

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

**DÉVELOPPEMENT D'UN BIORÉACTEUR À GARNISSAGES
POUR LA CULTURE DE RACINES TRANSFORMÉES**

MARIE-JOSÉE BOUDREAU

**DÉPARTEMENT DE GÉNIE CHIMIQUE
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL**

**MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLOME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE CHIMIQUE)**

JANVIER 2000



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions et
services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-53562-2

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé :

**DÉVELOPPEMENT D'UN BIORÉACTEUR À GARNISSAGES
POUR LA CULTURE DE RACINES TRANSFORMÉES**

présenté par : BOUDREAU Marie-Josée

en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M. LAFLEUR Pierre G., Ph.D., président

M. JOLICOEUR Mario, Ph.D., membre et directeur de recherche

M. PERRIER Michel, Ph.D., membre et codirecteur de recherche

M. CHAVARIE Claude, Ph.D., membre et codirecteur de recherche

M. GARNIER Alain, Ph.D., membre

À mes grands-parents,
dont l'amour inspire ma voie,
nourrit ma vie

REMERCIEMENTS

Je remercie la compagnie Premier Tech pour le soutien financier qu'elle a apporté à une partie du projet.

Je voudrais exprimer tout particulièrement ma gratitude à mes trois directeurs de recherche. Mario Jolicoeur m'a guidée par sa vision éclairée, son inspiration, ses encouragements et ses conseils, même avant de devenir professeur. Claude Chavarie a su m'accorder l'attention nécessaire malgré ses occupations administratives. Enfin, Michel Perrier s'est toujours montré intéressé par mes travaux et m'a apporté un grand soutien scientifique, même si mes travaux ne cadraient pas dans ses objectifs de recherche. Aucun n'a jamais remis en question mes implications associatives, l'intérêt qu'elles avaient pour moi et l'épanouissement qu'elles m'ont apporté. Je les remercie de m'avoir enseigné l'humilité, la politique et la persévérance malgré les coups durs.

En second lieu, j'aimerais remercier l'équipe du laboratoire : Dany, Rob, Luc, Laurence, Cyril, Martin Descôteaux, Jean, Hélène, Édith et Martin Gaudette pour m'avoir accompagnée pendant mes recherches. Avec ce groupe, l'atmosphère de travail était toujours agréable. Un merci tout spécial à Martin G. qui m'a initiée au laboratoire et m'a endurée pendant mes petites crises de découragement, d'orgueil et tout le reste, de même qu'à Martin D. qui a pris du temps de sa vie plus que remplie pour me relire avec amitié. Je veux remercier également les techniciens Gino et Jean

qui m'ont apporté leur aide sans ménagement. Un dernier hommage à toutes les personnes, trop nombreuses pour les nommer ici, qui m'ont aidée à rouler la corde de jute. Je devine que ces longs moments vous ont marqué autant que moi !

Ma mère et mon père n'ont douté de mes choix qu'une fois, lorsqu'ils ont eu peur pour moi. Je les remercie de s'être ravisés et d'avoir compris à quel point ma « double vie » m'a enrichie. Ils n'ont jamais économisé leur support moral et leur soutien technique (merci pour la correction !). Je remercie Marc qui m'a supporté pendant mes « crises expérimentales » et a bien volontiers participé à mes nombreux changements de milieux. Je remercie aussi Éric qui a traversé avec beaucoup de patience mes caprices d'écriture, il a su me donner l'énergie essentielle aux derniers efforts.

Finalement, je voudrais souligner l'appui de mes extraordinaires amis Antoine, Richard et Lionel qui m'ont été révélés, des gens de l'Association des Étudiants des Cycles Supérieurs de Polytechnique, surtout Hélène Lafortune, de mes amis merveilleux du groupe scout 218° Radisson qui ont su m'attendre et de toutes les autres personnes que je ne peux nommer et qui me donnent sans retenue leur amour.

Hermine déterminée

RÉSUMÉ

La production à grande échelle d'engrais naturels s'impose aujourd'hui comme une nécessité de protection de l'environnement. Les racines de plantes transformées sont utilisées à plusieurs fins dans les cultures en bioréacteurs dont la production de métabolites secondaires, extraits de plantes à forte valeur ajoutée, et comme hôte végétal pour les champignons endomycorhiziens, reconnus pour servir d'engrais naturel.

L'aspect des conditions de culture des racines de plantes dans un bioréacteur est abondamment documenté de même que le design des bioréacteurs. Cependant, peu d'études se sont intéressées à l'hydrodynamique du bioréacteur et aucune recherche ne s'est encore arrêtée au cas du bioréacteur ruisselant (ou à percolation), avec garnissages comme support de culture. Le présent travail souhaite contribuer au développement des connaissances dans ce domaine par une recherche centrée sur le bioréacteur à garnissages utilisé pour la culture des racines transformées. Les principaux axes de la recherche sont : l'identification d'un système modèle capable de remplacer les racines de carotte, l'identification du garnissage idéal comme support de culture, la caractérisation du développement spatial des racines en croissance, et l'étude de l'hydrodynamique du bioréacteur.

Pour débiter la recherche, on a tout d'abord identifié un modèle non vivant, ayant les mêmes caractéristiques qu'un lit de racines de carotte, dans le but de les remplacer par un matériau plus facile à utiliser pour l'expérimentation. En effet, le maintien de la stérilité en bioréacteur est délicat tout comme la croissance des cultures. Le système modèle non vivant permet donc de concentrer les efforts sur les essais hydrodynamiques. Le matériau le plus efficace pour remplacer le lit de racines de carotte s'est avéré la corde de jute coupée en bouts de 8 à 10 cm, séparés en leurs trois brins et façonnés en petites boules pour former un lit d'une densité de $0,16 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Quant au choix du garnissage, c'est le *Tri pack* de 2" qui s'est montré le plus performant. En effet, il permet aux racines un bon accrochage, une distribution satisfaisante dans le bioréacteur ainsi qu'un degré de remplissage élevé du garnissage. Il a donc servi de base aux cultures et permis de mettre en évidence l'importance de la qualité de l'inoculation comme facteur déterminant pour favoriser l'accrochage et la distribution des racines. De plus, il a été observé que de petits inocula, bien répartis dans le bioréacteur, favorisent le développement d'un lit plus uniforme et moins dense.

L'étude de la distribution spatiale des racines sur les garnissages tout au long de leur croissance a également fait l'objet d'une attention particulière. Deux expériences ont révélé la même tendance : les racines utilisent d'abord tout l'espace latéral disponible, puis le lit se densifie. Durant la première phase du développement latéral, les racines

poussent légèrement vers le bas mais, dès le début de la densification, le lit ne s'épaissit plus que vers le haut où les nutriments frais se retrouvent en plus grande abondance.

Une part importante de la recherche a été consacrée à l'étude de l'hydrodynamique des systèmes (c'est-à-dire à l'étude du temps de séjour, du nombre de Péclet et du temps de mélange) à partir des courbes expérimentales de distribution des temps de séjour (DTS) des cultures de racines et du modèle non vivant. L'analyse des résultats a montré que l'hydrodynamique de ces systèmes suit le modèle des deux réacteurs parfaitement agités (CSTR) en série de volumes différents. De plus, l'élaboration d'une méthode de déconvolution des courbes de distribution des temps de séjour a permis de dissocier l'effet des parois du réacteur de l'effet du lit, pour une partie des courbes étudiées.

Un autre aspect de l'analyse a porté sur les courbes de DTS « échelon ». Cette étude a montré que, une fois dérivées, elles suivent la tendance des courbes de DTS « injection » pour des conditions de culture identiques. Ceci confirme la validité des méthodes expérimentales qui utilisent l'injection de traceur pour l'obtention des courbes de DTS.

Un autre élément important de la recherche est l'analyse du nombre de Péclet (Pe). Il a été calculé à partir des paramètres τ_1 et τ_2 du modèle des deux CSTR en série de volumes différents. Pour le système modèle, de même que pour le lit de racines et le lit de racines sur garnissages, le Pe calculé est plus petit que 10, ce qui indique un écart

important par rapport à l'écoulement piston. Par ailleurs, l'analyse du nombre de Péclet en fonction du temps de résidence a révélé que la tendance d'évolution est similaire quelque soit le système étudié.

Quant au temps de mélange dans le bioréacteur, il a été mesuré à partir des courbes de DTS non déconvoluées. Pour le système modèle, la corrélation entre le temps de mélange et le temps de résidence (volume/débit) donne : $\text{temps de mélange} = 9.3(V/Q)^{0.65}$. De plus, il a été observé que le mode d'alimentation par atomisation est plus efficace au niveau du mélange que le mode du goutte à goutte aléatoire. Par ailleurs, la comparaison des temps de mélange du système modèle non vivant et du lit de racines sans garnissage a montré de grands écarts entre les deux systèmes. Tandis que le temps de mélange du bioréacteur à garnissages s'est avéré deux fois plus court que celui du système modèle non vivant.

L'étude du transfert d'oxygène n'a pas été complétée. En effet, il a été impossible avec le modèle développé d'obtenir des coefficients de transfert d'oxygène. Des suggestions quant aux modifications à apporter au modèle et à l'alimentation gazeuse du bioréacteur ont été faites.

ABSTRACT

Genetically transformed plant roots to produce only roots are used in many ways in bioreactor cultures. The production of secondary metabolites - plant extracts of high value - is well documented in the literature. However, the large scale production of endomycorrhized fungus in obligatory symbiosis with plant roots is a field less explored.

The culture conditions for plant roots production in a bioreactor and the study of different bioreactor design are also well documented. But very few studies have explored the hydrodynamics of such bioreactors and none have considered the use of packed trickle bed bioreactor. The work reported here has the goal of improving the knowledge in this field by contributing to the development of a packed bed bioreactor for transformed roots culture. The main research trusts are the identification of a model to replace carrot roots, the identification of a packing as culture support, the characterization of the spacial development of roots while these are growing on the packing, and the study of the bioreactor hydrodynamics.

As a first step, we have searched for a non living model with the same characteristics as a bed of roots in order to replace the roots during the numerous experiments. The tasks of upholding sterility and maintaining culture growth are delicate and demanding, and using a non living model enables to better focus on the hydrodynamic experiments. The material which presents the most similarities with a bed of carrot roots is jute rope, cut

in pieces of 8 to 10 cm. separated in their three strands, and rolled in small balls to make a bed of $0.16 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ density.

Two inches *Tri pack* was the packing chosen as the best culture support. It offers a good grip, a good distribution of the roots in the bioreactor and a good filling of each packing by the roots. The quality of inoculation is very important to facilitate gripping of the roots and good distribution of roots in the bioreactor. Distributing small inocula evenly in the bioreactor results in a more uniformed and less dense bed.

Spacial distribution of roots during their growth on the packing has also been studied. Two experiments have demonstrated a common tendency : the roots use all lateral space before densification of the bed. During the first step of lateral development, the roots grow a bit downward but, as soon as densification begins, the bed thickens only upwards where fresh nutriments are abundant.

Study of hydrodynamic curves of both the non living model and the root bed has revealed that the hydrodynamics follow the model of two perfectly mixed bioreactors of different volumes in series. A deconvolution method has been developped for the residence time distribution curves in order to dissociate the wall effect from the bed.

Step function RTD curves, once derived, follow the same tendency as the injection RTD curves for identical culture conditions. This validates the experimental method of tracer injection to obtain RTD curves.

The Peclet number was calculated from parameters τ_1 et τ_2 of the model of two CSTR of different volumes in series. For the non living model, the root bed and the root bed with packings, it is less than 10, which means a great deviation from plug flow. The variation of Pe as a function of residence time is similar, whatever system is studied.

Mixing time in the bioreactor is measured from the non deconvoluted RTD curves. For the non living model, a correlation between mixing time and residence time (volume/flow rate) has been established: $\text{mixing time} = 9.3(V/Q)^{0.65}$. It was also observed that the feeding by atomization is more effective than the aleatory drop-by-drop method. Comparing the non living model mixing times with the roots bed ones, we see a large deviation. For the roots bed with packing, mixing times are around half of the non living model mixing times.

The study of oxygen transfer hasn't been completed. Obtaining oxygen transfer coefficient with the model developed was impossible. Changes on the bioreactor and the model have been suggested.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	V
RÉSUMÉ.....	VII
ABSTRACT.....	XI
TABLE DES MATIÈRES.....	XIV
LISTE DES ANNEXES.....	XVII
LISTE DES FIGURES.....	XVIII
LISTE DES TABLEAUX.....	XXIV
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....	XXV
CHAPITRE 1 - INTRODUCTION	1
CHAPITRE 2 - REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	6
2.1 LES CHAMPIGNONS ENDOMYCORHIZIENS	6
2.2 LES MÉTABOLITES SECONDAIRES.....	11
2.3 LES RACINES TRANSFORMÉES.....	14
2.4 LES DESIGNS DE BIORÉACTEURS	17
2.4.1 <i>Supports de culture</i>	20
2.4.2 <i>Bioréacteurs agités mécaniquement</i>	20
2.4.3 <i>Bioréacteurs à air forcé</i>	24
2.4.4 <i>Bioréacteurs à liquide circulant</i>	28

2.4.5	<i>Comparaison des designs de bioréacteurs</i>	35
2.5	DISTRIBUTION DE TEMPS DE SÉJOUR	38
2.6	TRANSFERT D'OXYGÈNE	40
CHAPITRE 3 - MATÉRIELS ET MÉTHODES		48
3.1	MATÉRIEL BIOLOGIQUE	48
3.2	CHOIX DU SYSTÈME MODÈLE NON VIVANT	49
3.2.1	<i>Propriétés hydrostatiques</i>	52
3.2.2	<i>Propriétés hydrodynamiques</i>	53
3.3	ÉTUDE DE L'HYDRODYNAMIQUE	54
3.4	ÉTUDE DU TRANSFERT D'OXYGÈNE	57
3.5	BIORÉACTEURS ET CULTURES	58
3.5.1	<i>Réacteur pour les essais non stériles</i>	60
3.5.2	<i>Bioréacteurs de 1 L et 2 L pour les cultures</i>	63
3.5.3	<i>Bioréacteurs de 6 L et 20 L pour les cultures</i>	72
3.6	ANALYTIQUE	74
3.6.1	<i>Échantillonnage et récolte</i>	74
3.6.2	<i>Analyse des nutriments extracellulaires</i>	75
CHAPITRE 4 - DÉVELOPPEMENT DES MODÈLES ET DES PARAMÈTRES		76
4.1	MODÈLE HYDRODYNAMIQUE	76
4.1.1	<i>Courbes DTS échelon</i>	80
4.2	MÉTHODE DE DÉCONVOLUTION	81
4.3	LE NOMBRE DE PÉCLET COMME PARAMÈTRE	83
4.4	TEMPS DE MÉLANGE	84
4.5	MODÈLE DE TRANSFERT D'OXYGÈNE	85
4.6	SYNTHÈSE DU MODÈLE	90

CHAPITRE 5 - RÉSULTATS ET DISCUSSION	93
5.1 CHOIX DU SYSTÈME MODÈLE NON VIVANT	93
5.1.1 <i>Perméabilité</i>	94
5.1.2 <i>Rétentions liquide et gazeuse</i>	97
5.2 CHOIX DU GARNISSAGE	101
5.3 DISTRIBUTION SPATIALE DES RACINES EN CROISSANCE	108
5.4 ÉTUDE DE L'HYDRODYNAMIQUE	115
5.4.1 <i>Observations expérimentales</i>	116
5.4.2 <i>Comparaison générale entre les courbes de DTS et le modèle</i>	119
5.4.3 <i>Nombre de Pe</i>	136
5.4.4 <i>Temps de mélange</i>	140
5.4.5 <i>Transfert d'oxygène</i>	148
CHAPITRE 6 - CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS	150
6.1 CONCLUSIONS	150
6.2 RECOMMANDATIONS	154
RÉFÉRENCES	156

LISTE DES ANNEXES

ANNEXES A – COMPOSITION DES MILIEUX.....	170
ANNEXES B – RÉSULTATS DES RÉCOLTES POUR LE CHOIX DU GARNISSAGE	172
ANNEXES C – CALCULS POUR L'ANALYSE FACTORIELLE.....	176
ANNEXES D – DONNÉES HYDRODYNAMIQUES	178
ANNEXES E – COURBES DE DTS : E(T) EN FONCTION DU TEMPS.....	186
ANNEXES F – COURBES DE DTS DÉCONVOLUÉES ET MODÈLE DES 2 CSTR EN SÉRIE DE VOLUMES DIFFÉRENTS.....	211
ANNEXES G – DONNÉES DE TRANSFERT D'OXYGÈNE	220
ANNEXES H – COURBES DE TRANSFERT D'OXYGÈNE : DO EN FONCTION DU TEMPS	224

LISTE DES FIGURES

Figure 2-1 Bioréacteur agité à pales avec aération à la base (Kondo <i>et al.</i> , 1989)	21
Figure 2-2 Bouteille rotative (Kondo <i>et al.</i> , 1989).....	23
Figure 2-3 Bioréacteur agité horizontalement (Honda <i>et al.</i> , 1997)	24
Figure 2-4 Bioréacteur à bulles (Kwok et Doran, 1995).....	25
Figure 2-5 Bioréacteur gazosiphon (Hong <i>et al.</i> , 1989).....	27
Figure 2-6 Bioréacteur à convection forcée (Carvalho et Curtis, 1998).....	29
Figure 2-7 Bioréacteur ruisselant (Singh <i>et al.</i> , 1994).....	30
Figure 2-8 Bioréacteur à brume (Whitney, 1992).....	33
Figure 2-9 Profil de la concentration en oxygène dans une racine de rayon R avec un cortex poreux. C_s est la concentration en oxygène à la surface de la racine; ΔC est le déficit total en oxygène à travers le rayon de la racine. (Yu <i>et al.</i> , 1998).....	42
Figure 2-10 Concentration en oxygène dissous à l'intérieur d'amas de racines en fonction de la vitesse superficielle et de la densité des amas de racines (Yu et Doran, 1994).	44
Figure 3-1 Différentes formes de cordes testées.....	51
Figure 3-2 Racines utilisées pour la caractérisation.....	51
Figure 3-3 Montage permettant d'évaluer la perméabilité.....	53
Figure 3-4 Support à sondes.....	56
Figure 3-5 Système de transfert d'oxygène	58

Figure 3-6 Montage pour les essais avec le système modèle (non stérile)	61
Figure 3-7 Distributeur liquide (Bélanger, 1994)	62
Figure 3-8 Cône de distribution modifié.....	63
Figure 3-9 Bioréacteur pour lit simple.....	64
Figure 3-10 Distributeur de liquide.....	66
Figure 3-11 Types de garnissages utilisés.....	68
Figure 3-12 Bioréacteur pour le choix du garnissage	72
Figure 3-13 Bioréacteur de 6 L	74
Figure 4-1 Exemple d'une courbe échelon expérimentale en fonction du temps	80
Figure 4-2 Représentation schématique de la convolution dans le bioréacteur	82
Figure 4-3 Description du temps de mélange	85
Figure 5-1 Calcul de la perméabilité – montage à vide.....	94
Figure 5-2 Perméabilité des racines de carotte en fonction de la densité du lit	95
Figure 5-3 Perméabilité des différents matériaux en fonction de leur densité.....	97
Figure 5-4 Rétentions liquide et gazeuse d'un lit de racines de carotte en fonction de sa densité	98
Figure 5-5 Rétention liquide statique des différents matériaux en fonction de leur densité	99
Figure 5-6 Rétention gazeuse des différents matériaux en fonction de leur densité...	100
Figure 5-7 Diagramme d'écoulement pour les trois réponses et la moyenne des réponses.....	103

Figure 5-8 A) Racines et garnissages (<i>Tri pack 1"</i>) lors de l'inoculation; B) Racines et garnissages (<i>Tri pack 2"</i>) avant la récolte; C) Garnissages (<i>Pall rings 2 "</i>) provenant d'un bioréacteur dont les racines sont mal distribuées; D) Garnissages (<i>Tri pack 1"</i>) provenant d'un bioréacteur dont les racines sont bien distribuées.	107
Figure 5-9 Bioréacteur de 2L. croissance spatiale après 57 jours de culture	109
Figure 5-10 Bioréacteur de 6L. croissance spatiale A) après l'inoculation B) 23 jours de culture C) juste avant la récolte D) les garnissages de la partie supérieure du bioréacteur, dans l'ordre où ils ont été retirés du bioréacteur.	111
Figure 5-11 Répartition du poids des racines en fonction de la hauteur du bioréacteur de 2 litres au moment de la récolte, après 98 jours de culture.	113
Figure 5-12 Répartition du poids des racines et du remplissage des garnissages en fonction de la hauteur du bioréacteur de 6 L au moment de la récolte, après 100 jours de culture. Le remplissage est la moyenne sur chaque étage du degré de remplissage de chaque garnissage.....	114
Figure 5-13 Lit de racines sans support de culture A) lors de l'inoculation B) après quelques semaines (40 jours) C) coupe d'un lit de racines de 4 cm d'épaisseur (26 jours) D) après 75 jours de culture E) juste avant la récolte, après 90 jours de culture.....	117
Figure 5-14 Bioréacteur de 20L avec garnissages <i>Tri pack</i> de 2" A) quelques jours après l'inoculation B) après 88 jours de culture.....	118
Figure 5-15 Comparaison entre une courbe typique de DTS expérimentale (culture 34, jour 49) et les courbes des bioréacteurs idéaux CSTR et piston.....	121

Figure 5-16 Comparaison entre une courbe expérimentale typique (culture 34, jour 49) et les courbes des modèles de CTSR en série ($n = 3.47$) et de dispersion axiale ($Pe = 4.17$).	122
Figure 5-17 Comparaison entre une courbe de DTS expérimentale (culture 34, jour 49) et celle du modèle à deux CSTR en série de volumes différents avec $\tau_1 = 60$ s et $\tau_2 = 68$ s.	123
Figure 5-18 Comparaison de la courbe de DTS déconvoluée du lit seul avec garnissages (culture 34, jour 49) avec celle du modèle à deux CSTR de volumes différents avec $\tau_1 = 10$ s et $\tau_2 = 25$ s.	124
Figure 5-19 Comparaison entre une courbe DTS échelon dérivée et une courbe DTS injection.	126
Figure 5-20 Comparaison entre le modèle des deux CSTR en série de volumes différents ($\tau_1 = 33.5$ s, $\tau_2 = 46$ s) et une courbe de DTS déconvoluée du système modèle (DECJ53, épaisseur = 1.5 cm, débit de liquide = $0.44 \text{ ml}\cdot\text{s}^{-1}$, $V/Q = 268$ s).	127
Figure 5-21 Premier moment du modèle des 2 CSTR en série de volumes différents calculé à partir de τ_1 et τ_2 en fonction du temps de résidence V/Q pour le modèle pour le système modèle.	128
Figure 5-22 Comparaison entre le modèle des deux CSTR en série de volumes différents ($\tau_1 = 8$ s, $\tau_2 = 120$ s) et la courbe de DTS déconvoluée d'un lit de racines (LitDec10, cult. 29, jour 16, épais. 3 cm, débit de liquide = $0.7 \text{ ml}\cdot\text{s}^{-1}$, $V/Q = 407$ s).	129

Figure 5-23 Premier moment du modèle des 2 CSTR en série de volumes différents calculé à partir de τ_1 et τ_2 en fonction du temps de résidence V/Q pour le lit de racines.	130
Figure 5-24 Comparaison entre le modèle des deux CSTR en série de volumes différents ($\tau_1 = 8$ s. $\tau_2 = 38$ s. $\alpha = 18$ s) et la courbe de DTS déconvoluée d'un lit de racines sur garnissages (20Dec8. culture 34. jour 63. $0.7 \text{ mL}\cdot\text{s}^{-1}$).....	131
Figure 5-25 Premier moment du modèle des 2 CSTR en série de volumes différents calculé à partir de τ_1 et τ_2 en fonction du temps de culture pour le lit avec garnissages.	132
Figure 5-26 Comparaison entre les courbe de DTS pour le système modèle dans un bioréacteur de 2.6 cm de diamètre pour un débit de liquide de $0.1 \text{ mL}\cdot\text{s}^{-1}$	134
Figure 5-27 Comparaison entre les courbe de DTS pour le système modèle dans un bioréacteur de 11 cm de diamètre pour un débit de liquide de $0.7 \text{ mL}\cdot\text{s}^{-1}$	135
Figure 5-28 Comparaison entre les courbe de DTS pour le système modèle dans un bioréacteur de 25 cm de diamètre pour un débit de liquide de $0.7 \text{ mL}\cdot\text{s}^{-1}$	136
Figure 5-29 Nombre de Péclet en fonction du temps de résidence pour le système modèle.....	137
Figure 5-30 Nombre de Péclet en fonction de l'épaisseur d'un lit de racines	138
Figure 5-31 Comparaison du nombre de Pe en fonction du temps de résidence du lit de racines par rapport au système modèle	139
Figure 5-32 Nombre de Pe en fonction du temps de culture pour un lit de racines avec garnissages	140

Figure 5-33 Temps de mélange en fonction du temps de résidence pour le système modèle	141
Figure 5-34 Comparaison entre les temps de mélange du système modèle et des cultures de racines en fonction de l'épaisseur du lit	143
Figure 5-35 Temps de mélange pour un lit de racines avec garnissages en fonction du temps de culture et dans le cas du système modèle, en fonction de l'épaisseur ..	145
Figure 5-36 Temps de mélange pour différentes cultures sur garnissages. Volume du bioréacteur égal à 1.3 L pour les garnissages de 1'' et 2.4 L pour les garnissages de 2''	147
Figure 5-37 Temps de mélange en fonction du débit de liquide pour deux modes d'alimentation liquide pour le système modèle (épaisseur = 1.5 cm).....	148

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2-1 Comparaison entre les performances de différents procédés de production de propagules de <i>G. intraradices</i> (Jolicoeur <i>et al.</i> , 1999).....	10
Tableau 2-2 Comparaison des différents designs de bioréacteurs	36
Tableau 3-1 Plan factoriel complet	67
Tableau 3-2 Facteurs et modalités pour l'analyse statistique.....	68
Tableau 3-3 Critères pour la sélection d'un garnissage	68
Tableau 5-1 Moyenne des réplicats de chaque essai pour les trois réponses.....	102
Tableau 5-2 Caractéristiques du garnissage sélectionné.....	105
Tableau 5-3 Observations du développement de la culture en bioréacteur de 2 L	109
Tableau 5-4 Observations du développement de la culture en bioréacteur de 6L	110

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

Lettres grecques

α_r	coefficient de résistance du montage (perméabilité du montage à vide) (m^{-3})
α_m	modalité (+ ou -) pour le calcul statistique
α	délai entre le moment de l'injection et le moment où le traceur quitte le bioréacteur (s)
$\hat{\beta}$	demi-effet pour le calcul statistique
ϵ_g	rétenction gazeuse ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) (porosité, fraction de vide)
ϵ_{ls}	rétenction liquide statique ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
μ	viscosité ($\text{Pa}\cdot\text{s}$)
θ	temps adimensionnel
ρ	masse volumique ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$)
σ^2	second moment ou variance d'une courbe (s^2)
σ_M^2	second moment calculé à partir d'un modèle (s^2)
τ	premier moment ou temps de résidence moyen d'une courbe (s)
τ_i	temps de résidence moyen dans un réacteur (s)
τ_M	premier moment calculé à partir d'un modèle (s)

Lettres arabes

A	aire du lit (m^2)
ADN	acide désoxyribo-nucléique

$\hat{C}$	contraste pour le calcul statistique
C^*	concentration en oxygène en équilibre à une certaine pression partielle dans le gaz ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
$\hat{C}(s)$	transformée de Laplace de $C(t)$
$C(t)$	concentration du traceur à la sortie du réacteur ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
C_z	concentration en oxygène à la position z ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
CSTR	réacteur parfaitement agité (continuous stirred tank reactor)
DTS	distribution des temps de séjour
DW	masse sèche (dry weight)
$E(t)$	fonction de distribution du temps de séjour
$F(t)$	fonction de distribution des temps de séjour cumulative
H	hauteur (m)
ID	Diamètre interne (cm)
k	nombre d'essais pour le calcul statistique
K	perméabilité (m^2)
$k_L a$	coefficient volumétrique de transfert d'oxygène (h^{-1})
L	hauteur du lit (m)
m	pente de la droite (vitesse relative / tête hydrostatique) pour le calcul de la perméabilité (s^{-1})
M	masse (kg)
Myco	racines de carotte mycorhizées
n_r	nombre de réplicats pour le calcul statistique

n	nombre de réacteurs en série
OUR	taux de disparition d'oxygène (oxygen uptake rate) ($\text{mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)
Pe	nombre adimensionnel de Péclet
PR	garnissage de marque <i>Pall rings</i>
Q	débit de liquide ($\text{mL} \cdot \text{s}^{-1}$)
q _{O2}	taux spécifique de consommation d'oxygène ($\text{mg O}_2 \cdot \text{g DW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)
SS($\hat{C}$)	somme des carrés des contrastes pour le calcul statistique
t	temps (s)
TP	garnissage de marque <i>Tri pack</i>
U _l	vitesse superficielle du liquide ($\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$)
U _g	vitesse superficielle du gaz ($\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$)
VAM	champignon endomycorhizien à arbuscules et à vésicules
V	volume (L)
VVM	volume de gaz par volume de liquide circulant par minute
WW	masse humide (wet weight)
X	concentration en masse sèche ($\text{kg DW} \cdot \text{m}^{-3}$)
$\bar{Y}_i$	valeur moyenne de la variable réponse pour l'essai i pour le calcul statistique
z	position longitudinale (m)

CHAPITRE 1 - INTRODUCTION

La polémique entourant la détérioration des rivières causée par les rejets de phosphates provenant des engrais agricoles a fait naître la nécessité de développer de nouveaux types d'engrais moins dommageables pour l'environnement. Cette polémique a suscité un intérêt grandissant dans les milieux scientifiques pour la recherche sur les champignons microscopiques « endomycorhizes » qui vivent en symbiose avec les racines des plantes et qui agissent comme un engrais vivant naturel. En effet, ces champignons aident les plantes à retirer les nutriments du sol et, en retour, celles-ci les alimentent en carbone qu'ils sont incapables de puiser eux-mêmes dans le sol. Ce petit organisme a fait l'objet de nombreuses études ces dernières années qui ont permis le développement des méthodes de culture en pot. Toutefois, le début de la commercialisation des endomycorhizes a rapidement fait naître le besoin de rentabiliser le procédé à grande échelle. C'est ainsi que sont apparues les premières études sur la culture d'endomycorhizes en bioréacteur.

Par ailleurs, les champignons endomycorhiziens étant des symbiotes obligatoires, il était essentiel qu'ils soient cultivés en présence de racines de plantes. C'est l'utilisation de racines de plantes génétiquement transformées pour ne former que des racines qui a permis de contourner cet obstacle. On connaît bien aujourd'hui les conditions de culture des champignons qui assurent de très bons taux de croissance. En bioréacteur, la principale difficulté des cultures d'endomycorhizes est d'obtenir une bonne croissance

des champignons et des racines tout en tenant compte de la fragilité de la structure des tissus et du lien symbiotique.

La littérature regorge d'informations sur les racines transformées et leurs produits à cause de la demande pressante de l'industrie. En effet, les racines transformées sont abondamment utilisées pour la production de métabolites secondaires. Ces métabolites à forte valeur ajoutée sont la plupart du temps produits à partir de cultures de cellules de plantes indifférenciées (Verpoorte *et al.*, 1993). Il semble que dans certains cas on parvienne à une meilleure productivité avec des cultures de racines de plantes à cause de leur plus grande stabilité (Flores *et al.*, 1987; Rhodes *et al.*, 1987; Toivonen, 1992).

De nombreuses recherches ont été réalisées à ce jour sur les procédés de culture de racines dans le but d'améliorer la productivité et la densité des cultures. On a étudié, entre autres, les différents types de réacteurs, les méthodes d'aération et les façons d'alimenter le milieu de culture. Les résultats sont encourageants en ce qui concerne la densité des cultures. Cependant, il reste encore du chemin à parcourir, car le problème de la mise à l'échelle des procédés n'est pas entièrement résolu. En effet, la plupart des procédés qui se sont révélés efficaces à petite échelle sont difficilement adaptables à la production industrielle.

La présente recherche a été entreprise dans le but de poursuivre le travail exploratoire sur le développement d'un procédé efficace de culture de racines transformées en

bioréacteur, adaptable à la production industrielle. Le bioréacteur ruisselant avec garnissages est reconnu, dans la littérature, pour donner de bons résultats de culture de racines (Whitney, 1992; Ramakrishnan *et al.*, 1994; Kwok et Doran, 1995; Wilson, 1998). C'est aussi un bioréacteur facile d'installation et prometteur pour la production industrielle. C'est ce type de bioréacteur qui sera utilisé pour réaliser l'expérimentation nécessaire à la recherche. De plus, les racines de carotte ont été choisies car elles sont faciles à cultiver et leur comportement est bien connu. Les racines non mycorhizées ont été utilisées afin de simplifier l'expérimentation et concentrer la recherche sur l'étude du bioréacteur, sans avoir à se soucier d'un autre organisme vivant. D'ailleurs, la différence entre la morphologie des racines non mycorhizées et mycorhizées n'est pas assez importante pour modifier significativement l'hydrodynamique du bioréacteur.

L'objectif principal de cette étude est de contribuer au développement d'un bioréacteur à garnissages pour la culture de racines transformées, ce qui sera fait :

- en identifiant un système modèle pour remplacer les racines de carotte.
- en identifiant le garnissage le plus performant pour la culture des racines.
- en caractérisant le développement spatial des racines sur les garnissages et.
- en caractérisant l'hydrodynamique du système.

La revue de la littérature développe plus en profondeur le contexte de la recherche, de même que l'état des connaissances sur plusieurs sujets abordés dans ce travail dont: les

champignons endomycorhiziens, les métabolites secondaires, les racines transformées, le design et l'hydrodynamique des bioréacteurs.

Sept étapes seront nécessaires pour atteindre l'objectif fixé. La première consiste à identifier un système modèle non vivant qui soit capable de simuler le comportement physique d'un lit de racines et ainsi faciliter l'analyse du bioréacteur sans avoir à se préoccuper du maintien de la stérilité et de la croissance des racines, deux éléments particulièrement délicats pendant les cultures.

La deuxième étape consiste à choisir le garnissage le plus approprié pour les cultures en expérimentant sur des racines vivantes. Une fois le garnissage choisi, plusieurs cultures devront être réalisées pour observer la distribution spatiale des racines dans les garnissages durant leur croissance, ce qui constitue la troisième étape de la recherche.

Jusqu'à ce jour, peu de recherches avaient porté sur l'étude l'hydrodynamique d'un lit de racines, et encore moins sur une culture en bioréacteur ruisselant tel qu'utilisé dans ce travail. La quatrième étape de cette recherche sera donc consacrée au développement d'un modèle hydrodynamique à partir de nombreux essais expérimentaux.

L'étude hydrodynamique permettra d'identifier certains paramètres qui fourniront de l'information complémentaire sur le comportement des trois systèmes observés, soient : le modèle non vivant, le lit de racines et le lit de racines avec garnissages. Le nombre

de Péclet ainsi que le temps de mélange seront utilisés à cette fin. L'analyse de chacun de ces paramètres constitue la cinquième et la sixième étape de la recherche.

Finalement, la dernière étape de ce travail sera consacrée à l'étude du transfert d'oxygène dans le bioréacteur, et permettra de compléter les éléments mis en lumière par l'étude hydrodynamique.

CHAPITRE 2 - REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Cette revue bibliographique ne prétend pas faire le portrait complet du domaine mais bien une revue des différentes connaissances utiles pour situer cette recherche. Plusieurs sujets sont traités dans la revue : les champignons endomycorhiziens, les métabolites secondaires, les racines transformées (aussi appelées racines chevelues) les différents designs de bioréacteurs, l'étude de l'hydrodynamique, et l'étude du transfert d'oxygène.

