth rates model, introducing a new growth function parameterized as follows:

$$\mu(s, x) = \mu_0 \frac{s}{x^\alpha} \quad (6)$$

where α , is a positive parameter that “measures” the density dependence, and in particular, s does not appear anymore at the denominator. From now on, we will refer to this model as model (6). Notice that the idea followed here was not to precisely identify the parameters of a given growth rate, but rather to establish qualitatively the resource or the density-dependent character of the kinetics. It also means that the identified values cannot be easily interpreted: it is the reason why we did not name the parameters μ_{max} nor K_s but rather used the notations μ_0 and α . The model with $\alpha = 0$ can be seen as the approximation of the Monod model (3) with $\mu_0 = \mu_{max}/K_s$ as long as the concentration of substrate is low (typically lower than K_s), and with $\alpha = 1$ as an approximation of the Contois model (4). Therefore, this new model tries to reconcile both model choices in a single model.

As already said, the model variables are COD for s and SS for x . For simplicity, the temperature was considered as constant while the oxygen concentration was supposed to be non-limiting.

To identify the model parameters, we can proceed as follows: solving the system (5) (section 2.3.) and according to model (6) at the steady state, one has

$$\mu_0 \frac{S_{in} - x/Y}{x^\alpha} = D$$

$$\frac{\mu_0}{Y^\alpha} \frac{s}{(S_{in} - s)^\alpha} = D$$

which implies $\log s = \alpha(\log x - \log(S_{in} - s)) - \alpha \log Y$.

Therefore, if one plots, $\log(S_{in} - x/Y) - \log s$ as a function of $\log x - \log(S_{in} - s)$, a simple linear regression provides the coefficient α . Unfortunately, within these experiments, we got too few data (5 steady states only) to use this approach.

Based on the identification procedure detailed in section 2.4, the whole dynamics over the time was used (from a given initial condition until the end of the experiment, *i.e.* when the system is supposed to have reached almost a steady state). The estimated parameters of model (6) are given in Table 6 and 7 for *SE1* and *SE2*, respectively. The simulations of the proposed models are compared to the experimental data of *SE1* and *SE2* in Figures 2 and 3, respectively.

Table 6: Identification results for *SE1*

S_{in} (g/L)	Parameters/Criterion	Model (6)	Standard deviation
1	μ_0	10.47	± 1.59
	α	0.41	± 0.13
	J	0.18	-
2	μ_0	10.46	± 2.37
	α	0	± 0.42
	J	0.05	-

Table 7: Identification results for *SE2*

S_{in} (g/L)	Parameters/Criterion	Model (6)	Standard deviation
1	μ_0	1.42	± 0.29
	α	3.92	± 0.25
	J	0.03	-
2	μ_0	11.75	± 0.67
	α	1.54	± 0.35
	J	0.25	-
4	μ_0	29.90	± 15.79
	α	2.35	± 0.98
	J	0.36	-

3.6. Discussion of modelling results

We first observe that except for $S_{in} = 2$ g/L of *SE1*, all models exhibit a - more or less - strong density-dependence. This can be correlated with the complexity of biomass instead of its density. Indeed, for *SE1*, recall that we performed experiments in series: the final state of the experiment

realized with $S_{in} = 1$ g/L is the initial conditions for the experiment realized with $S_{in} = 2$ g/L. Clearly, the structure of the community between the beginning of the first experiment (characterized by a quite high density of filamentous bacteria) and the end of the second experiment has simplified very much. This result could be summarized as follows: as long as the biomass concentration is low, simpler the structure of the community, more important the resource-dependency. For *SE2*, recall that these results have been obtained sequentially in realizing the experiments with decreasing values of S_{in} from 4 g/L to 1 g/L, the first observation is that we obtained increasing values for μ_0 . In addition, models for all loads exhibit density-dependence. The differences observed on the values of μ_0 can again be explained by the structure of the ecosystem which is significantly simpler and less structured (with smaller flocs) at $S_{in}=1$ g/L than at $S_{in}=4$ g/L which actually supports our claim about density-dependence (refer to the monitoring of granulometry during experiments presented in floc size distribution section. The second important point to be underlined is that, except for *SE1* when $S_{in}=2$ g/L, α is never null even if we subtract the corresponding standard deviation (*cf.* Table 7). This fact confirms the density-dependent character of the growth rate as soon as the biomass is structured into flocs or its density becomes high enough.

4. CONCLUSION AND PERSPECTIVES

In this paper, we analyzed the results of experiments realized in a chemostat to study the growth rate properties of a complex microbial ecosystem. To do so, we relied on experimental data of two series of experiments named *SE1* and *SE2*. The main characteristics of the chemostat were monitored over the experiments, including variables such as the biomass and substrate density, microscopic observations, the structure of the bacterial community and the granulometry of flocs. In addition, a modeling approach was used considering separate identifications for data obtained at the different input substrate concentrations considered. The analysis of steady-state raw data allowed us to show that biomasses growth rates were not following neither *pure* Monod nor Contois laws. The new model we propose presents a parameter α that measures the strength of density dependency. The growth kinetics obtained for *SE1* data sets presented a weak density dependent effect (low $\alpha \leq 0.41 < 1$) both at low substrate concentration and in the presence of flocs and filaments. Then for $S_{in} = 2$ g/L, being simpler in structure and low in biomass concentration, the effect that emerged is rather resource-dependent ($\alpha = 0$). This fact was confirmed under conditions where biomasses are mainly formed by a lot of free bacteria and some small flocs. It is suspected that the substrate-dependent relationship that was expected to appear with applying low substrate concentration in *SE2* as in *SE1* has been hidden by a high structuration of the biomass into flocs. *SE2* data sets characterized also with greater biomass concentrations conditions than in *SE1*, was best fitted by

models with density-effect ($\alpha > 1$) emphasizing high density dependence relations and confirmed by flocculation of biomass. This finding is based on the idea discussed in the literature that spatial structuration of biomass (here via flocculation) justifies the consideration of density-dependent growth model in the chemostat, as it was introduced in the field of mathematical ecology (Arditi et Ginzburg, 2012) or engineering of wastewater treatment processes (Harmand and Godon 2007, Lobry and Harmand, 2006).

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors thank Roger Arditi for fruitful comments in designing the experiments and the discussions we had about the results during the Bernoulli Seminar Series workshop *Microbial ecology and mathematical modelling* (15–19 December 2014), part of the *Role of mathematics and computer science in the ecological theory Program*, July–December 2014, CIB/EPFL, Lausanne, Switzerland.

The first author recognises the help of the Ministry of Higher Education of Tunisia for the half-scholarship awarded to her and is gratefully to LABEX NUMEV and ADEME for funding her PhD grant.

REFERENCES

- Arditi, R., L. R. Ginzburg (2012) How species interact – Altering the standard view on trophic ecology, Oxford University Press.
- Contois, D. E. (1959). Kinetics of bacterial growth: relationship between population density and specific growth rate of continuous cultures. *J. Gen. Microbiol.* 21: 40-50.
- Daigger, G. T. and Grady, C. P. L., Jr. 1977. A model for the bio-oxidation process based on product formation concepts.– *Water Res.* 11: 1049–1057.
- Dochain, D. and P. Vanrolleghem 2001. *Dynamical Modelling & Estimation in Wastewater Treatment Processes*, IWA publishing 2001, 360 pages.
- Elmaleh, S. and Ben Aim, R. 1976. Influence sur la cinétique biochimique de la concentration en carbone organique à l'entrée d'un réacteur développant une polyculture microbienne en mélange parfait. – *Water Res.* 10: 1005–1009.
- Gévaudan G, Hamelin J, Dabert P, Godon J-J, Bernet N. (2012) Homogeneity and synchronous dynamics of microbial communities in particulate biofilms: from major populations to minor groups. *Microbes Environ.* 2012; 27:142–148.
- Grady, C. P. L., Jr., Harlow, L. J. and Riesing, R. R. 1972. Effects of growth rate and influent substrate concentration on effluent quality from chemostats containing bacteria in pure and mixed

- culture. – *Biotechnol. Bioengineer.* 14:391–410.
- Grady, C. P. L., Jr. and Williams, D. R. 1975. Effects of influent substrate concentration on the kinetics of natural microbial populations in continuous culture. – *Water Res.* 9: 171–180.
- Grady L. C. P.; Glen Jr ;Daigger T et Lim H. C. (1999): *Biological wastewater treatment*. Second edition. New York. Basel. Marcel Dekker, 1076p.
- Hardin, G. (1960). The competitive exclusion principle. *Science* 131(3409): 1292-1297.
- Harmand, J. and J. J. Godon (2007) Density-dependent kinetics models for a simple description of complex phenomena in macroscopic mass-balance modeling of bioreactors, *Ecological Modelling*, Volume 200, Issues 3-4, 24 January 2007, Pages 393-402.
- Harmand, J., C. Lobry, A. Rapaport, T. Sari (2017) *Le chimostat: Théorie mathématique de la culture continue de micro-organismes*, ISTE Edition, 240 pages.
- Jessup, C. M., R. Kassen, et al. (2004). Big questions, small world: microbial model systems in ecology. *TRENDS in Ecology and Evolution* 19(4): 189-197.
- Jost, C. (2000). Predator-prey theory: hidden twins in ecology and microbiology. *OIKOS* 90(1): 202-208.
- Lobry, C. and J. Harmand (2006) A new hypothesis to explain the coexistence of N species in the presence of a single resource, *CRAS sérieBiologie*, Vol. 329, pp. 40-46.
- Lotka, A.J., *Analytical Note on Certain Rhythmic Relations in Organic Systems*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 6, 410–415, (1920)
- Monod, J. (1950). La technique de culture continue : Theorie et applications. *Ann. Inst. Pasteur, Lille* 79: 390-410.
- Novick, A. and L. Szilard (1950). Experiments with the chemostat on spontaneous mutations of bacteria. *PNAS* 36: 708-719.
- Volterra, V., *Variazioni e fluttuazioni del numero d'individui in specie animali conviventi*, *Mem. Acad. Lincei Roma*, 2, 31–113, (1926)
- Wade, M. J., J. Harmand, B. Benyahia, T. Bouchez, S. Chaillou, B. Cloez, J. J. Godon, B. Moussa Boudjemaa, A. Rapaport, T. Sari, R. Arditi, and C. Lobry, (2016) *Perspectives in Mathematical Modelling for Microbial Ecology*, *Ecological Modelling*, Vol. 321, pp. 64–74.
- Yoshinori, F. (1963) Kinetics of microbial growth and substrate consumption. *J. Theor. et Biol.* 5, 171-191.
- Z. Al-Qodah, H. Daghestani, Ph. Geopel, W. Lafi, Determination of kinetic parameters of α -amylase producing thermophile *Bacillus sphaericus* *African Journal of Biotechnology* Vol. 6(6), pp. 699-706, 19 March, 2007.

Annexe B

Composition du milieu de croissance Z8 de référence

Nous donnons un extrait contenant une description du milieu de culture Z8 [308]. Nous notons que la composition de ce milieu a été réajustée selon les expériences réalisées dans les travaux de cette thèse. Pour plus de détail voir les Chapitres 3 et 4. Toutefois, dans toutes les études réalisées, seule la forme ammonium NH_4^+ a été considérée. Les autres formes ont été supprimées de la préparation et remplacées avec du NH_4Cl pour avoir le milieu Z8- NH_4^+ .

1. Stock solution I

NaNO ₃	46.7 g
Ca(NO ₃) ₂ •4H ₂ O	5.9 g
MgSO ₄ •7H ₂ O	2.5 g

Dissolve chemicals (separately) in dH₂O and dilute to 1 litre.

2. Stock solution II

K ₂ HPO ₄	3.1 g
Na ₂ CO ₃	2.1 g

Dissolve chemicals (separately) in dH₂O and dilute to 1 litre.

3. Stock solution III

Fe-solution: 2.80 g FeCl₃•6H₂O dissolved in 100 mL 0.1 N HCl

EDTA-solution: 3.90 g EDTA-Na₂ dissolved in 100 mL 0.1 N NaOH

10 mL of the Fe-solution are dissolved in c. 900 mL dH₂O.

Then add 9.5 mL of the EDTA-solution, and fill up to one litre.

4. Stock solution IV

1. Na ₂ WO ₄ •2H ₂ O	0.330 g/100 mL
2. (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ •4H ₂ O	0.880 g/100 mL
3. KBr	1.20 g/100 mL
4. KJ	4. 0.83 g/100 mL
5. ZnSO ₄ •7H ₂ O	2.87 g/100 mL
6. Cd(NO ₃) ₂ •4H ₂ O	1.55 g/100 mL
7. Co(NO ₃) ₂ •6H ₂ O	1.46 g/100 mL
8. CuSO ₄ •5H ₂ O	1.25 g/100 mL
9. NiSO ₄ (NH ₄) ₂ SO ₄ •6H ₂ O	1.98 g/100 mL
10. Cr(NO ₃) ₃ •9H ₂ O	0.410 g/100 mL
11. V ₂ O ₅	0.0890 g/1000 mL
12. KAl(SO ₄) ₂ •12H ₂ O	4.74 g/100 mL
13. H ₃ BO ₃	3.10 g
MnSO ₄ •H ₂ O	1.60 g /1000 mL

Add 1 mL from solutions 1-10 & 12, and 10 mL from solution 11 & 100 mL from solution 13 to c. 700 mL dH₂O. Dilute to 1 litre with dH₂O.

5. Making up the final preparation

Bubble 500 mL dH₂O with CO₂ gas for ½ hour. Add:

- 10 mL solution I
- 10 mL solution II
- 10 mL solution III
- 1 mL solution IV

Dilute to 1 litre with dH₂O. Autoclave.

The medium should have a pH of 6-7.

Annexe C

Comparaison de méthodes d'identification des paramètres de la fonction de croissance de Monod

Introduction

Nous présentons ici une synthèse sur la comparaison entre quatre méthodes dédiées à l'identification des paramètres de la cinétique de Monod (voir Figure 16) sur des données expérimentales de suivi de la biomasse au cours du temps dans les réacteurs en mode batch. Nous rappelons qu'une *première*

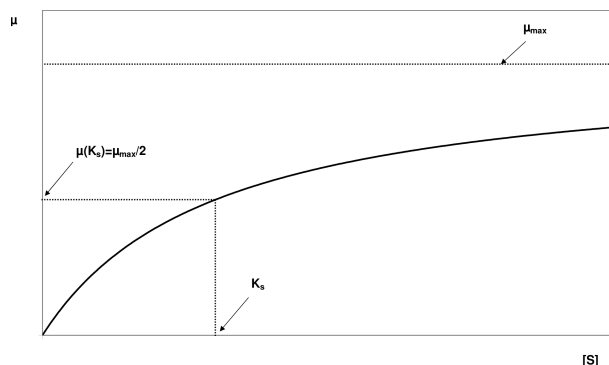


FIGURE 16 : Monod-type growth curve

méthode [1] proposée consiste à reconstruire, à l'aide des données de biomasse, l'état s et $\mu(s)$ et d'identifier les paramètres avec une méthode de régression non-linéaire. Une *deuxième méthode* [2] proposée est basée sur une transformation linéaire de la fonction de Monod qui permet de s'appuyer sur les outils performants de la régression linéaire pour identifier les paramètres. Le principe de la *troisième méthode* [3] est basée sur le calcul de la pente en 0 sur la courbe de la biomasse ($x(t)$) pour différentes conditions initiales de la gamme de ressources qu'on souhaite tester alors que la *quatrième méthode* [4] repose sur l'intégration du système des équations différentielles (du batch) avec des conditions initiales connues du substrat et de la biomasse.