2.1 LES CHAMPIGNONS ENDOMYCORHIZIENS

Les fertilisants chimiques ont un rôle négatif sur l'environnement à cause de leur ruissellement dans le sol entraînant la contamination des cours d'eau et des eaux souterraines. Une alternative intéressante aux fertilisants chimiques est l'utilisation de champignons à arbuscules et vésicules (VAM), stimulateurs de croissance des plantes (Wood et Cummings, 1992), naturellement présents dans les sols, mais souvent détruits par l'application intensive d'engrais chimiques et par le labourage trop intense. Ces champignons sont des symbiotes obligatoires avec les plantes vascularisées (Pfeffer *et al.*, 1998). Beaucoup de plantes vivent naturellement en symbiose avec des champignons endomycorhiziens. Cette relation améliore la nutrition des plantes (Smith, 1980), la croissance (Bethlenfalvay, 1992) ainsi que la résistance aux pathogènes du sol (Andrade *et al.*, 1997; St-Arnaud *et al.*, 1997, 1995, 1994) et à la sécheresse (Arora *et al.*, 1991; Khasa *et al.*, 1990; Trappe *et al.*, 1984). Le champignon est capable d'absorber les phosphores solubles, de les transporter et de les transférer à la

plante, et ce, bien au delà de la zone d'épuisement en phosphore, ce qui donne à la racine de nouvelles sources de phosphore difficilement accessibles autrement. Par contre, le champignon n'étant que partiellement apte à puiser le carbone nécessaire à sa croissance dans le sol, il doit obligatoirement s'associer à une plante. L'utilisation de champignons endomycorhiziens comme engrais aurait donc un effet bénéfique sur les pratiques agricoles.

Les endomycorhizes forment deux types d'organes de survie pouvant régénérer le champignon : les spores (propagules formées à l'extérieur des racines) et les vésicules (propagules formées à l'intérieur des racines) (Sylvia et Jarstfer, 1992). Ce sont ces propagules qu'il est intéressant de produire de façon industrielle. Actuellement, la production industrielle d'endomycorhizes est basée sur la culture en pots : les plantes entières sont inoculées par des propagules et sont cultivées dans différents sols et substrats (Plenchette *et al.*, 1982; Mosse et Thompson, 1984; Hung et Sylvia, 1988; Dugassa *et al.*, 1995). Le problème de ces cultures non stériles est l'introduction possible de pathogènes dans le sol de la plante que l'on veut inoculer avec le champignon. Puisque le temps de production de l'inoculum endomycorhizien est de 2 à 4 mois, ce temps est suffisamment long pour produire plusieurs contaminants tels les bactéries, les champignons et les pathogènes indésirables. De plus, les méthodes de production sont très coûteuses et très longues.

D'autres méthodes qui permettent une récolte des structures extra-racinaires du champignon ont aussi été expérimentées. Il s'agit de l'aéroponie (Hung et Sylvia, 1988), de l'hydroponie (Dugassa *et al.*, 1995), de la technique du film liquide (Mosse et Thompson, 1984) et du système hydroponique à sable (Millner et Kitt, 1992). Cette dernière permet d'augmenter la croissance du champignon et la sporulation (pour un maximum de 210 000 spores/pot). Par contre, elle demande un procédé de séparation qui peut détruire les structures du champignon. Tous ces procédés de première génération entraînent des coûts d'opération trop élevés pour qu'ils soient rentables sur le plan industriel.

C'est pourquoi les racines transformées génétiquement (qui croissent en ne formant que des racines) ont présenté un intérêt comme hôte végétal. Ce procédé de deuxième génération en condition stérile de boîtes de Pétri a été utilisé avec succès (Mugnier et Mosse, 1987). Par la suite, il a été possible pour Bécart et Fortin (1988) de faire l'inoculation de racines transformées avec des spores de champignon, mais avec une production de spores réduite. Récemment, la production de spores a été quintuplée à l'aide des boîtes pétri à 2 compartiments (St-Arnaud *et al.*, 1996), passant à 25 000 spores par boîte compartimentée. En élargissant le concept de compartimentation, un bioréacteur gel-papier a été conçu pour une production de 110 000 spores et 479 000 vésicules par bioréacteur contenant 250 mL de milieu gélifié (Gaudette, 1997).

Le premier essai visant la production d'endomycorhizes en bioréacteur pouvant être mis à l'échelle est réalisé par Jolicoeur *et al.* (1999). Une production moyenne de 1.82×10^5 spores·(g DW inoculum)⁻¹·(L milieu)⁻¹ en 107 jours de culture dans un bioréacteur gázosiphon est obtenue, ce qui représente une production maximale 10 fois inférieure aux cultures en Pétri mais comparable à celle obtenue pour les cultures en pots et hydroponiques (voir tableau 2-1). La faible croissance du champignon dans le gázosiphon peut être due, entre autres, au fait qu'il y a circulation continue du milieu contrairement aux conditions statiques naturelles. Il semble donc intéressant d'explorer plus en détail la possibilité de créer un design de bioréacteur compartimenté pouvant être mis à l'échelle, afin de créer un stress osmotique et nutritionnel, conditions favorisant la croissance du champignon (Jolicoeur, 1998). C'est ainsi que le bioréacteur opéré en mode brouillard avec un lit de perlite comme support de culture a permis d'augmenter la production de spores à 280 000 par bioréacteur et la production de vésicules à 80 000 par bioréacteur (Jolicoeur, 1998).

Tableau 2-1 Comparaison entre les performances de différents procédés de production de propagules de *G. intraradices* (Jolicoeur et al., 1999)

Table II. Comparative *G. intraradices* propagules production process performances.*

Culture method	Host plant	Spore production		Root mycorrhization		Time (weeks)	References
		#/Plant	% Germination	% Colonization	% With viable fungus		
Aeroponic	Bahia grass	NA	NA	50%	NA	12	Sylvia and Hubbel (1986)
Aeroponic	Bahia grass	630	NA	17-28%		12-14	Hung and Sylvia (1988)
Aeroponic	Sweet potato	4500	NA	21%	NA	12-14	
Pot (sand)	Linseed	NA	NA	75%	NA	13	Dugassa et al. (1995)
Hydroponic		NA	NA	80%	NA	13	
			#/L of M medium				
Dual compartment Petri dish ^a	Carrot hairy roots	500,000	67%	NA	NA	16	St-Arnaud et al. (1996)
Petri dish (liquid) ^b	Carrot hairy roots	30,000 ± 11,500	60%	25-50%	33% ^d	12	This work
Airlift bioreactor ^c	Carrot hairy roots	12,400 ± 800	58%	25-75%	30% ^d	12	This work

^aActual spore production in a two-compartment Petri dish as described by St-Arnaud et al. (1996).

^bActual spore production in a standard Petri dish filled with 0.02 L liquid M medium and 0.015 g DW inoculum.

^cActual spore production in a 1-L airlift bioreactor filled with 0.5 L liquid M medium and 0.065 g DW inoculum.

^dPercentage of 1 cm pieces of mycorrhiza producing hyphal growth on subculture.

*NA, non-available. Error data are 95% confidence interval values.

L'approche des racines transformées est donc une approche intéressante pour des productions à plus grande échelle de champignons endomycorhiziens car ces racines poussent plus rapidement que les non transformées, n'ont pas besoin d'ajouts de régulateur de croissance et permettent une protection au réseau mycélien. Elles sont également un bon substrat pour l'étude de toutes sortes d'autres relations symbiotiques : nématodes biotrophiques, bactéries colonisatrices de racines, insectes se nourrissant de racines (Mugnier, 1998).

2.2 LES MÉTABOLITES SECONDAIRES

Un autre domaine d'intérêt pour les racines transformées est leur utilisation pour la production de métabolites secondaires. Les industries cosmétiques, alimentaires, pharmaceutiques et chimiques utilisent une multitudes de métabolites secondaires de plantes qui servent, entre autres, comme fragrances, saveurs, pesticides, médicaments, enzymes, pigments, protéines, autres additifs alimentaires, préservatifs naturels et vitamines. Les métabolites secondaires ne sont pas synthétisés par les métabolismes de base (primaires) et sont spécifiques à une espèce, un genre ou une famille. Ils sont généralement produits par la plante comme mécanisme de défense en réaction à une infection microbienne ou autre. Les produits chimiques ainsi formés s'accumulent sur les sites d'infection.

La production de masse de ces produits à forte valeur ajoutée par des plantes en champs est limitée à cause de leur faible taux de croissance, de leur dépendance au climat, de la qualité et de la quantité variables du matériel biologique et des zones de culture limitées. Ils ont souvent une structure complexe, difficile à synthétiser chimiquement à prix compétitif (Toivonen, 1993; Verpoorte *et al.*, 1993). La culture de cellules comme les cals, les embryons et les tiges a d'abord été utilisée pour tenter de contrer ces inconvénients, ce qui a permis la réalisation de cultures contrôlées. On a ainsi obtenu des cultures de cellules rapides et des taux reproductibles. Dans certains cas, plusieurs problèmes sont pourtant apparus lors des recherches : productions instables dues à l'hétérogénéité génétique et biochimique, et difficulté à oxygéner adéquatement les

bioréacteurs (Taya *et al.*, 1989). Pour certaines plantes, la productivité et le rendement en produits ont été les principales limitations à une utilisation industrielle plus étendue de cultures de cellules (Toivonen, 1993). Pour ces plantes à faible productivité, beaucoup d'efforts ont été consacrés au développement de milieux et de conditions de culture pour promouvoir une production stable, mais généralement, sans le succès escompté.

Les cultures de racines chevelues ont donc offert une alternative intéressante pour certaines plantes dans le but de produire commercialement des métabolites secondaires (Flores *et al.*, 1987; Rhodes *et al.*, 1987; Toivonen *et al.*, 1992). Ce type de culture est plus stable, plus robuste aux variations environnementales, et le métabolisme est mieux régulé car une racine est un tissu organisé de plusieurs cellules, contrairement aux cellules en suspension ou les cals qui ne sont pas organisés. Les rendements en produits sont semblables ou supérieurs à ceux des plantes mères et on retrouve même des produits non formés dans les racines non transformées (à cause des différences entre les mécanismes de régulation). Par exemple, Yonemitsu *et al.* (1990) sont les premiers à transformer les racines de *Lobelia inflata* pour produire de la lobeline à un niveau comparable à la plante mère et aux cals. Les racines chevelues ayant une croissance supérieure aux cals (le taux de croissance des cals est d'environ $0,1 \text{ j}^{-1}$, Dixon 1985, et celui des racines peut atteindre $0,24 \text{ j}^{-1}$, Taya *et al.*, 1989) représentent un meilleur système au niveau de la stabilité pour la production de la lobeline. De la vindoline servant à la production de vinblastine (médicaments contre le cancer) a été

détectée pour la première fois par Bhadra *et al.* (1993) dans des racines chevelues de *Catharanthus roseus*. Seulement de très faibles quantités avaient été détectées dans les cultures de suspensions de cellules, alors qu'avant même optimisation, des niveaux 3 fois supérieurs ont été détectés dans les racines transformées.

Les métabolites secondaires sont accumulés soit intracellulairement (dans les vacuoles ou autres organelles) ou extracellulairement (liés à la paroi cellulaire ou relargués dans le milieu). Il est préférable que les produits d'intérêt soient libérés dans le milieu plutôt qu'accumulés intracellulairement. Plusieurs moyens sont tentés pour favoriser la sécrétion : composés biotiques (origine biologique : fragments de paroi cellulaire de champignon pathogène ou de la plante) ou abiotiques (métaux lourds, concentration en sels élevée, les stress abiotiques étant moins efficaces que les stress biotiques), milieu chaud, froid, électricité ou ultrasons. Parce que l'ajout d'additifs peut impliquer aussi l'introduction de contaminants, ce type de solution est parfois mis de côté. Certaines autres stratégies sont avantageuses pour favoriser la production : passage continu de milieu frais dans la culture, adsorbants polymériques qui récoltent le produit lorsqu'on y fait circuler le milieu de culture, technique des deux phases liquides (Buitelaar *et al.*, 1991). Pour cette dernière méthode, on utilise des milieux différents, un pour la croissance des racines et un pour la production (qui limite la croissance mais stimule la biosynthèse). Muranaka *et al.* (1993) ont obtenu ainsi une production de $1.3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de scopolamine à partir de racines chevelues de *Duboisia leichhardtii* après 11 semaines

de culture dans un bioréacteur de 1 L agité par des pales, avec un grillage en acier inoxydable cylindrique dans le volume du bioréacteur séparé des pales.

Une autre méthode pour améliorer la sécrétion consiste à priver les cellules d'oxygène par l'alimentation en azote au lieu d'air. Cette méthode a été utilisée avec succès sur des racines chevelues de *Beta vulgaris* pour la production de pigment rouge (Kino-Oka *et al.*, 1992). Une privation totale d'air a été nécessaire pour une durée maximale de 16 h, au-delà de laquelle les racines ont une phase de latence très longue avant de se remettre à croître. La production a atteint $11.3 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ pour 450 h de culture, 4 périodes de 16 h de privation en oxygène, et une biomasse finale de $11.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, dans un bioréacteur agité de 1 L utile avec grillage pour séparer les racines des pales. De par une étude cinétique, afin d'optimiser la production de pigments, une production totale de $2.7 \times 10^{-4} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ est obtenue pour 3 périodes de 16 h de privation d'oxygène (Kino-Oka et Tone, 1996). Cette étude a montré que la production de pigments par les cellules est directement reliée à la diminution de la viabilité des cellules.

2.3 LES RACINES TRANSFORMÉES

Les racines chevelues sont intéressantes par rapport aux autres cultures à cause de nombreuses caractéristiques qui leur sont propres : leur capacité à croître indéfiniment dans un milieu sans phytohormones, leur capacité à accumuler et à synthétiser des produits à forte valeur ajoutée à des niveaux comparables à la plante mère (Flores *et al.* 1987), leur grande stabilité génétique (donc plus grande reproductibilité permettant de

prédire la croissance et le niveau de production). Les racines chevelues sont souvent caractérisées par leur haut niveau de croissance latérale, une profusion de poils absorbants, et l'absence de géotropisme ou un géotropisme inverse. La transformation des racines par *Agrobacterium rhizogenes* se fait par l'intégration d'un segment de ADN (Ri T-DNA) du plasmide Ri (inducteur de racines) dans le génome de la plante, ce qui provoque la prolifération de racines adventives (racines qui poussent latéralement) sur le lieu de la transformation. Cette transformation produit des cultures stables qui continueront à croître indéfiniment en racines, et une production stable de plusieurs métabolites sur plusieurs années, en contraste avec les cultures de racines normales (Mugnier, 1988). De plus, les racines sont des organes différenciés, ce qui semble être nécessaire pour certaines biosynthèses de produits phytochimiques qui sont couplées à la différenciation morphologique (Bhadra *et al.*, 1993).

Les racines transformées sont différentes morphologiquement des racines non transformées : elles sont beaucoup plus ramifiées, donc possèdent plus de points de croissance méristématique, ce qui entraîne une croissance globale plus rapide que pour les racines normales. La morphologie des racines chevelues varie d'abord avec l'espèce de la plante, mais aussi avec d'autres facteurs non inhérents à la racine, tel le milieu de culture (Yonemitsu *et al.*, 1990). La morphologie des racines dans des cultures en boîte de Pétri peut varier d'une forme d'amas compact à une forme de plusieurs poils absorbants et beaucoup de branchage latéral. La morphologie des racines comme la formation de métabolites peut aussi varier avec l'illumination et le

dosage d'hormones (Tone *et al.*, 1998). Il a été observé lors du choix de cultivars parmi 150 clones que les 5 choisis pour la meilleure croissance étaient minces, fines, et possédaient des branches régulières avec des bouts fins (Bhadra *et al.*, 1993). Un autre élément à considérer est le niveau de branchage des racines. Beaucoup de branchage favorise la formation d'amas de racines et augmente le risque d'un mauvais transfert d'oxygène. Des racines moins branchées auront tendance à être mieux distribuées. La morphologie des racines est donc un des critères importants qui influencent de façon marquée le comportement des racines en bioréacteur.

Les racines transformées sont très fragiles et sensibles aux forces de cisaillement, ce qui est une grande contrainte. Cette sensibilité varie d'une espèce à une autre. Par exemple, Nuutila *et al.* (1994) ont observé que les racines de *Catharanthus roseus* sont très sensibles au cisaillement à tel point qu'ils ont dû renoncer à utiliser leur colonne à bulles avec pales. Par contre, une culture d'*Ajuga reptans* a donné une bonne croissance dans un bioréacteur à pales où le cisaillement est important (Uozumi *et al.*, 1993). Il est donc essentiel de tenir compte de cette caractéristique lors du design d'un bioréacteur.

Une autre utilité des racines chevelues est qu'elles peuvent servir de modèle pour l'étude de la bioaccumulation de métaux lourds dans les plantes (Macek *et al.*, 1998), les racines étant les premiers agents de contact entre la plante et les métaux lourds. Le cadmium, le mercure ainsi que le plomb sont très toxiques à forte concentration et ils

ont tendance à s'accumuler dans l'environnement. Les traitements conventionnels de sols contaminés sont très coûteux, et les tests sur les microorganismes ne sont possibles que sous une certaine concentration en métaux lourds. C'est pourquoi il s'est développé un intérêt pour la phytoremédiation, l'utilisation de plantes *in situ* pour la décontamination.

Nous avons vu que les caractéristiques des racines transformées sont intéressantes à plusieurs points de vue. Par contre, certaines risquent de poser problème lors des cultures en bioréacteur et nous verrons dans la prochaine section les stratégies utilisées lors du design du bioréacteur pour contourner ces obstacles.

2.4 LES DESIGNS DE BIORÉACTEURS

Le design du bioréacteur est de première importance. Pour favoriser la production et ainsi augmenter la rentabilité des opérations, les racines chevelues doivent être cultivées dans des bioréacteurs de grande taille. Les racines elles-mêmes présentent un défi unique en tant que structure filamenteuse, entrelacée et distribuée de façon non homogène dans le bioréacteur. Les principales difficultés proviennent de l'inoculation, de la densité du lit de racines, de la sédimentation rapide des racines dans le liquide, de la sensibilité des racines par rapport aux forces de cisaillement et de la prise d'échantillon représentatif de racines qui est impossible. Le défi d'un design de bioréacteur est de fournir simultanément des nutriments dans la phase liquide et de l'oxygène dans la phase gazeuse.

La première difficulté énoncée est l'inoculation des bioréacteurs. C'est une étape de première importance qui influence la qualité de la distribution des racines pendant la culture. Une bonne inoculation doit assurer une répartition de l'inoculum dans l'ensemble du volume du bioréacteur. Pour les bioréacteurs submergés, la difficulté est moins grande parce qu'il est plus aisé de disperser l'inoculum de façon homogène dans le milieu de culture. Mais pour les bioréacteurs non submergés, une solution consiste à accrocher les racines préliminairement à l'inoculation à des supports de culture. Une autre solution est d'opérer un bioréacteur avec supports de culture en mode submergé pendant les premiers jours de culture pour permettre aux racines de s'accrocher et ensuite d'adopter un mode non submergé (Ramakrishnan *et al.*, 1994).

Une culture trop dense peut conduire à des limitations en oxygène et en nutriments, entraînant des problèmes de transfert d'oxygène qui peuvent conduire à une perte de productivité et possiblement à la lyse des cellules. Un transfert d'oxygène adéquat peut être très difficile à obtenir car les conditions à l'intérieur des amas de racines peuvent être très différentes des conditions dans le liquide ambiant. L'oxygène est un des nutriments les moins solubles dans l'eau et risque donc de devenir le substrat limitant. À cause de la couche limite qui se forme à la surface des racines submergées ou mouillées, le transfert d'oxygène est fonction de la vitesse d'écoulement du liquide et de la pénétration de courants convectifs à l'intérieur des amas de racines. Une façon d'éviter ce problème peut être l'installation de plusieurs points d'alimentation

d'oxygène dans le bioréacteur (Kwok et Doran, 1995). Il pourrait aussi être tentant de tout simplement augmenter la vitesse d'écoulement du liquide afin de contrer les limitations de transfert. Cette option doit être prise avec prudence car Hitaka *et al.* (1997) ont montré que des vitesses d'écoulement de liquide relativement élevées ont un effet négatif sur la croissance de racines de *Beta vulgaris*, à cause du dommage créé sur les zones de croissance des racines par le haut niveau de cisaillement.

Il semble que la configuration du bioréacteur et l'espèce de racines utilisée soient des paramètres très importants pour la culture de racines transformées. Certaines espèces sont insensibles aux différences de design des bioréacteurs alors que d'autres répondent positivement à certaines formes de bioréacteurs (Whitney, 1992). Nuutila *et al.* (1994) suggèrent que l'effet des forces de cisaillement sur les racines est fonction de l'espèce de racine utilisée. Le mode de culture doit donc être bien choisi, d'autant plus qu'une alimentation liquide brouillard peut être plus favorable qu'un mode submergé pour la production de certaines substances (Weathers *et al.*, 1998).

De plus, certaines limitations du mode submergé ont été relevées pour la culture de racines. McKelvey *et al.* (1993) laissent supposer que l'utilisation de bioréacteurs submergés devra être limitée à des cultures peu denses à cause du fait que les zones requérant le plus d'oxygène sont aussi les zones présentant la plus grande résistance à l'écoulement. Pour Carvalho et Curtis (1998), il semble peu probable que des cultures à forte densité puissent être obtenues par des bioréacteurs en mode submergé sans de

très fortes limitations en oxygène, à cause de l'énergie très importante qui doit être dépensée pour créer les pertes de charge suffisantes pour fournir l'oxygène nécessaire. Il semble aussi que les racines compensent mieux une mauvaise distribution de liquide qu'une mauvaise distribution d'air grâce au transport vasculaire (McKelvey *et al.*, 1993).

2.4.1 Supports de culture

Les supports de culture sont utilisés dans plusieurs bioréacteurs pour favoriser une distribution des racines dans tout leur volume et éviter la formation d'amas très denses de racines qui nuisent au transfert d'oxygène. Une grande diversité de support est employée : mousse de polyuréthane réticulée (Taya *et al.*, 1989), support de grillage de nylon (Weathers *et al.*, 1989; Dilorio 1992; Chatterjee *et al.*, 1997), billes de verres de 3.5 mm de diamètre (Whitney, 1992), sphères en mailles métalliques (pour le thé) (Yu *et al.*, 1994), garnissage pour distillation (Ramakrishnan *et al.*, 1994; Carvalho et Curtis, 1998), picots de fil de fer barbelé installés en chaîne (Wilson, 1998).

2.4.2 Bioréacteurs agités mécaniquement

2.4.2.1 Flacons agités

Les flacons agités fournissent un assez bon rendement en biomasse et en production de métabolites secondaires. Les cultures en flacons agités ne sont pas appropriées pour l'optimisation et le contrôle continu des conditions de culture, et impossibles à mettre à l'échelle. Ce sont souvent des systèmes modèles pour la comparaison des rendements

des autres designs de bioréacteurs. Les flacons agités sont utilisés pour les sous-cultures et leurs racines servent d'inoculum pour les bioréacteurs.

2.4.2.2 Bioréacteurs agités

Les bioréacteurs agités possèdent un système d'agitation à pales ou à hélices qui remuent directement le milieu de culture, avec souvent un système d'aération par bullage en bas de réacteur (voir figure suivante).

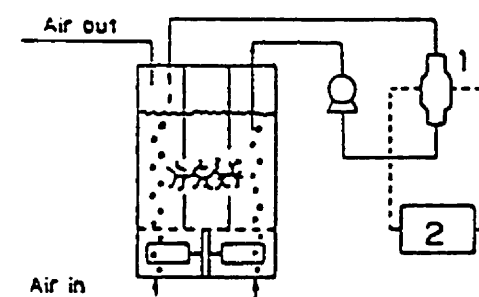


Figure 2-1 Bioréacteur agité à pales avec aération à la base (Kondo *et al.*, 1989)

Il a été observé la présence d'irrégularités dans des cultures dues aux amas de racines en croissance, ce qui pourrait expliquer les mauvais résultats de ces cultures (Taya *et al.*, 1989). Un exemple plus réussi montre qu'à l'aide d'un bioréacteur à pales de 1 L, une culture avec un inoculum de 2 g WW de *Ajuga reptans* et du glucose comme source de carbone, a permis d'obtenir une biomasse de $27.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ DW en 39 jours de culture (Uozumi *et al.*, 1993). Dans cette culture, il a aussi été observé qu'il y a de fortes probabilités d'endommager les racines par la rotation des pales ou par les forces de cisaillement, ce qui cause la formation de cals ainsi qu'une désorganisation des racines provoquant une diminution de la production (Hilton et Rhodes, 1990; Kim et

Yoo, 1993; Nuutila *et al.*, 1994). Un moyen pour éviter cet endommagement est de séparer les pales du volume de culture par un grillage (qui sert aussi de support de culture). De cette façon, une culture de *Daucus carota* a produit une masse de $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ DW à partir de 0.2 g DW d'inoculum pour 30 jours de culture dans un bioréacteur de 1 L (Kondo *et al.*, 1989). Le bon rendement peut être dû au fort transfert d'oxygène qui est produit dans ces bioréacteurs (Kondo *et al.*, 1989). Une culture de *Datura stramonium* a produit une masse de 248 g WW en 37 jours de culture ($17.7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ dans un bioréacteur de 14 L) à partir de $40\text{-}60 \text{ g WW}$ d'inoculum (Hilton et Rhodes, 1990). L'installation d'un grillage tubulaire sur toute la hauteur du réacteur dans la zone au-dessus des pales améliore la croissance et la bonne distribution dans le bioréacteur (Muranaka *et al.*, 1993). De cette façon, une masse de 84 g WW de *Duboisia leichhardtii* est obtenue en 16 semaines dans un bioréacteur de 0.6 L inoculé avec 10 g WW de racines. Un problème risque de survenir lorsque la concentration en racines devient plus importante. En effet, les racines couvrent alors toute la grille ce qui bloque le passage des bulles et conduit à une carence en oxygène (Kim et Yoo, 1993).

2.4.2.3 Tambour rotatif

Dans le tambour rotatif les racines sont submergées dans le milieu qui est mélangé par la rotation du bioréacteur. L'aération est assurée par l'oxygène de surface qui diffuse dans le liquide (voir figure suivante).

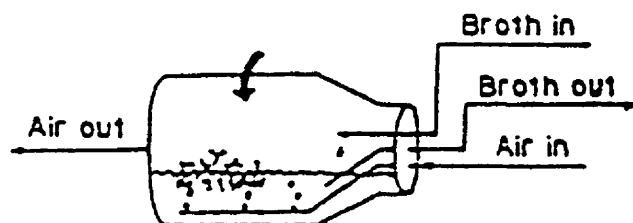


Figure 2-2 Bouteille rotative (Kondo *et al.*, 1989)

Le principal problème de ce bioréacteur est que les racines ont tendance à coller aux parois pour ensuite retomber lorsqu'elles sont hors du liquide, ce qui les endommage. Une façon d'éviter ce problème est de coller une feuille de mousse de polyuréthane sur la paroi. Les racines s'y accrochent et croissent d'environ $12 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ DW à partir de 0.2 g DW d'inoculum de *Daucus carota* pour 40 jours de culture dans un bioréacteur de 10 L (Kondo *et al.*, 1989). Ce bon rendement peut être attribué au fort transfert d'oxygène produit par ce type de bioréacteur (Kondo *et al.*, 1989).

2.4.2.4 Bioréacteurs agités horizontalement

Dans les bioréacteurs agités horizontalement, les forces de cisaillement moyennes sont moins importantes que dans les bioréacteurs agités par pales. L'oxygène nécessaire est fourni par échange sur la surface libre du milieu (voir figure suivante). Pour des vitesses de rotation supérieures à 120 rpm , il est possible que les tissus soient abîmés à cause du stress hydrodynamique trop important (Honda *et al.*, 1997). Cette configuration est particulièrement sujette à des limitations de transfert d'oxygène.

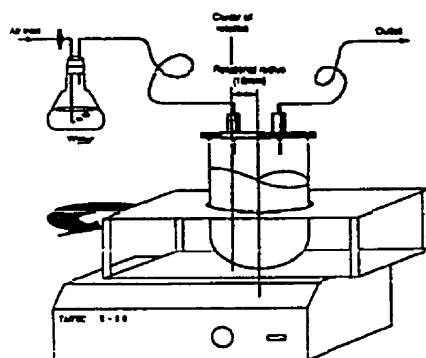


Figure 2-3 Bioréacteur agité horizontalement (Honda *et al.*, 1997)

2.4.3 Bioréacteurs à air forcé

2.4.3.1 Colonne à bulles

La colonne à bulles est un bioréacteur comportant un ratio hauteur sur diamètre élevé. Le mélange est obtenu par le passage de bulles créées par un distributeur placé au bas de la colonne.

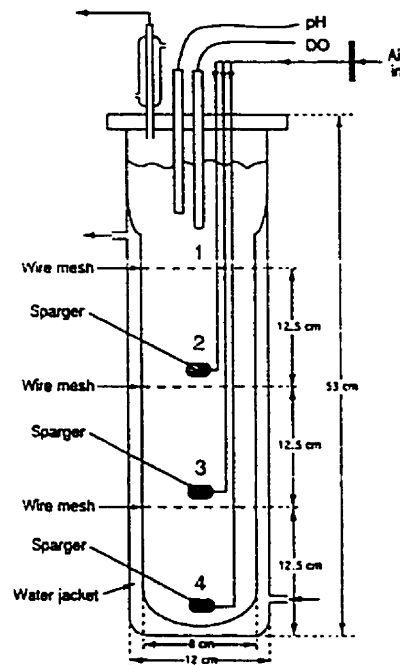


Figure 2-4 Bioréacteur à bulles (Kwok et Doran, 1995)

McKelvey *et al.* (1993) suggèrent que la colonne à bulles peut limiter sévèrement la croissance à cause du gaz circulant par chemin préférentiel et du mélange de liquide affaibli. Ils montrent que la faible croissance n'est pas due à l'enlèvement du CO_2 par les bulles (le CO_2 étant un stimulateur de croissance pour les racines) ni au cisaillement causé par les bulles. Liu *et al.* (1998) ont observé une formation d'amas de racines qui se déposent au fond du bioréacteur et poussent vers le haut.

Une légère modification de cette configuration consiste en l'utilisation d'un support de culture. Des grilles en acier inoxydable disposées en étages sur toute la hauteur du bioréacteur est un type de support qui aide les bulles à circuler même pour des concentrations en racines élevées, ce qui permet de conserver des $k_L a$ élevés. Une

concentration en racines de $20.9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ DW de *Daucus carota* pour 25 jours de culture est obtenue dans un bioréacteur de 2 L utiles (Kim et Yoo, 1993) par cette méthode. De plus, cette configuration permet d'augmenter l'espace disponible pour la croissance et augmente le nombre de points actifs de croissance. Liu *et al.* (1998) ont ainsi obtenu des cultures homogènes de $24.8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ DW dans leur bioréacteur de 2,5 L avec 4 g WW d'inoculum de racines d'*Artemisia annua* en 20 jours.

Nuutila *et al.* (1994) ont essayé différentes modifications du bioréacteur afin d'augmenter le transfert, soit par l'ajout d'une recirculation du milieu par une pompe ou par l'ajout d'un mélange mécanique par des pales. Ces modifications ont eu pour effet d'augmenter les forces de cisaillement auxquelles *Catharanthus roseus* est très sensible et de très mauvaises croissances ont été observées. Ces modifications pourraient quand même être utilisées sur d'autres espèces de racines moins sensibles.

2.4.3.2 Bioréacteur gazosiphon

La configuration gazosiphon est très similaire à la colonne à bulles avec pour différence que la circulation du liquide est dirigée. Un cylindre est placé au centre du bioréacteur, par lequel les bulles poussent le liquide vers le haut, qui redescend ensuite de l'autre côté.

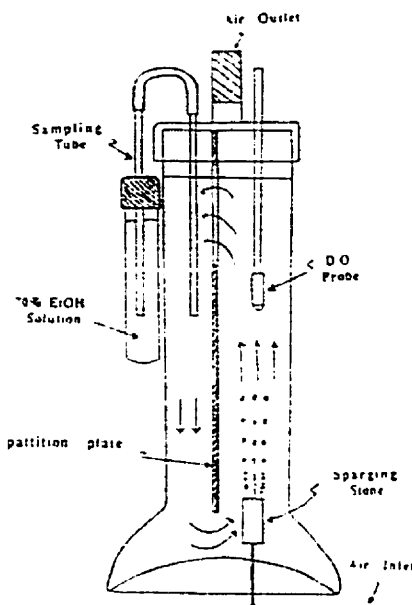


Figure 2-5 Bioréacteur gazosiphon (Hong *et al.* 1989)

Il est observé que les racines sont expulsées hors du milieu à cause des bulles, ce qui pourrait expliquer les mauvais résultats des cultures (Taya *et al.*, 1989). Il est tout de même possible d'obtenir des cultures de $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ DW pour 0.2 g DW d'inoculum de *Daucus carota* pour 50 jours de culture dans un bioréacteur de 1 L (Kondo *et al.*, 1989). Un gazosiphon (2.5 L de volume utile) avec de l'air bullé sur toute la hauteur du bioréacteur et 3 étages en grillage a donné une croissance homogène de $26.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ DW en 20 jours avec un inoculum de 4 g WW d'*Artemisia annua* (Liu *et al.*, 1998). L'immobilisation des racines sur de la mousse en polyuréthane (Taya *et al.*, 1989) donne $11 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ DW de *Armoracia rusticana* pour 31 jours de culture dans un bioréacteur de 0.3 L utile et un inoculum de 0.3 à $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ DW. L'utilisation d'un support de culture en mousse de polyuréthane a permis d'augmenter la croissance de

50% dans un autre bioréacteur (Muranaka *et al.*, 1993) et de mieux distribuer les racines pour ainsi augmenter la production de métabolites secondaires de 100%. Ainsi, un inoculum de 30 g WW de *Duboisia leichhardtii* dans un bioréacteur de 3 L permet d'obtenir une masse de 420 g WW en 12 semaines de culture.

2.4.4 Bioréacteurs à liquide circulant

2.4.4.1 Bioréacteurs à convection forcée

Le bioréacteur à convection forcée comporte un réservoir où le milieu est enrichi en oxygène par bullage et un tube où les racines poussent sur des supports de culture. La circulation du fluide est forcée à travers le lit de racines par le pompage du nouveau milieu par le bas du bioréacteur (voir figure suivante). Le bioréacteur est d'abord opéré en mode colonne à bulles pour permettre l'accrochage des racines sur les supports de culture. De très bonnes densités de racines sont obtenues avec ce type de bioréacteur : un inoculum de 8 g WW donne 25,3 g·L⁻¹ DW en 30 jours de culture de *Hyoscyamus muticus* dans un bioréacteur de 14 L, presque deux fois plus que le contrôle en mode colonne à bulles seul (Carvalho et Curtis, 1998). De plus il est montré qu'une même masse de racines consomme environ 3 fois plus d'oxygène dans ce type de bioréacteur que dans un colonne à bulles, laissant croire que dans une colonne à bulles, les racines nuisent au transfert d'oxygène en favorisant la coalescence des bulles.

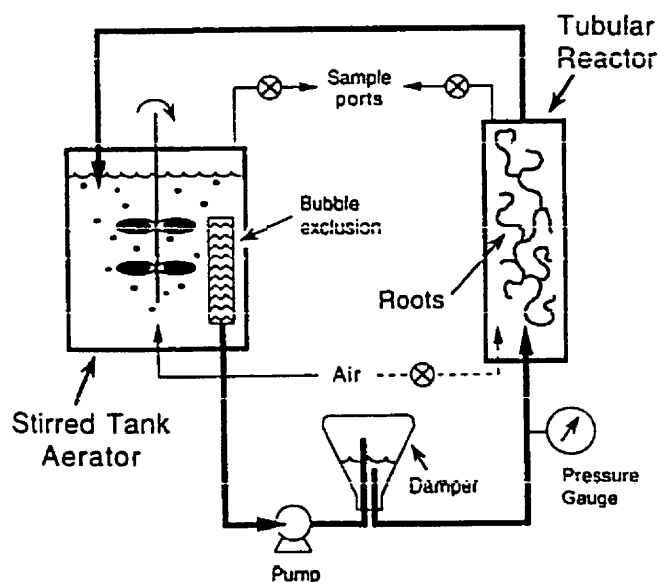


Figure 2-6 Bioréacteur à convection forcée (Carvalho et Curtis, 1998)

2.4.4.2 Bioréacteur ruisselant alimenté par gouttelettes

Le bioréacteur ruisselant ou à percolation est un type de réacteur où le milieu percole à travers un lit, puis est circulé et pulvérisé en gouttes de 10 μm à 1 mm au dessus d'une colonne de racines (figure 2-7). C'est une configuration qui permet un bon contact du milieu avec les racines et de même qu'avec la phase gazeuse pour assurer un renouvellement de l'oxygène à mesure que le milieu s'en appauvrit. De plus, puisque la phase principale est gazeuse, la croissance risque moins d'être limitée en oxygène. Il s'agit d'une configuration simple qui nécessite peu d'énergie. McKelvey *et al.* (1993) montrent qu'il est possible d'atteindre des croissances comparables à celles des cultures en flacons agités et que cette configuration serait indiquée pour la mise à l'échelle, à conditions qu'il y ait une bonne distribution du liquide et des racines dans le

bioréacteur. Ils obtiennent une masse de 1.09 g DW dans un bioréacteur de 250 mL avec un inoculum de 26 mg DW de racines d'*Hyoscyamus muticus* en 18 jours de culture. Pour le bioréacteur goutte à goutte (goutte un peu plus grosse que par une pulvérisation), une aération à contre-courant et 5 étages en grillage, un volume de 1L donne les mêmes croissances que pour des flacons agités avec une masse de 135 g de *Datura stramonium* en 50 jours de culture (Holmes *et al.*, 1998). Par contre, les gouttes très fines sont à favoriser car elles augmentent le contact entre les racines et les nutriments, le cas contraire entraînant une limitation de croissance à cause du manque de nutriments (Nuutila *et al.*, 1997).

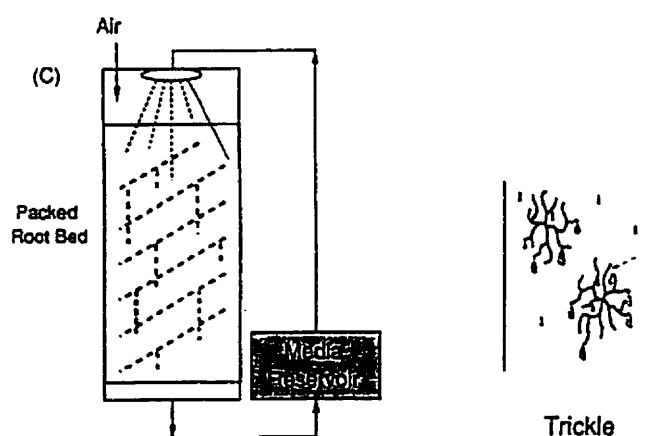


Figure 2-7 Bioréacteur ruisselant (Singh *et al.*, 1994)

Afin d'obtenir une bonne distribution des racines (et par le fait même du liquide) dans le bioréacteur, l'utilisation d'un support de culture est un choix judicieux. Selon Taya *et al.* (1989) la culture sur une mousse en polyuréthane ne donne pas une bonne croissance, sans pouvoir en expliquer la raison. Un autre essai avec des billes de verres (3.5 mm) donne une croissance supérieure à un système en mode submergé et donne un

rendement équivalent aux cultures en flacons agités (Whitney, 1992). Une masse de 58,9 g WW de *Nicotiana tabacum* est obtenue à partir d'un inoculum de 55 mg en 28 jours de culture. Par contre, la récolte s'est avérée difficile car les racines adhèrent aux billes de verre. Dans une colonne de 2,5 L à 3 points d'alimentation en gaz uniformément réparti sur la hauteur du bioréacteur et 4 points d'inoculation (support en grillage), une concentration de $9,9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ DW est obtenue à partir d'un inoculum d'*Atropa belladonna* de $0,06 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ DW pour 43 jours de culture cuvée (Kwok et Doran, 1995).

Pour favoriser l'accrochage des racines sur les supports de culture, une stratégie est imaginée par Ramakrishnan *et al.* (1994). La culture est d'abord opérée en mode submergé, de type colonne à bulles et lorsque les racines sont bien accrochées au support de culture, le milieu est drainé et le bioréacteur est opéré en mode ruisselant. Il est peu probable que les problèmes habituellement reliés au mode submergé apparaissent ici car ils surviennent lorsqu'il y a une grande concentration de racines, ce qui n'est pas le cas en début de culture. Il est possible que, lors d'une mise à l'échelle, il y ait formation de chemins préférentiels dans les amas de racines, mais la capacité qu'ont les racines à transporter de façon interne par vascularisation les nutriments d'une zone à une autre aide à compenser ce problème hydrodynamique (McKelvey *et al.*, 1993).

Pour l'équipe de Wilson (1998), ce sont les bonnes caractéristiques de croissance, le bon taux de transfert d'oxygène, la faible dilution des produits dans le milieu ainsi que la facilité à suivre la croissance par la méthode du drainage-pesée qui les a incité à choisir un bioréacteur ruisselant avec support de culture comme bioréacteur pilote de 500 L. Le support de culture est constitué de picot (petite pointe) de fil de fer barbelé installé en chaîne. Après 40 jours de culture, une masse humide de 39.8 kg de racines de *Datura stramonium* est obtenue de façon non optimale à cause de leur système de contrôle des nutriments non adapté. De plus, une très bonne distribution est obtenue, sans amas très dense de racines.

2.4.4.3 Bioréacteur ruisselant alimenté par brumisateur

Dans le bioréacteur à brume, le milieu est dispersé en très fines gouttelettes (comme une brume) de diamètre variant de 0,01 μm à 10 μm à l'aide d'un transducteur ultrasonique ou d'une buze couplée à de l'air comprimé. La brume est transportée par un courant d'air (voir figure suivante). L'avantage d'un tel bioréacteur est que les racines sont continuellement baignées dans la brume de milieu de culture permettant l'alimentation en nutriments et l'enlèvement des déchets toxiques. L'utilisation d'un brouillard de très fines particules ainsi que d'un cycle marche-arrêt limite la formation de films épais sur les racines qui pourraient limiter le transfert d'oxygène. La principale limitation réside dans le transport et la disponibilité de gouttelettes sur la surface des racines. Il a été montré que le cycle optimal marche-arrêt est de 5 minutes d'alimentation liquide, et de 6 minutes d'aération (Dilorio *et al.*, 1992).

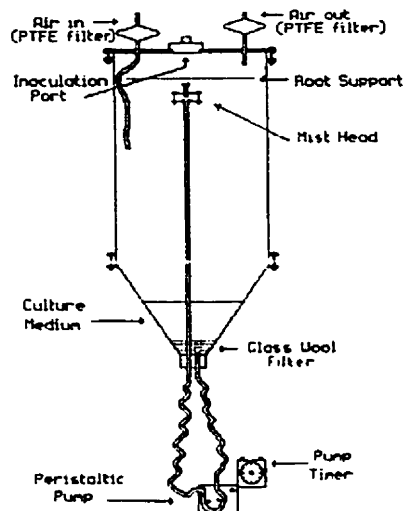


Figure 2-8 Bioréacteur à brume (Whitney, 1992)

Par ailleurs, des cultures de *Beta vulgaris* et *Carthamus tinctorius* ont montré des croissance équivalentes à celles des cultures en flacons agités (DiIorio *et al.*, 1992). La position de l'alimentation du milieu dans le bioréacteur est très importante et il semble que la croissance soit meilleure lorsque le brumisateur se situe en dessous des racines (Whitney, 1992). Ceci est probablement dû au fait que seules les très petites gouttes sont en contact avec les racines car ces gouttes sont plus facilement emportées par un courant d'air ascendant. La croissance des racines obtenue est meilleure que dans un système en mode submergé et peut donner une croissance jusqu'à 1.16 fois supérieure à une culture en flacon agité. En effet, une masse de 127,6 g WW de *Nicotiana tabacum* est obtenue dans un bioréacteur de 35 L en 28 jours de culture à partir d'un inoculum de 37,5 mg WW. Woo et Park (1996) montrent que la disponibilité de la brume pour les racines (ratio du volume de brume fourni aux racines sur le volume de brume

disponible) augmente à mesure que les racines poussent, à cause d'une plus grande coalescence de la brume due à l'agrandissement du réseau de racines.

Dans le bioréacteur à brume modifié (0.8 L de volume utile) construit par Chatterjee *et al.* (1997), un brunissement des racines est observé après 12 jours de culture, ce qui est probablement dû à un manque de nutriment. Ce problème peut être résolu par une culture cuvée où une alimentation supplémentaire en nutriments est faite au douzième jour de culture. Les cultures d'*Artemisia annua* dans un bioréacteur de 0.8 L ont donné des ratio de 7.4 WW finale sur WW initiale pour une durée de 24 jours. Pour Weathers *et al.*, (1998) 37 g WW *Beta vulgaris* sont obtenues à partir d'un inoculum de 4.5 g WW en 14 jours avec un débit d'air de $1500 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ dans un bioréacteur de 1.2 L pour 5 minutes en marche et 6 minutes à l'arrêt de brouillard pour un débit global de liquide de $0.19 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, ce qui semblait tout de même insuffisant pour une nutrition adéquate. L'ajout de CO_2 lors de la culture n'augmente pas la croissance mais diminue sensiblement (environ 2 jours) la phase de latence.

La configuration du bioréacteur à brume n'en est donc pas encore à son design optimal. Woo et Park (1996) avancent même que les dimensions maximales pour un bioréacteur utilisant l'air comme transporteur pour le milieu seraient de 2 à 3 dm^3 avant d'être limité en nutriments. Ils considèrent donc ce type de bioréacteur non adéquat pour la culture rapide de racines dans un but de production, puisque l'alimentation nécessaire en nutriment pour favoriser une croissance maximale est limitée lors de la mise à

l'échelle par les problèmes reliés aux débits d'air requis. La croissance maximale qu'ils ont réussi à atteindre dans un bioréacteur de 5 L à partir d'un inoculum de 3 g WW est de 9.29 fois l'inoculum en 25 jours, comparativement à 21.4 pour les cultures en flacons de *Hyoscyamus niger* non transformées.

2.4.5 Comparaison des designs de bioréacteurs

Afin de rassembler l'information donnée sur les différents bioréacteurs et d'en faire une meilleure interprétation, le tableau suivant présente un résumé des configurations étudiées précédemment. C'est un outil qui permet une comparaison, mais il est à noter que la sorte de racines et les autres conditions de culture (sorte de milieu, débit liquide et gazeux, type d'alimentation gazeuse...) influencent aussi la performance des bioréacteurs.

La croissance apparente est calculée en prenant la différence entre la masse humide finale et la masse humide initiale, divisée par le temps de culture et le volume du bioréacteur. Le rapport de la masse sèche sur la masse humide est le même pour tous les cas et il est estimé à 15 g DW/ g WW.

Tableau 2-2 Comparaison des différents designs de bioréacteurs

Configuration	Support de culture	Volume	Racines	Inoculum	Masse ou conc. Finale	Temps culture (j)	Croiss. app. (gWW/j L)	Référence
Agité avec pales		1 L	<i>Ajuga reptans</i>	2 g WW	27.2 g·L ⁻¹ DW	39	10.41	Uozumi <i>et al.</i> , 1993
Agité avec pales	1 grillage	1 L	<i>Daucus carota</i>	0.2 g DW	10 g·L ⁻¹ DW	30	4.9	Kondo <i>et al.</i> , 1989
Agité avec pales	1 grillage	14 L	<i>Datura stramonium</i>	40-60 g WW	248 g WW	37	0.363	Hilton et Rhodes, 1990
Agité avec pales	Grillage en tube	0.6 L	<i>Duboisia leichhardtii</i>	10 g	84 g WW	112	1.1	Muranaka <i>et al.</i> , 1993
Tambour rotatif	Mousse de polyur.	10 L	<i>Daucus carota</i>	0.2 g DW	12 g·L ⁻¹ DW	40	4.4	Kondo <i>et al.</i> , 1989
Colonne à bulles	Étages en grillage	2 L	<i>Daucus carota</i>	Inconnue	20.9 g·L ⁻¹ DW	25	< 12.5	Kim et Yoo, 1993
Colonne à bulles	3 grillages	2.5 L	<i>Artemisia annua</i>	4 g WW	24.8 g·L ⁻¹ DW	20	18.5	Liu <i>et al.</i> , 1998
Gazosiphon		1 L	<i>Daucus carota</i>	0.2 g DW	10 g·L ⁻¹ DW	50	2.94	Kondo <i>et al.</i> , 1989
Gazosiphon	3 grillages	2.5 L	<i>Artemisia annua</i>	4 g WW	26.8 g·L ⁻¹ DW	20	20	Liu <i>et al.</i> , 1998
Gazosiphon	Mousse de polyur.	0.3 L	<i>Armoracia rusticana</i>	0.3-0.5 g/L DW	11 g·L ⁻¹ DW	31	5.1	Taya <i>et al.</i> , 1989
Gazosiphon	Mousse de polyur.	3 L	<i>Duboisia leichhardtii</i>	30 g WW	420 g WW	84	1.55	Muranaka <i>et al.</i> , 1993
Convection forcée		14 L	<i>Hyoscyamus muticus</i>	8 g WW	25.3 g·L ⁻¹ DW	30	12.57	Carvalho et Curtis, 1998
Gouttelettes		0.25 L	<i>Hyoscyamus muticus</i>	26 mg DW	1.09 g DW	18	3.54	McKelvey <i>et al.</i> , 1993
Gouttelettes	4 grillages	2.5 L	<i>Atropa belladonna</i>	0.06 g/L DW	9.9 g·L ⁻¹ DW	43	3.43	Kwok et Doran, 1995
Gouttelettes	5 grillages	1 L	<i>Datura stramonium</i>	Inconnue	135 g WW	50	< 2.7	Holmes <i>et al.</i> , 1998
Gouttelettes	Pico de fer	500 L	<i>Datura stramonium</i>	Inconnue	39.8 kg WW	40	< 1.99	Wilson, 1998
Gouttelettes	Billes de verre	5 L	<i>Nicotiana tabacum</i>	55 mg WW	58.9 g WW	28	0.42	Whitney, 1992
Brume		1.2 L	<i>Beta vulgaris</i>	4.5 g WW	37 g WW	14	1.93	Weather <i>et al.</i> , 1998
Brume		35 L	<i>Nicotiana tabacum</i>	37.5 mg WW	127.6 g WW	28	0.13	Whitney, 1992
Brume		0.8 L	<i>Artemisia annua</i>	12-31 g WW	7.4 final/initial WW	24	8.47	Chatterjee <i>et al.</i> , 1997
Brume		5 L	<i>Hyoscyamus niger</i>	3 g WW	3.25 g·L ⁻¹ DW	25	1.93	Woo et Park, 1996

Les points marquants des configurations de bioréacteurs sont ici résumées. Les supports de culture favorisent une bonne distribution des racines et sont utilisés par un très grand nombre d'auteurs. Les limitations des bioréacteurs en mode submergé ont été énoncées par McKelvey et al. (1993) et par Carvalho et Curtis (1998) : création de chemins préférentiels, demande en énergie élevée pour fournir l'oxygène aux racines, limitation à des cultures peu denses car les zones de carence en oxygène sont aussi celles de résistance à l'écoulement. Due à la grande sensibilité des racines aux forces de cisaillement, les gros débits de liquide ainsi que les actions mécaniques trop intenses sont à éviter. Quant aux bioréacteurs ruisselants, ils favorisent un bon contact avec le milieu de culture et le gaz.

Les données du tableau montrent que les meilleures croissances apparentes ont été obtenues par Liu *et al.* (1998) dans une colonne à bulles et dans un gazosiphon, avec comme support de culture 3 grillages. Il est à remarquer que de si bonnes croissances sont obtenues dans un petit bioréacteur (2.5 L), et qu'il est peu probable que de telles croissances seraient possibles dans de plus grands bioréacteurs, à cause de ce qui a été dit précédemment.

Les croissances apparentes observées dans les bioréacteurs ruisselants à gouttelettes et à brume ne sont pas très élevées, malgré le grand potentiel de ces configurations. Les recherches dans ce sens étant très nombreuses, il est fort probable que d'ici quelques années cette situation sera différente.

2.5 DISTRIBUTION DE TEMPS DE SÉJOUR

Les mesures de distribution de temps de séjour (DTS) doivent être effectuées pour déterminer les temps moyens de résidence des bioréacteurs, afin de valider que les modèles de mélange développés lors du design reflètent bien les conditions réelles d'opération des bioréacteurs. Ils sont aussi utiles pour quantifier les non-idéalités des bioréacteurs, soient les zones stagnantes et les chemins préférentiels. Ces informations peuvent souvent guider des modifications dans le design des bioréacteurs. Mais surtout, les DTS servent à comparer différentes conditions opératoires.

Plusieurs paramètres sont intéressants pour comparer les différents DTS. Le temps de mélange est défini par Russell *et al.* (1994) comme étant le temps requis pour que la concentration du traceur diminue à un dixième de l'amplitude de la première crête de la réponse impulsionnelle. Un autre paramètre utilisé pour caractériser le mélange est l'amplitude de la première crête. L'analyse de la variance d'une distribution de temps de séjour permet de mesurer l'étendue de la déviation par rapport à un écoulement idéal de type piston.

L'hydrodynamique des colonnes à garnissages opérées en mode ruisselant a été très étudiée. Le premier modèle utilisé pour caractériser l'écoulement dans ce type de réacteur est le modèle de dispersion axiale. Charpentier *et al.* (1971) et Michell et Furzer (1972) ont montré que ce modèle est inadéquat pour donner une représentation satisfaisante de l'écoulement. Un second modèle développé par Hoogendoorn et Lips

(1965) tient compte de la présence d'un liquide stagnant parfaitement mélangé qui échange lentement avec un liquide dynamique à écoulement piston. Mais ce modèle ne prend pas en considération la dispersion axiale qui a lieu dans le liquide dynamique, ce qui a été fait par le modèle de Van Swaaij *et al.* (1969) et Bennet et Goodridge (1970). Un autre modèle, encore plus complexe, tient compte du fait que la phase stagnante n'est pas parfaitement mélangée (Beg *et al.*, 1996).

Quelques exemples de caractérisation de cultures de racines transformées par les DTS existent dans la littérature, mais ils sont peu complets et ne donnent que très peu d'information sur les modifications qui peuvent survenir pendant les cultures.

- Afin d'illustrer la sévérité du problème de mélange dans une colonne à bulles de 15 L avec support de culture, le temps de mélange a été mesuré pour des racines de *Solanum tuberosum* (Tescione *et al.*, 1997). Le temps de mélange (défini comme le temps nécessaire pour recouvrer 95% de la concentration en régime permanent) est passé de 1 minute lors de l'inoculation de 2 g·L⁻¹ WW, à 40 minutes quand la concentration atteint 180 g·L⁻¹ WW.
- Des mesures de DTS sont faites par Carvalho et Curtis (1998) dans un bioréacteur tubulaire à convection forcée avec garnissages. Afin de comparer l'écoulement dans le bioréacteur à l'écoulement piston, le nombre de réacteurs en série est déduit des mesures de DTS. Pour le bioréacteur à vide avec garnissages, le nombre de réacteurs en série est en moyenne 46,9, ce qui représente un écoulement piston. Pour le bioréacteur en culture, la moyenne est de 7,6 réacteurs, ce qui est considéré

proche du modèle piston car 10 réacteurs en série est un faible écart au modèle piston (Levenspiel, 1972). L'étude des courbes a permis aussi d'observer des chemins préférentiels. La comparaison du bioréacteur à convection forcée est aussi faite avec un bioréacteur à bulles qui obtient une moyenne de 9.1 réacteurs en série.

L'étude de l'hydrodynamique d'un biofiltre à tourbe opéré en mode percolation a été faite par Bélanger (1994). La tourbe a une structure poreuse et elle absorbe et retient l'eau qui y percole, ce qui ressemble beaucoup au comportement des cultures de racines transformées. L'écoulement dans ce bioréacteur (0.05 m de diamètre et 0.30 m de hauteur) est de type piston avec dispersion axiale et le nombre de Péclet est de l'ordre de 10 à 30 ce qui correspond à une dispersion moyenne. De plus, deux régimes d'écoulement ont été détectés : à faible vitesse, le liquide s'écoule dans les agrégats des particules de tourbe et à plus grande vitesse, le liquide s'écoule entre les agrégats solides et peu de liquide pénètre les agrégats (Karamanev *et al.*, 1994).

2.6 TRANSFERT D'OXYGÈNE

Pour le design de bioréacteurs dédiés à la culture de cellules de plantes, le transfert d'oxygène est un des facteurs les plus importants à considérer (Kondo *et al.*, 1989). Les racines chevelues sont hétérotrophes. Ce sont des organismes qui respirent et qui dépendent de l'oxygène pour générer de l'énergie et d'autres fonctions métaboliques. Le taux de croissance des racines chevelues ainsi que la production de certains métabolites sont donc fortement dépendants du taux de transfert d'oxygène.

Les mécanismes de transfert d'oxygène de toutes plantes sont principalement la diffusion provenant du sol et le transfert provenant de ses parties aériennes. Pour les racines chevelues, le mécanisme de transfert dominant est donc la diffusion. La structure même de la racine est la première résistance au transfert et elle est peu contrôlable (figure 2-9). La consommation d'oxygène se fait surtout dans le cortex où la concentration est élevée alors que la partie plus interne de la racine sert au transport des nutriments. La deuxième résistance au transfert provient de la couche limite à la surface des racines, présente à l'intérieur de chaque amas de racines. Même si la culture en mode non submergé est entourée d'air et ne baigne pas dans le liquide, une couche limite est tout de même présente, assurant le maintien des racines humides. Un facteur important influençant l'épaisseur de la couche limite est la vitesse de drainage du lit. Pour des bioréacteurs sans mécanisme d'agitation, il peut être difficile de réduire la couche limite. Une troisième résistance au transfert peut provenir de la résistance à la convection dans les amas de racines.

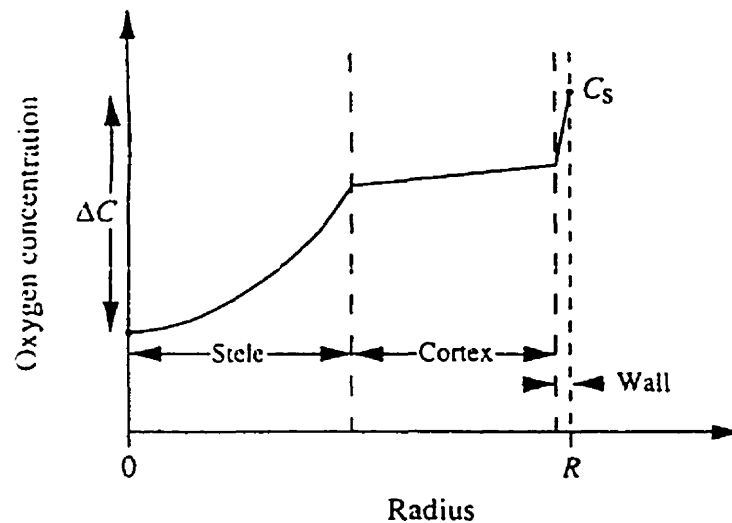


Figure 2-9 Profil de la concentration en oxygène dans une racine de rayon R avec un cortex poreux. C_s est la concentration en oxygène à la surface de la racine; ΔC est le déficit total en oxygène à travers le rayon de la racine. (Yu *et al.*, 1998)

Plusieurs exemples montrent à quel point le transfert d'oxygène est important pour la croissance des racines. Il est observé par Yu *et al.* (1994) qu'aucune croissance n'a lieu lorsque le niveau d'oxygène n'est qu'à 50% de l'air saturé, mais que la croissance augmente à mesure que la concentration en oxygène dissous se rapproche de 100%. Pour des racines en flacons agités, une alimentation en oxygène de 150% par rapport à l'air saturé a été efficace pour augmenter la croissance des racines, signifiant qu'il y a des limitations en oxygène même pour le système modèle qu'est le flacon agité (Yu *et al.*, 1998). Dans une colonne à bulles de 2.5 L à 3 points d'alimentation en gaz répartis sur toute la hauteur, des cultures de *Atropa belladonna* ont montré que le niveau d'oxygène diminue progressivement de 100% à 40% en 43 jours de culture dans la section supérieure du bioréacteur (Kwok *et Doran*, 1995).

D'autres travaux montrent aussi que la convection est essentielle à l'intérieur des amas de racines car la diffusion seule est insuffisante pour assurer une alimentation suffisante en oxygène (Carvalho *et al.*, 1998). Par exemple, pour un amas de racines d'oignon non transformées de 2.6 cm avec une densité de biomasse de $0.32 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1} \text{ WW}$, il faut une vitesse de liquide à l'extérieur de l'amas de $1 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ pour éliminer la restriction (Prince *et al.*, 1991). D'après Yu et Doran (1994), les valeurs de Pe obtenues indiquent que la convection est le mécanisme dominant plutôt que la diffusion lors du transfert d'oxygène dans les amas de racines, même pour de fortes densités. Ils montrent aussi que le niveau d'oxygène à l'intérieur des amas de racines diminue significativement avec l'augmentation de la densité des amas de racines et la diminution de la vitesse d'écoulement du liquide (figure 2-10). De plus, ils montrent que le niveau critique d'oxygène à l'extérieur des amas de racines est de 90 à 100% de l'air saturé pour favoriser la croissance.

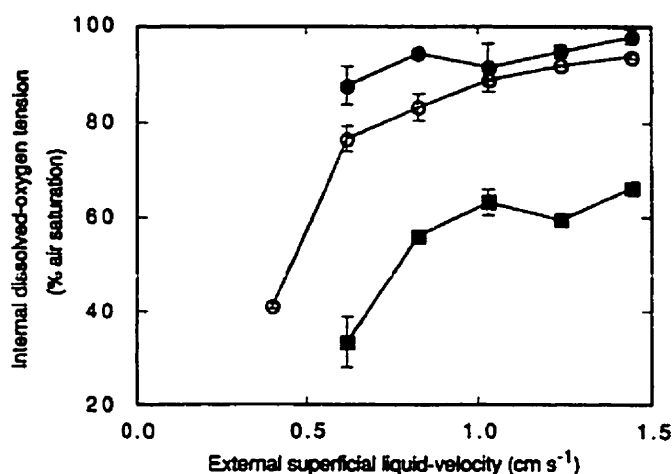


Figure 2. Typical results for dissolved-oxygen tension inside hairy-root clumps as a function of external flow velocity and root density in the clump: (●), 9.1 g L⁻¹; (○), 14.4 g L⁻¹; and (■), 20.7 g L⁻¹ dry weight. The external oxygen level remained high at 95% to 100% air saturation. The root ball was 4.0 cm in diameter.

Figure 2-10 Concentration en oxygène dissous à l'intérieur d'amas de racines en fonction de la vitesse superficielle et de la densité des amas de racines (Yu et Doran, 1994).

D'une façon plus précise, il existe une concentration d'oxygène critique en dessous de laquelle le taux de consommation d'oxygène diminue, impliquant une activité métabolique limitée des cellules. Kessel et Car (1972) ont identifié une concentration d'oxygène critique pour des cellules de plante en suspension de l'ordre de 16 à 20%. Pour maintenir les cellules à l'intérieur des racines au-dessus de cette concentration en oxygène, il faut des concentrations bien plus grandes à cause du gradient dans les tissus de la racine. Un essai est fait avec un petit bioréacteur submergé éliminant les couches limite autour des racines et où le taux de consommation d'oxygène est mesuré. Il

s'avère que pour les racines d'*Atropa belladonna*, la concentration en oxygène doit être à 110-120% de la saturation de l'air dans des conditions sans couche limite pour être au dessus de la concentration critique (Yu *et al.*, 1998). Il faut en conclure que les racines chevelues risquent d'être limitées en oxygène et nécessitent une méthode pour améliorer le transfert d'oxygène.

Une de ces méthodes, qui fonctionne très bien pour les suspensions de cellules, est l'utilisation de perfluorocarbone qui augmente le transfert d'oxygène gaz-liquide (la solubilité de l'oxygène est augmentée de 20 fois) (Ju *et al.*, 1991). Pour les cultures de racines transformées, cette méthode n'améliore pas significativement leur croissance, ce qui montre que la résistance au transfert provient essentiellement du transfert liquide-solide dans ce cas (Kanokwaree et Doran, 1998). Il est donc important de développer de nouvelles méthodes pour améliorer le transfert d'oxygène, comme celle qui consiste à injecter directement l'oxygène dans les amas de racines. Une aération de la culture est obtenue avec succès par l'introduction de tubes microporeux en polypropylène à l'intérieur des amas de racines. Ces tubes sont installés avant la culture sur des fils métalliques juste au-dessus de la zone d'inoculation. À mesure que le lit grandit, les tubes sont entourés de racines qui ne bouchent pas les pores grâce à la caractéristique hydrophobe du polypropylène. Cette méthode améliore significativement la croissance lors de la seconde partie de la culture, lorsque le lit est plus dense. Combinée à une méthode de bullage conventionnelle, la croissance est améliorée jusqu'à 65% au même débit de gaz total (Kanokwaree et Doran, 1998).

Un autre paramètre important qui affecte le transfert d'oxygène est la morphologie des racines. En condition de limitation en nutriments, il arrive souvent que la formation de poils absorbants augmente afin d'améliorer la surface d'échange. S'ils deviennent abondants, les poils peuvent être néfastes à cause de la présence accrue de couches limite stagnantes qui peuvent entraîner des problèmes de transport d'oxygène (Carvalho *et al.*, 1998). Il est donc préférable de limiter le plus possible la formation de poils absorbants par un milieu de culture adéquat et même de choisir dès le début des racines avec peu de poils absorbants.

Une façon de mesurer l'importance du transfert d'oxygène consiste à mesurer le coefficient volumétrique global de transfert d'oxygène ($k_L a$). Plusieurs méthodes existent pour ce faire, mais deux méthodes sont largement utilisées : l'absorption de l'oxygène dans le liquide (Goto et Smith, 1975) et la désorption de l'oxygène dans le liquide (Goto *et al.*, 1975 et Reiss, 1967).

Bélanger (1994) montre que le taux de transfert d'oxygène dans un biofiltre à tourbe est décrit par l'équation suivante lorsque le gaz alimenté a une concentration en oxygène différente du liquide alimenté au bioréacteur :

$$Q dC_z = \kappa_L a (C_z - C^*) A \cdot dz \quad (2-1)$$

où Q : débit de liquide, C_z : concentration en oxygène à la position z , C^* : concentration en oxygène à l'équilibre à une certaine pression partielle dans le gaz, $k_L a$: coefficient volumétrique global de transfert, A : section transversale, z : position longitudinale.

Ce biofiltre est un bioréacteur ruisselant dont l'hydrodynamique suit un modèle d'écoulement piston. En tenant compte des effets de bouts, le coefficient de transfert d'oxygène est obtenu par :

$$k_L a = \frac{Q}{AH_{lit}} \ln \left[\frac{C_e}{C_e'} \right] \quad (2-2)$$

où H_{lit} : hauteur du lit, C_e' : expérience faite avec une colonne vide, sans biofiltre, C_e : expérience faite en présence de biofiltre.

Grâce à plusieurs expériences, Bélanger trouve une équation empirique qui relie le coefficient de transfert d'oxygène aux différents débits liquide et gazeux, et qui ne varie pas avec la hauteur, le diamètre et le gaz utilisé :

$$k_L a = c U_g^\alpha U_l^\beta \quad (2-3)$$

où $\alpha = 0.20$, $\beta = 0.68$, $c = 0.37$, U_g : vitesse superficielle du gaz, U_l : vitesse superficielle du liquide.

CHAPITRE 3 - MATÉRIELS ET MÉTHODES

Ce chapitre présentant le matériel et la méthodologie utilisés est traité en six sections. La première porte sur la façon dont le matériel biologique est préparé et entretenu. Le deuxième expose la méthode utilisée pour parvenir au choix d'un système modèle inerte capable de simuler le comportement des racines de carotte. Viennent ensuite les descriptions des essais hydrodynamiques et de transfert d'oxygène, en troisième et quatrième section. La cinquième section présente les bioréacteurs et les cultures. Enfin, le chapitre se termine par la description des méthodes analytiques.

3.1 MATÉRIEL BIOLOGIQUE

La transformation des racines par la bactérie *Agrobacterium rhizogenes* se fait par l'intégration d'un segment d'ADN (Ri T-DNA) du plasmide Ri (inducteur de racines) dans le génome de la plante, ce qui induit la prolifération de racines adventives sur le lieu de la transformation. Les cultures de racines transformées de *Daucus carota* sont repiquées en transférant tous les mois environ 1 g humide de racines (WW) avec 80 ml de milieu White modifié (Bécard et Fortin, 1988) dans un flacon Erlenmeyer de 250 ml. Les flacons sont agités à 120 rpm en présence continue de lumière et la température est maintenue à 23 ± 1 °C.

Pour obtenir des racines de carotte mycorhizées, des spores de *Glomus intraradices* Schenck & Smith sont mises en contact *in vitro* avec les racines de carotte *Daucus carota*. Les premières cultures mycorhizées ont d'abord été produites à partir de spores

isolées du sol comme décrit par Chabot *et al.* (1992). En laboratoire, les racines sont préparées dans des boîtes de Pétri en plastique de 9 cm de diamètre. Un morceau de gel de 1 x 1 x 0.5 cm contenant des hyphes et des spores produites lors de cultures solides à 2 compartiments (St-Arnaud *et al.*, 1996) est d'abord placé avec 0.5 g WW de racines produites en flacon agité, dans 20 mL de milieu M (Bécard et Fortin, 1988) liquide pour trois mois de culture à l'obscurité et à 26 °C. Avant inoculation, les boîtes de Pétri sont observées au microscope afin de vérifier la présence de spores et d'hyphes du champignon. Les cultures compartimentées sont réalisées dans des boîtes de Pétri à deux compartiments isolés où les racines mycorhizées sont déposées dans un des compartiments. Les hyphes de champignon sont capables de passer dans l'autre compartiment et d'ainsi coloniser le gel par des spores.

3.2 CHOIX DU SYSTÈME MODÈLE NON VIVANT

De nombreux essais sont nécessaires pour caractériser l'hydrodynamique d'un lit de racines de carotte et les cultures sont longues (3 mois) et complexes face au maintien de la stérilité. Il est donc indispensable de remplacer les racines par un modèle non vivant. Les critères de sélection de ce système modèle sont les caractéristiques hydrostatiques et hydrodynamiques du lit, et le comportement de l'écoulement. Les valeurs numériques des critères doivent être équivalents à celles d'un lit de racines transformées.

Au niveau des propriétés hydrostatiques, des tests sur les rétentions gazeuses et liquides statiques en mode submergé sont développés. Un test sur la perméabilité permet de comparer les matériaux au niveau hydrodynamique. Comme autre critère de sélection du matériau, sa porosité ne doit pas diminuer au cours du temps, c'est-à-dire qu'il ne doit pas y avoir compaction du matériau lorsqu'il est gorgé d'eau. De plus, ce matériau doit préférentiellement être non vivant afin de faciliter les opérations en mode non stérile et il doit être globalement homogène (dans son hétérogénéité locale) afin que sa similitude à un lit de racines de carotte soit reproductible. Lors de précédents travaux, la luzerne avait été utilisée comme système modèle, mais sans succès (Durand, 1997).