Des méthodes d'identification ont été appliquées sur des séries de données, qui correspondent à différentes valeurs de substrat en considérant à la fois des plages de concentrations faibles et élevées de s lorsque $s < K_s$ et $s > K_s$, respectivement (voir Figure 16).

Nous discutons ci-dessous les avantages et les inconvénients des quatre méthodes.

Avantages et inconvénients de la méthode [1]

Cette méthode est relativement lente pour générer les paramètres de croissance car elle nécessite de déterminer à l'avance la valeur finale de la biomasse X_f , ce qui peut prendre du temps. En outre, il a été constaté que cette méthode est sensible aux nombre de points par expérience et à la fréquence de mesure.

La sensibilité de la méthode dans le cas de mélange de données provenant de plusieurs expériences à s_0 différents est donnée dans le tableau 3.

condition sur s_0	qualité de l'estimation des paramètres
mélange de deux gammes de s_0	-
s_0 forts $s_0 \gg K_s$	+
s_0 faibles $s_0 \ll K_s$	-

TABLE 3 : Résultats de la qualité des estimations de paramètres obtenues à l'aide de la première méthode ([1]) sur différentes combinaisons de données expérimentales.

Avantages et inconvénients de la méthode [2]

Comme pour la première méthode, la détermination des paramètres de croissance peut prendre du temps car il faut attendre la fin de l'expérience pour obtenir la valeur de X_f . En outre, cette méthode nécessite un filtre sur les valeurs de biomasse x qui correspondent à la phase stationnaire de croissance. Cette méthode ne peut s'appliquer qu'avec la fonction Monod. Malgré ses limites, cette méthode repose sur l'utilisation d'outils de régression linéaire pour l'estimation des paramètres permettant des interprétations statistiques plus robustes. Par rapport à la première méthode [1], la répartition des points de mesure n'est plus nécessairement uniforme en appliquant la transformation. Cependant, elle nécessite une fréquence de mesure constante.

La sensibilité de la méthode dans le cas de mélange de données provenant de plusieurs expériences à s_0 différents est donnée dans le tableau 4.

condition sur s_0	qualité de l'estimation des paramètres
mélange de deux gammes de s_0	+-
s_0 forts $s_0 \gg K_s$	-
s_0 faibles $s_0 \ll K_s$	+

TABLE 4 : Résultats de la qualité des estimations de paramètres obtenues à l'aide de la deuxième méthode ([2]) sur différentes combinaisons de données expérimentales.

Avantages et inconvénients de la méthode [3]

Cette méthode est considérablement plus rapide que les deux méthodes précédentes, car la croissance est contrôlée sur quelques jours de croissance (il n'est pas nécessaire d'attendre que le substrat soit complètement épuisé). En outre, l'identification des paramètres de croissance ne dépend pas de Y . Cette méthode est simple et facile à automatiser. En outre, elle peut être appliquée à des cinétiques autres que celle de Monod. Cependant, elle nécessite plusieurs expériences avec une large gamme de concentrations de substrat et peut être limitée soit par la concentration particulièrement faible de s_0 , soit par la sensibilité de certains micro-organismes aux conditions de croissance pouvant impliquer une longue phase de latence. Elle nécessite également une bonne qualité de mesures de la biomasse dans un intervalle de temps relativement court pour avoir une bonne estimation de la pente initiale.

Avantages et inconvénients de la méthode [4]

Cette méthode n'est pas influencée par la gamme des concentrations de substrat (contrairement aux deux premières méthodes). Toutefois, elle est sensible aux nombres de variables à identifier et surtout aux conditions initiales (l'erreur initiale se propage).

Conclusion

Le choix de la meilleure méthode dépend de la situation et/ou de la nature des données acquises. Les méthodes présentées peuvent être considérées comme des outils utiles pour l'expérimentateur lui permettant de guider et de choisir ses expériences (a priori), ou d'exploiter au mieux ses données de croissance.

Annexe D

Dispositif expérimental pour étudier le couplage entre microalgues et bactéries

De manière à tester expérimentalement les différentes interactions possibles entre les micro-algues et les bactéries, une réflexion a été menée durant la thèse sur le montage d'un nouveau type de réacteur avec une membrane permettant théoriquement de séparer les bactéries des micro-algues (voire séparer deux espèces de micro-algues) en profitant du même environnement abiotique (Figure 17)

On considère un chimostat avec une membrane qui sépare le volume total V en deux sous-volumes V_1 , V_2 , un débit d'entrée Q et deux sorties, de part et d'autre de la membrane, de débits Q_1 et Q_2 avec $Q = Q_1 + Q_2$.

On suppose que la membrane laisse passer substrat et bactéries et retient les micro-algues. Le réacteur est inoculé avec des micro-algues uniquement en amont de la membrane (cf. Figure 17).

On note S_1 , A et B_1 les concentrations en substrat, algues et bactéries dans le premier volume et S_2 , B_2 en substrat et bactéries dans le deuxième volume.

On mesure en sortie les concentrations en substrat S_1 , S_2 et en biomasse totale, c'est à dire $X_1 = A + B_1$ et B_2 .

On suppose les volumes V_1 , V_2 et les débits Q_1 , Q_2 connus. **L'objectif est de voir si ce dispositif permet, en théorie, de connaître les concentrations A et B_1 et leurs contributions à la consommation de substrat, en ne mesurant que la biomasse totale X_1 . On cherche également à savoir si la vitesse de reproduction des bactéries peut être considérée identique selon qu'elles sont en présence des algues ou pas.**

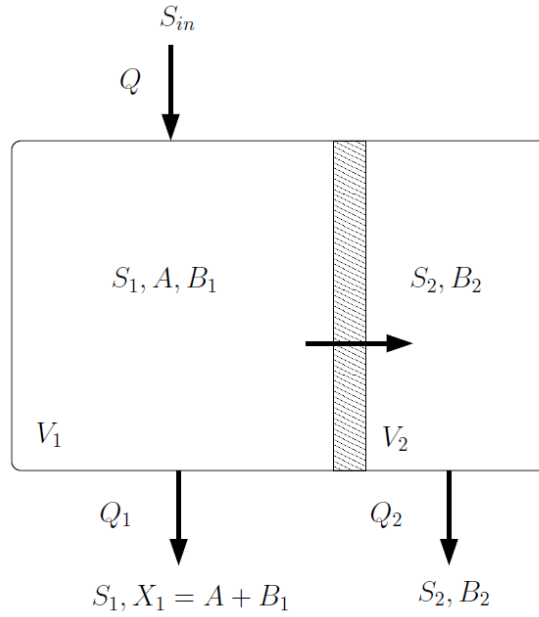


FIGURE 17 : Réacteur à membrane séparatrice : les micro-algues ne se reproduisent que dans le compartiment de gauche, alors que les bactéries peuvent se développer dans les deux compartiments.

Pour cela, on considère le modèle suivant, pour le premier volume :

$$\begin{cases} \dot{S}_1 &= -\mu_A(S_1, A)A - \mu_B(S_1)B_1 + \frac{Q}{V_1}(S_{in} - S_1) \\ \dot{A} &= \mu_A(S_1, A)A - \frac{Q_1}{V_1}A \\ \dot{B}_1 &= \mu_B(S_1)B_1 - \frac{Q}{V_1}B_1 \end{cases}$$

et pour le second

$$\begin{cases} \dot{S}_2 &= -\mu_B(S_2)B_2 + \frac{Q_2}{V_2}(S_1 - S_2) \\ \dot{B}_2 &= \mu_B(S_2)B_2 + \frac{Q_2}{V_2}(B_1 - B_2) \end{cases}$$

où $\mu_A(\cdot)$ désigne la fonction de croissance spécifique des algues, que nous supposons être densité dépendant pour tenir compte des effets dus à l'atténuation de la lumière par la densité des algues. Typiquement, cette fonction peut être de la forme

$$\mu_A(S, A) = \frac{\mu_{max,A}S}{K_A + S} \cdot \frac{I_0 e^{-kA}}{K_I + I_0 e^{-kA}}$$

où I_0 est l'intensité lumineuse en entrée. La fonction de croissance pour les bactéries peut être choisie de la forme classique de Monod :

$$\mu_B(S) = \frac{\mu_{max,B}S}{K_B + S}$$

A l'équilibre, on voit en écrivant $\dot{B}_1 = 0$ que la concentration en substrat S_1^* est imposée par la présence des bactéries :

$$\mu_B(S_1^*) = \frac{Q}{V_1}$$

Ainsi pour différentes valeurs de Q , on peut connaître des points de la courbe $S \mapsto \mu_B(S)$ et identifier les paramètres $\mu_{max,B}$ et K_B . Pour les algues, on a de même

$$\mu_A(A^*, S_1^*) = \frac{Q_1}{V_1}$$

mais ne mesurant pas A on ne peut pas reconstruire directement la fonction μ_A . Néanmoins, on écrivant $\dot{S}_1 = 0$, on obtient

$$Q_1 \frac{A^*}{Y_A} + Q \frac{B_1^*}{Y_B} = Q(S_{in} - S_1^*)$$

Ainsi en mesurant X_1 et S_1 , on peut théoriquement connaître les valeurs de A et B_1 à l'équilibre

$$\begin{bmatrix} A^* \\ B_1^* \end{bmatrix} = \begin{pmatrix} Q_1 & Q \\ 1 & 1 \end{pmatrix}^{-1} \cdot \begin{bmatrix} Q(S_{in} - S_1^*) \\ X_1^* \end{bmatrix}$$

car Q_1 est différent de Q Ceci est donc possible car les algues sont soumis à un taux de dilution Q_1/V_1 différent de celui des bactéries, égal à Q/V_1 . C'est l'intérêt du dispositif.

D'autre part, les sorties du deuxième volume sont intéressantes car elles permettent de connaître la fonction de croissance des bactéries en absence des algues. En écrivant $\dot{S}_2 = 0$, il vient :

$$\mu_B(S_2^*) = \frac{Q_2}{V_2} \cdot \frac{S_1^* - S_2^*}{B_2^*}$$

et on peut vérifier si elle suit la même courbe de croissance $\mu_B(\cdot)$ identifiée dans le premier volume (ce qui exige de tester des valeurs plus faibles de Q pour que S_2^* visite des valeurs de l'ordre de celles qui ont été explorées dans le premier volume).

Conclusion

On a montré théoriquement que le dispositif expérimental proposé (sous l'hypothèse d'une filtration parfaite sans encrassement) permet, avec différentes valeurs de Q et de Q_1 , et en mesurant la biomasse totale dans le premier compartiment $X_1 = A + B_1$ et le substrat S_1 , de connaître :

- la courbe de croissance des bactéries μ_B
- la courbe de croissance des micro-algues μ_A et d'identifier leurs paramètres.

La mesure des sorties du deuxième compartiment : substrat S_1 , et biomasse B_1 permet de :

- connaître la fonction de croissance des bactéries en absence des algues

Ce dispositif expérimental est très prometteur bien qu'il reste probablement difficile à mettre en place en pratique car il nécessite des essais au laboratoire.

Annexe E

Comparaison de solution d'équations différentielles

Nous rappelons ici le théorème de Muller [[421](#), [370](#)] dont un énoncé peut se trouver dans le livre [[422](#)], voir l'extrait suivant :

114 III. First Order Systems. Equations of Higher Order

XIII. M. Müller's Theorem for Arbitrary Systems. Let $f(x, y) : D \rightarrow \mathbb{R}^n$ satisfy a local Lipschitz condition in y . Let $y, v, w : J = [\xi, \xi + a] \rightarrow \mathbb{R}^n$ be differentiable, $v \leq w$ in J , $v(\xi) \leq y(\xi) \leq w(\xi)$, $y' = f(x, y)$, and

$$v'_i \leq f_i(x, z) \text{ for all } z \in \mathbb{R}^n \text{ such that } v(x) \leq z \leq w(x), z_i = v_i(x),$$

$$w'_i \leq f_i(x, z) \text{ for all } z \in \mathbb{R}^n \text{ such that } v(x) \leq z \leq w(x), z_i = w_i(x),$$

for $i = 1, \dots, n$. Then

$$v \leq y \leq w \text{ in } J.$$

Références :

Müller, M.: Über das Fundamentaltheorem in der Theorie der gewöhnlichen Differentialgleichungen. *Math. Z.* **26**, 619–645 (1926).

Müller, M.: Über die Eindeutigkeit der Integrale eines Systems gewöhnlicher Differentialgleichungen und die Konvergenz einer Gattung von Verfahren zur Approximation dieser Integrale. *Sitz.-Ber. Heidelberger Akad. Wiss. Math.-Naturwiss. Kl.* 1927, 9. Abh.

Références bibliographiques

- [1] Bruno SIALVE et Jean-Philippe STEYER : Les microalgues, promesses et défis. 2013.
- [2] Amos RICHMOND : *Handbook of microalgal culture : biotechnology and applied phycology*. John Wiley & Sons, 2008.
- [3] Fouilland E. Lanouguère E. Leboulanger C. Le Floc’h E. Mas S. Parin D. Roques C. Bonnafous A. Galès A. Sialve B. Steyer J-P. Tisserand P. Poullain C. Jauzein V. CARO A., Carré C. : Livrable 11.1 : Caractérisation et isolement des consortia microbiens. 2016.
- [4] Karoline FAUST et Jeroen RAES : Microbial interactions : from networks to models. *Nature Reviews Microbiology*, 10(8):538–550, 2012.
- [5] William Z LIDICKER JR : A clarification of interactions in ecological systems. *Bioscience*, 29(8):475–477, 1979.
- [6] Amandine GALÈS, Anaïs BONNAFOUS, Claire CARRÉ, Vincent JAUZEIN, Elodie LANOUGUÈRE, Emilie LE FLOC’H, Joanna PINOIT, Clothilde POULLAIN, Cécile ROQUES, Bruno SIALVE *et al.* : Importance of ecological interactions during wastewater treatment using high rate algal ponds under different temperate climates. *Algal Research*, 40:101508, 2019.
- [7] Alain RAPAPORT et Jérôme HARMAND : Biological control of the chemostat with nonmonotonic response and different removal rates. *Mathematical Biosciences and Engineering*, 5(3):539–547, 2008.
- [8] José RF MALAPASCUA, Celia G JEREZ, Magda SERGEJEVOVÁ, Félix L FIGUEROA et Jiří MASOJÍDEK : Photosynthesis monitoring to optimize growth of microalgal mass cultures : application of chlorophyll fluorescence techniques. *Aquatic biology*, 22:123–140, 2014.
- [9] Olivier BERNARD et Barbara RÉMOND : Validation of a simple model accounting for light and temperature effect on microalgal growth. *Bioresource technology*, 123:520–527, 2012.
- [10] Davide IPPOLITI, Cintia GÓMEZ, María del MAR MORALES-AMARAL, Rossella PISTOCCHI, JM FERNÁNDEZ-SEVILLA et F Gabriel ACIÉN : Modeling of photosynthesis and respiration

rate for *isochrysis galbana* (t-iso) and its influence on the production of this strain. *Bioresource technology*, 203:71–79, 2016.