Les matériaux suivants sont testés afin d'être comparés à un lit de racines : corde de jute (no 530, forte, Lehigh), corde de sisal (no 390, moyenne, Lehigh), tabac (Drum), ficelle maison (no 320CA, moyenne, Lehigh), laine à tapisserie (Anchor). Des morceaux de 10 cm sont coupés et placés sous différentes formes : en noeud pour être plus compacts, ou effilochés afin de s'apparenter morphologiquement à une racine (voir figure 3-1). Chacun des matériaux est testé sous chacune des formes pour différentes densités du lit de matériau : de la plus petite, définie comme la masse minimum qui permet au lit de se tenir dans un volume donné, à la plus grande, définie comme la masse maximale pouvant être contenue dans un volume donné. Le matériau choisi doit avoir les mêmes propriétés pour les 3 tests qu'un lit de racines de carotte.

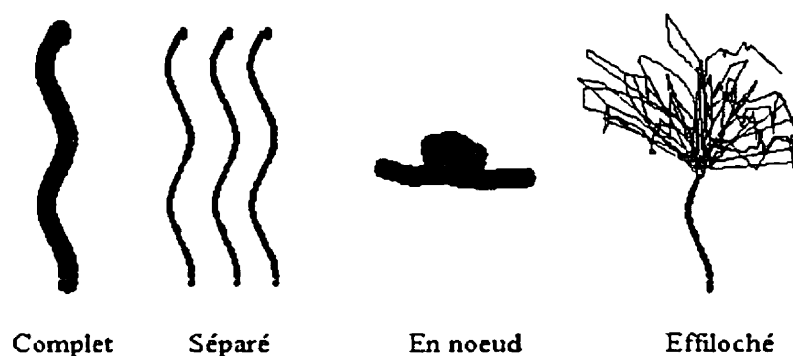


Figure 3-1 Différentes formes de cordes testées

Les racines utilisées pour la comparaison proviennent de sous-cultures en flacons Erlenmeyer de 250 mL. De ces racines, seuls les noyaux (les coeurs plus compactes) sont conservés (voir figure 3-2). La densité observée de ces noyaux de lit de racines non épongées est de 0.6 à $0.7 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ WW. Le comportement hydrodynamique et le transfert d'oxygène (méthodes décrites plus loin aux sections 3.3 et 3.4) au sein du matériau choisi sont ensuite comparés à ceux du lit de racines de carotte.

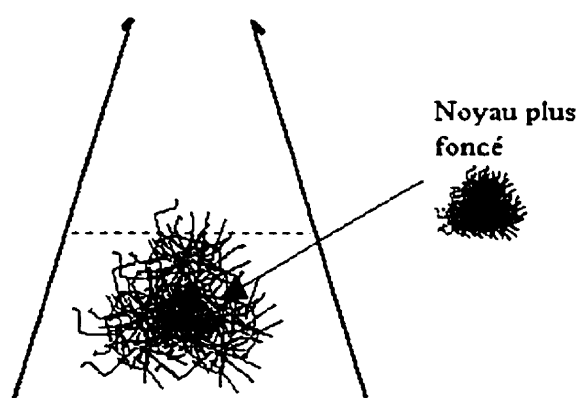


Figure 3-2 Racines utilisées pour la caractérisation

3.2.1 Propriétés hydrostatiques

L'évaluation des propriétés hydrostatiques du matériau en mode submergé est faite à l'aide des rétentions liquides et gazeuses. Elles sont obtenues à l'aide d'un montage constitué d'un cylindre gradué en polypropylène, percé à son extrémité inférieure et dans lequel une masse connue de matériau est placée dans un volume de 25 ml. En bouchant l'orifice inférieur du cylindre à l'aide d'une feuille de parafilm tendu, de l'eau est ajoutée jusqu'à noyage du lit. Ensuite, le lit est drainé en ouvrant rapidement cet orifice. On laisse s'écouler toute l'eau qui n'est pas retenue dans le lit, ce qui peut prendre jusqu'à 5 secondes. Ces deux manipulations permettent de déterminer la rétention gazeuse (ϵ_g) et la rétention liquide statique (ϵ_{ls}) :

$$\epsilon_g = \frac{V_{\text{eau drainée}}}{V_{\text{lit}}} = \frac{M_{\text{eau drainée}}}{M_{\text{eau équivalente pour le volume donné de lit}}} \quad (3-1)$$

⇒ Cette rétention indique la porosité du lit, c'est-à-dire le degré de vide du lit.

Elle est égale à la rétention liquide dynamique en mode submergé.

$$\epsilon_{ls} = \frac{V_{\text{eau ajoutée}} - V_{\text{eau drainée}}}{V_{\text{lit}}} = \frac{M_{\text{montage humide}} - M_{\text{montage sec}}}{M_{\text{eau équivalente pour le volume donné de lit}}} \quad (3-2)$$

⇒ Cette rétention donne la quantité d'eau piégée par les pores des fibres ainsi que la quantité d'eau retenue par capillarité à l'extérieur des fibres dans le lit.

Les différents poids sont mesurés précisément à l'aide d'une balance analytique.

3.2.2 Propriétés hydrodynamiques

Pour évaluer les propriétés hydrodynamiques du matériau, la perméabilité est mesurée en mode submergé. Elle représente la rapidité avec laquelle le liquide s'écoule dans le système fixe. Pour ce faire, un lit de racines est soumis à différentes têtes hydrostatiques, variées selon une différence de hauteur entre les 2 niveaux d'eau. La figure suivante illustre le principe du montage.

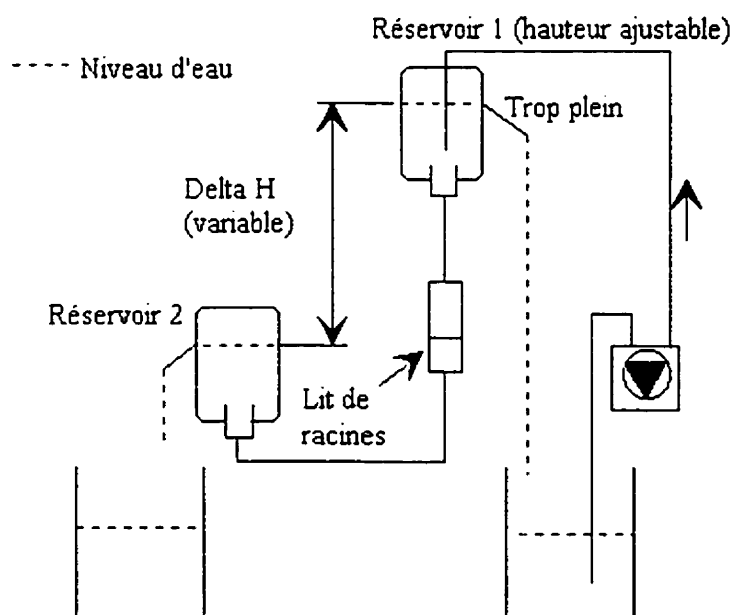


Figure 3-3 Montage permettant d'évaluer la perméabilité

Plus précisément, le réservoir 1 est alimenté en eau et il se vide dans le tube qui rejoint le cylindre percé contenant le lit (de 25 mL). Le trop plein d'eau est évacué dans le réservoir d'alimentation. Toute la tubulure entre les 2 réservoirs étant exempte d'air, l'eau traverse le lit et s'écoule par un second tube pour se vider par trop plein dans le réservoir 2. La différence de hauteur entre les 2 niveaux d'eau donne la tête

hydrostatique. La mesure de la vitesse relative de l'eau (débit d'eau par rapport à l'aire du lit) s'écoulant dans le système pour différentes têtes hydrostatiques permet de tracer une droite dont la pente est utile pour calculer la perméabilité. La perméabilité s'obtient par l'équation de Darcy:

$$K = \frac{m * \mu * L}{(\rho * g) - (\alpha_r * A * m * \mu)} \quad (3-3)$$

où m : pente de la droite (vitesse relative / tête hydrostatique), A : aire du lit, L : hauteur du lit, α_r : coefficient de résistance du montage.

En effectuant des essais à vide, sans lit, une nouvelle droite est obtenue et permet d'évaluer la constante α_r qui provient de l'équation de Darcy pour $K=0$.

$$\alpha_r = \frac{\rho * g}{m_0 * \mu * A} \quad (3-4)$$

où m_0 : pente de la droite pour le montage à vide.

3.3 ÉTUDE DE L'HYDRODYNAMIQUE

La distribution du temps de séjour est évaluée grâce à l'injection d'un traceur dans l'alimentation liquide en tête de bioréacteur. Le traceur choisi est de l'eau saturée en NaCl, d'utilisation très facile comparativement à un traceur radioactif par exemple. Une faible quantité de traceur (dans une seringue, de 0.25 mL à 0.4 mL selon l'essai) est rapidement injectée (impulsion) afin d'éviter de perturber l'écoulement du liquide d'alimentation. Du milieu frais alimente le bioréacteur et le milieu usé (salé) est

acheminé dans un réservoir vide. Pour des essais en échelon, au lieu de faire une injection de traceur, on change d'alimentation liquide d'un seul coup en passant d'un milieu saturé en NaCl à un milieu non saturé (de l'eau pure ou du milieu de culture) ou l'inverse.

Une sonde à conductivité est placée dans un support immédiatement à la sortie du liquide, en bas du bioréacteur, à moins de 5 cm de la sortie (le minimum possible). La figure suivante présente le schéma du support à sondes. Un petit circuit de recirculation du liquide autour de la sonde à oxygène dissous fonctionnant à l'aide d'une pompe péristaltique (Watson Marlow), permet de garder des conditions dynamiques à la membrane favorable à une lecture fiable. On évite ainsi que le liquide en contact avec la sonde soit stagnant ce qui fausserait l'essai. Pour les cultures, un support à sondes en acier inoxydable (grade 316) est utilisé, alors que pour les essais non stériles, un support à sondes en plexiglas est utilisé.

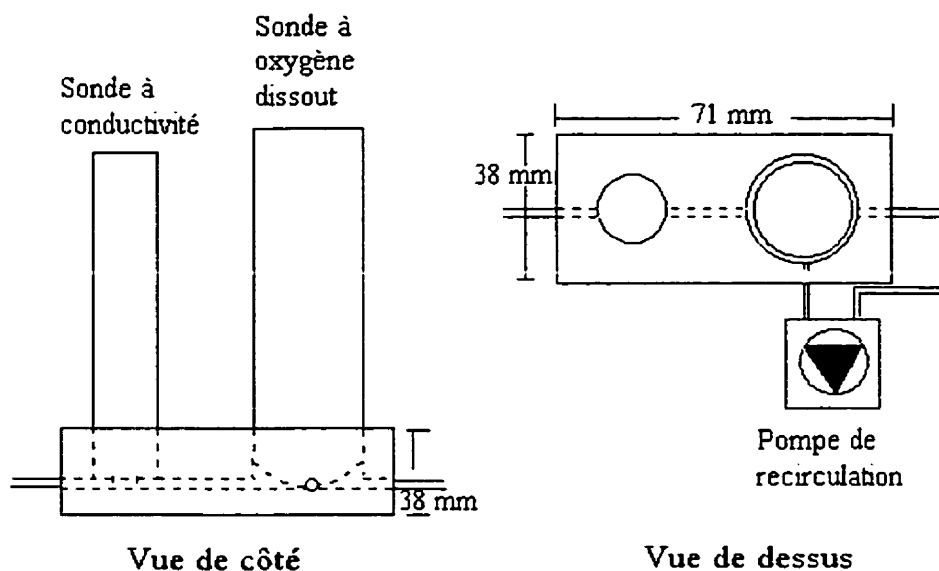


Figure 3-4 Support à sondes

La courbe de la concentration du traceur à la sortie du bioréacteur en fonction du temps est obtenue grâce à un système d'acquisition de données (carte d'acquisition LabMaster qui fait la conversion analogue-numérique, logiciel Labview). Parce que la quantité de traceur utilisée à chaque essai n'est pas la même, chaque courbe est normalisée pour que l'intégrale sous la courbe soit égale à 1 afin que les courbes soient comparables.

Les essais hydrodynamiques avec le système modèle sont faits pour une gamme de débits liquides variant de $0.1 \text{ mL}\cdot\text{s}^{-1}$ à $1 \text{ mL}\cdot\text{s}^{-1}$ correspondant au débit minimum de la pompe et du distributeur de liquide et au débit maximum, un peu avant noyage. Trois hauteurs de lit sont testées, soit 0,015 m, 0,06 m, et 0,18 m. Les essais hydrodynamiques en cultures sont faits au débit d'opération du bioréacteur et aux hauteurs de lit obtenues par la culture.

3.4 ÉTUDE DU TRANSFERT D'OXYGÈNE

La mesure du transfert d'oxygène dans le bioréacteur est obtenue à partir de l'absorption et de la désorption du bioréacteur en oxygène. Lors d'une désorption, le bioréacteur est initialement alimenté en oxygène: le gaz alimenté est de l'air et le liquide alimenté est saturé en oxygène par bullage préalable d'air dans le réservoir (bulleur en acier inoxydable poreux de 2 μm). Ensuite, la désorption est initiée par le changement des alimentations : le gaz alimenté devient de l'azote et le liquide alimenté est saturé d'azote. (voir figure 3-5). La sonde à oxygène dissous (polarographique : Ingold, Urdorf, Suisse) est placée à la sortie du bioréacteur dans le support à sondes. La sonde est reliée au système d'acquisition de données, ce qui permet de mesurer dans le temps la concentration en oxygène dissous dans le liquide. Une fois le bioréacteur totalement désoxygéné (lorsque la concentration en oxygène dissous tend vers zéro), le processus recommence en changeant les alimentations en azote pour des alimentations en air afin d'obtenir la courbe d'absorption. Pour les tests de transfert d'oxygène dans le cas du système modèle, des essais sont faits pour une gamme de débits liquides variant de 0.1 $\text{mL}\cdot\text{s}^{-1}$ à 1 $\text{mL}\cdot\text{s}^{-1}$ et ce, pour trois hauteurs de lit (0.015 m, 0.06 m, et 0.18 m). Les tests de transfert d'oxygène avec les cultures sont faits au débit d'opération du bioréacteur.

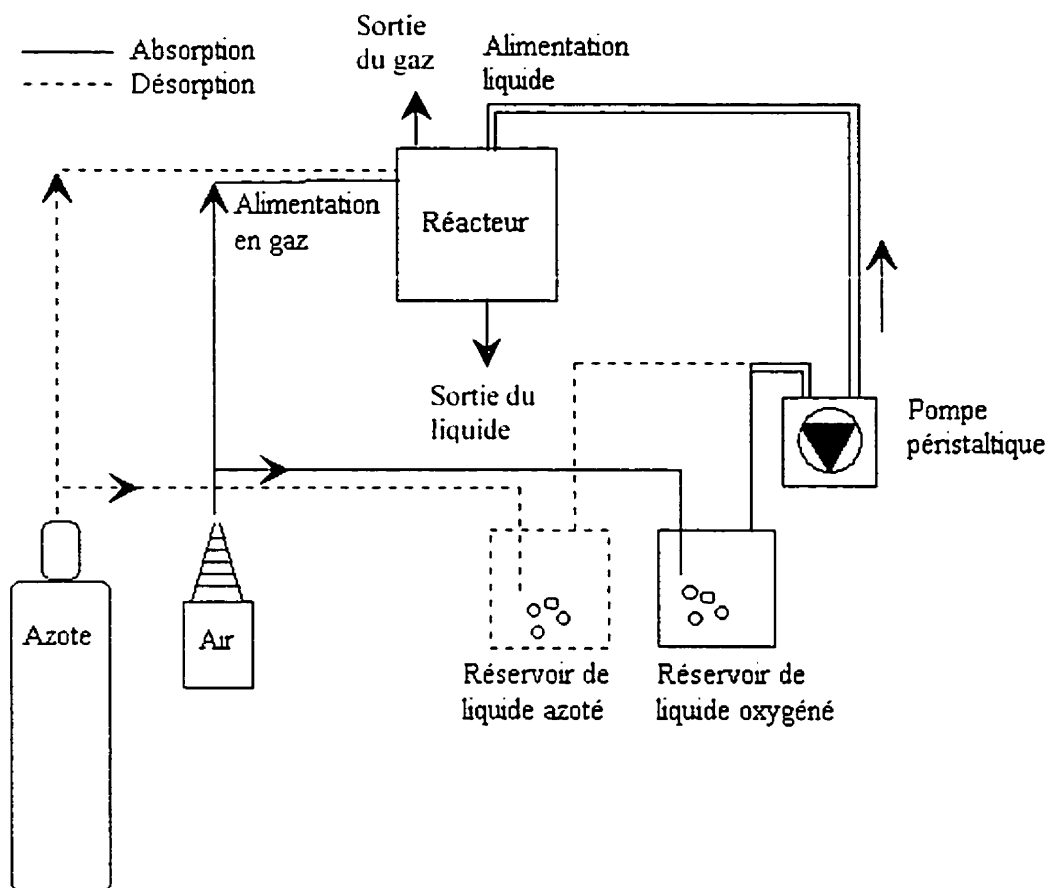


Figure 3-5 Système de transfert d'oxygène

3.5 BIORÉACTEURS ET CULTURES

Les bioréacteurs sont opérés selon un mode aéroponique (phase principale gazeuse) par ruissellement. Le liquide est contenu dans un réservoir et est acheminé en tête de réacteur à l'aide d'une pompe où il est dispersé en gouttelettes. En percolant à travers le lit de racines ou de modèle, le liquide traverse le lit jusqu'en bas du réacteur où il n'est pas accumulé, sauf en condition de noyage, et il retourne dans le réservoir.

Tous les bioréacteurs destinés aux cultures sont stérilisés à l'autoclave durant 1 heure (121°C, 1 bar) et les milieux durant 35 min. La culture des racines se fait à 23 ± 1 °C en présence continue de lumière. Le milieu de culture est un milieu minimum M (Bécard et Fortin, 1988) enrichi à 3 fois la concentration en sucrose, 3 fois la concentration en NO_3 et 10 fois la concentration en phosphate (KH_2PO_4) (voir annexe A). Certaines cultures sont alimentées par un milieu avec 25 fois la concentration en phosphate, mais il s'est avéré qu'une telle concentration n'était pas nécessaire pour favoriser une bonne croissance des racines étant donné l'accumulation importante de ce nutriment (Jolicoeur, 1998). La majeure partie des cultures ont donc été menées avec une concentration en phosphate de 10 fois la concentration du milieu minimum. Les milieux de culture sont enrichis afin de favoriser la croissance des racines. La plupart des cultures utilisent des racines non mycorhizées à l'exception de quelques cultures pour le choix du garnissage (voir section 3.5.2.2).

Plusieurs configurations de bioréacteurs sont utilisés dans ce projet. Le premier bioréacteur, non stérile, a permis de valider le choix du système modèle par des essais hydrodynamiques et de transfert d'oxygène sur le système modèle et sur un pseudo lit de racines de carotte formé d'amas de racines provenant de plusieurs flacons. Le deuxième type de bioréacteur a servi à faire les cultures destinées aux essais hydrodynamiques et de transfert d'oxygène sur un lit de racines ainsi qu'à faire le choix du garnissage pour les cultures de racines de carotte. Enfin, des bioréacteurs de 6 L et 20 L sont utilisés pour effectuer les cultures avec garnissage en situation pré-pilote.

3.5.1 Réacteur pour les essais non stériles

Les essais en réacteur avec le système modèle sont réalisés dans un réacteur de 2.3 L (volume utile de 1.5 L), d'un diamètre de 0.1 m et d'une hauteur de 0.3 m, muni d'un fond en plexiglas à courbure parabolique pour favoriser l'écoulement du liquide. Un simple grillage métallique (2 mm de maillage) est posé au fond du réacteur pour supporter le lit. Un grillage identique recouvre le lit lors des essais afin de confiner les fibres dans le volume voulu, imposant ainsi la densité désirée.

Une alimentation gazeuse près de l'alimentation liquide est prévue pour fournir un faible débit ($200 \text{ cc}\cdot\text{min}^{-1}$), réglé par un débitmètre (Brook). Un tube d'évacuation des gaz est aussi présent. La figure suivante montre les principales composantes du réacteur.

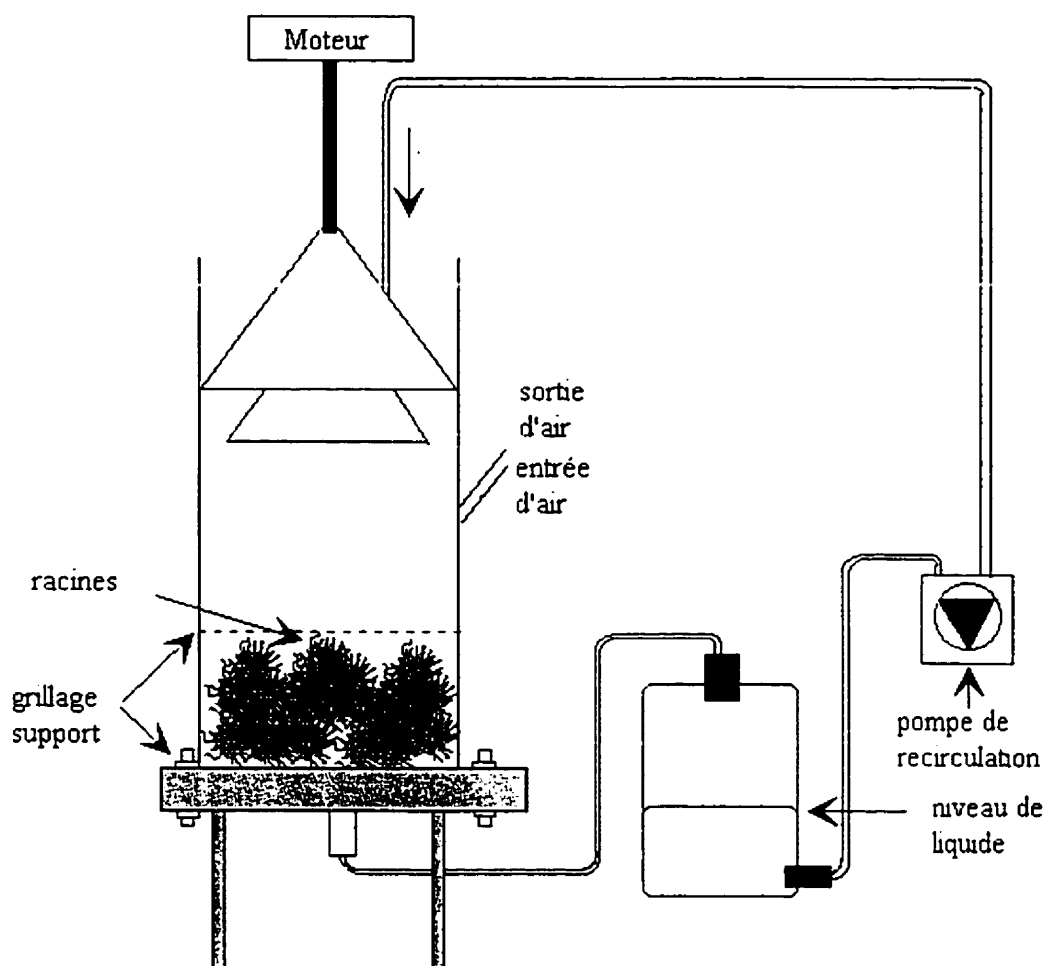


Figure 3-6 Montage pour les essais avec le système modèle (non stérile)

Deux alimentations liquides sont utilisées. La première est une alimentation brouillard fournie par une buse à parfum et la seconde est une alimentation par gouttes aléatoires, tel que décrit par Bélanger (1994).

L'alimentation liquide pour le système aléatoire se fait en un point fixe sur un cône perforé (figure 3-7) de 8.5 cm de diamètre mis en rotation (moteur Von WeiseGear co.) tournant à 7 tours/minute. Ainsi, les gouttes s'écoulent sur le cône et chaque goutte

passer par un trou différent grâce à la rotation du cône. Donc, le liquide est distribué sur toute la surface du lit.

Afin que le réacteur soit étanche par le haut et que le volume mort d'air soit le plus faible possible, le cône perforé est recouvert d'un second cône de 10 cm de diamètre venant s'imbriquer parfaitement dans le cylindre du réacteur. L'arbre de rotation du moteur traverse ce second cône pour rejoindre le cône perforé. Ce style d'alimentation est inspiré des travaux faits par Bélanger (1994), qui après expérimentation, obtenait une distribution uniforme du liquide avec deux points d'alimentation. La figure suivante représente le distributeur conçu par Bélanger.

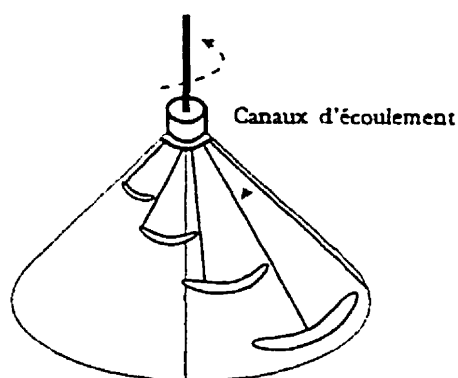


Figure 3-7 Distributeur liquide (Bélanger, 1994)

Cette configuration a été modifiée par Durand (1997) par l'agrandissement des canaux d'écoulement et l'ajout de dentelures pour favoriser la formation de gouttes. C'est cette même configuration qui est réutilisée pour le projet, comme le démontre la figure 3-8.

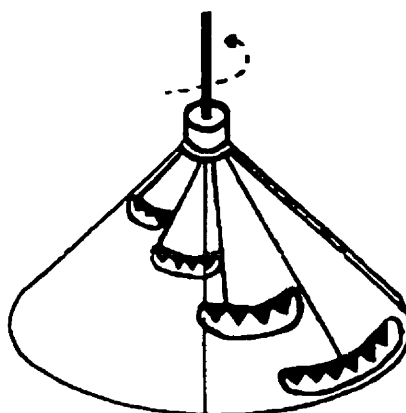


Figure 3-8 Cône de distribution modifié

3.5.2 Bioréacteurs de 1 L et 2 L pour les cultures

Tous les bioréacteurs utilisés sont construits à partir de jarres autoclavables (11 cm ID x 13 cm hauteur) en polycarbonate (Nalgene, Sybron International, Rochester, NY, USA). Les jarres sont fermées avec un couvercle modifié permettant l'alimentation liquide et gazeuse. Des filtres à air stériles 0.3 μm (bacterial air vent : Gelman Sciences, Ann Arbor, MI, USA) permettent un échange d'air stérile avec l'extérieur et un condenseur minimise les pertes de liquide par évaporation. Les racines sont retenues dans le bioréacteur, au fond, par un grillage en acier inoxydable (100 μm de maillage).

3.5.2.1 Bioréacteur pour culture de lit simple

Les cultures de lit simple de racines de carotte (culture sans support de culture) servent à la réalisation d'essais hydrodynamiques et de transfert d'oxygène. Le bioréacteur utilisé est un imbriquement de 3 jarres jointes au silicone (figure 3-9) d'un volume total

de 3.6 L (0,113 m de diamètre, 0,36 m de hauteur et un volume utile de 2,7 L). Les inocula sont de 10g WW de racines non mycorhizées. Les cultures sont menées avec environ 1.5 L de milieu liquide dans une bouteille.

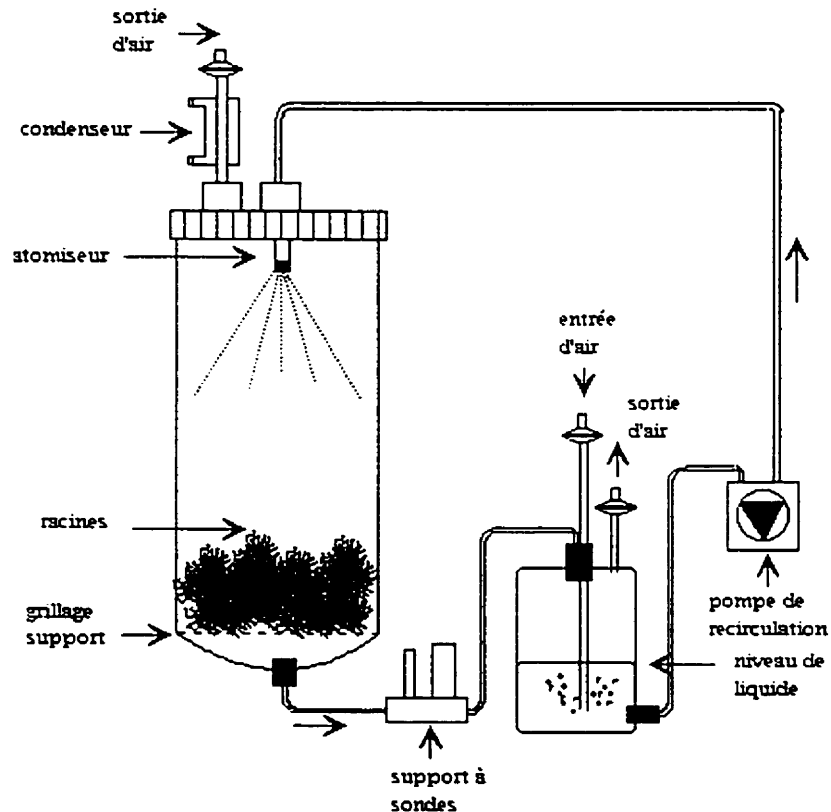


Figure 3-9 Bioréacteur pour lit simple

Quatre cultures sont menées avec ce bioréacteur. La première est faite à partir d'un inoculum de 46 g WW. Le liquide est alimenté grâce à l'atomisation par écoulement croisé de l'alimentation en gaz ($80 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ d'air) et de l'alimentation du milieu liquide ($15 \text{ à } 30 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) (adapté de Jolicoeur, 1998), pour donner entre 3 et 5 VVM (volume de gaz par volume de liquide par minute). Une goutte se forme sur la pointe

du tuyau puis est pulvérisée en fines gouttelettes par le courant d'air. En plus de cette pulvérisation du liquide, la goutte résiduelle est redistribuée à l'aide d'un cylindre en polypropylène (figure 3-10). Celle-ci se remplit de liquide jusqu'aux trous d'écoulement. Le liquide s'écoule par les trous du cylindre et coule le long des rampes de distribution pour tomber sur le lit. Sans cette distribution additionnelle du liquide, une goutte tomberait continuellement de 20 cm de haut au même endroit sur le lit.

Les trois autres cultures sont faites à partir d'inocula de 20, 20 et 38g provenant de plusieurs Erlenmeyers de 250 mL. La distribution du liquide est assurée par un atomiseur de type Unijet (TG-ss 0.4, spraying systems, John Brooks, Pointe Claire, Ca) avec un débit de $0.7 \text{ mL} \cdot \text{s}^{-1}$ pulvérisant le liquide en très fines gouttelettes (de $10 \mu\text{m}$ à 1 mm). Dans ce cas, l'oxygénation de la culture est assurée par un bulleur placé dans le réservoir du milieu de culture ainsi qu'un débit d'air d'environ $300 \text{ cc} \cdot \text{min}^{-1}$ placé en tête de réacteur. Les cultures faites avec un distributeur de type Unijet avaient un filtre en polyester (matériel 7607, Textel inc., Ste-Marie de Beauce, Canada) placé devant l'alimentation afin de retenir toutes les particules contenues dans le milieu et qui auraient pu bloquer l'alimentation.

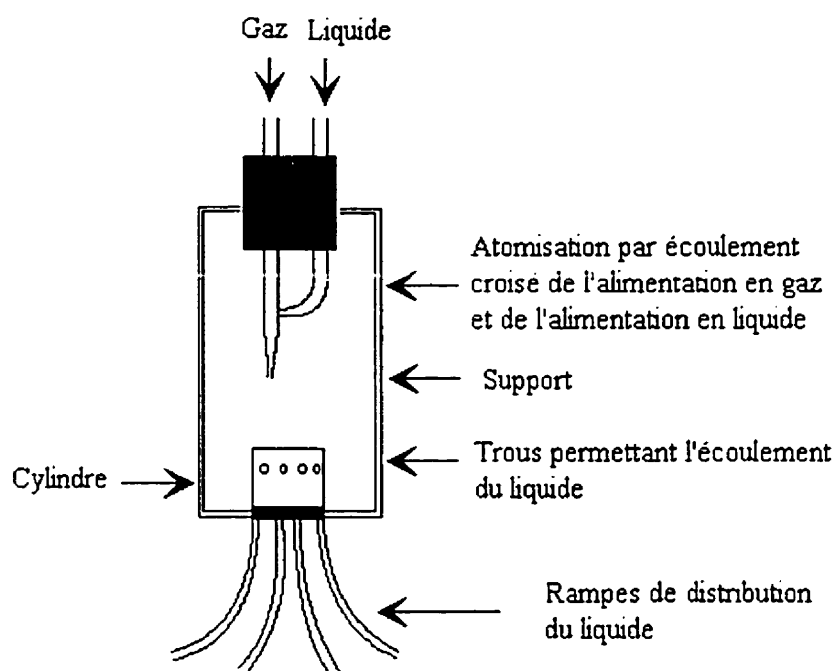


Figure 3-10 Distributeur de liquide

Pour permettre de comprendre les effets de parois ayant lieu dans les bioréacteurs, une autre culture est menée dans un bioréacteur pour lit simple (sans support de culture) dans un très petit bioréacteur. Le bioréacteur de 0.6 L est un cylindre de polypropylène de 0.025 m de diamètre et de 0.12 m de hauteur (volume utile de 0.4 L). L'alimentation du milieu de culture est faite grâce à une atomisation par écoulement croisé, tel que décrit précédemment. Le bioréacteur est inoculé avec 1 g WW de racines. Les 400 mL de milieu de culture sont circulés à un débit de $0.1 \text{ ml}\cdot\text{s}^{-1}$.

3.5.2.2 Choix du garnissage

Afin de choisir un garnissage assurant le meilleur accrochage des racines, des cultures de racines sur différents garnissages sont menées. Un plan de tamisage est construit à

partir de trois variables qui semblent jouer un rôle déterminant pour la qualité de l'accrochage. De cette analyse, huit essais en bioréacteurs sont identifiés et répliqués (tableau 3-1), ce qui fait 16 cultures. Deux types de garnissages sont testés, *Tri pack* (TP) et *Pall rings* (PR) (polypropylène, Fabco plastics, Montréal, Ca). 2 grandeurs de garnissage (1" et 2") (voir figure 3-11), ainsi que deux types d'inoculation (morceaux d'inoculum placés au centre des garnissages et morceaux d'inoculum dispersés aléatoirement). D'autres types de garnissages auraient pu être utilisés, mais il a été choisis de tester des garnissages de géométries très différentes dans le but de dégager une tendance.

Tableau 3-1 Plan factoriel complet

Essais	A	B	C
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+

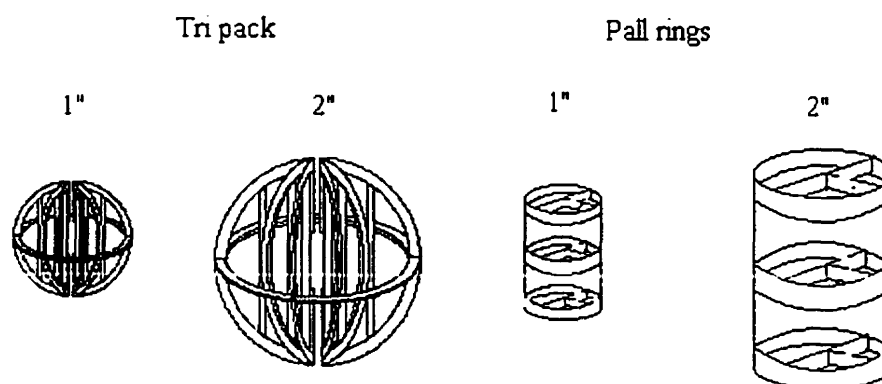


Figure 3-11 Types de garnissages utilisés

Tableau 3-2 Facteurs et modalités pour l'analyse statistique

Facteurs		-	+
A	Type de garnissage	TP	PR
B	Diamètre	1"	2"
C	Type d'inoculation	Placée	Aléatoire

Trois critères qualitatifs sont utilisés pour choisir le meilleur garnissage, soient le remplissage, la distribution dans le bioréacteur et l'accrochage (tableau 3-3).