- [11] Michel de O dos SANTOS, Márcio A MARTINS, Jane S dos R COIMBRA, Richard S GATES et Lucas de P CORRÊDO : Rheological behavior of *chlorella* sp. e *scenedesmus* sp. cultures in different biomass concentrations. *Engenharia agricola*, 33(5):1063–1071, 2013.
- [12] Alain RAPAPORT et Denis DOCHAIN : Interval observers for biochemical processes with uncertain kinetics and inputs. *Mathematical biosciences*, 193(2):235–253, 2005.
- [13] FB METTING : Biodiversity and application of microalgae. *Journal of industrial microbiology*, 17(5-6):477–489, 1996.
- [14] Teresa M MATA, Antonio A MARTINS et Nidia S CAETANO : Microalgae for biodiesel production and other applications : a review. *Renewable and sustainable energy reviews*, 14(1):217–232, 2010.
- [15] Giulia SAMORÌ, Chiara SAMORÌ, Franca GUERRINI et Rossella PISTOCCHI : Growth and nitrogen removal capacity of *desmodesmus communis* and of a natural microalgae consortium in a batch culture system in view of urban wastewater treatment : part i. *Water research*, 47(2):791–801, 2013.
- [16] Guanyi CHEN, Liu ZHAO et Yun QI : Enhancing the productivity of microalgae cultivated in wastewater toward biofuel production : a critical review. *Applied Energy*, 137:282–291, 2015.
- [17] Abbas MEHRABADI, Rupert CRAGGS et Mohammed M FARID : Wastewater treatment high rate algal ponds (wwt hrap) for low-cost biofuel production. *Bioresource technology*, 184:202–214, 2015.
- [18] Sanjay Kumar GUPTA, Faiz Ahmad ANSARI, Amritanshu SHRIWASTAV, Narendra Kumar SAHOO, Ismail RAWAT et Faizal BUX : Dual role of *chlorella sorokiniana* and *scenedesmus obliquus* for comprehensive wastewater treatment and biomass production for bio-fuels. *Journal of cleaner production*, 115:255–264, 2016.
- [19] Michael A BOROWITZKA et Navid R MOHEIMANI : *Algae for biofuels and energy*, volume 5. Springer, 2013.
- [20] Elena KAZAMIA, David C ALDRIDGE et Alison G SMITH : Synthetic ecology—a way forward for sustainable algal biofuel production ? *Journal of Biotechnology*, 162(1):163–169, 2012.
- [21] Jagroop PANDHAL et Josselin NOIREL : Synthetic microbial ecosystems for biotechnology. *Biotechnology letters*, 36(6):1141–1151, 2014.
- [22] Juan Cesar Federico ORTIZ-MARQUEZ, Mauro DO NASCIMENTO, Maria de los ANGELES DUBLAN et Leonardo CURATTI : Association with an ammonium-excreting bacte-

rium allows diazotrophic culture of oil-rich eukaryotic microalgae. *Applied and environmental microbiology*, 78(7):2345–2352, 2012.

- [23] Matthew AA GRANT, Elena KAZAMIA, Pietro CICUTA et Alison G SMITH : Direct exchange of vitamin b 12 is demonstrated by modelling the growth dynamics of algal–bacterial cocultures. *The ISME journal*, 8(7):1418–1427, 2014.
- [24] Senthil CHINNASAMY, Anjuli SOOD, Nirmal RENUKA, Radha PRASANNA, Sachitra Kumar RATHA, Sailendra BHASKAR, Ramasamy RENGASAMY et David M LEWIS : Ecobiological aspects of algae cultivation in wastewaters for recycling of nutrients and biofuel applications. *Biofuels*, 5(2):141–158, 2014.
- [25] Deborah T NEWBY, Teresa J MATHEWS, Ron C PATE, Michael H HUESEMANN, Todd W LANE, Bradley D WAHLEN, Shovon MANDAL, Robert K ENGLER, Kevin P FERIS et Jon B SHURIN : Assessing the potential of polyculture to accelerate algal biofuel production. *Algal research*, 19:264–277, 2016.
- [26] Jie LIAN, Rene H WIJFFELS, Hauke SMIDT et Detmer SIPKEMA : The effect of the algal microbiome on industrial production of microalgae. *Microbial Biotechnology*, 11(5):806–818, 2018.
- [27] Claude LOBRY, Frédéric MAZENC et Alain RAPAPORT : Persistence in ecological models of competition for a single resource. *Comptes Rendus Mathématique*, 340(3):199–204, 2005.
- [28] Roger ARDITI et Lev R GINZBURG : *How species interact : altering the standard view on trophic ecology*. Oxford University Press, 2012.
- [29] RA ANDERSEN : Diversity of eukaryotic algae. *Biodiversity & Conservation*, 1(4):267–292, 1992.
- [30] Naveen K SHARMA et Ashwani K RAI : Biodiversity and biogeography of microalgae : progress and pitfalls. *Environmental Reviews*, 19(NA):1–15, 2010.
- [31] Pierre MOLLO et Anne NOURY : *Le Manuel du plancton*. ECLM, 2013.
- [32] Zoe V FINKEL, John BEARDALL, Kevin J FLYNN, Antonietta QUIGG, T Alwyn V REES et John A RAVEN : Phytoplankton in a changing world : cell size and elemental stoichiometry. *Journal of plankton research*, 32(1):119–137, 2009.
- [33] Fabrizio DI CAPRIO, Pietro ALTIMARI et Francesca PAGNANELLI : New strategies enhancing feasibility of microalgal cultivations. In *Studies in Surface Science and Catalysis*, volume 179, pages 287–316. Elsevier, 2019.
- [34] Joel C GOLDMAN : Outdoor algal mass cultures—ii. photosynthetic yield limitations. *Water Research*, 13(2):119–136, 1979.

- [35] Giuseppe TORZILLO, Benjamin PUSHPARAJ, Jiri MASOJIDEK et Avigad VONSHAK : Biological constraints in algal biotechnology. *Biotechnology and bioprocess engineering*, 8(6):338–348, 2003.
- [36] Nirbhay Kumar SINGH et Dolly Wattal DHAR : Microalgae as second generation biofuel. a review. *Agronomy for Sustainable Development*, 31(4):605–629, 2011.
- [37] Stephen P LONG, S HUMPHRIES et Paul G FALKOWSKI : Photoinhibition of photosynthesis in nature. *Annual review of plant biology*, 45(1):633–662, 1994.
- [38] Hakgeun JEONG, Junghoon LEE et Misun CHA : Energy efficient growth control of microalgae using photobiological methods. *Renewable energy*, 54:161–165, 2013.
- [39] Kehong LIANG, Qinghua ZHANG, Ming GU et Wei CONG : Effect of phosphorus on lipid accumulation in freshwater microalga chlorella sp. *Journal of Applied Phycology*, 25(1):311–318, 2013.
- [40] Fei-Fei CHU, Pei-Na CHU, Pei-Jie CAI, Wen-Wei LI, Paul KS LAM et Raymond J ZENG : Phosphorus plays an important role in enhancing biodiesel productivity of chlorella vulgaris under nitrogen deficiency. *Bioresource technology*, 134:341–346, 2013.
- [41] Laurent LARDON, Arnaud HÉLIAS, Bruno SIALVE, Jean-Philippe STEYER et Olivier BERNARD : Life-cycle assessment of biodiesel production from microalgae, 2009.
- [42] Shih-Hsin HO, Chun-Yen CHEN et Jo-Shu CHANG : Effect of light intensity and nitrogen starvation on co2 fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga scenedesmus obliquus cnw-n. *Bioresource technology*, 113:244–252, 2012.
- [43] Guido BREUER, Packo P LAMERS, Dirk E MARTENS, René B DRAAISMA et René H WIJFFELS : The impact of nitrogen starvation on the dynamics of triacylglycerol accumulation in nine microalgae strains. *Bioresource Technology*, 124:217–226, 2012.
- [44] YT HUANG et CP SU : High lipid content and productivity of microalgae cultivating under elevated carbon dioxide. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 11(3):703–710, 2014.
- [45] El-Sayed SALAMA, Mayur B KURADE, Reda AI ABOU-SHANAB, Marwa M EL-DALATONY, Il-Seung YANG, Booki MIN et Byong-Hun JEON : Recent progress in microalgal biomass production coupled with wastewater treatment for biofuel generation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 79:1189–1211, 2017.
- [46] Xiao-Fei SHEN, Jing-Jing LIU, Fei-Fei CHU, Paul KS LAM et Raymond J ZENG : Enhancement of fame productivity of scenedesmus obliquus by combining nitrogen deficiency with sufficient phosphorus supply in heterotrophic cultivation. *Applied energy*, 158:348–354, 2015.

- [47] Fei-Fei CHU, Pei-Na CHU, Xiao-Fei SHEN, Paul KS LAM et Raymond J ZENG : Effect of phosphorus on biodiesel production from *scenedesmus obliquus* under nitrogen-deficiency stress. *Bioresource technology*, 152:241–246, 2014.
- [48] Liang FU, Xiaochun CUI, Yunbao LI, Liang XU, Chaofan ZHANG, Ruohan XIONG, Dandan ZHOU et John C CRITTENDEN : Excessive phosphorus enhances *chlorella regularis* lipid production under nitrogen starvation stress during glucose heterotrophic cultivation. *Chemical Engineering Journal*, 330:566–572, 2017.
- [49] Val H SMITH et Susan J BENNETT : Nitrogen : phosphorus supply ratios and phytoplankton community structure in lakes. *Archiv für Hydrobiologie*, pages 37–53, 1999.
- [50] Klaus-Peter MICHEL et Elfriede K PISTORIUS : Adaptation of the photosynthetic electron transport chain in cyanobacteria to iron deficiency : the function of *idia* and *isia*. *Physiologia Plantarum*, 120(1):36–50, 2004.
- [51] Kent L HILL, Richard HASSETT, Daniel KOSMAN et Sabeeha MERCHANT : Regulated copper uptake in *chlamydomonas reinhardtii* in response to copper availability. *Plant physiology*, 112(2):697–704, 1996.
- [52] J-E TILLBERG et JR ROWLEY : Physiological and structural effects of phosphorus starvation on the unicellular green alga *scenedesmus*. *Physiologia Plantarum*, 75(3):315–324, 1989.
- [53] Paul G FALKOWSKI et Julie LAROCHE : Acclimation to spectral irradiance in algae. *Journal of Phycology*, 27(1):8–14, 1991.
- [54] Tracy ANNING, Hugh L MACINTYRE, Sandra M PRATT, Pippa J SAMMES, Stuart GIBB et Richard J GEIDER : Photoacclimation in the marine diatom *skeletonema costatum*. *Limnology and Oceanography*, 45(8):1807–1817, 2000.
- [55] Hugh L MACINTYRE, Todd M KANA, Tracy ANNING et Richard J GEIDER : Photoacclimation of photosynthesis irradiance response curves and photosynthetic pigments in microalgae and cyanobacteria 1. *Journal of phycology*, 38(1):17–38, 2002.
- [56] Sverre M MYKLESTAD : Release of extracellular products by phytoplankton with special emphasis on polysaccharides. *Science of the total Environment*, 165(1-3):155–164, 1995.
- [57] Francisco JL GORDILLO, Carlos JIMENEZ, Felix L FIGUEROA et F Xavier NIELL : Influence of elevated CO_2 and nitrogen supply on the carbon assimilation performance and cell composition of the unicellular alga *dunaliella viridis*. *Physiologia Plantarum*, 119(4):513–518, 2003.
- [58] Joel QUERELLOU, Jean-Paul CADORET, Michael J ALLEN et Jonas COLLÉN : Marine biotechnology. In *Introduction to Marine Genomics*, pages 287–313. Springer, 2010.
- [59] Richa KATIYAR, BR GURJAR, Shalini BISWAS, Vikas PRUTHI, Nalin KUMAR et Prashant

- KUMAR : Microalgae : an emerging source of energy based bio-products and a solution for environmental issues. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 72:1083–1093, 2017.
- [60] José L GARCÍA, Marta de VICENTE et Beatriz GALÁN : Microalgae, old sustainable food and fashion nutraceuticals. *Microbial Biotechnology*, 10(5):1017–1024, 2017.
- [61] Manoj Kumar ENAMALA, Swapnika ENAMALA, Murthy CHAVALI, Jagadish DONEPUDI, Rajasri YADAVALLI, Bhulakshmi KOLAPALLI, Tirumala Vasu ARADHYULA, Jeevitha VELPURI et Chandrasekhar KUPPAM : Production of biofuels from microalgae—a review on cultivation, harvesting, lipid extraction, and numerous applications of microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 94:49–68, 2018.
- [62] Muhammad Imran KHAN, Jin Hyuk SHIN et Jong Deog KIM : The promising future of microalgae : current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microbial cell factories*, 17(1):36, 2018.
- [63] Michael HANNON, Javier GIMPEL, Miller TRAN, Beth RASALA et Stephen MAYFIELD : Biofuels from algae : challenges and potential. *Biofuels*, 1(5):763–784, 2010.
- [64] Apurav Krishna KOYANDE, Kit Wayne CHEW, Krishnamoorthy RAMBABU, Yang TAO, Dinh-Toi CHU et Pau-Loke SHOW : Microalgae : A potential alternative to health supplementation for humans. *Food Science and Human Wellness*, 8(1):16–24, 2019.
- [65] Pauline SPOLAORE, Claire JOANNIS-CASSAN, Elie DURAN et Arsène ISAMBERT : Commercial applications of microalgae. *Journal of bioscience and bioengineering*, 101(2):87–96, 2006.
- [66] Indira PRIYADARSHANI et Biswajit RATH : Commercial and industrial applications of microalgae—a review. *Journal of Algal Biomass Utilization*, 3(4):89–100, 2012.
- [67] I RAWAT, R Ranjith KUMAR, T MUTANDA et F BUX : Dual role of microalgae : phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied energy*, 88(10):3411–3424, 2011.
- [68] Otto PULZ : Photobioreactors : production systems for phototrophic microorganisms. *Applied microbiology and biotechnology*, 57(3):287–293, 2001.
- [69] Kirk E APT et Paul W BEHRENS : Commercial developments in microalgal biotechnology. *Journal of phycology*, 35(2):215–226, 1999.
- [70] Yusuf CHISTI : Biodiesel from microalgae. *Biotechnology advances*, 25(3):294–306, 2007.
- [71] Liam BRENNAN et Philip OWENDE : 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, 2010.

- [72] Val H SMITH, Belinda SM STURM, Frank J DENOYELLES et Sharon A BILLINGS : The ecology of algal biodiesel production. *Trends in ecology & evolution*, 25(5):301–309, 2010.
- [73] Marcondes M PACHECO, Michele HOELTZ, Maria SA MORAES et Rosana CS SCHNEIDER : Microalgae : cultivation techniques and wastewater phycoremediation. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 50(6):585–601, 2015.
- [74] Nora FY TAM, Yuk-Shan WONG et Craig G SIMPSON : Removal of copper by free and immobilized microalga, *chlorella vulgaris*. In *Wastewater treatment with algae*, pages 17–36. Springer, 1998.
- [75] Iago Teles Dominguez CABANELAS, Jesús RUIZ, Zouhayr ARBIB, Fábio Alexandre CHINALIA, Carmen GARRIDO-PÉREZ, Frank ROGALLA, Iracema Andrade NASCIMENTO et José A PERALES : Comparing the use of different domestic wastewaters for coupling microalgal production and nutrient removal. *Bioresource technology*, 131:429–436, 2013.
- [76] Ashish BHATNAGAR, Senthil CHINNASAMY, Manjinder SINGH et KC DAS : Renewable biomass production by mixotrophic algae in the presence of various carbon sources and wastewaters. *Applied Energy*, 88(10):3425–3431, 2011.
- [77] Eugenia J OLGUÍN : Dual purpose microalgae–bacteria-based systems that treat wastewater and produce biodiesel and chemical products within a biorefinery. *Biotechnology advances*, 30(5):1031–1046, 2012.
- [78] Manjinder SINGH et KC DAS : Low cost nutrients for algae cultivation. In *Algal biorefineries*, pages 69–82. Springer, 2014.
- [79] Laura T CARNEY, Joshua S WILKENFELD, Pam D LANE, Owen D SOLBERG, Zachary B FUQUA, Nina G CORNELIUS, Shaunette GILLESPIE, Kelly P WILLIAMS, Tzachi M SAMOCHA et Todd W LANE : Pond crash forensics : presumptive identification of pond crash agents by next generation sequencing in replicate raceway mass cultures of *nannochloropsis salina*. *Algal Research*, 17:341–347, 2016.
- [80] Karen Glaus PORTER : The plant-animal interface in freshwater ecosystems : microscopic grazers feed differentially on planktonic algae and can influence their community structure and succession in ways that are analogous to the effects of herbivores on terrestrial plant communities. *American Scientist*, 65(2):159–170, 1977.
- [81] I MORENO-GARRIDO et JP CANAVATE : Assessing chemical compounds for controlling predator ciliates in outdoor mass cultures of the green algae *dunaliella salina*. *Aquacultural engineering*, 24(2):107–114, 2001.
- [82] WJ OSWALD, HB GOTAAS, CG GOLUEKE, WR KELLEN, EF GLOYNA et ER HERMANN : Algae in waste treatment [with discussion]. *Sewage and industrial wastes*, 29(4):437–457,

1957.

- [83] Rishiram RAMANAN, Byung-Hyuk KIM, Dae-Hyun CHO, Hee-Mock OH et Hee-Sik KIM : Algae–bacteria interactions : evolution, ecology and emerging applications. *Biotechnology advances*, 34(1):14–29, 2016.
- [84] Dae-Hyun CHO, Rishiram RAMANAN, Jina HEO, Jimin LEE, Byung-Hyuk KIM, Hee-Mock OH et Hee-Sik KIM : Enhancing microalgal biomass productivity by engineering a microalgal–bacterial community. *Bioresource technology*, 175:578–585, 2015.
- [85] Dae-Hyun CHO, Jung-Woon CHOI, Zion KANG, Byung-Hyuk KIM, Hee-Mock OH, Hee-sik KIM et Rishiram RAMANAN : Microalgal diversity fosters stable biomass productivity in open ponds treating wastewater. *Scientific Reports*, 7(1):1979, 2017.
- [86] Dolosor C. Fouilland E. Garand P. Krichen E. Lanouguère E. Leboulanger C. Le Floc’h E. Linhart T. Mandonnet A. Bonnafeous A. Galès A. BEAUGELIN I., Carré C. : Livrable 11.2 : Performances des consortia algues-bactéries isolés. 2018.
- [87] David M NEEDHAM et Jed A FUHRMAN : Pronounced daily succession of phytoplankton, archaea and bacteria following a spring bloom. *Nature microbiology*, 1(4):1–7, 2016.
- [88] Peter KILHAM et Robert E HECKY : Comparative ecology of marine and freshwater phytoplankton 1. *Limnology and Oceanography*, 33(4part2):776–795, 1988.
- [89] QuBbec DIAMANT : Hierarchical control of phytoplankton succession by physical factors. *Mar. Ecol. Prog. Ser*, 19:211–222, 1984.
- [90] James P GROVER et Thomas H CHRZANOWSKI : Seasonal dynamics of phytoplankton in two warm temperate reservoirs : association of taxonomic composition with temperature. *Journal of Plankton Research*, 28(1):1–17, 2006.
- [91] Jianming DENG, Boqiang QIN, Hans W PAERL, Yunlin ZHANG, Pan WU, Jianrong MA et Yuwei CHEN : Effects of nutrients, temperature and their interactions on spring phytoplankton community succession in lake taihu, china. *PLoS One*, 9(12):e113960, 2014.
- [92] Nathan JB KRAFT, Renato VALENCIA et David D ACKERLY : Functional traits and niche-based tree community assembly in an amazonian forest. *Science*, 322(5901):580–582, 2008.
- [93] Janneke HILLERISLAMBERS, Peter B ADLER, WS HARPOLE, Jonathan M LEVINE et Margaret M MAYFIELD : Rethinking community assembly through the lens of coexistence theory. *Annual review of ecology, evolution, and systematics*, 43, 2012.
- [94] David TILMAN : *Resource competition and community structure*. Princeton university press, 1982.

- [95] Garrett HARDIN : The competitive exclusion principle. *science*, 131(3409):1292–1297, 1960.
- [96] Flore ZÉLÉ, Sara MAGALHÃES, Sonia KÉFI et Alison B DUNCAN : Ecology and evolution of facilitation among symbionts. *Nature communications*, 9(1):1–12, 2018.
- [97] John G DAY, Yingchun GONG et Qiang HU : Microzooplanktonic grazers—a potentially devastating threat to the commercial success of microalgal mass culture. *Algal research*, 27:356–365, 2017.
- [98] Jonathan B SHURIN, Rachel L ABBOTT, Michael S DEAL, Garfield T KWAN, Elena LITCHMAN, Robert C MCBRIDE, Shovon MANDAL et Val H SMITH : Industrial-strength ecology : trade-offs and opportunities in algal biofuel production. *Ecology letters*, 16(11):1393–1404, 2013.
- [99] Stuart L PIMM : The complexity and stability of ecosystems. *Nature*, 307(5949):321–326, 1984.
- [100] Steven M SHORT : The ecology of viruses that infect eukaryotic algae. *Environmental Microbiology*, 14(9):2253–2271, 2012.
- [101] Hui WANG, Wei ZHANG, Lin CHEN, Junfeng WANG et Tianzhong LIU : The contamination and control of biological pollutants in mass cultivation of microalgae. *Bioresource technology*, 128:745–750, 2013.
- [102] Tan Phat LAM, Tse-Min LEE, Chun-Yen CHEN et Jo-Shu CHANG : Strategies to control biological contaminants during microalgal cultivation in open ponds. *Bioresource technology*, 252:180–187, 2018.
- [103] Peer M SCHENK, Skye R THOMAS-HALL, Evan STEPHENS, Ute C MARX, Jan H MUSSGNUG, Clemens POSTEN, Olaf KRUSE et Ben HANKAMER : Second generation biofuels : high-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenergy research*, 1(1):20–43, 2008.
- [104] Fabrizio DI CAPRIO, Pietro ALTIMARI, Gaetano IAQUANIELLO, Luigi TORO et Francesca PAGNANELLI : Heterotrophic cultivation of t. obliquus under non-axenic conditions by uncoupled supply of nitrogen and glucose. *Biochemical Engineering Journal*, 145:127–136, 2019.
- [105] Pedro N LEÃO, Vitor RAMOS, Micaela VALE, João P MACHADO et Vitor M VASCONCELOS : Microbial community changes elicited by exposure to cyanobacterial allelochemicals. *Microbial ecology*, 63(1):85–95, 2012.
- [106] David U HOOPER, FS CHAPIN III, JJ EWEL, Andrew HECTOR, Pablo INCHAUSTI, Sandra LAVOREL, John Hartley LAWTON, DM LODGE, Michel LOREAU, Shahid NAEEM *et al.* : Effects of biodiversity on ecosystem functioning : a consensus of current knowledge. *Ecological monographs*, 75(1):3–35, 2005.

- [107] Bart VANELSLANDER, Aaike DE WEVER, Nicolas VAN OOSTENDE, Pattaratjit KAEWNU-RATCHADASORN, Pieter VANORMELINGEN, Frederik HENDRICKX, Koen SABBE et Wim VY-VERMAN : Complementarity effects drive positive diversity effects on biomass production in experimental benthic diatom biofilms. *Journal of Ecology*, 97(5):1075–1082, 2009.
- [108] John J STACHOWICZ : Mutualism, facilitation, and the structure of ecological communities : positive interactions play a critical, but underappreciated, role in ecological communities by reducing physical or biotic stresses in existing habitats and by creating new habitats on which many species depend. *Bioscience*, 51(3):235–246, 2001.
- [109] John F BRUNO, John J STACHOWICZ et Mark D BERTNESS : Inclusion of facilitation into ecological theory. *Trends in Ecology & Evolution*, 18(3):119–125, 2003.
- [110] Jason D FRIDLEY : The influence of species diversity on ecosystem productivity : how, where, and why ? *Oikos*, 93(3):514–526, 2001.
- [111] Bradley J CARDINALE, Diane S SRIVASTAVA, J Emmett DUFFY, Justin P WRIGHT, Amy L DOWNING, Mahesh SANKARAN et Claire JOUSEAU : Effects of biodiversity on the functioning of trophic groups and ecosystems. *Nature*, 443(7114):989–992, 2006.
- [112] Kevin GROSS, Bradley J CARDINALE, Jeremy W FOX, Andrew GONZALEZ, Michel LOREAU, H WAYNE POLLEY, Peter B REICH et Jasper van RUIJVEN : Species richness and the temporal stability of biomass production : a new analysis of recent biodiversity experiments. *The American Naturalist*, 183(1):1–12, 2014.
- [113] Stephan BEHL, Anne DONVAL et Herwig STIBOR : The relative importance of species diversity and functional group diversity on carbon uptake in phytoplankton communities. *Limnology and Oceanography*, 56(2):683–694, 2011.
- [114] Robert PTACNIK, Angelo G SOLIMINI, Tom ANDERSEN, Timo TAMMINEN, Pål BRETTUM, Liisa LEPISTÖ, Eva WILLÉN et Seppo REKOLAINEN : Diversity predicts stability and resource use efficiency in natural phytoplankton communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(13):5134–5138, 2008.
- [115] Bradley J CARDINALE : Biodiversity improves water quality through niche partitioning. *Nature*, 472(7341):86, 2011.
- [116] Edna GRANÉLI, Per CARLSSON et Catherine LEGRAND : The role of c, n and p in dissolved and particulate organic matter as a nutrient source for phytoplankton growth, including toxic species. *Aquatic Ecology*, 33(1):17–27, 1999.
- [117] Giorgos MARKOU, Dries VANDAMME et Koenraad MUYLAERT : Microalgal and cyanobacterial cultivation : the supply of nutrients. *Water research*, 65:186–202, 2014.

- [118] Shao-Peng LI, Jin-Tian LI, Jia-Liang KUANG, Hong-Nan DUAN, Yi ZENG et Wen-Sheng SHU : Effects of species richness on cadmium removal efficiencies of algal microcosms. *Journal of Applied Ecology*, 49(1):261–267, 2012.
- [119] Senthil CHINNASAMY, Ashish BHATNAGAR, Ronald CLAXTON et KC DAS : 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, 2010.
- [120] Sanjay Kumar DUBEY, Jaishree DUBEY, Sandeep MEHRA, Pradeep TIWARI et AJ BISHWAS : Potential use of cyanobacterial species in bioremediation of industrial effluents. *African journal of Biotechnology*, 10(7):1125–1132, 2011.
- [121] S Venkata MOHAN, M Prathima DEVI, G MOHANAKRISHNA, N AMARNATH, M Lenin BABU et PN SARMA : Potential of mixed microalgae to harness biodiesel from ecological water-bodies with simultaneous treatment. *Bioresource technology*, 102(2):1109–1117, 2011.
- [122] S HENA, S FATIMAH et S TABASSUM : Cultivation of algae consortium in a dairy farm wastewater for biodiesel production. *Water Resources and Industry*, 10:1–14, 2015.
- [123] Alina A CORCORAN et Wiebke J BOEING : Biodiversity increases the productivity and stability of phytoplankton communities. *PLoS One*, 7(11):e49397, 2012.
- [124] Yanyan SU, Artur MENNERICH et Brigitte URBAN : Coupled nutrient removal and biomass production with mixed algal culture : impact of biotic and abiotic factors. *Bioresource Technology*, 118:469–476, 2012.
- [125] Judita KOREIVIENĖ, Robertas VALČIUKAS, Jūratė KAROSIENĖ et Pranas BALTRĖNAS : Testing of chlorella/scenedesmus microalgae consortia for remediation of wastewater, co2 mitigation and algae biomass feasibility for lipid production. *Journal of Environmental Engineering and Landscape Management*, 22(2):105–114, 2014.
- [126] Jonathan B SHURIN, Shovon MANDAL et Rachel L ABBOTT : Trait diversity enhances yield in algal biofuel assemblages. *Journal of applied ecology*, 51(3):603–611, 2014.
- [127] Fatima Zahra MENNA, Zouhayr ARBIB et José Antonio PERALES : Urban wastewater treatment by seven species of microalgae and an algal bloom : biomass production, n and p removal kinetics and harvestability. *Water research*, 83:42–51, 2015.
- [128] Ana L GONÇALVES, José CM PIRES et Manuel SIMÕES : Biotechnological potential of synechocystis salina co-cultures with selected microalgae and cyanobacteria : Nutrients removal, biomass and lipid production. *Bioresource technology*, 200:279–286, 2016.
- [129] Daan J GERLA, Wolf M MOOIJ et Jef HUISMAN : Photoinhibition and the assembly of light-

limited phytoplankton communities. *Oikos*, 120(3):359–368, 2011.

- [130] Maria STOCKENREITER, Florian HAUPT, Anne-Kathrin GRABER, Jukka SEPPÄLÄ, Kristian SPILLING, Timo TAMMINEN et Herwig STIBOR : Functional group richness : implications of biodiversity for light use and lipid yield in microalgae. *Journal of phycology*, 49(5):838–847, 2013.
- [131] John TO KIRK : *Light and photosynthesis in aquatic ecosystems*. Cambridge university press, 1994.
- [132] Paul G FALKOWSKI, Miriam E KATZ, Andrew H KNOLL, Antonietta QUIGG, John A RAVEN, Oscar SCHOFIELD et FJR TAYLOR : The evolution of modern eukaryotic phytoplankton. *science*, 305(5682):354–360, 2004.
- [133] Shuo YAO, Shuxia LYU, Yingfeng AN, Jingquan LU, Claes GJERMENSEN et Andreas SCHRAMM : Microalgae–bacteria symbiosis in microalgal growth and biofuel production : a review. *Journal of applied microbiology*, 126(2):359–368, 2019.
- [134] Melanie KAEBERNICK et Brett A NEILAN : Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. *FEMS microbiology ecology*, 35(1):1–9, 2001.
- [135] Eric FOUILLAND : Biodiversity as a tool for waste phycoremediation and biomass production. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 11(1):1–4, 2012.
- [136] Byung-Hyuk KIM, Rishiram RAMANAN, Dae-Hyun CHO, Hee-Mock OH et Hee-Sik KIM : Role of rhizobium, a plant growth promoting bacterium, in enhancing algal biomass through mutualistic interaction. *Biomass and Bioenergy*, 69:95–105, 2014.
- [137] Matthew B COOPER et Alison G SMITH : Exploring mutualistic interactions between microalgae and bacteria in the omics age. *Current Opinion in Plant Biology*, 26:147–153, 2015.
- [138] Giovanni Antonio LUTZU et Dunford N TURGUT : Interactions of microalgae and other microorganisms for enhanced production of high-value compounds. *Front Biosci*, 23:1487–1504, 2018.
- [139] J Jeffrey MORRIS, Robin KIRKEGAARD, Martin J SZUL, Zackary I JOHNSON et Erik R ZINSER : Facilitation of robust growth of prochlorococcus colonies and dilute liquid cultures by “helper” heterotrophic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(14):4530–4534, 2008.
- [140] Per R JONSSON, Henrik PAVIA et Gunilla TOTH : Formation of harmful algal blooms cannot be explained by allelopathic interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(27):11177–11182, 2009.
- [141] Elena KAZAMIA, Hjördis CZESNICK, Thi Thanh Van NGUYEN, Martin Tom CROFT, Emma

SHERWOOD, Severin SASSO, Sarah James HODSON, Martin James WARREN et Alison Gail SMITH : Mutualistic interactions between vitamin b12-dependent algae and heterotrophic bacteria exhibit regulation. *Environmental microbiology*, 14(6):1466–1476, 2012.