Tableau 3-3 Critères pour la sélection d'un garnissage

Réponse	
Y1	Accrochage des racines sur les garnissages
Y2	Distribution des racines dans le bioréacteur
Y3	Remplissage des garnissages par les racines

Un classement de performance permet d'attribuer une note pour chaque réponse selon le degré de satisfaction. La note pour le pourcentage de remplissage est donné comme suit : 10 si la moitié des garnissages sont remplis à 100%, 8 si la moitié des garnissages sont remplis à plus de 50%, 5 si la moitié des garnissages sont remplis à plus de 20%, 2 si 50% des garnissages sont remplis à moins de 20%. La distribution des racines dans le bioréacteur est évaluée globalement (par exemple, une mauvaise note est attribuée si toutes les racines sont au fond du bioréacteur). Pour évaluer la qualité de l'accrochage des racines sur le garnissage on laisse tomber le garnissage d'une hauteur de 2 m sur une surface dure plusieurs fois de suite et son poids est mesuré après chaque chute. La « note » est attribuée en fonction de la perte de racines à chaque chute. Une note de 10 est attribuée lorsqu'il n'y a pas de perte de poids.

À l'aide des réponses, on calcule les contrastes, les sommes des carrés et les demi-effets des contrastes (voir l'annexe C pour le tableau de calcul) qui se définissent comme suit:

$$\text{contraste:} \quad \hat{C} = \sum_{i=1}^k \alpha_{mi} \cdot \bar{Y}_i \quad \text{avec} \quad \sum_{i=1}^k \alpha_{mi} = 0 \quad (3-5)$$

où k : nombre d'essais. α_m : modalité (+ ou -). $\bar{Y}_i$: valeur moyenne de la variable réponse pour l'essais i .

$$\text{somme des carrés:} \quad SS(\hat{C}) = \frac{n_r (\hat{C})^2}{k} \quad (3-6)$$

où n_r : nombre de réplicats.

$$\text{demi-effet: } \hat{\beta} = \frac{1}{2} \left(\frac{\hat{C}}{\sum_{\alpha_{mj} > 0} \alpha_{mj}} \right) \quad (3-7)$$

Grâce aux sommes des carrés associées à un contraste pour chaque réponse, il est possible de faire un test de signification des contrastes afin de séparer les effets importants de ceux qui ne le sont pas. Le diagramme d'écoulements de Paréto illustre de façon graphique l'importance relative des différents contrastes pour chacune des trois variables réponses.

Les conditions de culture sont les mêmes que pour les cultures de lit simple de racines. Les jarres utilisées pour les cultures avec garnissages de 1" sont les mêmes que précédemment, sauf qu'une jarre est suffisante pour fournir un volume de culture adéquat (diamètre 0.113 m, hauteur 0.13 m, volume 1.3 L, volume utile 0.8 L). Pour les essais avec des garnissages de 2", beaucoup plus gros, un agencement de deux jarres est nécessaire (diamètre 0.113 m, hauteur 0.24 m, volume 2.4 L, volume utile 1.8 L).

En général, les inocula utilisés sont des racines non mycorhizées. Cependant, cinq essais sont menés avec des racines mycorhizées afin de mettre en évidence un écart possible de comportement avec les racines non mycorhizées. Les inocula sont de petites quantités (~1-2 g WW) placées à la main dans les bioréacteurs sous une hotte à flux laminaire. Dans chaque bioréacteur, l'inoculum total est de 10 g WW pour les

bioréacteurs avec garnissage de 1" et de 20 g WW pour les bioréacteurs avec garnissages de 2". Pour les essais dont le type d'inoculation est placée, les racines sont introduites délicatement dans chaque garnissages qui sont alors déposés dans le bioréacteur. Pour les essais dont le type d'inoculation est aléatoire, les racines et les garnissages sont introduits alternativement dans le bioréacteur. Certaines cultures ont des inocula de 1 g WW afin de vérifier si de petits inocula forment des amas de racines moins denses en fin de culture et s'ils assurent une meilleure distribution des racines sur chaque garnissage.

Le milieu de culture liquide est atomisé au-dessus des racines par l'écoulement croisé de l'alimentation en gaz ($80 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ d'air) et de l'alimentation du milieu liquide (15 à $30 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$). Le milieu est circulé en continu du fond du bioréacteur jusqu'à l'atomiseur. Toutes les cultures sont menées avec un volume de 250 mL de milieu liquide (figure 3-12). Cette configuration est adaptée de Jolicoeur (1998).

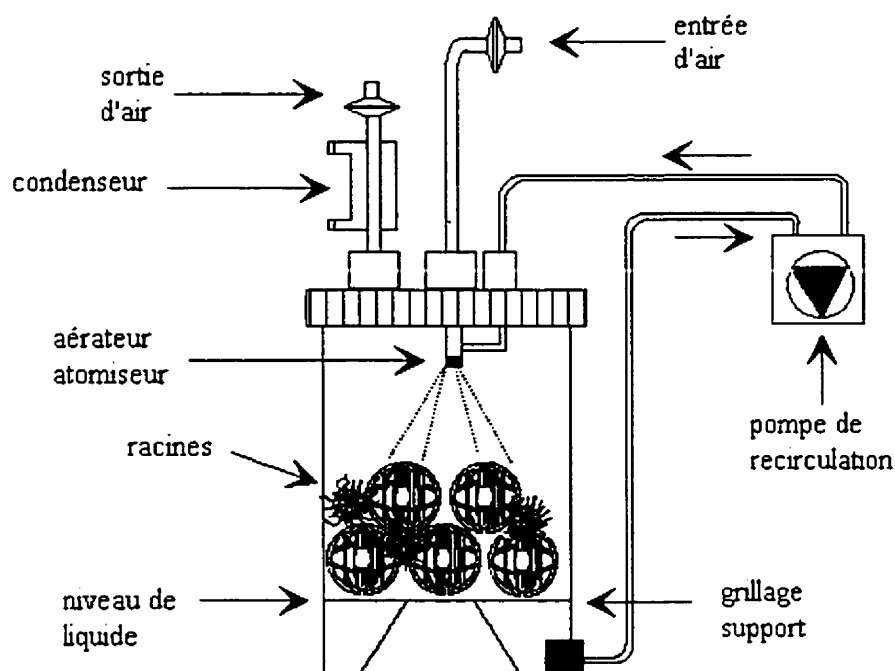


Figure 3-12 Bioréacteur pour le choix du garnissage

Une autre expérience est menée avec un bioréacteur de 2.4 L (diamètre 0.113 m. hauteur 0.24 m. volume utile 1.8 L) pour l'observation du développement d'un inoculum de racines placées dans un garnissage au milieu de plusieurs garnissages vides (même expérience que pour le bioréacteur le 6 L. voir section 3.5.3). Pour cette expérience, des garnissages Tri pack de 1" sont utilisés et un inoculum de moins de 1 g WW est placé au centre d'un garnissage au milieu du bioréacteur.

3.5.3 Bioréacteurs de 6 L et 20 L pour les cultures

La première expérience est réalisée dans le bioréacteur de 6 L et vise à observer le développement d'un inoculum de racines placées dans un garnissage au milieu de plusieurs garnissages vides. La moitié inférieure du bioréacteur est remplie de

garnissages vides lors de la stérilisation dans l'autoclave. Lors de l'inoculation, un garnissage provenant d'une autre culture, déjà rempli de racines (avec ~2 g de racines) est introduit dans le bioréacteur et ensuite recouvert de garnissages vides. La seconde expérience est réalisée dans le bioréacteur de 20 L et permet des mesures hydrodynamiques sur une culture dont les racines (100 g WW d'inoculum), lors de l'inoculation, sont placées dans des garnissages à la main, sous une hotte à flux laminaire.

Ces bioréacteurs sont composés d'un cylindre de verre avec une base et un couvercle en acier inoxydable. Le fond du bioréacteur est de forme toroïdale permettant l'écoulement du liquide. Pour le bioréacteur de 6 L, le diamètre est de 0.15 m et la hauteur est de 0.45 m pour un volume total de 8 L (volume utile de 6 L) et pour le bioréacteur de 20 L, le diamètre est de 0.23 m et la hauteur est de 0.45 m pour un volume total de 20 L (volume utile de 12 L). La distribution du liquide est fournie grâce à l'écoulement croisé de l'alimentation liquide et de l'alimentation en gaz pour le bioréacteur de 6 L et par un atomiseur Unijet pour le bioréacteur de 20 L. Les cultures de ce bioréacteur sont faites sur des garnissages *Tri pack* de 2". Les cultures sont menées avec environ 1 L de milieu liquide. La figure 3-13 présente le montage pour le bioréacteur de 6 L qui est très semblable au montage du bioréacteur de 20 L.

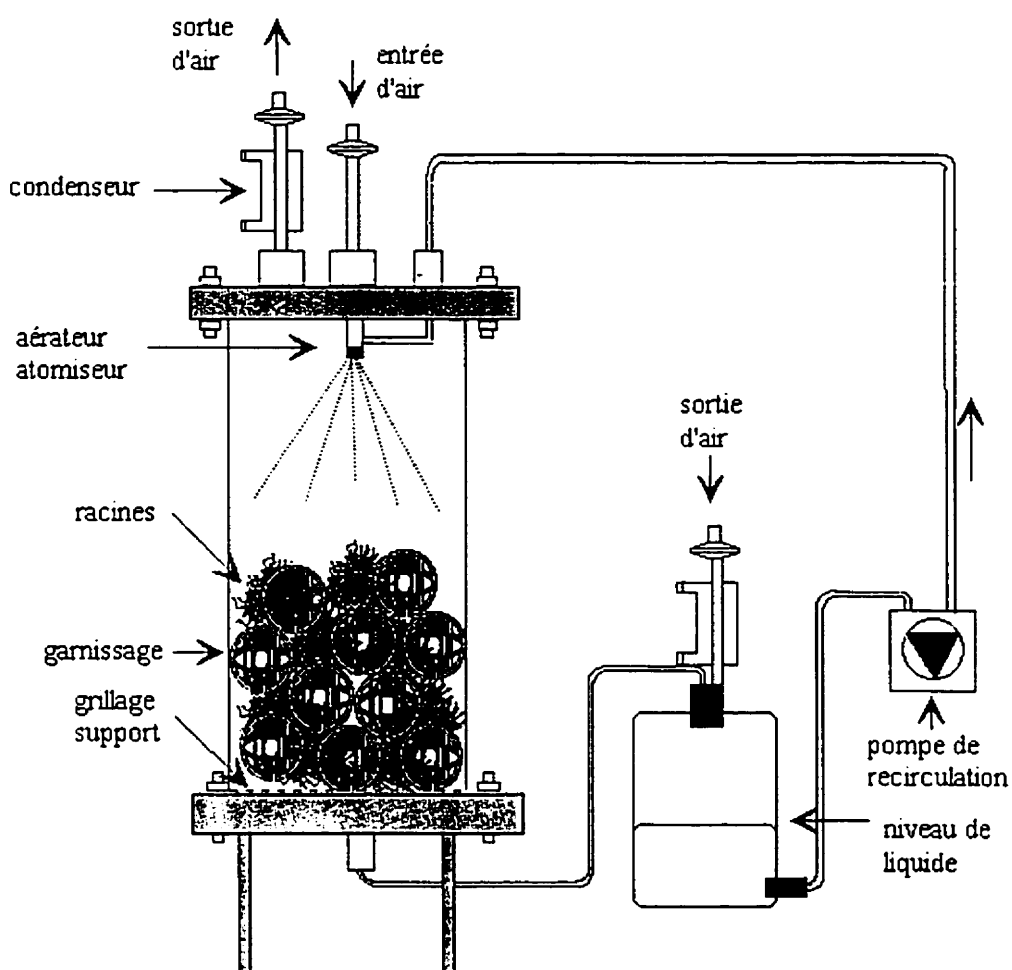


Figure 3-13 Bioréacteur de 6 L

3.6 ANALYTIQUE

3.6.1 Échantillonnage et récolte

Un échantillon du milieu est prélevé à chaque changement de milieu et au moment de la récolte. Les échantillons sont filtrés à $0,45\ \mu\text{m}$ et conservés à $-20\ ^\circ\text{C}$ jusqu'à leur analyse. Les racines sont récoltées à la fin des cultures et leur poids humide total est

mesuré. Les poids humide (WW) et sec (DW) (24 heures à 80 °C) d'un échantillon de racines sont mesurés.

3.6.2 Analyse des nutriments extracellulaires

Les principaux ions du milieu de culture sont analysés à l'aide d'un HPLC Dionex (Dionex Canada Ltd. Oakville, Canada) équipé d'une pompe, d'un injecteur automatique, d'un détecteur électrochimique opéré en mode conductivité, et contrôlé par un logiciel Dionex AI-450. Les ions sont analysés à une température de 23 ± 1 °C. Les anions sont séparés par une colonne 4 x 250 mM IONPAC AG4A-SC (Dionex) et un supresseur anionique (Dionex, ASRS-1). La phase mobile est une solution tampon aqueuse de bicarbonate (1.8 mM Na_2CO_3 et 1.7 mM NaHCO_3) alimentée à un débit de $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Les cations sont séparés à l'aide d'une colonne 4 x 250 mM IONPAC CS-12 (Dionex) et d'un supresseur cationique (Dionex, CSRS-1). La phase mobile est une solution aqueuse d'acide méthanosulphonique (20 mM) et circule à $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$.

CHAPITRE 4 - DÉVELOPPEMENT DES MODÈLES ET DES PARAMÈTRES

L'intérêt de réaliser une étude hydrodynamique d'un bioréacteur réside essentiellement dans le développement d'un modèle qui décrit son comportement. Ce modèle permet de comparer un bioréacteur réel à un agencement de réacteurs idéaux dans le but ultime d'en comprendre et prévoir le comportement. Cette section est donc destinée au développement d'un modèle qui décrit le comportement du bioréacteur ruisselant.

4.1 MODÈLE HYDRODYNAMIQUE

Lorsqu'on observe des courbes de distribution des temps de séjour (DTS), il est souvent possible de caractériser les comportements d'écoulement du liquide simplement à partir de la forme des courbes. Certaines « non idéalités » sont immédiatement identifiables comme, par exemple, un court-circuit qui fait apparaître deux sommets sur la courbe ou un volume mort qui se caractérise par une longue traînée.

Pour dépasser le niveau d'une simple observation visuelle, il faut regarder de plus près les données discrètes de concentration du traceur à la sortie du réacteur. Mais avant de procéder à cette analyse, il est important de normaliser les courbes, c'est-à-dire de les ramener à une base commune, parce que la quantité de traceur injectée peut varier d'un essai à l'autre. Pour ce faire, il suffit de diviser les données discrètes par la quantité de traceur injectée, ce qui donne des courbes dont l'intégrale est unitaire :

$$E(t) = \frac{C(t)}{\int_0^{\infty} C(t) dt} \quad \text{et} \quad \int_0^{\infty} E(t) dt = 1 \quad (4-1)$$

où $E(t)$: fonction de distribution du temps de séjour et $C(t)$: concentration du traceur à la sortie du réacteur. Deux informations de base sont extraites de ces courbes de distribution du temps de séjour. Il s'agit du temps de résidence du traceur dans le bioréacteur (premier moment de la courbe) et de la variance (deuxième moment de la courbe) :

$$\tau = \frac{\int_0^{\infty} t E(t) dt}{\int_0^{\infty} E(t) dt} = \int_0^{\infty} t E(t) dt \quad (4-2)$$

$$\sigma^2 = \int_0^{\infty} (t - \tau)^2 E(t) dt \quad (4-3)$$

Une fois cette étape terminée, on peut comparer les courbes uniformisées de DTS avec celles des réacteurs idéaux, parfaitement mélangés (CSTR) et écoulement piston. Lorsque les données expérimentales ne semblent pas suivre un modèle idéal, il est fréquent de s'en remettre au modèle des réacteurs parfaitement mélangés en série et au modèle de dispersion axiale. Pour ce premier modèle, celui des CSTR en série, le nombre de réacteurs « n » est variable, mais le volume de chacun est identique. On calcule le nombre de réacteurs « n » à partir des valeurs de τ et σ^2 :

$$n = \frac{\tau^2}{\sigma^2} \quad (4-4)$$

Le temps caractéristique τ_i est le même pour tous les bioréacteurs et correspond au temps de résidence moyen divisé par n que l'on calcule de la façon suivante:

$$\tau_i = \frac{\tau}{n} \quad (4-5)$$

On représente le modèle de réacteurs parfaitement mélangés en série par l'équation suivante :

$$E(t) = \frac{t^{n-1}}{(n-1)! \tau_i^n} e^{-t/\tau_i} \quad (4-6)$$

Dans le cas du deuxième modèle, celui de la dispersion axiale, l'écoulement piston est additionné de la composante diffusionnelle du traceur qui le disperse. Le nombre de Péclet (Pe) permet de caractériser cette dispersion. Il représente le rapport entre le taux de transport par convection et le taux de transport par dispersion. Dans un système aux conditions de frontières fermées, c'est-à-dire où il n'y a pas de dispersion avant le point d'injection ni après le point de sortie, l'équation suivante permet de relier le nombre de Pe au temps de résidence moyen et à la variance :

$$\frac{\sigma^2}{\tau^2} = \frac{2}{Pe} - \frac{2}{Pe^2} * (1 - e^{-Pe}) \quad (4-7)$$

Puisqu'il n'existe pas de réponse analytique pour représenter le modèle de dispersion axiale en conditions de frontières fermées, on peut se référer aux courbes de DTS tracées pour plusieurs Pe (Levenspeil, 1972). Notons que l'hypothèse qui dirige le modèle de dispersion axiale et qui stipule que le mélange suit un modèle simple de type fickien (la diffusion est fonction d'un gradient de concentration et d'un coefficient de diffusion) n'est pas valable pour de grandes dispersions.

Lorsque les courbes de DTS des données discrètes ne sont pas représentées par ces modèles simples à un seul paramètre, on choisit d'utiliser un modèle à plusieurs paramètres. Une option consiste à conserver la forme du modèle de CSTR en série. En fixant le nombre de réacteurs, on fait varier le volume de chaque bioréacteur pour ainsi avoir des temps caractéristiques différents dans chaque réacteur. Dans sa forme la plus simple, ce modèle contient deux réacteurs, ce qui en fait un modèle à deux paramètres, et se décrit de la façon suivante :

$$E(t) = \frac{1}{\tau_1 - \tau_2} (e^{-t/\tau_1} - e^{-t/\tau_2}) \quad (4-8)$$

On ajuste les deux paramètres de façon à ce que la courbe du modèle se rapproche de celle des données discrètes du bioréacteur réel. Un détail dont il faut tenir compte est le délai (α), le moment entre l'injection et la sortie du bioréacteur (représentant le début de la courbe de DTS). Pour effectuer cet ajustement, on ajoute un bioréacteur de type piston en série avant les deux CSTR. Le modèle prend alors la forme suivante :

$$E(t) = \frac{1}{\tau_1 - \tau_2} (e^{-(t-\alpha)/\tau_1} - e^{-(t-\alpha)/\tau_2}) \quad (4-9)$$

4.1.1 Courbes DTS échelon

Pour tester la validité des courbes de DTS obtenues par injection de traceur, on les compare aux courbes de DTS d'une courbe échelon. Ces essais « échelon » sont réalisés en changeant brusquement la concentration de traceur dans l'alimentation liquide du bioréacteur (de faible à forte, par exemple). La figure suivante montre la forme de la fonction échelon, $F(t)$.

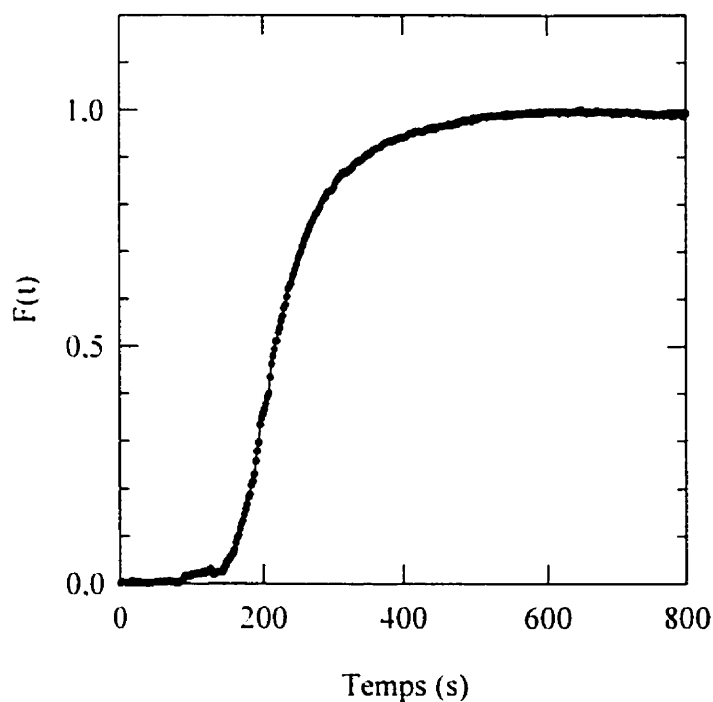


Figure 4-1 Exemple d'une courbe échelon expérimentale en fonction du temps

La courbe échelon se définit globalement par l'équation suivante :

$$F(t) = \int_0^t E(t) dt \quad (4-10)$$

On peut donc obtenir une courbe de DTS « injection » simplement en dérivant les données de DTS d'une courbe échelon.

4.2 MÉTHODE DE DÉCONVOLUTION

Une des caractéristiques d'un lit de racines en croissance est qu'avant d'atteindre la maturité, le lit de racines demeure très mince et la majorité du volume du bioréacteur reste vide. Le liquide ruisselle alors en abondance sur les parois et une faible proportion passe à travers le centre du lit de racines. Et, même lorsque le lit devient plus épais, ce phénomène persiste à cause de l'atomisation du liquide qui projette beaucoup de liquide sur les parois. Satterfield (1975) indique que ce ruissellement de paroi peut représenter jusqu'à 30 à 60% de l'écoulement dans les colonnes à garnissages. Il devient donc difficile de différencier l'effet du lit de celui des parois dans l'analyse des courbes de DTS alors que l'on cherche précisément à caractériser le lit de racines.

Cette observation suggère alors d'éliminer des courbes générales de DTS l'effet du ruissellement sur les parois. Pour parvenir à cette fin, on mesure l'effet de paroi par les courbes de DTS du bioréacteur à vide (i.e. sans lit de racines). Puis on utilise le concept de « convolution » qui permet de passer d'un signal d'entrée à un signal de

sortie, grâce à une fonction de transfert qui en fait n'est que la fonction de distribution du temps de séjour E :

$$C_{\text{sortie}} = C_{\text{entrée}} * E \quad (4-11)$$

Si l'on inverse le concept de convolution, l'effet du bioréacteur à vide peut être éliminé simplement en « déconvoluant » le signal de sortie par la courbe du bioréacteur à vide tel que synthétisé par le schéma suivant. Par une première expérience, on fait une injection dans un réacteur à vide, ce qui permet d'obtenir le signal de la concentration du réacteur à vide. Ensuite, on fait une deuxième expérience dans laquelle le réacteur contient un lit. Cette deuxième expérience permet d'obtenir le signal de concentration du lit et du réacteur à vide ensemble. Par la déconvolution, on enlève du signal de sortie « global » le signal de la concentration du réacteur à vide. La déconvolution est effectuée à l'aide de la méthode numérique des moindres carrés.

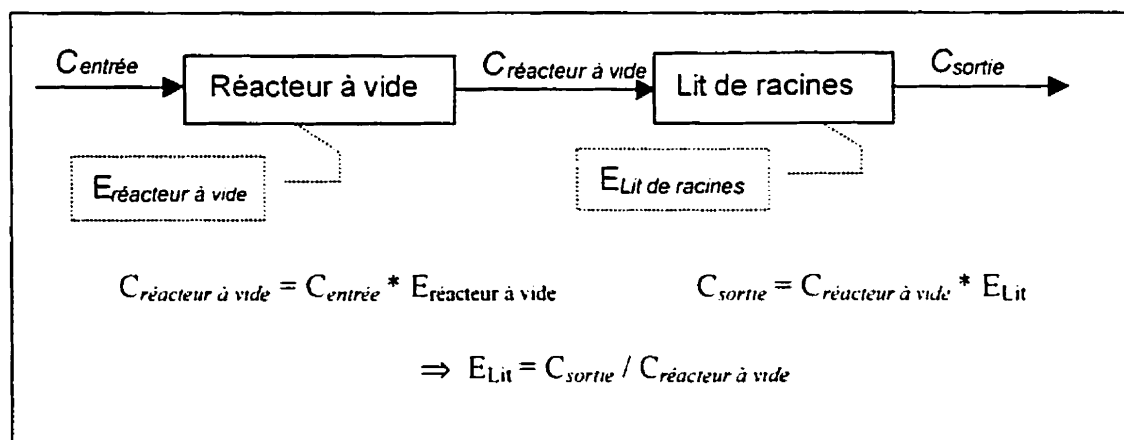


Figure 4-2 Représentation schématique de la convolution dans le bioréacteur

Les courbes de DTS dont on a retiré la fraction du bioréacteur à vide permettent de modéliser le comportement du lit seul, et on peut y appliquer le modèle des deux CSTR en série de volumes différents.

Il est important de noter que la méthode de convolution est valable pour un système linéaire, pour lequel il n'existe pas d'interaction entre les éléments. Cette condition est respectée lorsqu'on est en présence d'un lit de faible épaisseur. Par contre, si le lit est plus épais, cette condition est moins respectée car les parois ont un effet important sur le comportement du lit. Puisqu'il n'existe pas d'autres façons de séparer ces signaux, la méthode de déconvolution reste une bonne approximation, même si elle a des limites.

4.3 LE NOMBRE DE PÉCLET COMME PARAMÈTRE

Le nombre de Péclet est un paramètre couramment utilisé pour caractériser la dispersion axiale d'un écoulement, tel que discuté précédemment à la section 4.1. L'équation 4-7 permet de calculer le nombre de Péclet à partir des moments de la courbe (temps de résidence moyen et variance). Pour relier ces derniers au modèle des deux CSTR en série de volumes différents, il faut retourner aux définitions de ces deux termes :

$$\tau = \int_0^{\infty} t \cdot E(t) dt = \int_0^{\infty} \frac{t}{\tau_1 - \tau_2} \left(e^{-\frac{t-\alpha}{\tau_1}} - e^{-\frac{t-\alpha}{\tau_2}} \right) \cdot dt \quad (4-12)$$

$$\sigma^2 = \int_0^{\infty} (t - \tau)^2 \cdot E(t) dt = \int_0^{\infty} \frac{(t - \tau)^2}{\tau_1 - \tau_2} \left(e^{-\frac{(t-\alpha)}{\tau_1}} - e^{-\frac{(t-\alpha)}{\tau_2}} \right) \cdot dt \quad (4-13)$$

Dans la section 5.4.3, une analyse du nombre de Péclet en fonction des différentes conditions d'opération est présentée.

4.4 TEMPS DE MÉLANGE

Un autre paramètre caractéristique de l'hydrodynamique d'un réacteur est le « temps de mélange ». Il s'agit du temps nécessaire pour que la concentration de traceur à la sortie du bioréacteur diminue jusqu'à 10% de la concentration maximale atteinte (voir figure 4-3).

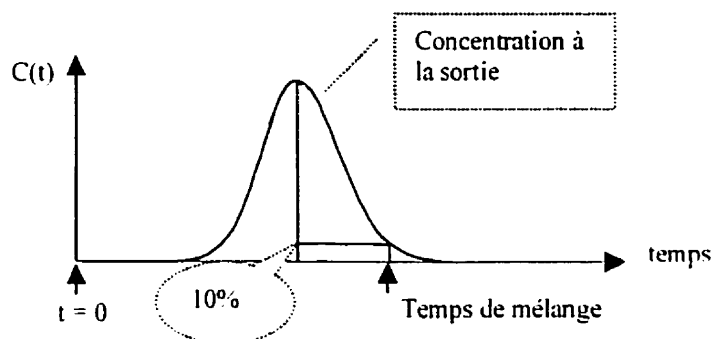


Figure 4-3 Description du temps de mélange

De plus, ce paramètre s'avère très utile pour comparer différentes configurations car il permet de dégager des conclusions sans avoir à déconvoluer chacune des courbes de données discrètes. En effet, les tendances des temps de mélange s'avèrent identiques dans les deux cas étudiés, celui du lit seul et celui plus global du « lit et du réacteur à vide ».

4.5 MODÈLE DE TRANSFERT D'OXYGÈNE

Dans le réacteur à percolation, comme celui utilisé dans ce travail, la phase continue est gazeuse et la phase dispersée est liquide. Tel que décrit dans la section 3.4 (Matériels et méthodes), la mesure du transfert d'oxygène se fait en désorption par de l'azote ou l'inverse. Alors que le réacteur fonctionne normalement, avec un liquide saturé en air et une alimentation gazeuse d'air, on change subitement ces alimentations pour une alimentation de liquide exempt d'oxygène et une alimentation gazeuse d'azote. On

mesure la concentration en oxygène dissous dans le liquide à la sortie du réacteur et on obtient une courbe de désorption d'oxygène.

Puisqu'il s'agit du même réacteur, le transfert d'oxygène doit suivre le même comportement que l'hydrodynamique, soit un modèle de 2 CSTR en série de volumes différents. Malheureusement, τ_1 et τ_2 ne sont pas disponibles pour toutes les conditions opératoires à cause de l'impossibilité de déconvoluer certaines courbes de DTS et d'y appliquer le modèle pour trouver τ_1 et τ_2 . Il faut donc développer le modèle de transfert d'oxygène selon deux modèles hydrodynamiques, un modèle à 1 CSTR, qui servira de première approximation, et un modèle à 2 CSTR en série de volumes différents, afin de pouvoir traiter toutes les courbes de transfert d'oxygène disponibles.

Deux éléments contribuent au transfert d'oxygène dans le réacteur : le liquide dynamique (qui circule dans le lit) et le courant gazeux alimenté en tête de réacteur. Deux éléments font obstacle à cet échange : le liquide statique (qui représente la rétention liquide statique) et le gaz contenu dans le lit. Certaines simplifications sont faites afin de faciliter l'analyse des courbes. Étant donné la faible solubilité de l'oxygène dans le liquide, il est raisonnable de croire que le principal échange avec le liquide statique se fait avec le gaz. De plus, puisqu'aucune information n'est disponible sur la concentration en oxygène du liquide statique, et que, en première hypothèse, le réacteur suit un modèle parfaitement mélangé (avec 1 CSTR), on peut supposer que tout le liquide statique dans le lit de racines a une concentration en oxygène dissous

égale à la concentration du liquide qui sort du réacteur. Ainsi, seuls deux éléments seront pris en compte : le courant de liquide dynamique qui renouvelle graduellement le liquide statique et l'échange entre le gaz en tête de réacteur et le liquide statique qui accélère le transfert.

À partir de ces hypothèses, et en traitant le transfert entre le gaz et le liquide comme dans un réacteur submergé, on peut écrire l'équation de bilan de matière sur le réacteur :

$$QC_{entrée} - QC_{sortie} + \kappa_L a V (C^* - C_{sortie}) = V \frac{dC_{sortie}}{dt} \quad (4-14)$$

où Q :débit de liquide, $\kappa_L a$: coefficient volumétrique de transfert d'oxygène, V : volume du réacteur C^* : concentration en oxygène à saturation avec le gaz, $C_{entrée}$: concentration en oxygène dissous dans le liquide à l'entrée du réacteur et C_{sortie} : concentration en oxygène dissous dans le liquide à la sortie du réacteur.

Il est possible de modifier cette équation pour faire apparaître τ , le temps de résidence moyen du liquide dans le réacteur:

$$\frac{dC_{sortie}}{dt} = \frac{C_{entrée}}{\tau} + \kappa_L a C^* - C_{sortie} \left(\frac{1}{\tau} + \kappa_L a \right) \quad (4-15)$$

La solution de cette équation ayant comme condition initiale $C_{sortie} = C_{sortie0}$ donne :

$$C_{sortie} = (C_{sortie0} - \frac{\frac{C_{entree}}{\tau} + \kappa_L a C^*}{(\kappa_L a + \frac{1}{\tau})}) * e^{-\left(\kappa_L a + \frac{1}{\tau}\right)t} + \frac{\frac{C_{entree}}{\tau} + \kappa_L a C^*}{(\kappa_L a + \frac{1}{\tau})} \quad (4-16)$$

Dans le deuxième cas, on prend comme hypothèse que le réacteur suit un modèle de deux CSTR en série de volumes différents. Puisque le gaz ne circule pas à travers tout le lit (l'entrée et la sortie de gaz se trouvent en tête de réacteur), la concentration de gaz dans le lit n'est sûrement pas uniforme. Il faut poser l'hypothèse que la concentration du gaz est uniforme mais différente dans chacun des réacteurs. Pour le premier réacteur de la série, on a donc un gradient de transfert où la concentration du gaz est supposée égale à C^* (concentration en oxygène en équilibre avec le gaz alimenté). Pour le deuxième réacteur, la meilleure approximation que l'on puisse faire est d'estimer la concentration du gaz à C_1 , la concentration en oxygène à la sortie du premier réacteur. On peut donc écrire les équations de bilan de matière pour chacun des réacteurs selon l'équation 4-15 :

$$\frac{dC_1}{dt} = \frac{C_{entree} - C_1}{\tau_1} + \kappa_L a (C^* - C_1) \quad (4-17)$$

$$\frac{dC_{sortie}}{dt} = \frac{C_1 - C_{sortie}}{\tau_2} + \kappa_L a (C_1 - C_{sortie}) \quad (4-18)$$

où τ_1 et τ_2 : temps caractéristiques des 2 réacteurs et C_1 : concentration en oxygène dissous à la sortie du premier réacteur et à l'entrée du second.

En prenant les transformées de Laplace des 2 équations, on obtient :

$$\hat{C}_1(s) = \frac{C_{sortie0} + \frac{C_{entrée}}{\tau_1 s} + \frac{\kappa_L a C^*}{s}}{(s + \frac{1}{\tau_1} + \kappa_L a)} \quad (4-19)$$

$$\hat{C}_{sortie}(s) = \frac{C_{sortie0} + \hat{C}_1(s)(\frac{1}{\tau_2} + \kappa_L a)}{(s + \frac{1}{\tau_2} + \kappa_L a)} \quad (4-20)$$

Puis en incorporant l'équation 4-19 dans 4-20 et prenant la transformée de Laplace inverse, on obtient :

$$C_{sortie}(t) = C_{sortie0} * e^{-\left(\frac{1}{\tau_2} + \kappa_L a\right)t} + \frac{C_{sortie0} \left(\frac{1}{\tau_2} + \kappa_L a\right)}{\left(\frac{1}{\tau_2} - \frac{1}{\tau_1}\right)} \left(e^{-\left(\frac{1}{\tau_1} + \kappa_L a\right)t} - e^{-\left(\frac{1}{\tau_2} + \kappa_L a\right)t} \right) + \frac{\frac{C_{entrée}}{\tau_1} + \kappa_L a C^*}{\left(\frac{1}{\tau_1} + \kappa_L a\right)} \left[1 + \frac{1}{\frac{1}{\tau_1} - \frac{1}{\tau_2}} \left(\left(\frac{1}{\tau_2} + \kappa_L a\right) e^{-\left(\frac{1}{\tau_1} + \kappa_L a\right)t} - \left(\frac{1}{\tau_1} + \kappa_L a\right) e^{-\left(\frac{1}{\tau_2} + \kappa_L a\right)t} \right) \right] \quad (4-21)$$

Dans le cas d'un lit de racines, il faut tenir compte de la respiration. La consommation d'oxygène par les racines est donnée par :

$$OUR = q_{O_2} * X \quad (4-22)$$

où OUR : taux de disparition d'oxygène (oxygen uptake rate), q_{O_2} : taux spécifique de consommation d'oxygène et X : concentration de la biomasse.