- [142] Martin T CROFT, Andrew D LAWRENCE, Evelyne RAUX-DEERY, Martin J WARREN et Alison G SMITH : Algae acquire vitamin b 12 through a symbiotic relationship with bacteria. *Nature*, 438(7064):90–93, 2005.
- [143] Bryndan P DURHAM, Shalabh SHARMA, Haiwei LUO, Christa B SMITH, Shady A AMIN, Sara J BENDER, Stephen P DEARTH, Benjamin AS VAN MOOY, Shawn R CAMPAGNA, Elizabeth B KUJAWINSKI *et al.* : Cryptic carbon and sulfur cycling between surface ocean plankton. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(2):453–457, 2015.
- [144] Shady A AMIN, David H GREEN, Mark C HART, Frithjof C KÜPPER, William G SUNDA et Carl J CARRANO : Photolysis of iron–siderophore chelates promotes bacterial–algal mutualism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(40):17071–17076, 2009.
- [145] Luz E DE-BASHAN, Juan-Pablo HERNANDEZ, Taylor MOREY et Yoav BASHAN : Microalgae growth-promoting bacteria as “helpers” for microalgae : a novel approach for removing ammonium and phosphorus from municipal wastewater. *Water Research*, 38(2):466–474, 2004.
- [146] Franca GUERRINI, Annalisa MAZZOTTI, Laurita BONI et Rossella PISTOCCHI : Bacterial-algal interactions in polysaccharide production. *Aquatic Microbial Ecology*, 15(3):247–253, 1998.
- [147] Juan Luis FUENTES, Inés GARBAYO, María CUARESMA, Zaida MONTERO, Manuel González-del VALLE et Carlos VÍLCHEZ : Impact of microalgae-bacteria interactions on the production of algal biomass and associated compounds. *Marine drugs*, 14(5):100, 2016.
- [148] Ian JOINT, Peter HENRIKSEN, Gro Anita FONNES, David BOURNE, T Frede THINGSTAD et Bo RIEMANN : Competition for inorganic nutrients between phytoplankton and bacterioplankton in nutrient manipulated mesocosms. *Aquatic Microbial Ecology*, 29(2):145–159, 2002.
- [149] Aigars LAVRINOVIČS et Tālis JUHNA : Review on challenges and limitations for algae-based wastewater treatment. *Construction Science*, 20(1):17–25, 2017.
- [150] F AZAM, T FENCHEL, JG FIELD, JS GREY, LA MEYER-REIL et F THINGSTAD : The ecological role of water-column microbes. *Mar. ecol. Prog. ser.*, 10:257–263, 1983.
- [151] G BRATBAK et TF THINGSTAD : Phytoplankton-bacteria interactions : an apparent paradox ? analysis of a model system with both competition and commensalism. *Marine ecology progress series. Oldendorf*, 25(1):23–30, 1985.
- [152] James P GROVER : Resource competition and community structure in aquatic micro-

organisms : experimental studies of algae and bacteria along a gradient of organic carbon to inorganic phosphorus supply. *Journal of Plankton Research*, 22(8):1591–1610, 2000.

- [153] Corina PD BRUSSAARD et Roel RIEGMAN : Influence of bacteria on phytoplankton cell mortality with phosphorus or nitrogen as the algal-growth-limiting nutrient. *Aquatic Microbial Ecology*, 14(3):271–280, 1998.
- [154] Yasuaki AOTA et Hisao NAKAJIMA : Mutualistic relationships between phytoplankton and bacteria caused by carbon excretion from phytoplankton. *Ecological research*, 16(2):289–299, 2001.
- [155] Olivier BERNARD, Francis MAIRET et Benoît CHACHUAT : Modelling of microalgae culture systems with applications to control and optimization. *In Microalgae Biotechnology*, pages 59–87. Springer, 2015.
- [156] Shu ZHANG, Nancy MERINO, Akihiro OKAMOTO et Phillip GEDALANGA : Interkingdom microbial consortia mechanisms to guide biotechnological applications. *Microbial biotechnology*, 11(5):833–847, 2018.
- [157] George EP BOX et Norman R DRAPER : *Empirical model-building and response surfaces*. John Wiley & Sons, 1987.
- [158] Edward A CODLING et Alex J DUMBRELL : Mathematical and theoretical ecology : linking models with ecological processes, 2012.
- [159] G BASTIN et D DOCHAIN : On-line estimation and adaptive control of bioreactors. *Analytica Chimica Acta*, 243, 1991.
- [160] William J OSWALD et Claence G GOLUEKE : Biological transformation of solar energy. *In Advances in applied microbiology*, volume 2, pages 223–262. Elsevier, 1960.
- [161] Lukas R DAHLIN, Stefanie VAN WYCHEN, Henri G GERKEN, John MCGOWEN, Philip T PIENKOS, Matthew C POSEWITZ et Michael T GUARNIERI : Down-selection and outdoor evaluation of novel, halotolerant algal strains for winter cultivation. *Frontiers in plant science*, 9:1513, 2018.
- [162] Seung-Woo JO, Jeong-Mi DO, Ho NA, Ji Won HONG, Il-Sup KIM et Ho-Sung YOON : Assessment of biomass potentials of microalgal communities in open pond raceways using mass cultivation. *PeerJ*, 8:e9418, 2020.
- [163] Mark E HUNTLEY et Donald G REDALJE : Co 2 mitigation and renewable oil from photosynthetic microbes : a new appraisal. *Mitigation and adaptation strategies for global change*, 12(4):573–608, 2007.
- [164] John R BENEMANN : Open ponds and closed photobioreactors—comparative economics. *In*

5th Annual World Congress on Industrial Biotechnology and Bioprocessing, Chicago, Illinois, USA, 2008.

- [165] D DOCHAIN : Automatic control of bioprocesses. usa : Editorial john wiley & sons, 2008.
- [166] Quentin BÉCHET, Andy SHILTON et Benoît GUIEYSSE : Modeling the effects of light and temperature on algae growth : state of the art and critical assessment for productivity prediction during outdoor cultivation. *Biotechnology advances*, 31(8):1648–1663, 2013.
- [167] M HUESEMANN, B CROWE, Peter WALLER, A CHAVIS, S HOBBS, S EDMUNDSON et M WIGMOSTA : A validated model to predict microalgae growth in outdoor pond cultures subjected to fluctuating light intensities and water temperatures. *Algal Research*, 13:195–206, 2016.
- [168] Jason QUINN, Lenneke DE WINTER et Thomas BRADLEY : Microalgae bulk growth model with application to industrial scale systems. *Bioresource technology*, 102(8):5083–5092, 2011.
- [169] J MONOD *et al.* : Thetechnique of continuous culture. *Ann. Inst. Pasteur*, 79:390–410, 1950.
- [170] Aaron NOVICK et Leo SZILARD : Experiments with the chemostat on spontaneous mutations of bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 36(12):708, 1950.
- [171] Hal L SMITH et Paul WALTMAN : *The theory of the chemostat : dynamics of microbial competition*, volume 13. Cambridge university press, 1995.
- [172] Jérôme HARMAND, Claude LOBRY, Alain RAPAPORT et Tewfik SARI : *Le chémostat : Théorie mathématique de la culture continue de micro-organismes*, volume 1. ISTE Group, 2017.
- [173] Sze-Bi HSU : A competition model for a seasonally fluctuating nutrient. *Journal of Mathematical Biology*, 9(2):115–132, 1980.
- [174] Gregory STEPHANOPOULOS, AG FREDERICKSON et Rutherford ARIS : The growth of competing microbial populations in a cstr with periodically varying inputs. *AIChE Journal*, 25(5):863–872, 1979.
- [175] Elena LITCHMAN : Competition and coexistence of phytoplankton under fluctuating light : experiments with two cyanobacteria. *Aquatic Microbial Ecology*, 31(3):241–248, 2003.
- [176] Claude LOBRY et Jérôme HARMAND : A new hypothesis to explain the coexistence of n species in the presence of a single resource. *Comptes rendus biologies*, 329(1):40–46, 2006.
- [177] Subrata SARKER, Ulrike FEUDEL, Cédric L MEUNIER, Peter LEMKE, Partha S DUTTA et Karen H WILTSHIRE : To share or not to share ? phytoplankton species coexistence puzzle in a competition model incorporating multiple resource-limitation and synthesizing unit concepts.

Ecological Modelling, 383:150–159, 2018.

- [178] Nicolai S PANIKOV : *Microbial growth kinetics*. Springer Science & Business Media, 1995.
- [179] Eunyoung LEE, Mehregan JALALIZADEH et Qiong ZHANG : Growth kinetic models for microalgae cultivation : a review. *Algal Research*, 12:497–512, 2015.
- [180] Pooya DARVEHEI, Parisa A BAHRI et Navid R MOHEIMANI : Model development for the growth of microalgae : a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 97:233–258, 2018.
- [181] Jacques MONOD : *Recherches sur la croissance des cultures bacteriennes*. Thèse de doctorat, 1942.
- [182] DE CONTOIS : Kinetics of bacterial growth : relationship between population density and specific growth rate of continuous cultures. *Microbiology*, 21(1):40–50, 1959.
- [183] Emna KRICHEN, Jérôme HARMAND, Michel TORRIJOS, Jean-Jacques GODON, Nicolas BERNET et Alain RAPAPORT : High biomass density promotes density-dependent microbial growth rate. *Biochemical Engineering Journal*, 130:66–75, 2018.
- [184] Paul J HARRISON et John A BERGES : Marine culture media. *Algal culturing techniques*, pages 21–34, 2005.
- [185] Caterina PANZECA, Antonio TOVAR-SANCHEZ, Susana AGUSTÍ, Isabel RECHE, Carlos M DUARTE, Gordon T TAYLOR et Sergio A SAÑUDO-WILHELMY : B vitamins as regulators of phytoplankton dynamics. *Eos, Transactions American Geophysical Union*, 87(52):593–596, 2006.
- [186] Jordan A FACEY, Simon C APTE et Simon M MITROVIC : A review of the effect of trace metals on freshwater cyanobacterial growth and toxin production. *Toxins*, 11(11):643, 2019.
- [187] Alfred C REDFIELD : The influence of organisms on the composition of seawater. *The sea*, 2:26–77, 1963.
- [188] Linda M SICKO-GOAD, Claire L SCHELSKE et Eugene F STOERMER : Estimation of intracellular carbon and silica content of diatoms from natural assemblages using morphometric techniques 1. *Limnology and Oceanography*, 29(6):1170–1178, 1984.
- [189] Ilana BERMAN-FRANK et Zvy DUBINSKY : Balanced growth in aquatic plants : Myth or reality ? phytoplankton use the imbalance between carbon assimilation and biomass production to their strategic advantage. *Bioscience*, 49(1):29–37, 1999.
- [190] PG FALKOWSKI et JA RAVEN : Aquatic photosynthesis blackwell science. *Malden, Massachusetts*, 1997.

- [191] Ana P CARVALHO, Luís A MEIRELES et F Xavier MALCATA : Microalgal reactors : a review of enclosed system designs and performances. *Biotechnology progress*, 22(6):1490–1506, 2006.
- [192] PG FALKOWSKI et JA RAVEN : Photosynthesis and primary production in nature. *Aquatic photosynthesis 2nd ed Princeton University Press, Princeton*, 2007.
- [193] Qing-xue KONG, Ling LI, Blanca MARTINEZ, Paul CHEN et Roger RUAN : Culture of microalgae *chlamydomonas reinhardtii* in wastewater for biomass feedstock production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160(1):9, 2010.
- [194] Gaël BOUGARAN, Olivier BERNARD et Antoine SCIANDRA : Modeling continuous cultures of microalgae colimited by nitrogen and phosphorus. *Journal of theoretical biology*, 265(3):443–454, 2010.
- [195] Octavio PEREZ-GARCIA, Froylan ME ESCALANTE, Luz E de BASHAN et Yoav BASHAN : Heterotrophic cultures of microalgae : metabolism and potential products. *Water research*, 45(1):11–36, 2011.
- [196] PJ SYRETT et JW LEFTLEY : Nitrate and urea assimilation by algae. *Perspectives in experimental biology*, 2:221–234, 2016.
- [197] Marie CHARPIN et Jean DEVAUX : Les principales voies enzymatiques de l'assimilation de l'azote chez les microalgues eucaryotes. *L'Année Biologique*, 37(1):1–9, 1998.
- [198] Ana L GONÇALVES, José CM PIRES et Manuel SIMÕES : A review on the use of microalgal consortia for wastewater treatment. *Algal Research*, 24:403–415, 2017.
- [199] WcJ PAYNE : Reduction of nitrogenous oxides by microorganisms. *Bacteriological reviews*, 37(4):409, 1973.
- [200] Czarena L CROFCHECK, Michael MONSTROSS, E XINYI, Aubrey P SHEA, Mark CROCKER et Rodney ANDREWS : Influence of media composition on the growth rate of *chlorella vulgaris* and *scenedesmus acutus* utilized for co2 mitigation. In *2012 Dallas, Texas, July 29-August 1, 2012*, page 1. American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2012.
- [201] Giorgos MARKOU et Dimitris GEORGAKAKIS : Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters : a review. *Applied Energy*, 88(10):3389–3401, 2011.
- [202] ALASDAIR H NEILSON et TOMMY LARSSON : The utilization of organic nitrogen for growth of algae : physiological aspects. *Physiologia Plantarum*, 48(4):542–553, 1980.
- [203] Yves COLLOS et Paul J HARRISON : Acclimation and toxicity of high ammonium concentrations to unicellular algae. *Marine Pollution Bulletin*, 80(1-2):8–23, 2014.

- [204] Luveshan RAMANNA, Abhishek GULDHE, Ismail RAWAT et Faizal BUX : The optimization of biomass and lipid yields of *Chlorella sorokiniana* when using wastewater supplemented with different nitrogen sources. *Bioresource technology*, 168:127–135, 2014.
- [205] Amos RICHMOND : Principles for attaining maximal microalgal productivity in photobioreactors : an overview. In *Asian Pacific Phycology in the 21st Century : Prospects and Challenges*, pages 33–37. Springer, 2004.
- [206] Richard GEIDER et Julie LA ROCHE : Redfield revisited : variability of c : N : P in marine microalgae and its biochemical basis. *European Journal of Phycology*, 37(1):1–17, 2002.
- [207] Liliana DELGADILLO-MIRQUEZ, Filipa LOPES, Behnam TAIDI et Dominique PAREAU : Nitrogen and phosphate removal from wastewater with a mixed microalgae and bacteria culture. *Biotechnology Reports*, 11:18–26, 2016.
- [208] Bei WANG, Yanqun LI, Nan WU et Christopher Q LAN : CO₂ bio-mitigation using microalgae. *Applied microbiology and biotechnology*, 79(5):707–718, 2008.
- [209] Michaël R DROOP : Vitamin B₁₂ and marine ecology. iv. the kinetics of uptake, growth and inhibition in *Monochrysis lutheri*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 48(3):689–733, 1968.
- [210] Olivier BERNARD : Hurdles and challenges for modelling and control of microalgae for CO₂ mitigation and biofuel production. *Journal of Process Control*, 21(10):1378–1389, 2011.
- [211] Michaël R DROOP : 25 years of algal growth kinetics a personal view. *Botanica marina*, 26(3):99–112, 1983.
- [212] James P GROVER : Dynamics of competition among microalgae in variable environments : experimental tests of alternative models. *Oikos*, pages 231–243, 1991.
- [213] Ulrich SOMMER : A comparison of the Droop and the Monod models of nutrient limited growth applied to natural populations of phytoplankton. *Functional Ecology*, pages 535–544, 1991.
- [214] Olivier BERNARD et Jean-Luc GOUZÉ : Transient behavior of biological loop models with application to the Droop model. *Mathematical Biosciences*, 127(1):19–43, 1995.
- [215] Ivor R ELRIFI et David H TURPIN : Steady-state luxury consumption and the concept of optimum nutrient ratios : A study with phosphate and nitrate limited *Selenastrum minutum* (Chlorophyta) 1. *Journal of Phycology*, 21(4):592–602, 1985.
- [216] Heikki HAARIO, Leonid KALACHEV et Marko LAINE : Reduced models of algae growth. *Bulletin of Mathematical Biology*, 71(7):1626–1648, 2009.
- [217] Li XIN, Hu HONG-YING, Gan KE et Sun YING-XUE : Effects of different nitrogen and phos-

phorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *scenedesmus* sp. *Bioresource technology*, 101(14):5494–5500, 2010.

- [218] Eunyoung LEE et Qiong ZHANG : Integrated co-limitation kinetic model for microalgae growth in anaerobically digested municipal sludge centrate. *Algal research*, 18:15–24, 2016.
- [219] Joel C GOLDMAN, William J OSWALD et David JENKINS : The kinetics of inorganic carbon limited algal growth. *Journal (Water Pollution Control Federation)*, pages 554–574, 1974.
- [220] John T NOVAK et David E BRUNE : Inorganic carbon limited growth kinetics of some freshwater algae. *Water research*, 19(2):215–225, 1985.
- [221] HT HSUEH, WJ LI, HH CHEN et Hsin CHU : Carbon bio-fixation by photosynthesis of *thermosynechococcus* sp. cl-1 and *nannochloropsis oculata*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B : Biology*, 95(1):33–39, 2009.
- [222] Sebnem ASLAN et Ilgi Karapinar KAPDAN : Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. *Ecological engineering*, 28(1):64–70, 2006.
- [223] John F ANDREWS : A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates. *Biotechnology and Bioengineering*, 10(6):707–723, 1968.
- [224] MJ MOYA, ML SÁNCHEZ-GUARDAMINO, A VILAVELLA et E BARBERA : Growth of *haematococcus lacustris* : A contribution to kinetic modelling. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology : International Research in Process, Environmental AND Clean Technology*, 68(3):303–309, 1997.
- [225] Norihide KURANO et Shigetoh MIYACHI : Selection of microalgal growth model for describing specific growth rate-light response using extended information criterion. *Journal of bioscience and bioengineering*, 100(4):403–408, 2005.
- [226] Victor H EDWARDS : The influence of high substrate concentrations on microbial kinetics. *Biotechnology and Bioengineering*, 12(5):679–712, 1970.
- [227] Hisbullah YUNARDI, Hisbullah HISBULLAH, Wahyu RINALDI et Umi FATHANAH : Development and validation of a modified Contois kinetics model for microalgae *Chlorella kessleri*. In *International Graduate Conference on Innovation, Creativity, Digital and TEchnopreneurship for Sustainable Development*, 2019.
- [228] E Molina GRIMA, JM Fernández SEVILLA, JA Sánchez PÉREZ et F Garcia CAMACHO : A study on simultaneous photolimitation and photoinhibition in dense microalgal cultures taking into account incident and averaged irradiances. *Journal of Biotechnology*, 45(1):59–69, 1996.
- [229] H TAMIYA, T IWAMURA, K SHIBATA, E HASE et T NIHEI : Correlation between photosynthesis and light-independent metabolism in the growth of *Chlorella*. *Biochimica et biophysica*

acta, 12(1-2):23–40, 1953.

- [230] J-F CORNET, CG DUSSAP, J-B GROS, C BINOIS et C LASSEUR : A simplified monodimensional approach for modeling coupling between radiant light transfer and growth kinetics in photobioreactors. *Chemical Engineering Science*, 50(9):1489–1500, 1995.
- [231] Divya SASI, Pranabendu MITRA, Andrea VIGUERAS et Gordon A HILL : Growth kinetics and lipid production using *chlorella vulgaris* in a circulating loop photobioreactor. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 86(6):875–880, 2011.
- [232] Shuichi AIBA : Growth kinetics of photosynthetic microorganisms. In *Microbial reactions*, pages 85–156. Springer, 1982.
- [233] Anne OJALA : Effects of temperature and irradiance on the growth of two freshwater photosynthetic cryptophytes 1. *Journal of phycology*, 29(3):278–284, 1993.
- [234] JH STEELE : Microbial kinetics and dynamics in chemical reactor theory. In *Chemical reactor theory*, pages 405–483. Englewood Cliffs, NJ, 1977.
- [235] HY LEE, LE ERICKSON et SS YANG : Kinetics and bioenergetics of light-limited photoautotrophic growth of *spirulina platensis*. *Biotechnology and bioengineering*, 29(7):832–843, 1987.
- [236] Sergio BORDEL, Benoît GUIEYSSE et Raul MUNOZ : Mechanistic model for the reclamation of industrial wastewaters using algal- bacterial photobioreactors. *Environmental science & technology*, 43(9):3200–3207, 2009.
- [237] James C OGBONNA, Hirokazu YADA et Hideo TANAKA : Light supply coefficient : a new engineering parameter for photobioreactor design. *Journal of fermentation and bioengineering*, 80(4):369–376, 1995.
- [238] Asterio Sánchez MIRÓN, Marie-Carmen Cerón GARCIA, Francisco Garcia CAMACHO, Emilio Molina GRIMA et Yusuf CHISTI : Growth and biochemical characterization of microalgal biomass produced in bubble column and airlift photobioreactors : studies in fed-batch culture. *Enzyme and microbial technology*, 31(7):1015–1023, 2002.
- [239] E Molina GRIMA, F García CAMACHO, JA Sanchez PEREZ, JM Fernandez SEVILLA, FG Ación FERNÁNDEZ et A Contreras GOMEZ : A mathematical model of microalgal growth in light-limited chemostat culture. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology : International Research in Process, Environmental AND Clean Technology*, 61(2):167–173, 1994.
- [240] Jef HUISMAN, Hans CP MATTHIJS, Petra M VISSER, Hans BALKE, Corrien AM SIGON, Jutta PASSARGE, Franz J WEISSING et Luuc R MUR : Principles of the light-limited chemostat : theory and ecological applications. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81(1-4):117–133, 2002.

- [241] W Edwin A KARDINAAL, Linda TONK, Ingmar JANSE, Suzanne HOL, Pieter SLOT, Jef HUISMAN et Petra M VISSER : Competition for light between toxic and nontoxic strains of the harmful cyanobacterium microcystis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(9):2939–2946, 2007.
- [242] Frédéric GROGNARD, Andrei R AKHMETZHANOV et Olivier BERNARD : Optimal strategies for biomass productivity maximization in a photobioreactor using natural light. *Automatica*, 50(2):359–368, 2014.
- [243] PG FALKOWSKI et CD WIRICK : A simulation model of the effects of vertical mixing on primary productivity. *Marine Biology*, 65(1):69–75, 1981.
- [244] F GARCÍA-CAMACHO, A SÁNCHEZ-MIRÓN, E MOLINA-GRIMA, F CAMACHO-RUBIO et JC MERCHUCK : A mechanistic model of photosynthesis in microalgae including photoacclimation dynamics. *Journal of theoretical biology*, 304:1–15, 2012.
- [245] William KW LI : Temperature adaptation in phytoplankton : cellular and photosynthetic characteristics. In *Primary productivity in the sea*, pages 259–279. Springer, 1980.
- [246] JM SANDNES, T KÄLLQVIST, D WENNER et H R GISLERØD : Combined influence of light and temperature on growth rates of nannochloropsis oceanica : linking cellular responses to large-scale biomass production. *Journal of Applied Phycology*, 17(6):515–525, 2005.
- [247] Erich KESSLER : Upper limits of temperature for growth in chlorella (chlorophyceae). *Plant systematics and evolution*, 151(1-2):67–71, 1985.
- [248] Li XIN, Hu HONG-YING et Zhang YU-PING : Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga scenedesmus sp. under different cultivation temperature. *Bioresource technology*, 102(3):3098–3102, 2011.
- [249] JF SÁNCHEZ, JM FERNÁNDEZ-SEVILLA, FG ACIÉN, MC CERÓN, J PÉREZ-PARRA et E MOLINA-GRIMA : Biomass and lutein productivity of scenedesmus almeriensis : influence of irradiance, dilution rate and temperature. *Applied microbiology and biotechnology*, 79(5):719–729, 2008.
- [250] S CANOVAS, B PICOT, C CASELLAS, H ZULKIFI, A DUBOIS et J BONToux : Seasonal development of phytoplankton and zooplankton in a high-rate algal pond. *Water Science and Technology*, 33(7):199, 1996.
- [251] Gunnel AHLGREN : Temperature functions in biology and their application to algal growth constants. *Oikos*, pages 177–190, 1987.
- [252] DA RATKOWSKY, RK LOWRY, TA McMEEKIN, AN STOKES et RE217594 CHANDLER : Model for bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range. *Journal of bacteriology*, 154(3):1222–1226, 1983.

- [253] Per Juel HANSEN : Effect of high ph on the growth and survival of marine phytoplankton : implications for species succession. *Aquatic Microbial Ecology*, 28(3):279–288, 2002.
- [254] Xue-Wu ZHANG, Feng CHEN et Michael R JOHNS : Kinetic models for heterotrophic growth of chlamydomonas reinhardtii in batch and fed-batch cultures. *Process Biochemistry*, 35(3-4):385–389, 1999.
- [255] Rayen FILALI, Sihem TEBBANI, Didier DUMUR, Arsène ISAMBERT, Dominique PAREAU et Filipa LOPES : Growth modeling of the green microalga chlorella vulgaris in an air-lift photobioreactor. *IFAC Proceedings Volumes*, 44(1):10603–10608, 2011.
- [256] George Adrian IFRIM, Marian BARBU, Emil CEANGA et Sergiu CARAMAN : Modeling and control of a multipurpose biotechnological plant. photobioreactor modeling. *In 2015 19th International Conference on System Theory, Control and Computing (ICSTCC)*, pages 55–60. IEEE, 2015.
- [257] A RAPAPORT et J-L GOUZÉ : Practical observers for uncertain affine output injection systems. *In 1999 European Control Conference (ECC)*, pages 1505–1510. IEEE, 1999.
- [258] Jean-Luc GOUZÉ, Alain RAPAPORT et Mohamed Zakaria HADJ-SADOK : Interval observers for uncertain biological systems. *Ecological modelling*, 133(1-2):45–56, 2000.
- [259] Wolfgang WALTER : Differential inequalities and maximum principles : theory, new methods and applications. *Nonlinear Analysis : Theory, Methods & Applications*, 30(8):4695–4711, 1997.
- [260] A RAPAPORT et J HARMAND : Robust regulation of a class of partially observed nonlinear continuous bioreactors. *Journal of Process Control*, 12(2):291–302, 2002.
- [261] V ALCARAZ-GONZÁLEZ, J HARMAND, A RAPAPORT, JP STEYER, V GONZALEZ-ALVAREZ et C PELAYO-ORTIZ : Software sensors for highly uncertain wwtps : a new approach based on interval observers. *Water research*, 36(10):2515–2524, 2002.
- [262] L LIN, GYS CHAN, BL JIANG et CY LAN : Use of ammoniacal nitrogen tolerant microalgae in landfill leachate treatment. *Waste management*, 27(10):1376–1382, 2007.
- [263] Liang WANG, Min MIN, Yecong LI, Paul CHEN, Yifeng CHEN, Yuhuan LIU, Yingkuan WANG et Roger RUAN : Cultivation of green algae chlorella sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant. *Applied biochemistry and biotechnology*, 162(4):1174–1186, 2010.
- [264] Anil PATEL, Suzelle BARRINGTON et Mark LEFSRUD : Microalgae for phosphorus removal and biomass production : a six species screen for dual-purpose organisms. *Gcb Bioenergy*, 4(5):485–495, 2012.

- [265] Edward W WILDE et John R BENEMANN : Bioremoval of heavy metals by the use of microalgae. *Biotechnology advances*, 11(4):781–812, 1993.
- [266] Hugo Virgilio PERALES-VELA, Julián Mario PENA-CASTRO et Rosa Olivia CANIZARES-VILLANUEVA : Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae. *Chemosphere*, 64(1):1–10, 2006.
- [267] Pandian PRABAKARAN et A David RAVINDRAN : Scenedesmus as a potential source of bio-diesel among selected microalgae. *Current Science*, pages 616–620, 2012.
- [268] SM MAYELI, S NANDINI et SSS SARMA : The efficacy of scenedesmus morphology as a defense mechanism against grazing by selected species of rotifers and cladocerans. *Aquatic Ecology*, 38(4):515–524, 2005.
- [269] Hassan K KHALIL et Jessy W GRIZZLE : *Nonlinear systems*, volume 3. Prentice hall Upper Saddle River, NJ, 2002.
- [270] Richard P BARBIERO, William F JAMES et John W BARKO : The effects of disturbance events on phytoplankton community structure in a small temperate reservoir. *Freshwater Biology*, 42(3):503–512, 1999.
- [271] Aleksandra LEWANDOWSKA et Ulrich SOMMER : Climate change and the spring bloom : a mesocosm study on the influence of light and temperature on phytoplankton and mesozooplankton. *Marine Ecology Progress Series*, 405:101–111, 2010.
- [272] A GAEDEKE et Ulrich SOMMER : The influence of the frequency of periodic disturbances on the maintenance of phytoplankton diversity. *Oecologia*, 71(1):25–28, 1986.
- [273] Tiina NÖGES, Peeter NÖGES et Reet LAUGASTE : Water level as the mediator between climate change and phytoplankton composition in a large shallow temperate lake. *Hydrobiologia*, 506(1-3):257–263, 2003.
- [274] James F ROBINSON et Jaime E DICKERSON : Does invasion sequence affect community structure? *Ecology*, 68(3):587–595, 1987.
- [275] Karl E HAVENS : Experimental perturbation of a freshwater plankton community : a test of hypotheses regarding the effects of stress. *Oikos*, pages 147–153, 1994.
- [276] Mathew A LEIBOLD : Biodiversity and nutrient enrichment in pond plankton communities. *Evolutionary Ecology Research*, 1(1):73–95, 1999.
- [277] Chandrasekharan Nair ANEESH, Ajit HARIDAS et Vattackatt Balakrishnan MANILAL : Role of nutrients input pattern on the growth dynamics of common freshwater microalgal community. *American Journal of Plant Sciences*, 6(15):2481, 2015.