Pour les racines de carotte, q_{O_2} est égal à $0.5 \text{ mmol g}^{-1} \text{ DW}$ (M. Jolicoeur, données non publiées) ce qui est similaire aux taux observés chez d'autres espèces de plantes (Van Gulik *et al.*, 1989).

Il faut donc ajouter la composante de la respiration aux équations de bilan 4-14, 4-17 et 4-18, ce qui donne les équations suivantes :

1 CSTR :

$$C'_{sortie} = (C'_{sortie0} - \frac{\frac{C'_{entree}}{\tau} + \kappa_L a C^* - Q_{O_2} \cdot Y}{(\kappa_L a + \frac{1}{\tau})}) * e^{-\left(\kappa_L a + \frac{1}{\tau}\right)t} + \frac{\frac{C'_{entree}}{\tau} + \kappa_L a C^*}{(\kappa_L a + \frac{1}{\tau})} \quad (4-23)$$

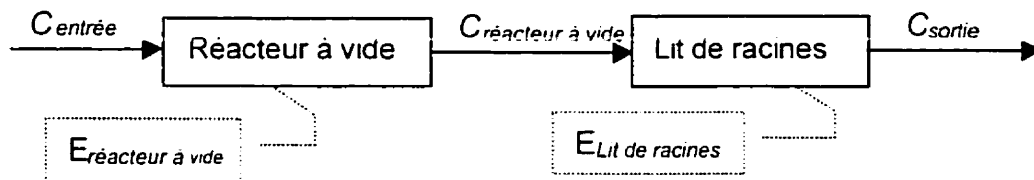
2 CSTR :

$$\begin{aligned} C'_{sortie}(t) = & C'_{sortie0} * e^{-\left(\frac{1}{\tau_2} + \kappa_L a\right)t} + \frac{C'_{sortie0} \left(\frac{1}{\tau_2} + \kappa_L a\right)}{\left(\frac{1}{\tau_2} - \frac{1}{\tau_1}\right)} \left(e^{-\left(\frac{1}{\tau_1} + \kappa_L a\right)t} - e^{-\left(\frac{1}{\tau_2} + \kappa_L a\right)t} \right) + \\ & \frac{\frac{C'_{entree}}{\tau_1} + \kappa_L a C^* - Q_{O_2} \cdot Y}{\left(\frac{1}{\tau_1} + \kappa_L a\right)} \left[1 + \frac{1}{\frac{1}{\tau_1} - \frac{1}{\tau_2}} \left(\left(\frac{1}{\tau_2} + \kappa_L a\right) e^{-\left(\frac{1}{\tau_1} + \kappa_L a\right)t} - \left(\frac{1}{\tau_1} + \kappa_L a\right) e^{-\left(\frac{1}{\tau_2} + \kappa_L a\right)t} \right) \right] \\ & - \frac{Q_{O_2} \cdot Y}{\frac{1}{\tau_2} + \kappa_L a} \left(1 - e^{-\left(\frac{1}{\tau_2} + \kappa_L a\right)t} \right) \end{aligned} \quad (4-24)$$

4.6 SYNTHÈSE DU MODÈLE

Cette section propose une synthèse des éléments du modèle hydrodynamique, afin de rassembler et clarifier les concepts.

La déconvolution de la courbe de DTS de C_{sortie} permet d'obtenir la courbe de DTS pour le lit seul (E_{lit}).



Un modèle qui représente bien les courbes E_{lit} est le modèle des deux CSTR en série de volumes différents (équation 4-9) :

$$E(t) = \frac{1}{\tau_1 - \tau_2} (e^{-(t-\alpha)/\tau_1} - e^{-(t-\alpha)/\tau_2})$$

Les premier et second moments de ce modèle sont calculés à partir des définitions de ces termes (équations 4-12 et 4-13) et à l'aide des paramètres τ_1 et τ_2 du modèle :

$$\tau_M = \int_0^{\infty} t \cdot E(t) dt = \int_0^{\infty} \frac{t}{\tau_1 - \tau_2} \left(e^{\frac{-(t-\alpha)}{\tau_1}} - e^{\frac{-(t-\alpha)}{\tau_2}} \right) \cdot dt$$

$$\sigma^2_M = \int_0^{\infty} (t - t_m)^2 \cdot E(t) dt = \int_0^{\infty} \frac{(t - t_m)^2}{\tau_1 - \tau_2} \left(e^{\frac{-(t-\alpha)}{\tau_1}} - e^{\frac{-(t-\alpha)}{\tau_2}} \right) \cdot dt$$

Grâce aux valeurs des deux moments, on peut calculer le nombre de Péclet pour des conditions de frontières fermées (équation 4-7) :

$$\frac{\sigma^2}{\tau^2} = \frac{2}{Pe} - \frac{2}{Pe^2} * (1 - e^{-Pe})$$

Le temps de mélange est un autre paramètre qui permet l'analyse des courbes de DTS. Il s'agit du temps nécessaire pour que la concentration de sortie du liquide soit à 10% de sa valeur maximale. Il est à noter que les temps de mélange des courbes déconvoluées et non déconvoluées suivent la même tendance. On peut donc utiliser ce paramètre pour traiter toutes les courbes, surtout celles dont la déconvolution est impossible.

Le transfert d'oxygène sans respiration (pour les essais sur le système modèle) est modélisé suivant deux cas :

$$1 \text{ CSTR (4-16)} \quad C_{\text{sortie}} = (C_{\text{sortie0}} - \frac{\frac{C_{\text{entree}}}{\tau} + \kappa_L a C^*}{(\kappa_L a + \frac{1}{\tau})}) * e^{-\left(\kappa_L a + \frac{1}{\tau}\right)t} + \frac{\frac{C_{\text{entree}}}{\tau} + \kappa_L a C^*}{(\kappa_L a + \frac{1}{\tau})}$$

2 CSTR de volumes différents (équation 4-21).

En ajoutant une composante pour la respiration (pour les essais sur un lit de racines), les équations sont modifiées pour obtenir l'équation 4-23 pour le modèle à 1 CSTR et l'équation 4-24 pour le modèle à 2 CSTR de volumes différents.

CHAPITRE 5 - RÉSULTATS ET DISCUSSION

Ce chapitre expose les résultats des expérimentations et travaux qui ont été nécessaires pour cette recherche. La première section sert à identifier le système modèle non vivant qui simule le comportement des racines de carotte dans un bioréacteur. La seconde section traite du choix du garnissage qui est utilisé par la suite dans les cultures en bioréacteur avec garnissages. On étudie ensuite la distribution spatiale des racines pendant leur croissance dans un bioréacteur. La dernière section traite des essais hydrodynamiques qui ont été faits sur trois systèmes différents : le système modèle, un lit de racines et un lit de racines sur garnissages.

5.1 CHOIX DU SYSTÈME MODÈLE NON VIVANT

Les cultures de racines transformées présentent plusieurs obstacles : difficulté à maintenir la stérilité du milieu pendant plusieurs semaines, investissement de temps considérable pour l'entretien des cultures, complexité des montages expérimentaux. L'importance de ces obstacles croît en fonction du nombre d'essais et du nombre de cultures. Étant donné que l'objectif de cette recherche consiste, entre autres, à réaliser une étude hydrodynamique d'un bioréacteur de racines, ce qui nécessite de nombreux essais expérimentaux, il s'avère avantageux de remplacer les racines de carotte par un système modèle possédant les mêmes caractéristiques. La description des critères et la méthodologie de sélection de ce système modèle ont été présentées à la section 3-2. Le choix du système modèle s'est fait en comparant les propriétés hydrostatiques et

hydrodynamiques de différents matériaux avec celles des racines de carotte : perméabilité, rétention liquide statique et rétention gazeuse (porosité).

5.1.1 Perméabilité

La détermination de la pente m_0 du montage à vide est essentielle au calcul de la perméabilité (figure 5-1).

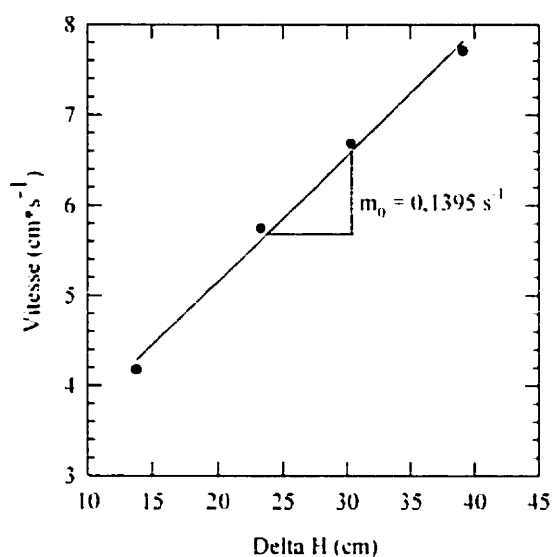


Figure 5-1 Calcul de la perméabilité – montage à vide

D'après la formule 3-4, on obtient la constante de résistance du montage α_r soit $1.32 \times 10^{11} \text{ m}^{-3}$. La figure 5-2 montre que la perméabilité d'un lit de racines de carotte d'une densité de 0.6 à 0.7 g .mL⁻¹ WW se situe entre 2.2×10^{-10} et $4 \times 10^{-10} \text{ m}^2$.

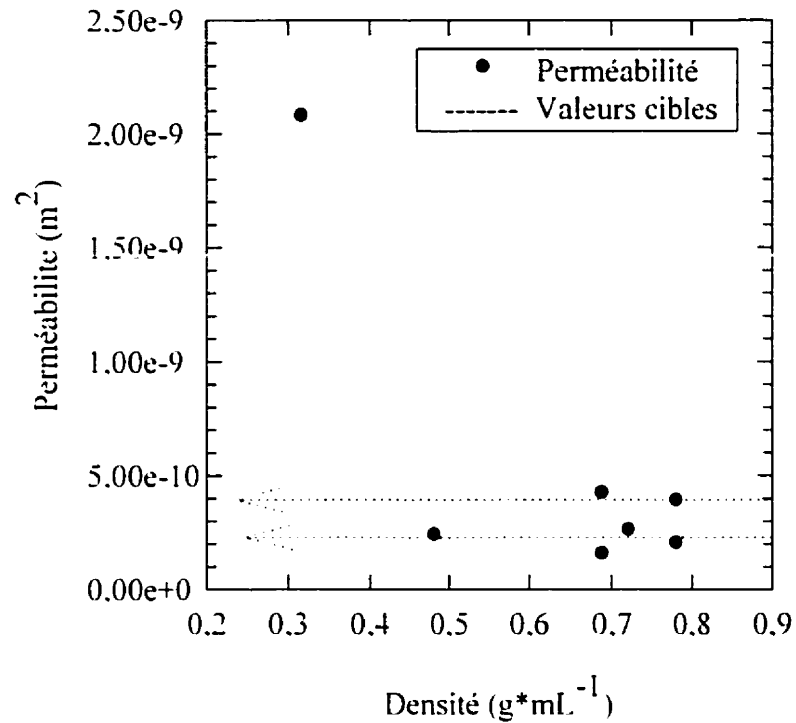


Figure 5-2 Perméabilité des racines de carotte en fonction de la densité du lit

Yu *et al.* (1994) ont mesuré la perméabilité à l'intérieur d'amas de racines d'*Atropa belladonna*: elle est indépendante de la perte de charge et de la vitesse d'écoulement du fluide, mais elle est fortement influencée par la densité du lit. Ils trouvent que la perméabilité est directement reliée à la fraction de vide ϵ_g , allant de $7 \times 10^{-11} \text{ m}^2$ pour $\epsilon_g = 0.22$ à $3.8 \times 10^{-10} \text{ m}^2$ pour $\epsilon_g = 0.46$. Carvalho et Curtis (1998) mesurent que la perméabilité d'un amas de racines de *Hyoscyamus muticus* dans un bioréacteur à convection forcée est de $1.2 \times 10^{-10} \text{ m}^2$, soit 16 fois plus grande que les racines provenant d'un flacon agité.

Voici une description détaillée de la légende utilisée par la suite pour décrire les différents matériaux dont la perméabilité et les rétentions sont étudiées (figures 5-3 à 5-6) :

1. Jute : jute coupé en bouts de 8 à 10 cm.
2. Jute 1/3 : jute coupé en bouts de 8 à 10 cm, séparés en leurs 3 brins.
3. Jute 1/3 nœud : jute coupé en bouts de 8 à 10 cm, séparés en leurs 3 brins qui sont façonnés en petites boules.
4. Jute eff. : jute coupé en bouts de 8 à 10 cm, séparés en leurs 3 brins qui sont éfilochés.
5. Corde : petite corde de coton coupée en bouts de 8 à 10 cm
6. Corde eff. : petite corde de coton coupée en bouts de 8 à 10 cm et qui est éfilochée.
7. Tapisserie : corde à tapisserie coupée en bouts de 8 à 10 cm.
8. Sisal : corde de sisal coupée en bouts de 8 à 10 cm et qui est éfilochée.
9. Tabac : tabac à rouler de marque Drum.

La figure 5-3 présente la perméabilité de plusieurs matériaux en fonction de leur densité, ainsi que la zone cible de perméabilité recherchée. On voit que la perméabilité diminue avec la densité, globalement et pour chaque matériau. Pour le jute éfiloché, on remarque la présence de deux points expérimentaux totalement isolés pour lesquels la perméabilité est beaucoup plus élevée que pour les autres matériaux. Ceci est probablement dû au fait que la structure éfilochée offre une perméabilité dépendante de la façon dont les fibres sont placées.

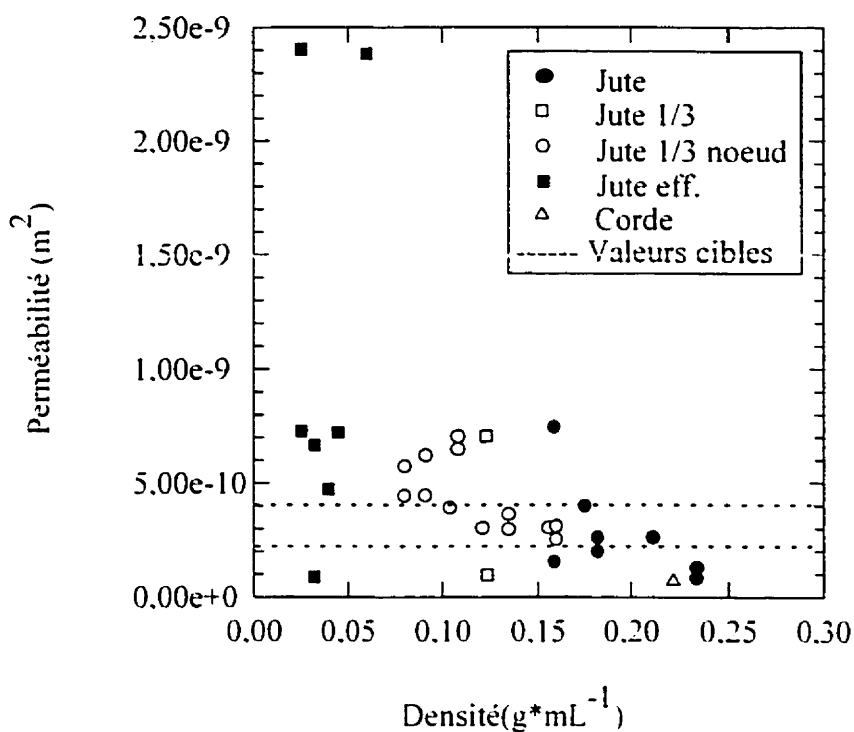


Figure 5-3 Perméabilité des différents matériaux en fonction de leur densité

Les matériaux qui ont une perméabilité correspondant à celle d'un lit de racines de carotte sont :

- le jute entre 0,17 et 0,21 g·mL⁻¹
- le jute 1/3 noeud entre 0,12 et 0,16 g·mL⁻¹.

5.1.2 Rétentions liquide et gazeuse

La figure 5-4 montre que, dans le cas d'un lit de racines de carotte, la rétention gazeuse d'un lit d'une densité de 0,6 à 0,7 g·mL⁻¹ WW est de 0,14 g·g⁻¹ tandis que la rétention liquide statique se situe entre 0,76 et 0,82 g·g⁻¹. Sur cette figure, on observe aussi que la somme des rétentions liquide et gazeuse pour chaque densité de lit est environ égale à

95%. En se référant aux définitions des rétentions (équations 3-1 et 3-2), on voit que la somme de la rétention liquide statique et de la rétention gazeuse représente le volume d'eau ajoutée sur le volume du lit. On en déduit donc que le volume occupé par les racines représente environ 5% du volume total du lit. En considérant les masses au lieu des volumes, on obtient que la somme des rétentions représente la masse d'eau ajoutée sur la masse d'eau équivalente au volume du lit. On en déduit encore que la masse occupée par les racines représente environ 5% de la masse d'eau équivalente au volume du lit.

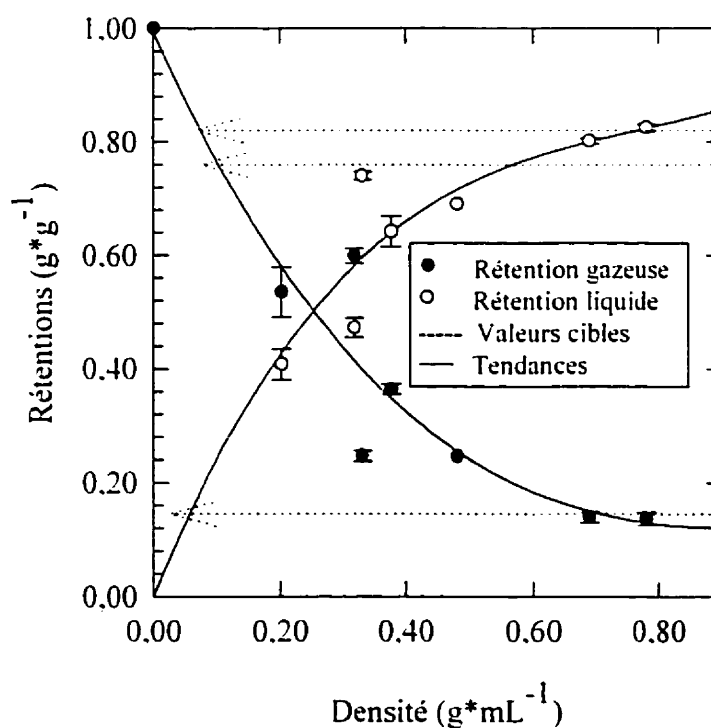


Figure 5-4 Rétentions liquide et gazeuse d'un lit de racines de carotte en fonction de sa densité

Les figures 5-5 et 5-6 présentent les rétentions liquide et gazeuse des différents matériaux étudiés. On remarque que la rétention liquide statique augmente et que la rétention gazeuse diminue en fonction de la densité des lits de matériau.

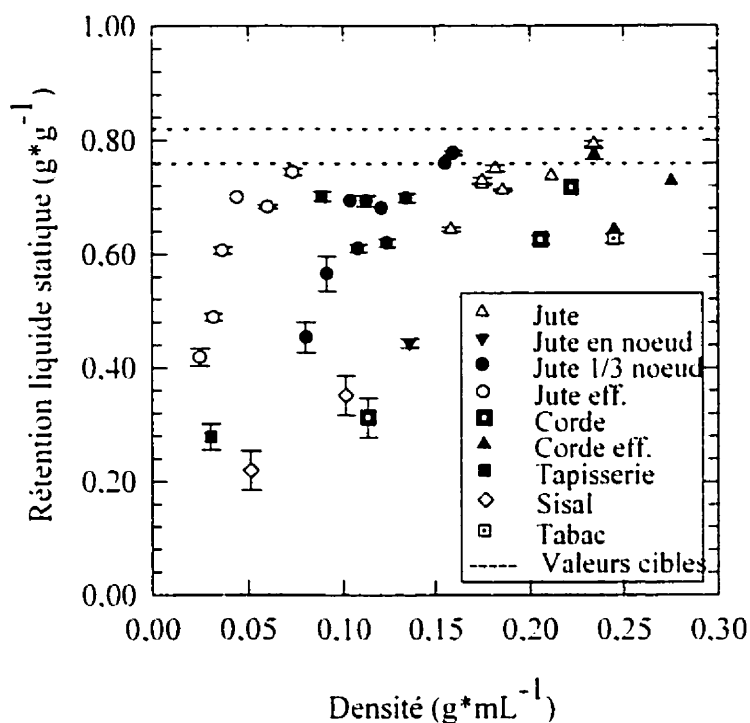


Figure 5-5 Rétention liquide statique des différents matériaux en fonction de leur densité

Les matériaux dont la rétention liquide statique correspond à celle d'un lit de racines de carotte sont :

- le jute à 0.23 g·mL⁻¹
- le jute 1/3 noeud à 0.15-0.16 g·mL⁻¹
- la corde effilochée à 0.23 g·mL⁻¹.

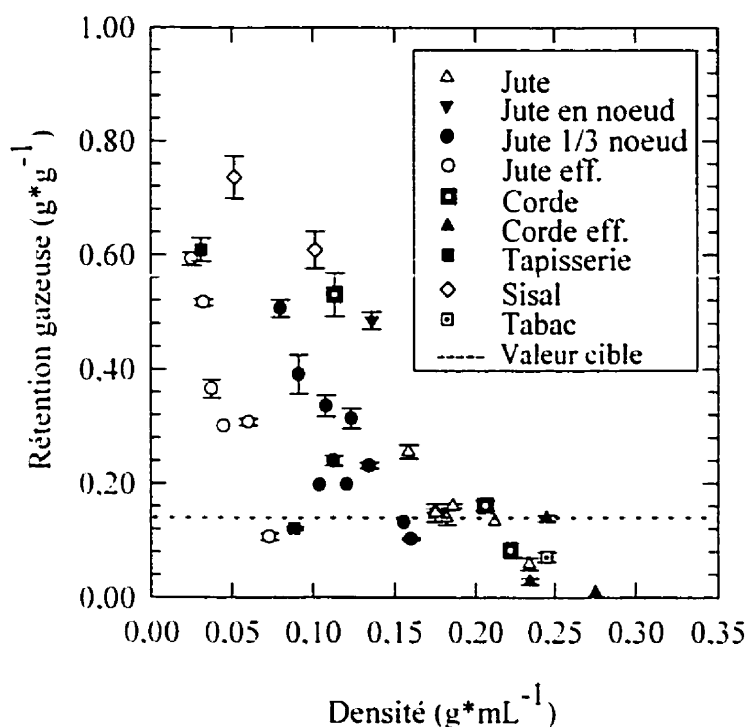


Figure 5-6 Rétention gazeuse des différents matériaux en fonction de leur densité

Les matériaux dont la rétention gazeuse correspond à celle d'un lit de racines de carotte

sont :

- le jute de 0.17 à 0.22 g·mL⁻¹
- le jute 1/3 noeud à 0.16g·mL⁻¹
- la corde effilochée à 0.24 g·mL⁻¹
- la corde à 0.21 g·mL⁻¹.

Le seul système modèle dont toutes les caractéristiques sont similaires à celles d'un lit de racines de carotte pour une même densité est le jute 1/3 noeud à une densité de lit de 0.16 g·mL⁻¹. De plus, la porosité du matériau ne change pas avec le temps : lorsque

gorgé d'eau aucune compaction n'est observée dans le temps. Même si l'apparence physique de ce système est différente d'un lit de racines de carotte, leurs principales propriétés sont semblables, ce qui laisse croire que leur comportement hydrodynamique sera aussi similaire.

5.2 CHOIX DU GARNISSAGE

L'étude exploratoire des différents garnissages susceptibles de servir de support lors des cultures de racines transformées est présentée dans cette section. Il est impératif de déterminer si la taille et la géométrie du garnissage influencent la qualité de la distribution et de l'accrochage des racines dans les cultures. De plus, la procédure d'inoculation du bioréacteur est aussi étudiée afin de mettre en évidence les difficultés liées à la mise à l'échelle du procédé. Un plan de tamisage est employé pour réaliser cette étude et identifier les facteurs qui ont un effet significatif sur les réponses et les maximiser.

Les facteurs, les modalités, les critères ainsi que le plan de tamisage sont présentés dans la section 3.5.2.2 du chapitre Matériel et méthodes. Tous les résultats des cultures qui ont servi à calculer les réponses sont présentés en annexe B. Chaque réponse est notée sur un total de 10 et représente le degré de performance par rapport au critère qualitatif. La moyenne des réplicats pour chaque réponse est présentée au tableau 5-1 et les diagrammes d'éboulement identifiant les effets significatifs sont présentés à la figure 5-7.

Tableau 5-1 Moyenne des réplicats de chaque essai pour les trois réponses

Essai	Y1Moy	Y2Moy	Y3Moy	YMoy
1	10	10	9	9.7
2	7	5	10	7.3
3	10	10	7.5	9.2
4	9	10	9	9.3
5	3.5	6	6	5.2
6	6	6	5	5.7
7	10	2	3.5	5.2
8	5.5	2	5	4.2

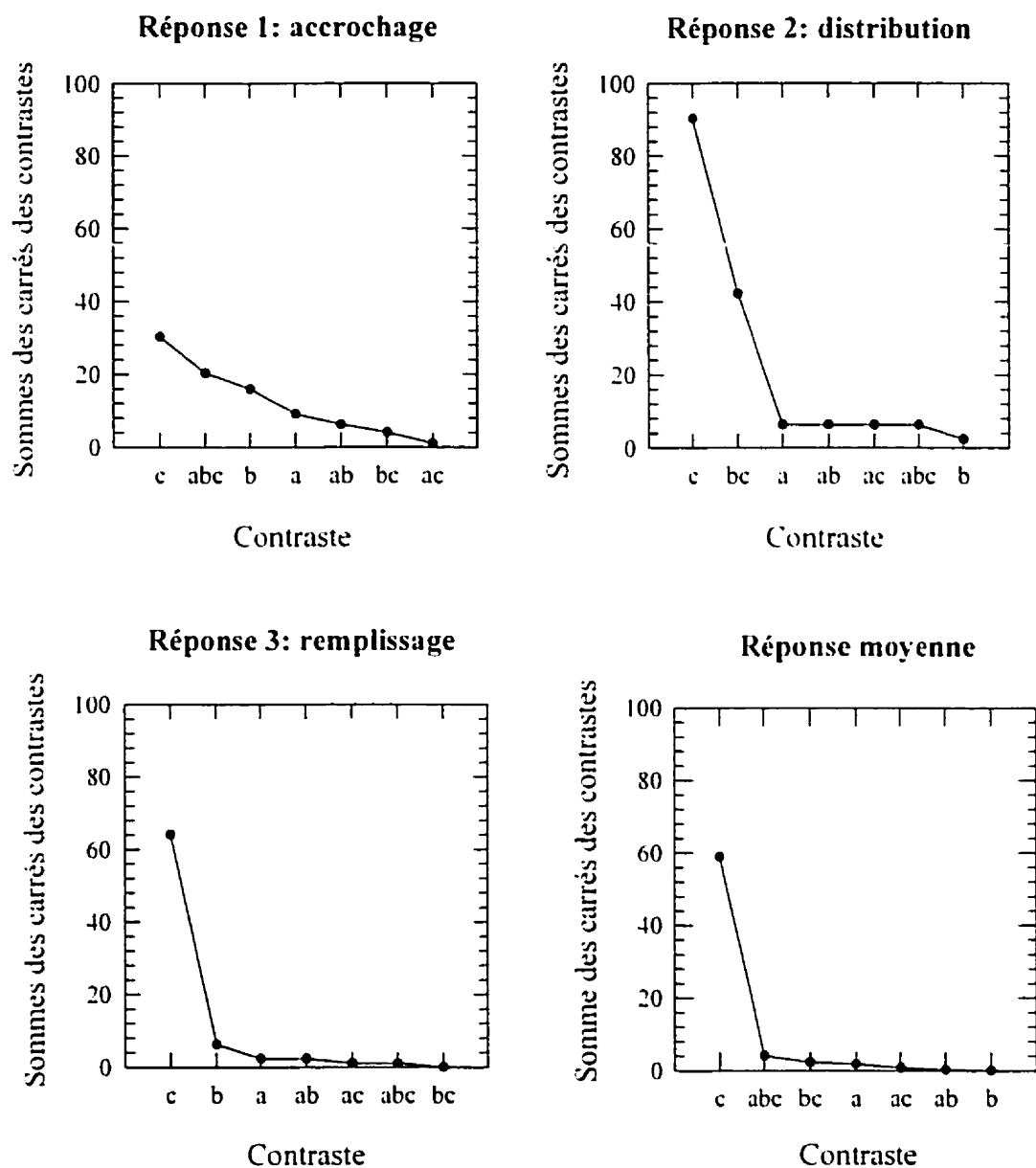


Figure 5-7 Diagramme d'éboulement pour les trois réponses et la moyenne des réponses

On voit que pour l'accrochage, il n'y a pas de démarcation claire, et les sommes des carrés ne sont pas très importantes. On note tout de même que les effets c, abc, b et a

sont les plus importants. Dans le cas de la distribution, ce sont les effets c et bc qui sont les plus importants, tandis que dans le cas du remplissage, seul l'effet c est important. Le diagramme d'éboulement de la moyenne des réponses montre clairement que l'effet c est le plus important.

Donc, dans le cas de la distribution et du remplissage, le seul critère à considérer est le mode d'inoculation. En effet, l'utilisation du mode d'inoculation « aléatoire » a donné de très mauvais résultats car les racines n'étaient pas bien accrochées au garnissage et avaient tendance à tomber au fond du réacteur. Une méthode d'inoculation assurant une distribution des racines dans les garnissages et un accrochage solide permettrait de maximiser ces réponses.

L'analyse statistique permet aussi de déterminer les modalités optimales des facteurs. Seul le critère « accrochage » (réponse 1) permet de choisir le garnissage le plus efficace car c'est le seul critère qui donne des sommes des carrés des contrastes significatifs pour les facteurs a, b et c. Il suffit de choisir la modalité des trois facteurs du même signe que celui du demi-effet (se référer au tableau 3-2 pour les modalités). Le tableau 5-2 résume cette démarche. Le garnissage de type *Tri pack* de 2" de diamètre est donc sélectionné comme le plus performant afin de servir de support de culture.

Tableau 5-2 Caractéristiques du garnissage sélectionné

	A	B	C
Demi-effet	-0,75	1	-1.38
Modalité	-1	1	-1
Facteur	TP	2"	Placé

D'autres observations ont été faites à partir de ces 16 cultures. À propos de l'inoculum mycorhizé, il a été observé qu'il n'a pas donné de résultats différents de l'inoculum non mycorhizé. Les racines mycorhizées sont généralement plus ramifiées, ce qui serait susceptible de favoriser l'accrochage. Quant à la taille de l'inoculum, il a été observé qu'un petit inoculum donne un lit plus uniforme et moins dense avec beaucoup moins de gros amas de racines très compacts où des limitations de transfert sont possibles. Lors de l'inoculation de gros bioréacteurs, on devra donc favoriser de petits inoculum, bien répartis dans le bioréacteur.

Les figures A, B, C et D de la figure 5-8 présentent quelques exemples de différents types de garnissages utilisés comme supports de culture. La figure A montre l'inoculation d'un bioréacteur avec des garnissages de type *Tri pack* de 1". Il s'agit d'une inoculation de type « placée ». La figure B présente un bioréacteur de garnissage de type *Tri pack* de 2" juste avant sa récolte. La figure C donne l'exemple de garnissages de type *Pall rings* de 2" provenant d'un bioréacteur dont les racines étaient

mal distribuées. Par contre, sur la figure D, on peut voir des garnissages de type *Tri pack* de 1" provenant cette fois d'un bioréacteur dont les racines sont bien distribuées.

Ces photos sont l'illustration du comportement des racines sur différents garnissages. On voit que les gros garnissages *Pall rings* n'ont pas permis aux racines de s'accrocher dès l'inoculation, ce qui a conduit à une mauvaise distribution des racines dans le bioréacteur. On voit aussi sur cette photo C qu'il y a de gros amas de racines provenant du fond du réacteur et du haut du réacteur. Il n'y a que très peu de racines dans chaque garnissages. Par contre, sur la photo D, on voit que les garnissages du haut du bioréacteur sont plus denses que les autres, mais qu'il y a présence de plusieurs racines dans tous les autres garnissages du bioréacteur. Tous les garnissages de ce bioréacteur auraient pu servir d'inoculum pour une nouvelle culture. Les garnissages moins denses auraient fait de meilleurs inoculum, en créant des cultures moins denses, comme il a été dit précédemment.

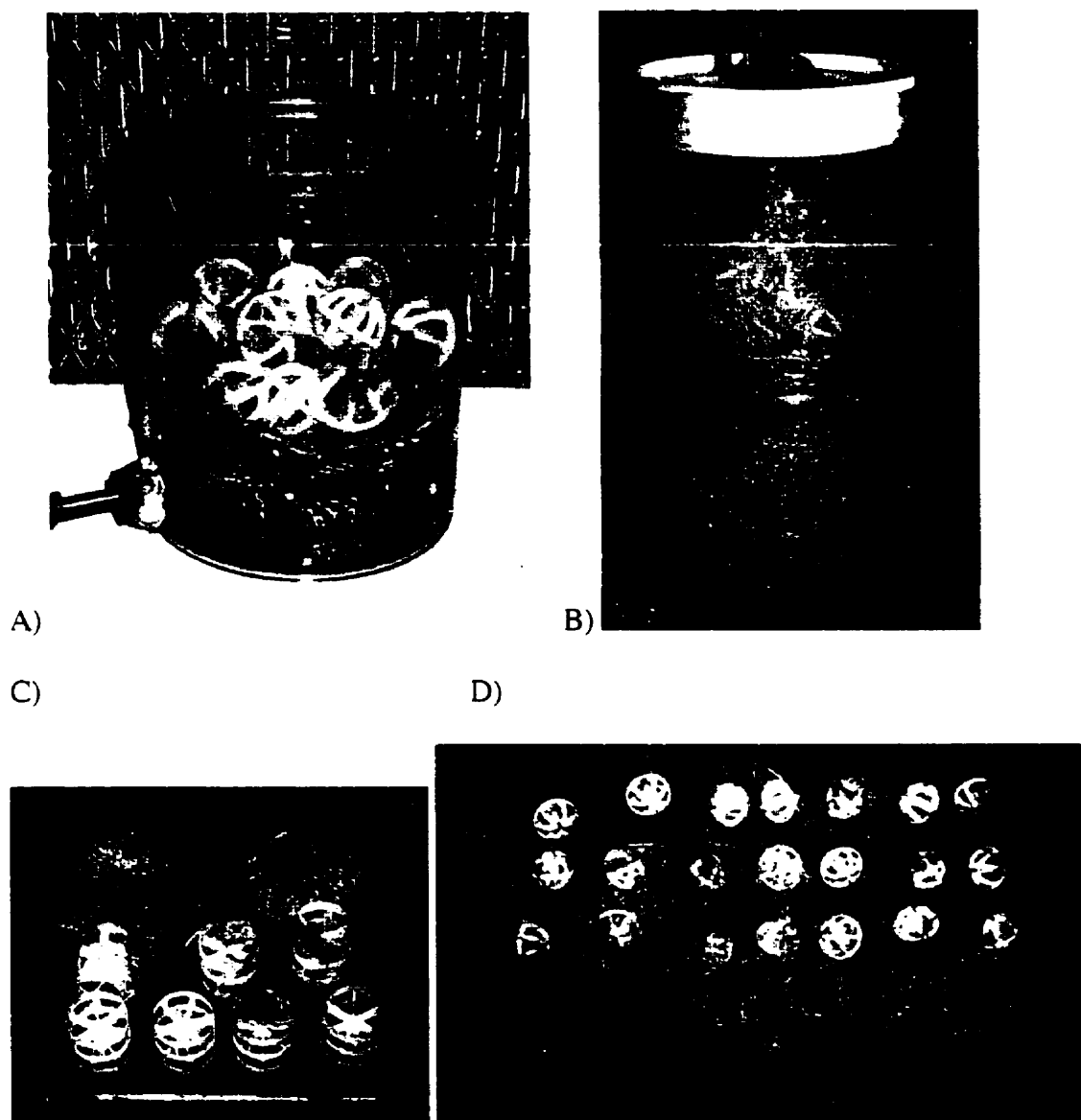


Figure 5-8 A) Racines et garnissages (*Tri pack 1"*) lors de l'inoculation; B) Racines et garnissages (*Tri pack 2"*) avant la récolte; C) Garnissages (*Pall rings 2 "*) provenant d'un bioréacteur dont les racines sont mal distribuées; D) Garnissages (*Tri pack 1"*) provenant d'un bioréacteur dont les racines sont bien distribuées.