- [278] R MARGALEF : Life-forms of phytoplankton as survival alternatives in an unstable environment. *Oceanol. Acta*, 1(4), 1978.
- [279] TJ SMAYDA : Phytoplankton species succession. *The Physiological Ecology of Phytoplakton.*-, pages 493–570, 1980.
- [280] Orlane ANNEVILLE, Sami SOUISSI, Frédéric IBANEZ, Vincent GINOT, Jean Claude DRUART et Nadine ANGELI : Temporal mapping of phytoplankton assemblages in lake geneva : annual and interannual changes in their patterns of succession. *Limnology and Oceanography*, 47(5): 1355–1366, 2002.
- [281] Colin S REYNOLDS : *Vegetation processes in the pelagic : a model for ecosystem theory*, volume 9. Ecology Institute Oldendorf, 1997.
- [282] Ronald E JOHNSON, Nancy C TUCHMAN et Christopher G PETERSON : Changes in the vertical microdistribution of diatoms within a developing periphyton mat. *Journal of the North American Benthological Society*, 16(3):503–519, 1997.
- [283] Joseph H CONNELL et Ralph O SLATYER : Mechanisms of succession in natural communities and their role in community stability and organization. *The American Naturalist*, 111(982): 1119–1144, 1977.
- [284] R Jan STEVENSON : Effects of current and conditions simulating autogenically changing microhabitats on benthic diatom immigration. *Ecology*, 64(6):1514–1524, 1983.
- [285] Stephen C ROEMER, Kyle D HOAGLAND et James R ROSOWSKI : Development of a fresh-water periphyton community as influenced by diatom mucilages. *Canadian Journal of Botany*, 62(9):1799–1813, 1984.
- [286] Manfred SCHLÜTER, Joost GROENEWEG et Carl J SOEDER : Impact of rotifer grazing on population dynamics of green microalgae in high-rate ponds. *Water Research*, 21(10):1293–1297, 1987.
- [287] AHARON ABELIOVICH et Yosef AZOV : Toxicity of ammonia to algae in sewage oxidation ponds. *Appl. Environ. Microbiol.*, 31(6):801–806, 1976.
- [288] Joel C GOLDMAN, Yossef AZOV, Carol B RILEY et Mark R DENNETT : The effect of pH in intensive microalgal cultures. i. biomass regulation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 57(1):1–13, 1982.
- [289] T KÄLLQVIST et A SVENSON : Assessment of ammonia toxicity in tests with the microalga, *nephroselmis pyriformis*, chlorophyta. *Water Research*, 37(3):477–484, 2003.
- [290] Jie WANG, Wei ZHOU, Hui CHEN, Jiao ZHAN, Chenliu HE et Qiang WANG : Ammonium nitrogen tolerant chlorella strain screening and its damaging effects on photosynthesis. *Frontiers*

in *Microbiology*, 9, 2018.

- [291] KV NATARAJAN : Toxicity of ammonia to marine diatoms. *Journal (Water Pollution Control Federation)*, pages R184–R190, 1970.
- [292] W ADMIRAAL : Tolerance of estuarine benthic diatoms to high concentrations of ammonia, nitrite ion, nitrate ion and orthophosphate. *Marine Biology*, 43(4):307–315, 1977.
- [293] A KONIG, HW PEARSON et Salomao Anselmo SILVA : Ammonia toxicity to algal growth in waste stabilization ponds. *Water Science and Technology*, 19(12):115–122, 1987.
- [294] NFY TAM et YS WONG : Effect of ammonia concentrations on growth of chlorella vulgaris and nitrogen removal from media. *Bioresource Technology*, 57(1):45–50, 1996.
- [295] M PRZYTOCKA-JUSIAK, A MLYNARCZYK, M KULESZA et R MYCIELSKI : Properties of chlorella vulgaris strain adapted to high concentration of ammonium nitrogen. *Acta Microbiologica Polonica*, 26(2):185–197, 1977.
- [296] Jongmin PARK, Hai-Feng JIN, Byung-Ran LIM, Ki-Young PARK et Kisay LEE : Ammonia removal from anaerobic digestion effluent of livestock waste using green alga scenedesmus sp. *Bioresource Technology*, 101(22):8649–8657, 2010.
- [297] Joseph C WEISSMAN, Raymond P GOEBEL et John R BENEMANN : Photobioreactor design : mixing, carbon utilization, and oxygen accumulation. *Biotechnology and Bioengineering*, 31(4):336–344, 1988.
- [298] Y AZOV et Joel C GOLDMAN : Free ammonia inhibition of algal photosynthesis in intensive cultures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 43(4):735–739, 1982.
- [299] C ROTATORE et B COLMAN : The active uptake of carbon dioxide by the unicellular green algae chlorella saccharophila and c. ellipsoidea. *Plant, Cell & Environment*, 14(4):371–375, 1991.
- [300] Geoffrey P HAYWOOD : Ammonia toxicity in teleost fishes : a review. *Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci.*, 1177:1–35, 1983.
- [301] James C OGBONNA, Hitoshi YOSHIKAWA et Hideo TANAKA : Treatment of high strength organic wastewater by a mixed culture of photosynthetic microorganisms. *Journal of Applied Phycology*, 12(3-5):277–284, 2000.
- [302] Kenneth EMERSON, Rosemarie C RUSSO, Richard E LUND et Robert V THURSTON : Aqueous ammonia equilibrium calculations : effect of ph and temperature. *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 32(12):2379–2383, 1975.
- [303] Ulrich SOMMER : Comparison between steady state and non-steady state competition : expe-

- riments with natural phytoplankton. *Limnology and Oceanography*, 30(2):335–346, 1985.
- [304] E Molina GRIMA, E-H BELARBI, FG Acién FERNÁNDEZ, A Robles MEDINA et Yusuf CHISTI : Recovery of microalgal biomass and metabolites : process options and economics. *Biotechnology Advances*, 20(7-8):491–515, 2003.
- [305] Asma AHMED, Nimmakayala JYOTHI et Adithya RAMESH : Improved ammonium removal from industrial wastewater through systematic adaptation of wild type chlorella pyrenoidosa. *Water Science and Technology*, 75(1):182–188, 2016.
- [306] JA ELLIOTT, CS REYNOLDS et AE IRISH : An investigation of dominance in phytoplankton using the protech model. *Freshwater Biology*, 46(1):99–108, 2001.
- [307] Colin S REYNOLDS : Environmental requirements and habitat preferences of phytoplankton : chance and certainty in species selection. *Botanica Marina*, 55(1):1–17, 2012.
- [308] J KOTAI : Instructions for preparation of modified nutrient solution z8 for algae. *Norwegian Institute for Water Research, Oslo*, 11(69):5, 1972.
- [309] Joseph SAMBROOK, Edward F FRITSCH, Tom MANIATIS *et al.* : *Molecular cloning : a laboratory manual*. Numéro Ed. 2. Cold spring harbor laboratory press, 1989.
- [310] Thomas PRÖSCHOLD, Birger MARIN, Uwe Gert SCHLÖSSER et Michael MELKONIAN : Molecular phylogeny and taxonomic revision of chlamydomonas (chlorophyta). i. emendation of chlamydomonas ehrenberg and chloromonas gobi, and description of oogamochlamys gen. nov. and lobochochlamys gen. nov. *Protist*, 152(4):265–300, 2001.
- [311] Alain AMINOT et Roger KÉROUEL : *Hydrologie des écosystèmes marins : paramètres et analyses*. Editions Quae, 2004.
- [312] Srikanth Reddy MEDIPALLY, Fatimah Md YUSOFF, Sanjoy BANERJEE et M SHARIFF : Microalgae as sustainable renewable energy feedstock for biofuel production. *BioMed research international*, 2015, 2015.
- [313] Violeta MAKAREVICIENE, Vaida ANDRULEVIČIŪTĖ, Virginija SKORUPSKAITĖ et Jūratė KASPEROVIČIENĖ : Cultivation of microalgae chlorella sp. and scenedesmus sp. as a potential biofuel feedstock. *Environmental Research, Engineering and Management*, 57(3):21–27, 2011.
- [314] Jayashree JENA, Manoranjan NAYAK, Himansu Sekhar PANDA, Nilotpala PRADHAN, Chandragiri SARIKA, Prasanna Ku PANDA, BVSK RAO, Rachapudi BN PRASAD et Lala Behari SUKLA : Microalgae of odisha coast as a potential source for biodiesel production. *World Environ*, 2(1):11–16, 2012.
- [315] Sabeela Beevi UMMALYMA, Dinabandhu SAHOO et Ashok PANDEY : Bioremediation and

biofuel production from chlorella sp. : A comprehensive review. *In Microalgae Biotechnology for Development of Biofuel and Wastewater Treatment*, pages 635–655. Springer, 2019.

- [316] Asha PARMAR, Niraj Kumar SINGH, Ashok PANDEY, Edgard GNANSOUNOU et Datta MADAMWAR : Cyanobacteria and microalgae : a positive prospect for biofuels. *Bioresource technology*, 102(22):10163–10172, 2011.
- [317] Ana P CARVALHO, Susana O SILVA, José M BAPTISTA et F Xavier MALCATA : Light requirements in microalgal photobioreactors : an overview of biophotonic aspects. *Applied microbiology and biotechnology*, 89(5):1275–1288, 2011.
- [318] Maryam AL-QASMI, Nitin RAUT, Sahar TALEBI, Sara AL-RAJHI et Tahir AL-BARWANI : A review of effect of light on microalgae growth. *In Proceedings of the world congress on engineering*, volume 1, pages 4–6, 2012.
- [319] Izabela KRZEMIŃSKA, Barbara PAWLIK-SKOWROŃSKA, Magdalena TRZCIŃSKA et Jerzy TYS : Influence of photoperiods on the growth rate and biomass productivity of green microalgae. *Bioprocess and biosystems engineering*, 37(4):735–741, 2014.
- [320] RJ GEIDER, HL MACINTYRE et TM KANA : Dynamic model of phytoplankton growth and acclimation : responses of the balanced growth rate and the chlorophyll a : carbon ratio to light, nutrient-limitation and temperature. *Marine Ecology Progress Series*, 148:187–200, 1997.
- [321] F Camacho RUBIO, F García CAMACHO, JM Fernández SEVILLA, Y CHISTI et E Molina GRIMA : A mechanistic model of photosynthesis in microalgae. *Biotechnology and bioengineering*, 81(4):459–473, 2003.
- [322] Philipp HARTMANN, Andreas NIKOLAOU, Benoît CHACHUAT et Olivier BERNARD : A dynamic model coupling photoacclimation and photoinhibition in microalgae. *In 2013 European Control Conference (ECC)*, pages 4178–4183. IEEE, 2013.
- [323] Andreas NIKOLAOU, Philipp HARTMANN, Antoine SCIANDRA, Benoît CHACHUAT et Olivier BERNARD : Dynamic coupling of photoacclimation and photoinhibition in a model of microalgae growth. *Journal of theoretical biology*, 390:61–72, 2016.
- [324] You-Chul JEON, Chul-Woong CHO et Yeoung-Sang YUN : Measurement of microalgal photosynthetic activity depending on light intensity and quality. *Biochemical Engineering Journal*, 27(2):127–131, 2005.
- [325] Takahira OGAWA et Shuichi AIBA : Bioenergetic analysis of mixotrophic growth in chlorella vulgaris and scenedesmus acutus. *Biotechnology and Bioengineering*, 23(5):1121–1132, 1981.
- [326] RO MEGARD, DW TONKYN et WH SENFT : Kinetics of oxygenic photosynthesis in planktonic algae. *Journal of Plankton Research*, 6(2):325–337, 1984.

- [327] Siti Fatihah SALLEH, Azlina KAMARUDDIN, Mohamad Hekarl UZIR, Abdul Rahman MOHAMED et Abdul Halim SHAMSUDDIN : Modeling the light attenuation phenomenon during photoautotrophic growth of *a. variabilis* atcc 29413 in a batch photobioreactor. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 92(2):358–366, 2017.
- [328] Emna KRICHEN, Alain RAPAPORT, Emilie LE FLOC'H et Eric FOUILLAND : Demonstration of facilitation between microalgae to face environmental stress. *Scientific Reports*, 9(1):1–11, 2019.
- [329] Norman R DRAPER et Harry SMITH : *Applied regression analysis*, volume 326. John Wiley & Sons, 1998.
- [330] Paul WESTERHOFF, Qiang HU, Mario ESPARZA-SOTO et Wim VERMAAS : Growth parameters of microalgae tolerant to high levels of carbon dioxide in batch and continuous-flow photobioreactors. *Environmental technology*, 31(5):523–532, 2010.
- [331] Jiří MASOJÍDEK, Giuseppe TORZILLO, Michal KOBLÍŽEK, Jiří KOPECKÝ, Paola BERNARDINI, Angelo SACCHI et Josef KOMENDA : Photoadaptation of two members of the chlorophyta (*scenedesmus* and *chlorella*) in laboratory and outdoor cultures : changes in chlorophyll fluorescence quenching and the xanthophyll cycle. *Planta*, 209(1):126–135, 1999.
- [332] Hu QIANG et Amos RICHMOND : Optimizing the population density in *isochrysis galbana* grown outdoors in a glass column photobioreactor. *Journal of Applied Phycology*, 6(4):391–396, 1994.
- [333] Bo-Ping HAN, Markku VIRTANEN, Jorma KOPONEN et Milan STRAŠKRABA : Effect of photoinhibition on algal photosynthesis : a dynamic model. *Journal of Plankton Research*, 22(5):865–885, 2000.
- [334] Jef HUISMAN, Richard R JONKER, Cor ZONNEVELD et Franz J WEISSING : Competition for light between phytoplankton species : experimental tests of mechanistic theory. *Ecology*, 80(1):211–222, 1999.
- [335] Yongjun ZHAO, Juan WANG, Hui ZHANG, Cheng YAN et Yuejin ZHANG : Effects of various led light wavelengths and intensities on microalgae-based simultaneous biogas upgrading and digestate nutrient reduction process. *Bioresource technology*, 136:461–468, 2013.
- [336] Arezoo KHALILI, Ghasem D NAJAFPOUR, Ghazaleh AMINI et Faezeh SAMKHANIYANI : Influence of nutrients and led light intensities on biomass production of microalgae *chlorella vulgaris*. *Biotechnology and bioprocess engineering*, 20(2):284–290, 2015.
- [337] SP HUBBELL *et al.* : Single-nutrient microbial competition : qualitative agreement between experimental and theoretically forecast outcomes. *Science*, 207(4438):1491–1493, 1980.

- [338] Garry PETERSON, Craig R ALLEN et Crawford Stanley HOLLING : Ecological resilience, biodiversity, and scale. *Ecosystems*, 1(1):6–18, 1998.
- [339] Florian JELTSCH, Volker GRIMM, Jette REEG et Ulrike E SCHLÄGEL : Give chance a chance : from coexistence to coviability in biodiversity theory. *Ecosphere*, 10(5):e02700, 2019.
- [340] G. BUTLER, S. HSU et P. WALTMAN : A mathematical model of the chemostat with periodic washout rate. *SIAM J. Appl. Math.*, 45:435–449, 1985.
- [341] Hal L SMITH : Monotone dynamical systems, volume 41 of mathematical surveys and monographs. *American Mathematical Society, Providence, RI*, 1995.
- [342] Shuhao HUO, Changhua SHANG, Zhongming WANG, Weizheng ZHOU, Fengjie CUI, Feifei ZHU, Zhenhong YUAN et Renjie DONG : Outdoor growth characterization of an unknown microalga screened from contaminated chlorella culture. *BioMed research international*, 2017, 2017.
- [343] T Frede THINGSTAD, Ulla Li ZWEIFEL et Fereidoun RASSOULZADEGAN : P limitation of heterotrophic bacteria and phytoplankton in the northwest mediterranean. *Limnology and Oceanography*, 43(1):88–94, 1998.
- [344] Patricia A WHEELER et David L KIRCHMAN : Utilization of inorganic and organic nitrogen by bacteria in marine systems 1. *Limnology and Oceanography*, 31(5):998–1009, 1986.
- [345] DL KIRCHMAN : The uptake of inorganic nutrients by heterotrophic bacteria. *Microbial Ecology*, 28(2):255–271, 1994.
- [346] Eric FOUILLAND et Behzad MOSTAJIR : Revisited phytoplanktonic carbon dependency of heterotrophic bacteria in freshwaters, transitional, coastal and oceanic waters. *FEMS Microbiology Ecology*, 73(3):419–429, 2010.
- [347] Michael JR FASHAM, Philip W BOYD et Graham SAVIDGE : Modeling the relative contributions of autotrophs and heterotrophs to carbon flow at a lagrangian jgofs station in the northeast atlantic : the importance of doc. *Limnology and Oceanography*, 44(1):80–94, 1999.
- [348] Karel Van den MEERSCHE, Jack J MIDDELBURG, Karline SOETAERT, Pieter VAN RIJSWIJK, Henricus TS BOSCHKER et Carlo HR HEIP : Carbon-nitrogen coupling and algal-bacterial interactions during an experimental bloom : Modeling a ^{13}C tracer experiment. *Limnology and Oceanography*, 49(3):862–878, 2004.
- [349] JC BLACKFORD, JI ALLEN et F Jn GILBERT : Ecosystem dynamics at six contrasting sites : a generic modelling study. *Journal of Marine Systems*, 52(1-4):191–215, 2004.
- [350] Markus SCHARTAU, Anja ENGEL, Jens SCHRÖTER, Silke THOMS, Christoph VÖLKER et Dieter WOLF-GLADROW : Modelling carbon overconsumption and the formation of extracellular

particulate organic carbon. *Biogeosciences Discussions*, 4(1):13–67, 2007.