5.3 DISTRIBUTION SPATIALE DES RACINES EN CROISSANCE

Cette section traite de l'évolution de la distribution spatiale des racines en croissance dans les garnissages. Deux expériences ont été menées pour faire ces observations, la première dans un bioréacteur de 2 L et la deuxième dans un bioréacteur de 6 L. Dans chacun des cas, l'inoculum est placé dans un seul garnissage au centre du bioréacteur, au milieu de plusieurs garnissages vides. Pour la deuxième culture, il s'agissait d'un garnissage provenant d'une autre culture, rempli de racines très denses. Aucun échantillonnage n'a été effectué avant la récolte, seules des observations visuelles sont relatées.

Les tableaux 5-3 et 5-4 présentent les observations faites pendant les cultures dans le bioréacteur de 2 L et de 6 L. Les figures 5-9 et 5-10 montrent ces bioréacteurs à différents moments. À la figure 5-10, on voit sur la photo C qu'il y a présence de racines dans les garnissages sous l'amas principal de racines, et que certains de ces garnissages pourraient servir d'inoculum à une nouvelle culture.

Tableau 5-3 Observations du développement de la culture en bioréacteur de 2 L

Jours de culture	Description
31	Un côté du bioréacteur est colonisé par les racines qui montent aussi sur la paroi. Une racine grimpe à travers les garnissages jusqu'en haut du bioréacteur.
47	Les racines poussent surtout au centre du bioréacteur où un des côtés est plus épais. Elles descendent légèrement sous le point d'inoculation.
57	Le lit épaissit et la section est recouverte à 75%. Les racines montent jusqu'en haut et descendent presque jusqu'en bas sur un des côté (voir figure 5-9).
72	L'anneau central est complètement colonisé et les racines montent presque jusqu'en haut. Le lit fait environ 6 cm d'épaisseur.
91	Les racines atteignent l'alimentation du milieu liquide et gênent sa bonne distribution.
98	Arrêt de la culture. Le lit atteint 8.25 cm d'épaisseur et une masse de 217 g WW de racines est récupérée

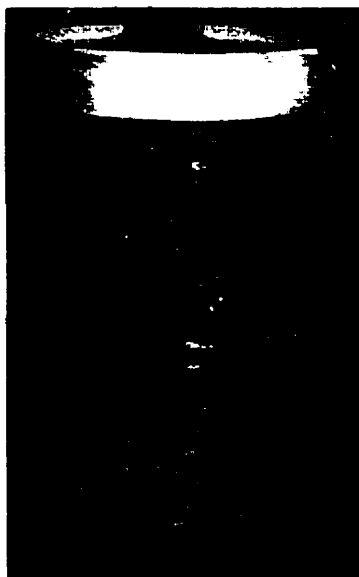
**Figure 5-9 Bioréacteur de 2L, croissance spatiale après 57 jours de culture**

Tableau 5-4 Observations du développement de la culture en bioréacteur de 6L

Jours de culture	Description
15	Le lit a 3 cm d'épaisseur et la surface couverte par les racines forme un demi anneau. On voit très clairement les racines coloniser les garnissages adjacents horizontalement. Le lit semble épaisser vers le bas. (Figure 5-10 A)
23	Les racines occupent toute la section du bioréacteur. (Figure 5-10 B)
29	Les racines lèchent les parois du bioréacteur. Le lit continue à épaisser. Il semble épaisser vers le haut.
37	Le lit a 4 cm d'épaisseur et très dense.
57	Les racines commencent à devenir plus foncées, signe d'un manque de nutriments. Le lit fait 6,25 cm.
72	Les racines demeurent blanches sur le dessus, mais sont foncées dans le bas du bioréacteur où elles poussent aussi le long des parois. Le lit fait 7 cm.
100	Arrêt de la culture car les racines obstruent tous les tuyaux. Le lit atteint 8,5 cm d'épaisseur et une masse de 450 g WW de racines est récupérée (figure 5-10 C). Les racines du bas du bioréacteur ont formé des cals, signe d'un manque de nutriments.

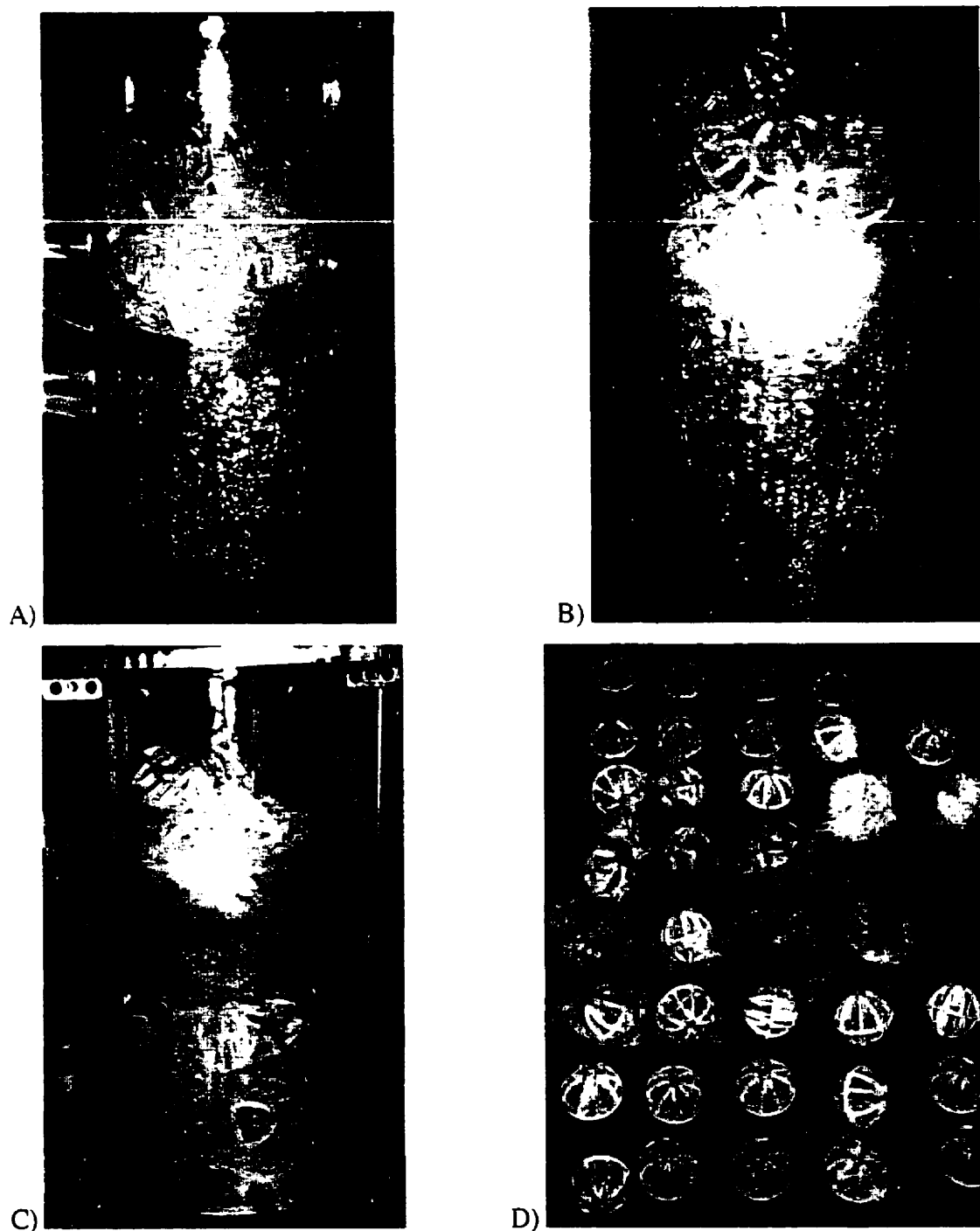


Figure 5-10 Bioréacteur de 6L, croissance spatiale A) après l'inoculation B) 23 jours de culture C) juste avant la récolte D) les garnissages de la partie supérieure du bioréacteur, dans l'ordre où ils ont été retirés du bioréacteur.

L'observation de ces 2 cultures permet de décrire sommairement le développement spatial des racines. Les racines commencent par couvrir globalement tout l'espace latéral disponible. Elles poussent aussi vers le bas car les nutriments y sont abondants. Par la suite, le lit se densifie et lorsque les racines situées dans le haut du bioréacteur deviennent plus denses, moins de nutriments sont disponibles pour les niveaux inférieurs. Le lit cesse alors de s'épaissir vers le bas mais continue à croître vers le haut où le milieu frais est abondant.

L'observation de ces cultures a aussi permis de savoir que le mode d'alimentation du milieu liquide utilisé n'est pas adéquat, même s'il s'agit d'un mode brouillard. La dispersion du liquide serait plus efficace avec un système industriel d'alimentation. Comme il sera relaté plus tard, des atomiseurs UniJet ont été utilisés pour les cultures de lits de racines dans les bioréacteurs de 3.6 L et 20 L et ils se sont avérés très efficaces.

La figure 5-11 présente la répartition du poids des racines sur toute la hauteur du bioréacteur de 2 L à la récolte. On y observe que la majorité de la masse est située autour du point d'inoculation, mais qu'il y a des racines sur toute la hauteur du bioréacteur.

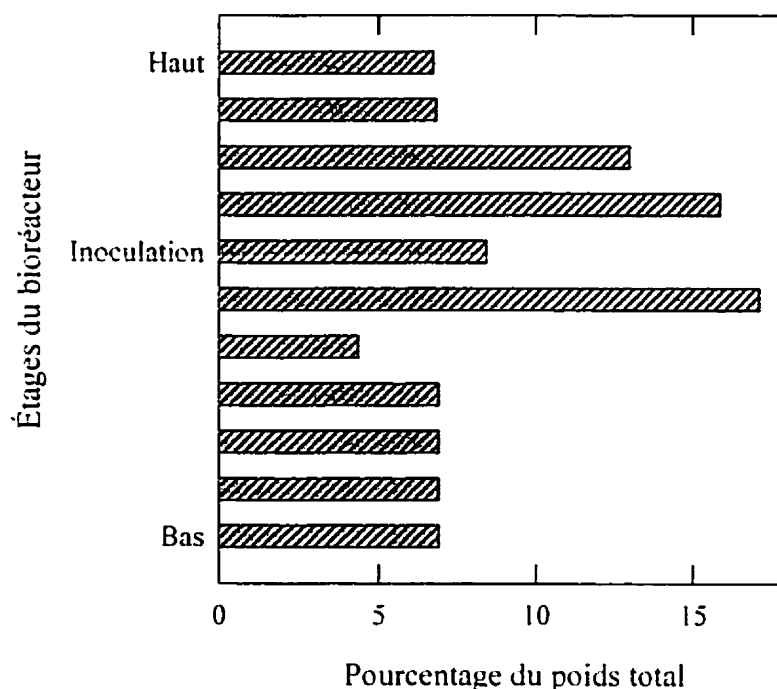


Figure 5-11 Répartition du poids des racines en fonction de la hauteur du bioréacteur de 2 litres au moment de la récolte, après 98 jours de culture.

La figure 5-12 montre la répartition de la masse de racines dans le bioréacteur de 6L. étage par étage. Comme pour le bioréacteur de 2 L. la majorité de la masse se situe autour du point d'inoculation. Cette figure présente également la répartition dans le bioréacteur du remplissage des garnissages. Pour chaque étage du bioréacteur, la moyenne du remplissage de chaque garnissage est calculée. Ainsi, un étage dont chaque garnissage est plein de racines a 100% de remplissage, tandis qu'un étage dont les garnissages sont traversés de quelques racines seulement a un remplissage beaucoup moindre. On remarque que les garnissages sont presque tous remplis à 100% autour du

point d'inoculation mais, en général, ils contiennent près de 20% de racines. sauf pour ceux situés en haut du bioréacteur.

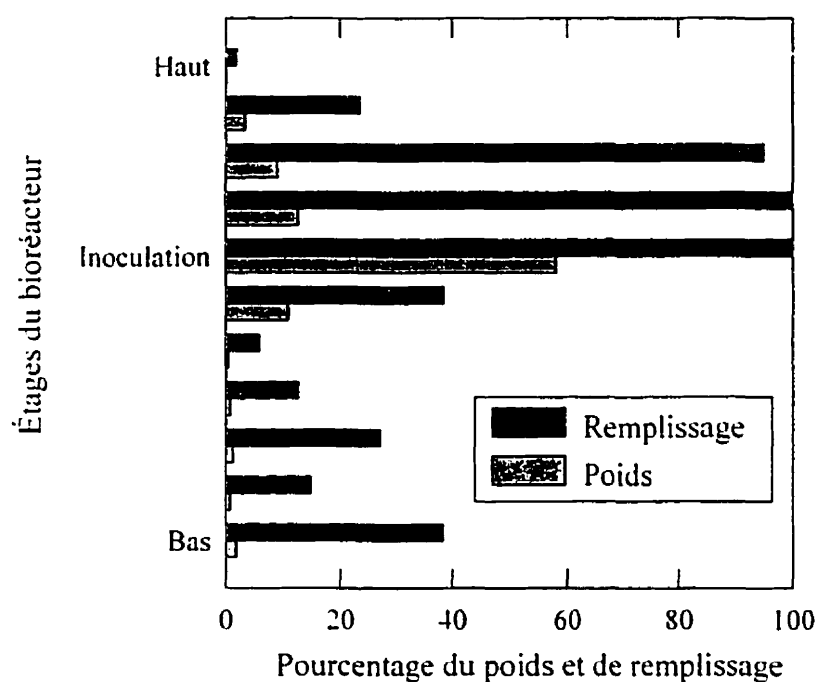


Figure 5-12 Répartition du poids des racines et du remplissage des garnissages en fonction de la hauteur du bioréacteur de 6 L au moment de la récolte, après 100 jours de culture. Le remplissage est la moyenne sur chaque étage du degré de remplissage de chaque garnissage.

5.4 ÉTUDE DE L'HYDRODYNAMIQUE

Cette section porte sur l'étude de l'hydrodynamique du système modèle, du lit de racines, et du lit de racines avec garnissages. Des observations sur les cultures de racines réalisées pour cette étude sont tout d'abord présentées. Ensuite, différents exemples de modèles sont exposés et comparés aux données brutes. Enfin, le nombre de Péclet, le temps de mélange et le transfert d'oxygène sont présentés selon différentes conditions opératoires sur le système modèle, le lit de racines, et le lit de racines avec garnissages.

Dans ce chapitre, les courbes qui décrivent les changements survenus à différents moments durant les cultures sont présentées en fonction de l'épaisseur du lit plutôt qu'en fonction de la biomasse. En effet, le suivi de la biomasse permet habituellement de connaître la masse des racines vivantes du lit. La méthode du suivi de la biomasse utilise la consommation des principaux nutriments du milieu de culture pour calculer la masse de racines vivantes participant à cette consommation. Mais dans les cultures qui ont été réalisées dans le cadre de cette étude, il a été observé qu'après un certain temps, la biomasse demeurait pratiquement constante tandis que le lit continuait à épaisser. Puisque l'hydrodynamique est fonction de la masse totale des racines (vivantes et mortes) dans le bioréacteur et non de la masse de racines vivantes, c'est donc l'épaisseur du lit de racines qui a été choisie comme variable indicatrice de la masse des racines dans le bioréacteur.

5.4.1 Observations expérimentales

Cette section relate les observations relevées durant les cultures réalisées sur lit sans garnissage et sur lit avec garnissages. Des mesures hydrodynamiques ont été faites tout au long des cultures. Dans le premier cas, quatre cultures ont été accomplies. Seule la quatrième culture s'est rendue à terme, les autres ayant rencontré divers problèmes. Elle a atteint une masse humide totale de 811 g WW (81 g DW) pour une densité de $0.6 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ WW dans le volume du lit. La figure suivante montre le développement d'une culture de racines, lors de l'inoculation, après 40 jours, après 75 jours et juste avant la récolte après 90 jours. La couleur plus foncée des figures D et E dans le bas du lit indique une zone où les racines sont nécrosées. On voit aussi en C la coupe d'un lit de 4 cm après récolte, ce qui permet d'en apprécier la densité.

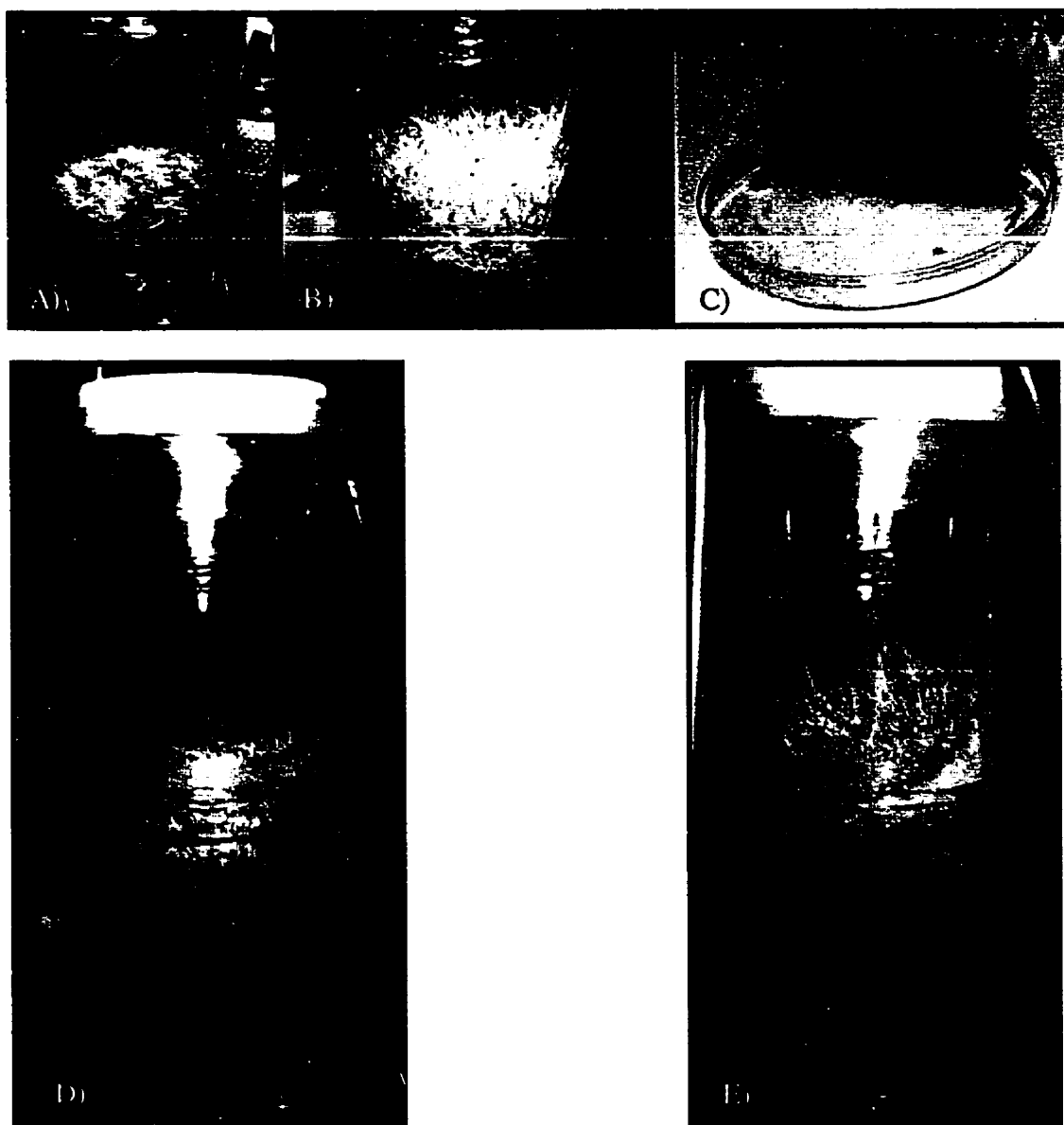


Figure 5-13 Lit de racines sans support de culture A) lors de l'inoculation B) après quelques semaines (40 jours) C) coupe d'un lit de racines de 4 cm d'épaisseur (26 jours) D) après 75 jours de culture E) juste avant la récolte, après 90 jours de culture.

Dans le cas de la culture avec garnissages, un bioréacteur de 20L et des garnissages de type *Tri pack* de 2" ont été utilisés. Une seule culture a pu se développer suffisamment pour permettre des mesures hydrodynamiques. La figure suivante montre deux photos du bioréacteur, une quelques jours après l'inoculation où l'on voit les amas de racines distribués à travers les garnissages et l'autre juste avant la récolte (626 g WW et 55 g DW) où l'on voit une zone de croissance plus importante en haut du bioréacteur.

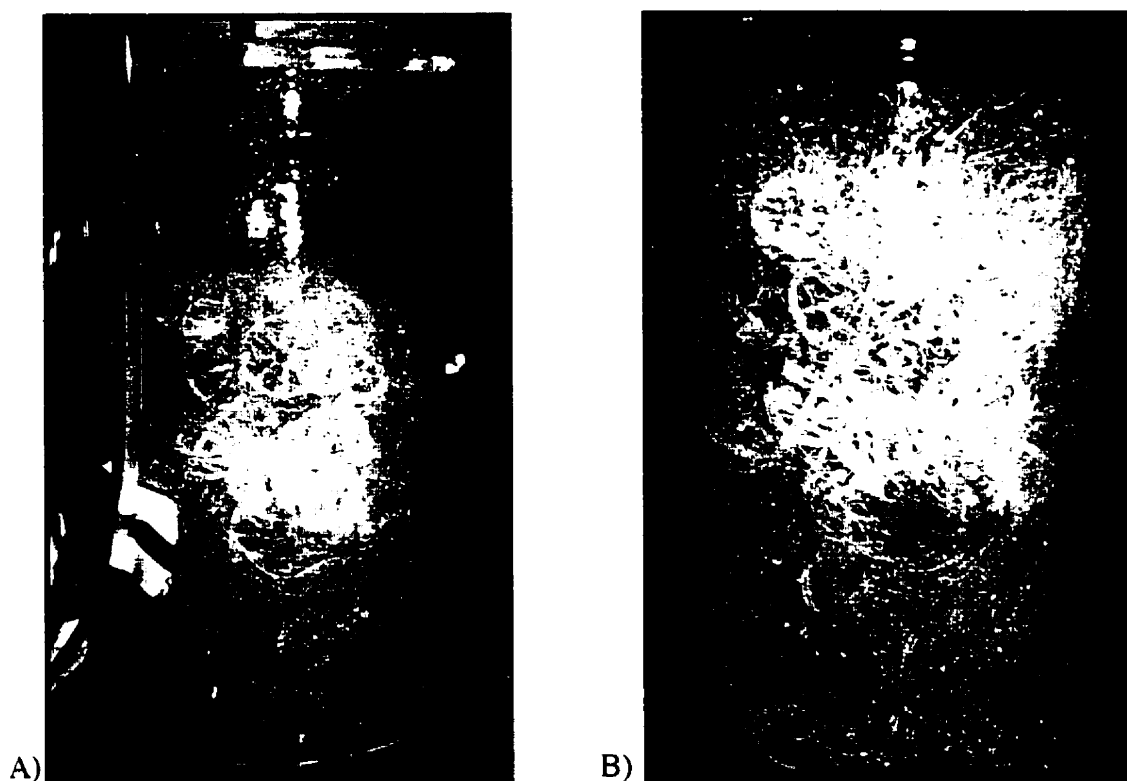


Figure 5-14 Bioréacteur de 20L avec garnissages *Tri pack* de 2" A) quelques jours après l'inoculation B) après 88 jours de culture.

Lors des cultures dont l'alimentation liquide est fournie par un distributeur industriel de type Unijet (i.e. les deuxième, troisième et quatrième cultures de lit simple et la culture avec garnissages), il a été observé que la dispersion du liquide est très efficace, mieux qu'avec les distributeurs maison. Les gouttelettes sont très fines et la zone arrosée couvre tout le diamètre du bioréacteur. Par contre, ces distributeurs se sont avérés beaucoup plus sensibles aux blocages pouvant survenir durant les cultures et ont effectivement forcé l'interruption de quelques unes des cultures. Ce blocage du distributeur est probablement causé par la cristallisation du sucre du milieu de culture. Il est aussi possible que des amas cellulaires ou protéiques soient à l'origine de ce problème, même si les filtres placés devant l'alimentation liquide devaient servir à contourner ce problème.

5.4.2 Comparaison générale entre les courbes de DTS et le modèle

Cette section est consacrée à la démonstration de la concordance entre le modèle hydrodynamique choisi et les courbes de DTS expérimentales. En suivant une démarche identique à celle utilisée pour le développement du modèle présenté au chapitre 4, des courbes de DTS typiques sont comparées à différents modèles. Notons que toutes les courbes de DTS expérimentales des bioréacteurs étudiés dans le cadre de ce projet n'ont révélé aucun court-circuit. La forte asymétrie de certaines courbes laisse soupçonner la présence de zones stagnantes dans le réacteur, même si les queues observées sont peu prononcées.

La courbe choisie pour comparer les données discrètes aux différents modèles (figures 5-15 à 5-18) est représentative des autres courbes obtenues dans les bioréacteurs (voir l'annexe E pour toutes les courbes expérimentales et l'annexe F pour les courbes déconvoluées). Il s'agit d'une courbe de DTS obtenue par injection de traceur dans un bioréacteur de 20 L avec garnissages et une culture de racines de carotte de 49 jours ($\tau = 192$ s et $\sigma^2 = 10626$ s²).

La première étape de cette analyse consiste d'abord à comparer les données expérimentales aux réacteurs idéaux : écoulement piston et réacteur parfaitement mélangé (CSTR). L'abscisse est exprimée en temps adimensionnel θ ($\theta = t / \tau$), où τ correspond au temps de résidence moyen dans le réacteur (voir équation 4-2) et

$$E(\theta) = \tau E(t) \quad (5-1)$$

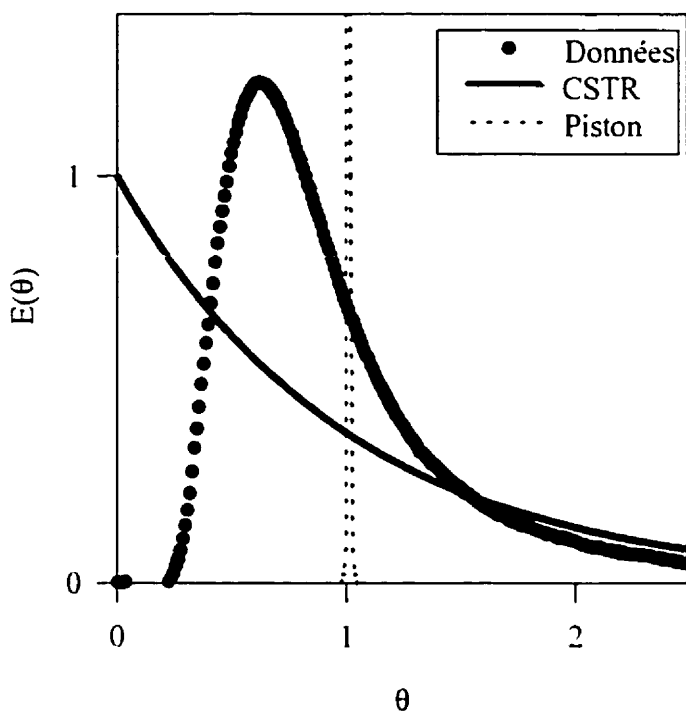


Figure 5-15 Comparaison entre une courbe typique de DTS expérimentale (culture 34, jour 49) et les courbes des bioréacteurs idéaux CSTR et piston.

On remarque sur la figure 5-15 que les courbes des deux modèles (CSTR et piston) ne représentent pas de façon satisfaisante le comportement de la courbe expérimentale. Lorsque les modèles de réacteurs idéaux ne sont pas adéquats, on utilise souvent le modèle des réacteurs parfaitement mélangés en série et le modèle de la dispersion axiale de l'écoulement piston.

Pour le modèle des CSTR en série, le nombre « n » de réacteurs en série (équation 4-4) est calculé pour les données expérimentales: $n = \tau^2 / \sigma^2 = 192^2 / 10626 = 3.47$. Et pour le modèle de dispersion axiale, on obtient $Pe = 4,17$ avec l'équation 4-7. La figure

suivante compare une courbe de DTS expérimentale aux courbes des modèles de CSTR en série et de dispersion axiale. Ici encore, on remarque que ces modèles ne donnent pas une représentation adéquate de la courbe expérimentale.

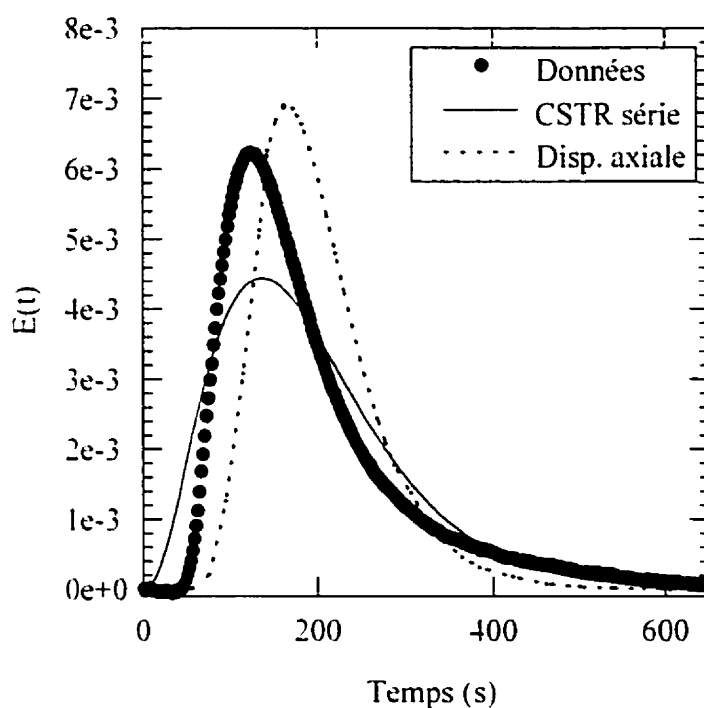


Figure 5-16 Comparaison entre une courbe expérimentale typique (culture 34, jour 49) et les courbes des modèles de CSTR en série ($n = 3,47$) et de dispersion axiale ($Pe = 4,17$).

Le modèle des 2 CSTR en série de volumes différents permet d'ajuster les deux paramètres τ_1 et τ_2 , et ainsi d'obtenir une représentation conforme des courbes expérimentales. (voir la figure 5-17 où $\tau_1 = 60$ s et $\tau_2 = 68$ s et $\alpha = 50$ s). Il est à noter que quelques autres modèles hydrodynamiques à deux paramètres avec différents

agencements de volumes morts, CSTR et réacteurs piston ont été essayés pour tenter de représenter les courbes expérimentales. sans y parvenir aussi efficacement qu'avec le modèle des 2 CSTR de volumes différents.

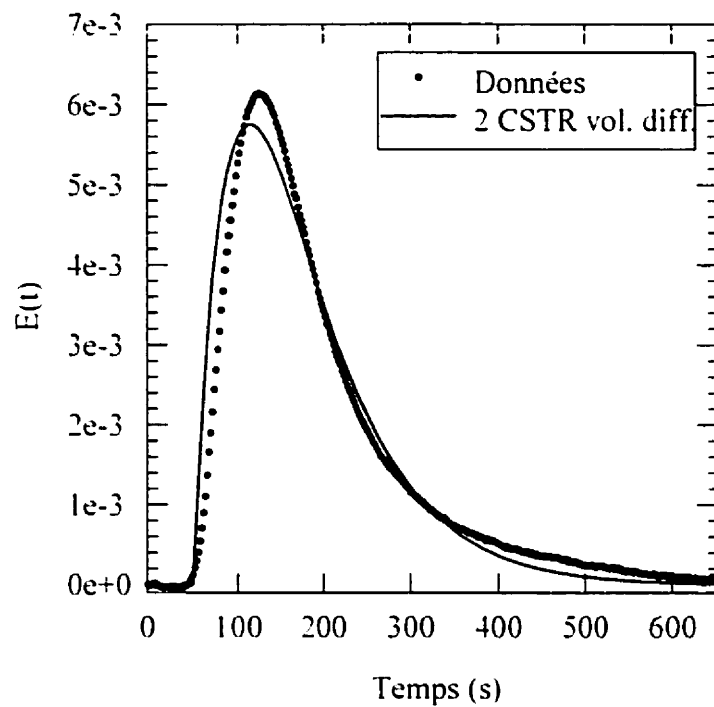


Figure 5-17 Comparaison entre une courbe de DTS expérimentale (culture 34, jour 49) et celle du modèle à deux CSTR en série de volumes différents avec $\tau_1 = 60$ s et $\tau_2 = 68$ s.

De plus, la figure 5-18 montre que le modèle à deux CSTR en série de volumes différents représente bien les courbes de DTS déconvoluées.

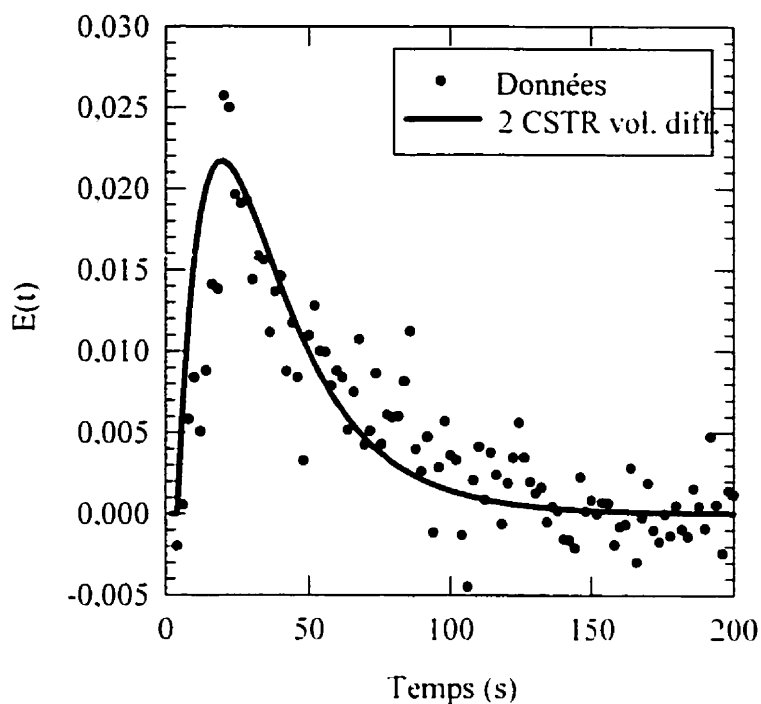


Figure 5-18 Comparaison de la courbe de DTS déconvoluée du lit seul avec garnissages (culture 34, jour 49) avec celle du modèle à deux CSTR de volumes différents avec $\tau_1 = 10$ s et $\tau_2 = 25$ s.