- [351] Kevin J FLYNN, Darren R CLARK et Yao XUE : Modeling the release of dissolved organic matter by phytoplankton 1. *Journal of phycology*, 44(5):1171–1187, 2008.
- [352] Michael DANGER, Joséphine LEFLAIVE, Catherine OUMAROU, Loïc TEN-HAGE et Gérard LACROIX : Control of phytoplankton–bacteria interactions by stoichiometric constraints. *Oikos*, 116(7):1079–1086, 2007.
- [353] Davis TILMAN : *Resource Competition and Community Structure*. Princeton University Press, 1982.
- [354] James GROVER : *Resource Competition*. Springer-Verlag, New York, 2012.
- [355] Th IETSWAART et KJ FLYNN : Modelling interactions between phytoplankton and bacteria under nutrient-regenerating conditions. *Journal of plankton research*, 17(4):729–744, 1995.
- [356] Thomas R ANDERSON et Peter J le B WILLIAMS : A one-dimensional model of dissolved organic carbon cycling in the water column incorporating combined biological-photochemical decomposition. *Global Biogeochemical Cycles*, 13(2):337–349, 1999.
- [357] David S REAY, David B NEDWELL, Julian PRIDDLE et J Cynan ELLIS-EVANS : Temperature dependence of inorganic nitrogen uptake : reduced affinity for nitrate at suboptimal temperatures in both algae and bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(6):2577–2584, 1999.
- [358] CT CODECO et JP GROVER : Competition along a spatial gradient of resource supply : a microbial experimental model. *The American Naturalist*, 157(3):300–315, 2001.
- [359] Carol D COLLINS et Joseph H WLOSINSKI : Coefficients for Use in the US Army Corps of Engineers Reservoir Model, CE-QUAL-R1. Rapport technique, Army engineer waterways experiment station Vicksburg MS Environmental Lab, 1983.
- [360] James M EBELING, Michael B TIMMONS et JJ BISOGNI : Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia–nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture*, 257(1-4):346–358, 2006.
- [361] MaE Martínez SANCHO, JM Jiménez CASTILLO et Farida EL YOUSFI : Influence of phosphorus concentration on the growth kinetics and stoichiometry of the microalga *scenedesmus obliquus*. *Process Biochemistry*, 32(8):657–664, 1997.
- [362] Maryam Khajeh ALIJANI, Hao WANG et James J ELSEY : Modeling the bacterial contribution to planktonic community respiration in the regulation of solar energy and nutrient availability. *Ecological Complexity*, 23:25–33, 2015.
- [363] Bernard J ABBOTT, Allen I LASKIN et CJ MCCOY : Effect of growth rate and nutrient li-

mitation on the composition and biomass yield of acinetobacter calcoaceticus. *Appl. Environ. Microbiol.*, 28(1):58–63, 1974.

- [364] Kjell Magne FAGERBAKKE, Mikal HELDAL et Svein NORLAND : Content of carbon, nitrogen, oxygen, sulfur and phosphorus in native aquatic and cultured bacteria. *Aquatic Microbial Ecology*, 10(1):15–27, 1996.
- [365] Garand P. : Croissance des micro-algues en mono et polycultures soumises à des ressources variables. 2017.
- [366] Blahoslav MARŠÁLEK et Renata ROJÍČKOVÁ : Stress factors enhancing production of algal exudates : a potential self-protective mechanism? *Zeitschrift für Naturforschung C*, 51(9-10):646–650, 1996.
- [367] Emma K WEAR, Craig A CARLSON, Laura A WINDECKER et Mark A BRZEZINSKI : Roles of diatom nutrient stress and species identity in determining the short-and long-term bioavailability of diatom exudates to bacterioplankton. *Marine Chemistry*, 177:335–348, 2015.
- [368] Myriam LE CHEVANTON, Matthieu GARNIER, Ewa LUKOMSKA, Nathalie SCHREIBER, Jean-Paul CADORET, Bruno SAINT-JEAN et Gaël BOUGARAN : Effects of nitrogen limitation on dunaliella sp.–alteromonas sp. interactions : from mutualistic to competitive relationships. *Frontiers in Marine Science*, 3:123, 2016.
- [369] Guillaume GOFFAUX et Alain Vande WOUWER : Bioprocess state estimation : some classical and less classical approaches. In *Control and Observer Design for Nonlinear Finite and Infinite Dimensional Systems*, pages 111–128. Springer, 2005.
- [370] Max MÜLLER : Über das fundamentaltheorem in der theorie der gewöhnlichen differentialgleichungen. *Mathematische Zeitschrift*, 26(1):619–645, 1927.
- [371] Rudolf J LOHNER : Computation of guaranteed enclosures for the solutions of ordinary initial and boundary value problems. In *Institute of mathematics and its applications conference series*, volume 39, pages 425–425. Oxford University Press, 1992.
- [372] Adam B SINGER et Paul I BARTON : Bounding the solutions of parameter dependent nonlinear ordinary differential equations. *SIAM Journal on Scientific Computing*, 27(6):2167–2182, 2006.
- [373] Luc JAULIN : Nonlinear bounded-error state estimation of continuous-time systems. *Automatica*, 38(6):1079–1082, 2002.
- [374] Jaulin LUC et Kieffer MICHEL : Applied interval analysis : with examples in parameter and state estimation, robust control and robotics, 2001.
- [375] Tarek RAISSI, Nacim RAMDANI et Yves CANDAU : Set membership state and parameter

estimation for systems described by nonlinear differential equations. *Automatica*, 40(10):1771–1777, 2004.

- [376] Michel KIEFFER, Eric WALTER et Ivan SIMEONOV : Guaranteed nonlinear parameter estimation for continuous-time dynamical models. *IFAC Proceedings Volumes*, 39(1):843–848, 2006.
- [377] Vasily V SAURIN, Georgy V KOSTIN, Andreas RAUH et Harald ASCHEMANN : Adaptive control strategies in heat transfer problems with parameter uncertainties based on a projective approach. *In Modeling, Design, and Simulation of Systems with Uncertainties*, pages 309–332. Springer, 2011.
- [378] Nacim MESLEM, Nacim RAMDANI et Yves CANDAU : Approximation garantie de l’espace d’état atteignable des systèmes dynamiques continus incertains. *Journal Européen des Systèmes Automatisés*, 43(1):241–266, 2009.
- [379] Marcelo MOISAN et Olivier BERNARD : Robust interval observers for global lipschitz uncertain chaotic systems. *Systems & Control Letters*, 59(11):687–694, 2010.
- [380] Denis EFIMOV, Tarek RAÏSSI, Stanislav CHEBOTAREV et Ali ZOLGHADRI : Interval state observer for nonlinear time varying systems. *Automatica*, 49(1):200–205, 2013.
- [381] Rihab El Houda THABET, Tarek RAÏSSI, Christophe COMBASTEL, Denis EFIMOV et Ali ZOLGHADRI : An effective method to interval observer design for time-varying systems. *Automatica*, 50(10):2677–2684, 2014.
- [382] Patrick DE LEENHEER, David ANGELI et Eduardo D SONTAG : A tutorial on monotone systems-with an application to chemical reaction networks. *In Proc. 16th Int. Symp. Mathematical Theory of Networks and Systems (MTNS)*, pages 2965–2970. Citeseer, 2004.
- [383] Olivier BERNARD, Zakaria HADJ-SADOK et J-L GOUZÉ : Observers for the biotechnological processes with unknown kinetics. application to wastewater treatment. *In Proceedings of the 39th IEEE Conference on Decision and Control (Cat. No. 00CH37187)*, volume 5, pages 4526–4531. IEEE, 2000.
- [384] MZ HADJ-SADOK et JL GOUZÉ : Estimation of uncertain models of activated sludge processes with interval observers. *Journal of Process Control*, 11(3):299–310, 2001.
- [385] Marcelo MOISAN et Olivier BERNARD : Interval observers for non monotone systems. application to bioprocess models. *IFAC Proceedings Volumes*, 38(1):43–48, 2005.
- [386] Tarek RAÏSSI, Nacim RAMDANI et Yves CANDAU : Bounded error moving horizon state estimator for non-linear continuous-time systems : application to a bioprocess system. *Journal of Process control*, 15(5):537–545, 2005.

- [387] Nacim MESLEM, Nacim RAMDANI et Yves CANDAU : Interval observers for uncertain nonlinear systems. application to bioreactors. *IFAC Proceedings Volumes*, 41(2):9667–9672, 2008.
- [388] Guillaume GOFFAUX, A Vande WOUWER et Olivier BERNARD : Continuous-discrete interval observers for monitoring microalgae cultures. *Biotechnology progress*, 25(3):667–675, 2009.
- [389] Francis MAIRET, Marcello MOISAN et Olivier BERNARD : Interval observer-based estimator of specific growth rate in bioreactors. 2010.
- [390] Elena M BUNCIU : Biomass estimation for an anaerobic bioprocess using interval observer. *In Intelligent Decision Technologies*, pages 95–102. Springer, 2011.
- [391] Tarek RAÏSSI, Denis EFIMOV et Ali ZOLGHADRI : Interval state estimation for a class of nonlinear systems. *IEEE Transactions on Automatic Control*, 57(1):260–265, 2011.
- [392] Frédéric MAZENC et Olivier BERNARD : Iss interval observers for nonlinear systems transformed into triangular systems. *International Journal of Robust and Nonlinear Control*, 24(7):1241–1261, 2014.
- [393] David GUCIK-DERIGNY, Tarek RAÏSSI et Ali ZOLGHADRI : A note on interval observer design for unknown input estimation. *International Journal of Control*, 89(1):25–37, 2016.
- [394] Gang ZHENG, Denis EFIMOV et Wilfrid PERRUQUETTI : Design of interval observer for a class of uncertain unobservable nonlinear systems. *Automatica*, 63:167–174, 2016.
- [395] A RAPAPORT et JL GOUZÉ : Parallelotopic and practical observers for non-linear uncertain systems. *International journal of control*, 76(3):237–251, 2003.
- [396] Olivier BERNARD et Jean-Luc GOUZÉ : Closed loop observers bundle for uncertain biotechnological models. *Journal of process control*, 14(7):765–774, 2004.
- [397] M. MOISAN et O. BERNARD : Near optimal interval observers bundle for uncertain bioreactors. *Automatica*, 45(1):291–295, 2009.
- [398] Michel KIEFFER et Eric WALTER : Guaranteed nonlinear state estimator for cooperative systems. *Numerical algorithms*, 37(1-4):187–198, 2004.
- [399] Nacim MESLEM, Nacim RAMDANI et Yves CANDAU : Using hybrid automata for set-membership state estimation with uncertain nonlinear continuous-time systems. *Journal of Process Control*, 20(4):481–489, 2010.
- [400] Ramon E MOORE : *Interval analysis*, volume 4. Prentice-Hall Englewood Cliffs, NJ, 1966.
- [401] Eric WALTER et Hélène PIET-LAHANIER : Estimation of parameter bounds from bounded-error data : a survey. *Mathematics and Computers in simulation*, 32(5-6):449–468, 1990.

- [402] Ramon MOORE : Parameter sets for bounded-error data. *Mathematics and Computers in Simulation*, 34(2):113–119, 1992.
- [403] Luc JAULIN et Eric WALTER : Guaranteed nonlinear parameter estimation from bounded-error data via interval analysis. *Mathematics and computers in simulation*, 35(2):123–137, 1993.
- [404] Mario MILANESE : Properties of least squares estimates in set membership identification. *Automatica*, 31(2):327–332, 1995.
- [405] Nikola D PERIĆ, Radoslav PAULEN, Mario E VILLANUEVA et Benoît CHACHUAT : Set-membership nonlinear regression approach to parameter estimation. *Journal of Process Control*, 70:80–95, 2018.
- [406] Skylar W MARVEL et Cranos M WILLIAMS : Set membership experimental design for biological systems. *BMC systems biology*, 6(1):21, 2012.
- [407] Anwesh Reddy Gottu MUKKULA et Radoslav PAULEN : Model-based design of optimal experiments for nonlinear systems in the context of guaranteed parameter estimation. *Computers & Chemical Engineering*, 99:198–213, 2017.
- [408] Graham Clifford GOODWIN et Robert L PAYNE : *Dynamic system identification : experiment design and data analysis*. Academic press, 1977.
- [409] Klaus SCHITTKOWSKI : Numerical data fitting in dynamical systems : A practical introduction with applications and software. 2002.
- [410] Hermann MOSER *et al.* : The dynamics of bacterial populations maintained in the chemostat. *The dynamics of bacterial populations maintained in the chemostat.*, 1958.
- [411] Andrzej P RUSZCZYŃSKI et Andrzej RUSZCZYNSKI : *Nonlinear optimization*, volume 13. Princeton university press, 2006.
- [412] Luc JAULIN, Éric WALTER et Olivier DIDRIT : Guaranteed robust nonlinear parameter bounding. In *Proc. CESA*, volume 96, pages 1156–1161, 1996.
- [413] David A RATKOWSKY : Model fitting and uncertainty. 2004.
- [414] Hao WANG, Hal L SMITH, Yang KUANG et James J ELSER : Dynamics of stoichiometric bacteria-algae interactions in the epilimnion. *SIAM Journal on Applied Mathematics*, 68(2): 503–522, 2007.
- [415] Alexander WEZEL, Marion CASAGRANDE, Florian CELETTE, Jean-François VIAN, Aurélie FERRER et Joséphine PEIGNÉ : Agroecological practices for sustainable agriculture. a review. *Agronomy for sustainable development*, 34(1):1–20, 2014.
- [416] Rob W BROOKER, Alison J KARLEY, Adrian C NEWTON, Robin J PAKEMAN et Christian

SCHÖB : Facilitation and sustainable agriculture : a mechanistic approach to reconciling crop production and conservation. *Functional ecology*, 30(1):98–107, 2016.

- [417] Petros LENAS et Stavros PAVLOU : Coexistence of three competing microbial populations in a chemostat with periodically varying dilution rate. *Mathematical Biosciences*, 129(2):111–142, 1995.
- [418] Fatima-Zahra TANI, Alain RAPAPORT et T rence BAYEN : A hybrid control against species invasion in the chemostat. *In 2019 IEEE 58th Conference on Decision and Control (CDC)*, pages 2814–2819. IEEE, 2019.
- [419] T rence BAYEN, Alain RAPAPORT et Fatima-Zahra TANI : Weak resilience of the chemostat model to a species invasion with non-autonomous removal rates. 2019.
- [420] Alain RAPAPORT, Jérôme HARMAND et Frédéric MAZENC : Coexistence in the design of a series of two chemostats. *Nonlinear Analysis : Real World Applications*, 9(3):1052–1067, 2008.
- [421] Hans M LLER : Die theorie der koagulation polydisperser systeme. *Kolloid-Zeitschrift*, 38(1): 1–2, 1926.
- [422] Wolfgang WALTER : Linear differential equations. *In Ordinary Differential Equations*, pages 159–212. Springer, 1998.