Il est probable que les modèles plus complexes développés pour les colonnes à garnissages, cités à la section 2.5, donneraient une meilleure représentation des courbes de DTS et permettraient une meilleure compréhension phénoménologique. En effet, ces modèles tiennent compte du mélange lent du liquide statique absorbé dans le lit échangeant avec le liquide dynamique en écoulement piston.

Cependant, ces modèles sont complexes puisqu'ils comportent 4 paramètres tandis que le modèle des 2 CSTR en série de volumes différents est satisfaisant pour donner une

représentation simple et exacte des courbes expérimentales. En effet, il permet d'identifier les paramètres τ_1 et τ_2 et ainsi d'obtenir le nombre de Péclet, qui lui, fournit une explication phénoménologique. Il est donc préférable de regarder le modèle à deux CSTR non comme un modèle strictement phénoménologique, mais comme un modèle d'utilisation simple qui permet certaines déductions.

On peut quand même proposer une explication phénoménologique qui, tout en restant imparfaite, permet une représentation plus concrète du modèle. On place donc le premier réacteur de la série en haut du réacteur pour qu'il représente la première couche du lit, celle qui reçoit directement l'alimentation liquide par atomisation. Le volume de ce réacteur est petit et le mélange rapide à cause de l'agitation causée par le liquide qui tombe sur le lit. Le second réacteur de la série est en dessous du premier, duquel il obtient son alimentation liquide par percolation. Son volume est plus important et le mélange est plus lent.

5.4.2.1 Échelons

Dans le but de valider la méthode par injection de traceur, plusieurs expériences « échelon » ont été effectuées sous différentes conditions d'opération et dans plusieurs bioréacteurs. Toutes les courbes échelons obtenues par expérimentation ont donné, une fois dérivées, une forme de courbe de DTS très semblable à celle des courbes de DTS « injection » pour une même configuration. Ceci démontre que la méthode par injection de traceur est une méthode valide pour déterminer l'hydrodynamique des

bioréacteurs. La figure suivante montre un exemple de la similitude entre une courbe de DTS obtenue par injection et la dérivée d'une courbe de DTS obtenue par échelon.

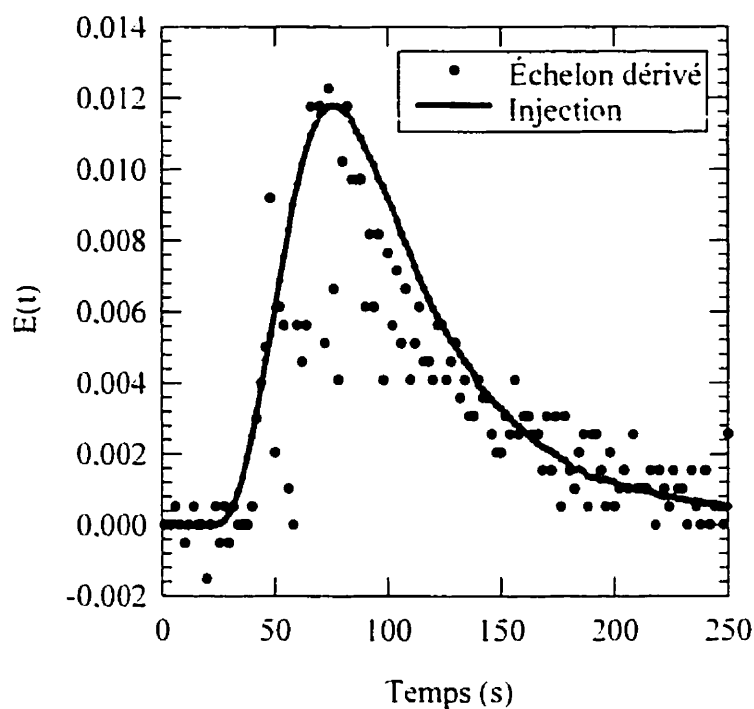


Figure 5-19 Comparaison entre une courbe DTS échelon dérivée et une courbe DTS injection

5.4.2.2 Représentativité du modèle de comportement pour le système modèle

L'observation des courbes déconvoluées du système modèle montre qu'elles sont très bien représentées par le modèle des deux CSTR en série de volumes différents. La figure 5-20 illustre un exemple représentatif de l'ensemble des courbes obtenues. Par contre, pour les lits d'une épaisseur de 18 cm, le modèle représente moins bien les courbes de DTS.

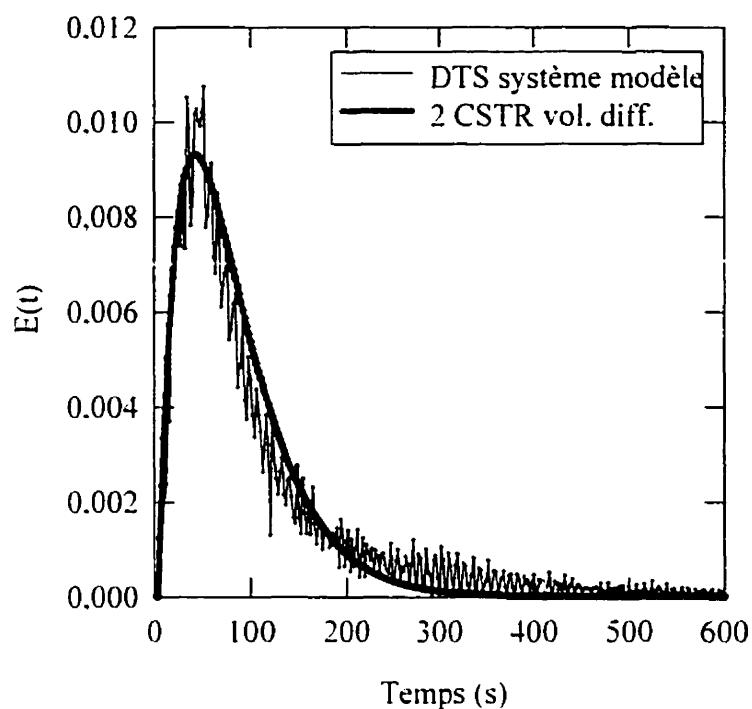


Figure 5-20 Comparaison entre le modèle des deux CSTR en série de volumes différents ($\tau_1 = 33,5s$, $\tau_2 = 46s$) et une courbe de DTS déconvoluée du système modèle (DECJ53, épaisseur = 1,5 cm, débit de liquide = $0,44 \text{ ml}\cdot\text{s}^{-1}$, $V/Q = 268 \text{ s}$).

La figure suivante donne les valeurs du premier moment τ_M calculé à partir des valeurs de τ_1 et τ_2 du modèle et de l'équation 4-12. On observe que le premier moment suit une fonction linéaire selon la relation suivante :

$$\tau_M = 0,3 V/Q \quad (5-2)$$

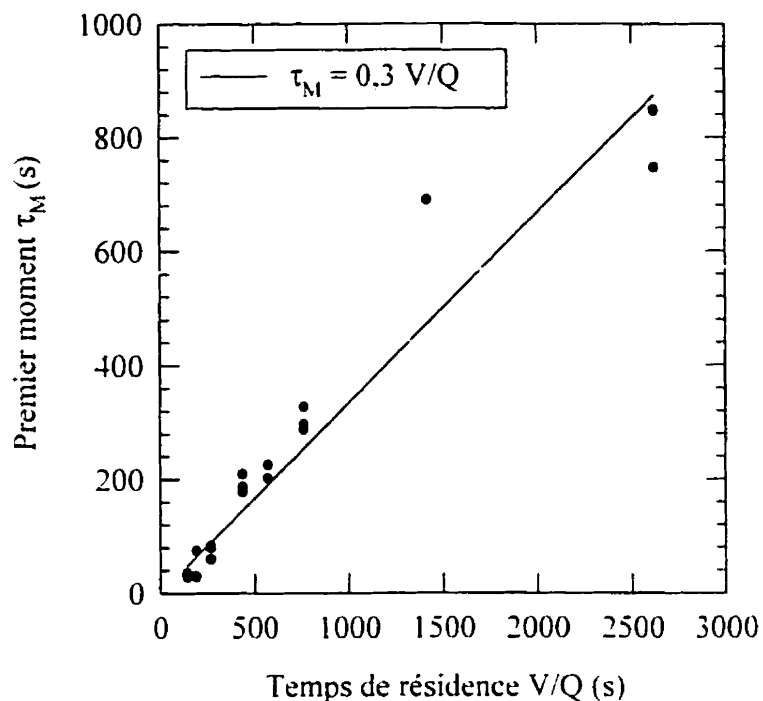


Figure 5-21 Premier moment du modèle des 2 CSTR en série de volumes différents calculé à partir de τ_1 et τ_2 en fonction du temps de résidence V/Q pour le modèle pour le système modèle.

Malheureusement, plusieurs courbes de DTS sont impossibles à déconvoluer. Les valeurs de τ_1 et τ_2 ne sont donc pas disponibles pour toutes les conditions d'opération, mais les données de tous les essais hydrodynamiques qui ont été faits sont fournies en annexe D.

Il est à noter que le débit de liquide conduisant au noyage de 18 cm de système modèle a été mesuré à $156 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$.

5.4.2.3 Représentativité du modèle de comportement pour le lit de racines

Le modèle des deux CSTR en série de volumes différents représente assez bien les courbes déconvoluées du lit de racines (exemple figure 5-22), mais moins efficacement que le système modèle, puisqu'il s'agit de cultures vivantes et donc moins uniformes. On obtient les valeurs du premier moment à partir de τ_1 et τ_2 en fonction du temps de résidence (figure 5-23), ce qui donne :

$$\tau_M = 0.1 V/Q \quad (5-3)$$

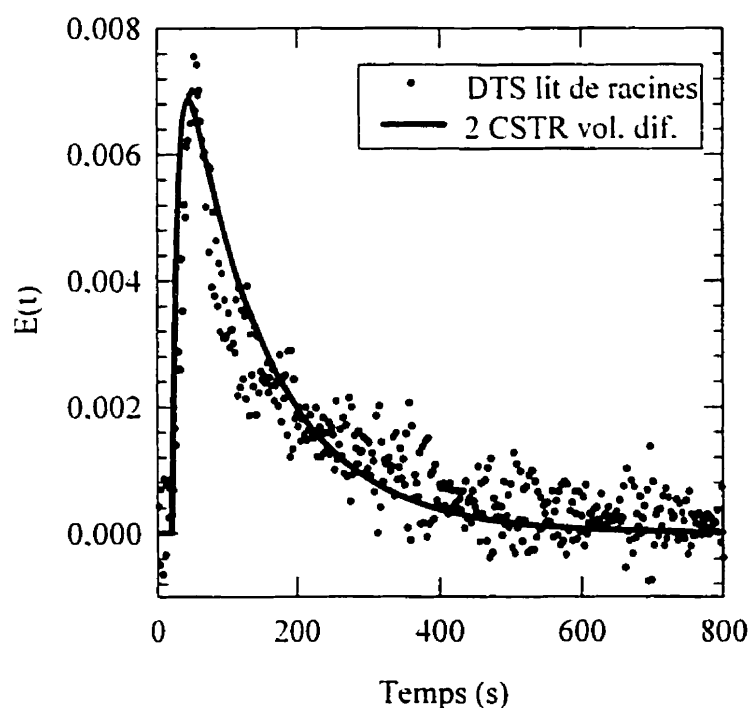


Figure 5-22 Comparaison entre le modèle des deux CSTR en série de volumes différents ($\tau_1 = 8$ s, $\tau_2 = 120$ s) et la courbe de DTS déconvoluée d'un lit de racines (LitDec10, cult. 29, jour 16, épais. 3 cm, débit de liquide = $0,7 \text{ ml}\cdot\text{s}^{-1}$, $V/Q = 407$ s).

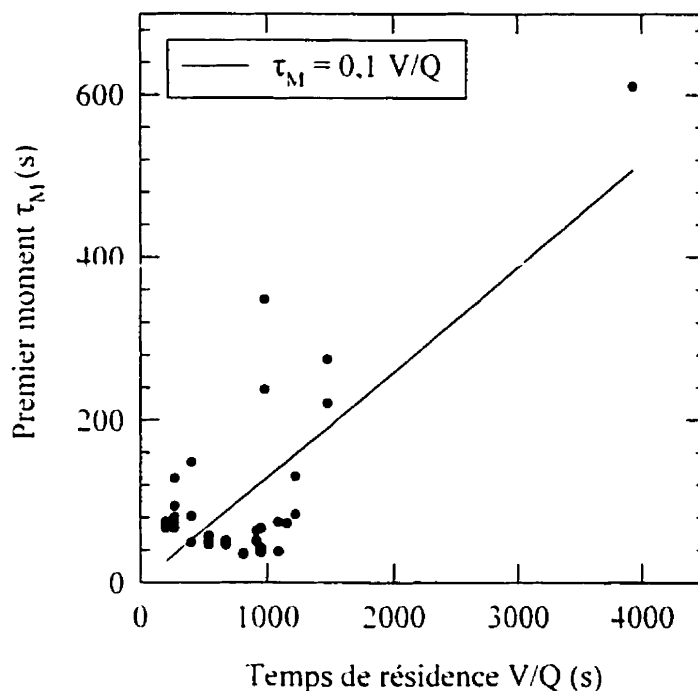


Figure 5-23 Premier moment du modèle des 2 CSTR en série de volumes différents calculé à partir de τ_1 et τ_2 en fonction du temps de résidence V/Q pour le lit de racines.

5.4.2.4 Représentativité du modèle de comportement pour le lit de racines avec garnissages

Le modèle des 2 CSTR en série de volumes différents simule bien le comportement des courbes déconvoluées des cultures de racines sur garnissages (exemple figure 5-24). On obtient des valeurs de premier moment très disparates (figure 5-25) mais il est quand même possible de dégager une tendance en fonction du temps de culture (âge de la culture) :

$$\tau_M = 1.3 * (\text{temps de culture}) \quad (5-4)$$

On peut expliquer ces valeurs très disparates par le fait que cette culture sur garnissages présentait une structure très hétérogène avec des amas de racines concentrés en haut du bioréacteur et à plusieurs autres endroits au centre.

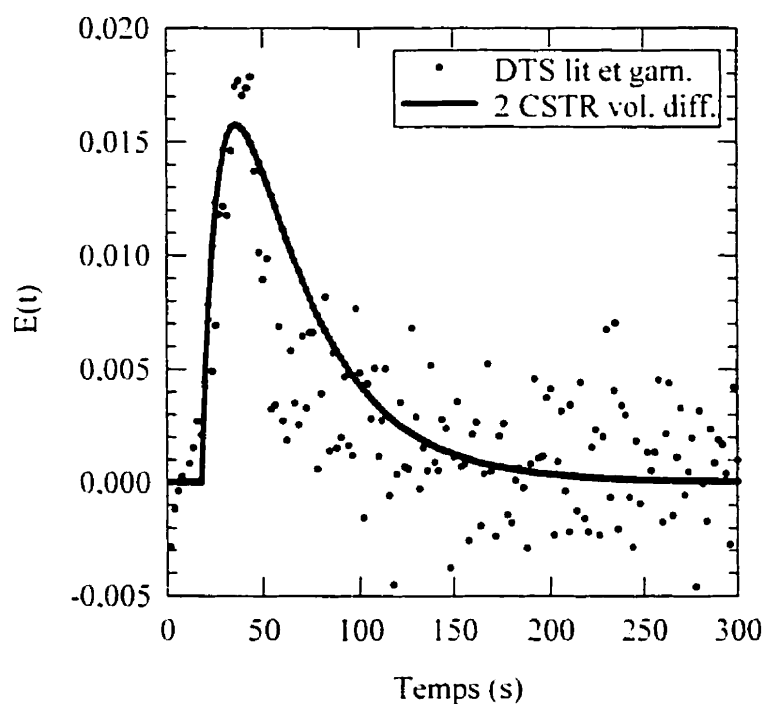


Figure 5-24 Comparaison entre le modèle des deux CSTR en série de volumes différents ($\tau_1 = 8$ s, $\tau_2 = 38$ s, $\alpha = 18$ s) et la courbe de DTS déconvoluée d'un lit de racines sur garnissages (20Dec8, culture 34, jour 63, $0,7 \text{ ml}\cdot\text{s}^{-1}$).

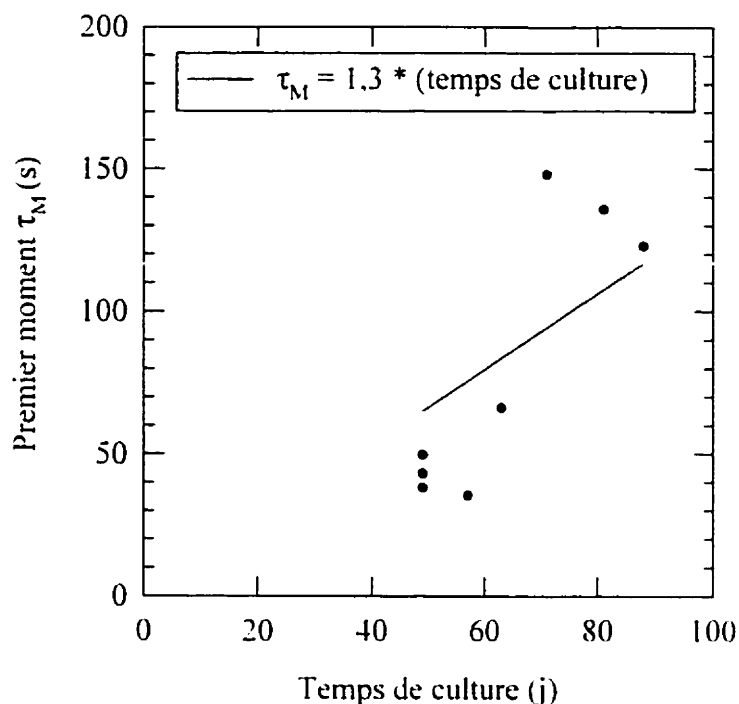


Figure 5-25 Premier moment du modèle des 2 CSTR en série de volumes différents calculé à partir de τ_1 et τ_2 en fonction du temps de culture pour le lit avec garnissages.

Des essais hydrodynamiques ont été accomplis dans le bioréacteur de 20 L avec des garnissages vides. Une expérience semblable faite par Carvalho et Curtis (1998) dans un bioréacteur à convection forcée (submergé) avec garnissages vides avait permis d'obtenir 47 réacteurs en série par le modèle des CSTR en série, ce qui se rapproche beaucoup d'un écoulement piston idéal. Avec l'équation 4-4, on calcule le nombre de réacteurs en série à partir des courbes de DTS, et on obtient entre 2 et 5 réacteurs en série pour les 7 essais réalisés. Il est à remarquer que les débits des essais faits par Carvalho et Curtis variaient de 2,25 à 28.8 mL·s⁻¹ alors que les débits de liquide dans le

bioréacteur à garnissages étaient de 0.5 à 0.9 mL·s⁻¹. Une autre expérience faite par Michell et Furzer (1972) dans un réacteur ruisselant avec des garnissages de 1" (anneaux « Lessing ») a permis d'obtenir des Pe entre 0.1 et 0.4 pour des débits entre 200 et 1600 mL·s⁻¹. Cet ordre de grandeur indique un grand écart par rapport à l'écoulement piston, même pour une colonne à garnissages vides de 2.4 m de hauteur et 0.6 m de diamètre et un grand débit de liquide.

5.4.2.5 *Effet de parois*

Des essais dans un très petit réacteur ont été faits dans le but de faire ressortir les effets de parois. Les trois figures suivantes comparent les courbes de DTS du système modèle pour trois diamètres de réacteur et deux épaisseurs de lit. En augmentant le diamètre du réacteur et l'épaisseur du lit, on voit que l'écoulement dans le réacteur avec le système modèle se différencie de l'écoulement à vide. Pour le réacteur de 11 cm de diamètre et un lit de 1.5 cm d'épaisseur, on voit que l'écoulement est très proche de l'écoulement du réacteur à vide.

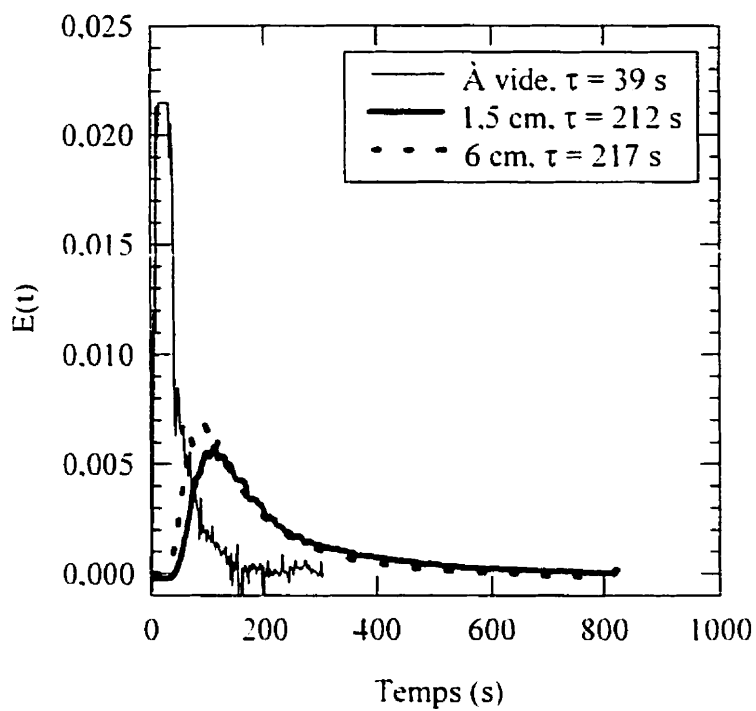


Figure 5-26 Comparaison entre les courbe de DTS pour le système modèle dans un bioréacteur de 2,6 cm de diamètre pour un débit de liquide de $0,1 \text{ mL} \cdot \text{s}^{-1}$.

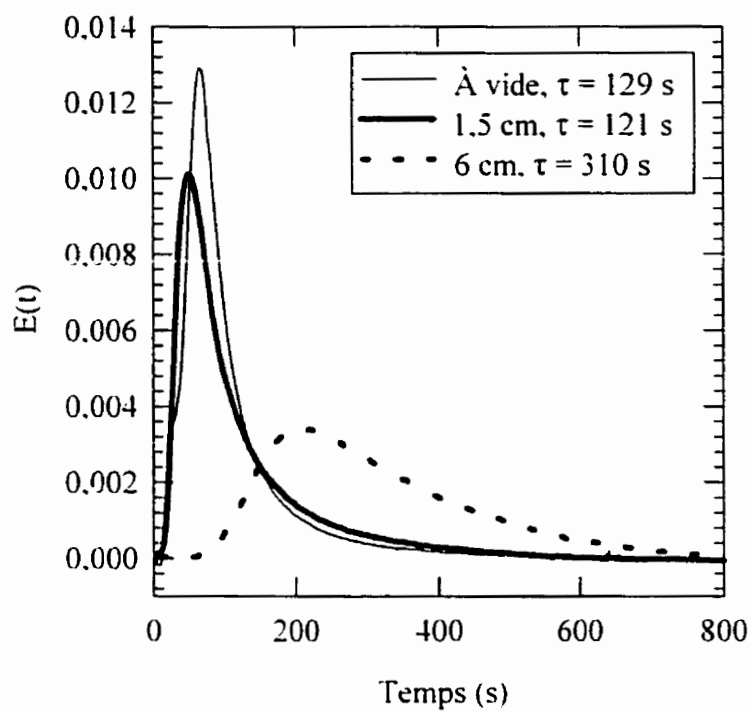


Figure 5-27 Comparaison entre les courbe de DTS pour le système modèle dans un bioréacteur de 11 cm de diamètre pour un débit de liquide de $0,7 \text{ mL}\cdot\text{s}^{-1}$.

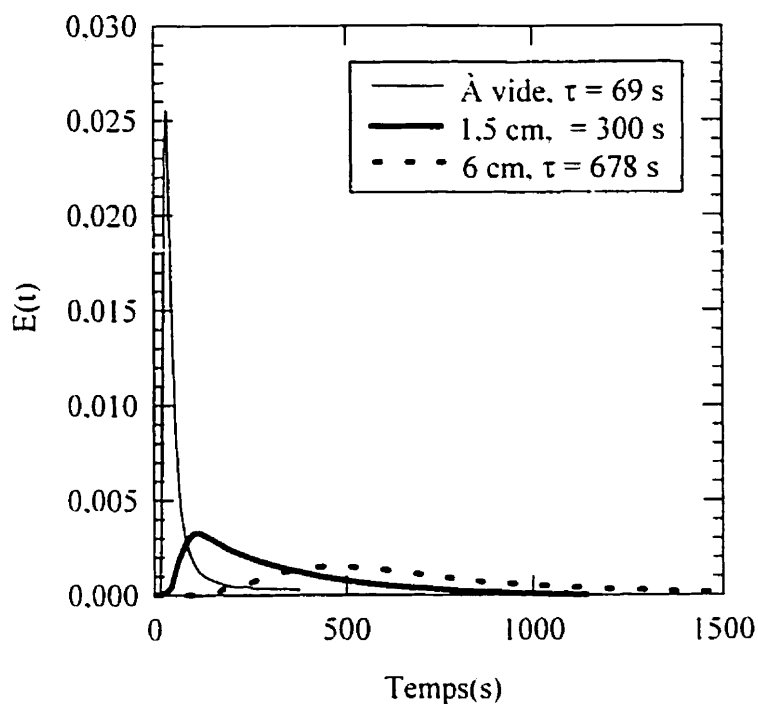


Figure 5-28 Comparaison entre les courbes de DTS pour le système modèle dans un bioréacteur de 25 cm de diamètre pour un débit de liquide de $0,7 \text{ mL}\cdot\text{s}^{-1}$.

5.4.3 Nombre de Pe

À partir des courbes expérimentales déconvoluées et grâce aux paramètres du modèle des deux CSTR de volumes différents, on obtient les nombres de Péclet selon différentes conditions opératoires. Toutes les valeurs des nombres de Péclet sont fournies à l'annexe D.

La figure 5-29 présente le nombre de Péclet pour le système modèle en fonction du temps de résidence V/Q . On remarque que les Pe sont faibles, ce qui indique une

dispersion très rapide du traceur et un grand éloignement par rapport à un écoulement piston. De plus, en regardant les valeurs de Pe dans l'annexe D, on voit que l'effet du volume sur le Pe est beaucoup plus important que l'effet du débit de liquide, et le Pe est donc directement fonction du volume du lit.

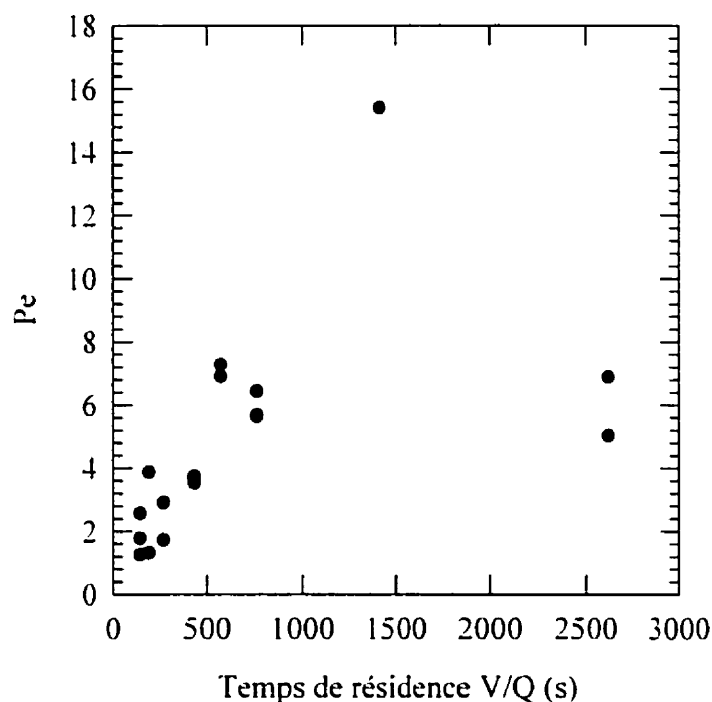


Figure 5-29 Nombre de Péclet en fonction du temps de résidence pour le système modèle

La figure suivante présente le nombre de Péclet en fonction de l'épaisseur d'un lit composé seulement de racines. On remarque ici encore que les Pe sont faibles et qu'ils augmentent avec l'épaisseur du lit, comme pour le système modèle. D'ailleurs, en comparant les Pe du lit par rapport aux Pe du système modèle en fonction des temps de

résidence (figure 5-31), on observe que les Pe du lit sont du même ordre de grandeur et suivent la même tendance que les Pe du système modèle.

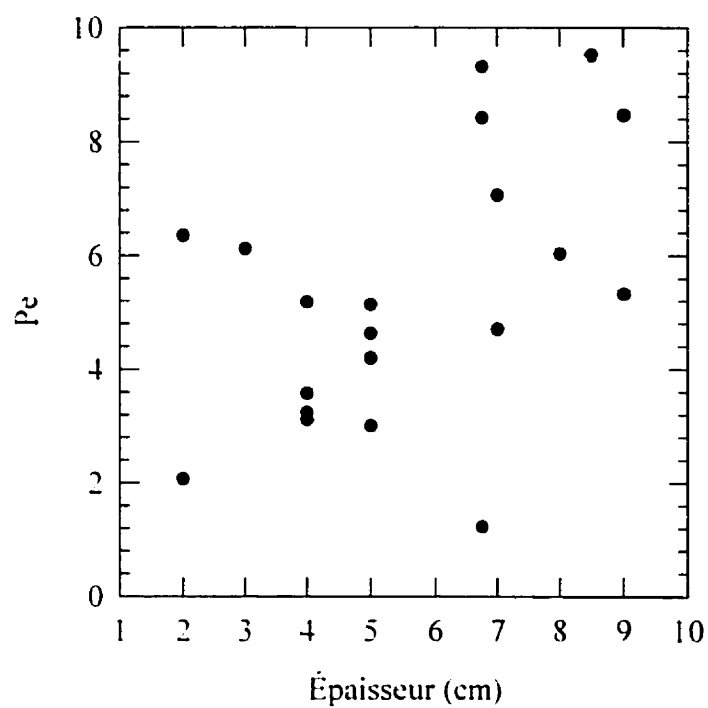


Figure 5-30 Nombre de Péclet en fonction de l'épaisseur d'un lit de racines

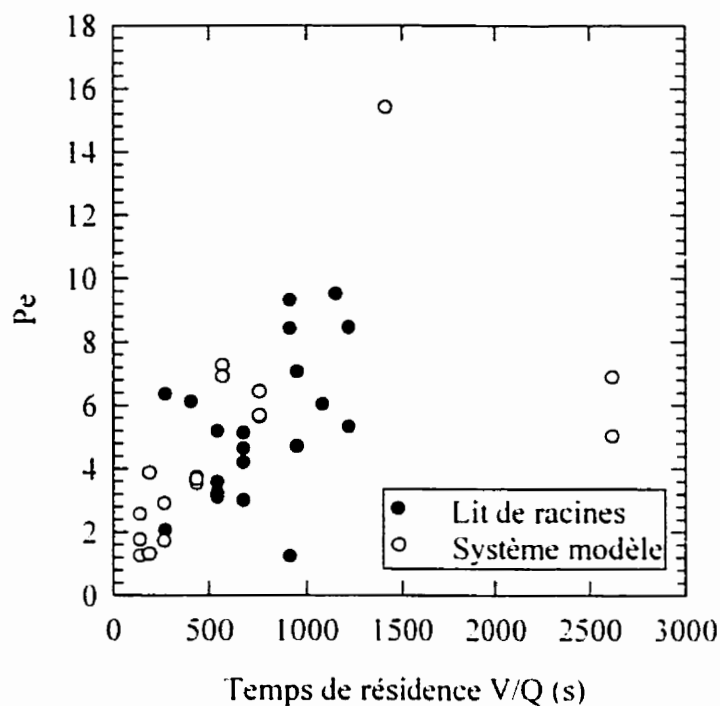


Figure 5-31 Comparaison du nombre de Pe en fonction du temps de résidence du lit de racines par rapport au système modèle

Dans le cas du lit de racines avec garnissages, les nombres de Péclet sont inférieurs à 4 (figure 5-32), ce qui confirme que l'écoulement dans le bioréacteur est loin d'un écoulement piston.

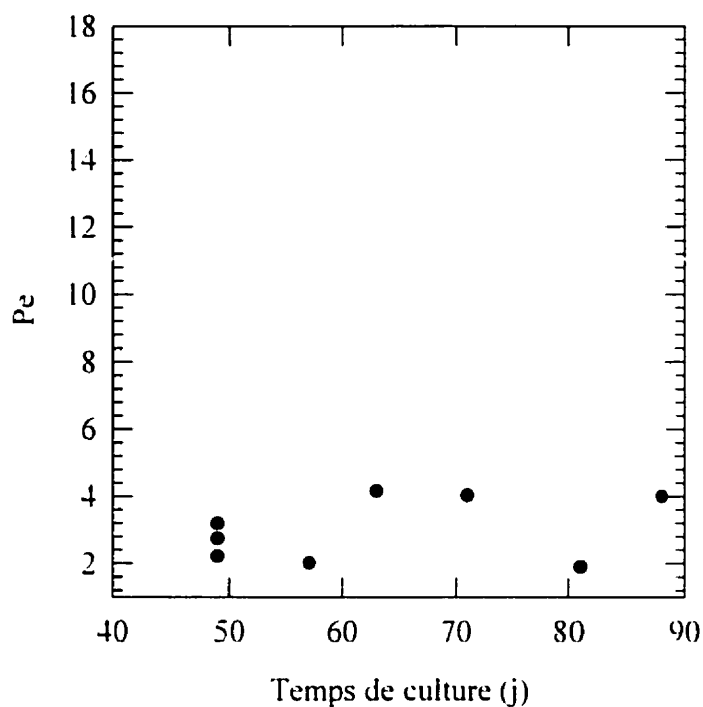


Figure 5-32 Nombre de P_e en fonction du temps de culture pour un lit de racines avec garnissages

5.4.4 Temps de mélange

On calcule le temps de mélange pour chaque courbe de DTS expérimentale non déconvoluée tel qu'expliqué dans la section 4.4. Toutes les valeurs des temps de mélange sont fournies à l'annexe D. La figure 5-33 présente un résumé de tous les essais effectués sur le système modèle. Les conditions de ces essais varient d'un diamètre de 2.5 à 25 cm, d'un débit de liquide de 0.1 à 1 mL·s⁻¹ et d'une épaisseur de lit de 1.5 à 18 cm. Sur cette figure, on observe que la courbe est relativement étroite et

qu'il existe une corrélation. On peut relier le temps de mélange au temps de résidence V/Q avec un coefficient de détermination de 84% par la relation suivante :

$$\text{Temps de mélange} = 9.3 (V/Q)^{0.65} \quad (5-5)$$

Cette courbe s'avère être un outil de design de grande importance. En effet, elle permet de choisir les conditions opératoires idéales de culture afin d'obtenir des temps de mélange faibles qui permettent de fournir un milieu toujours frais au plus grand nombre de racines. Pour obtenir un faible temps de mélange, il faut minimiser V/Q . Par exemple pour $V/Q = 500$ s, on obtient un débit de $40 \text{ mL}\cdot\text{s}^{-1}$ pour un lit de 20 L.

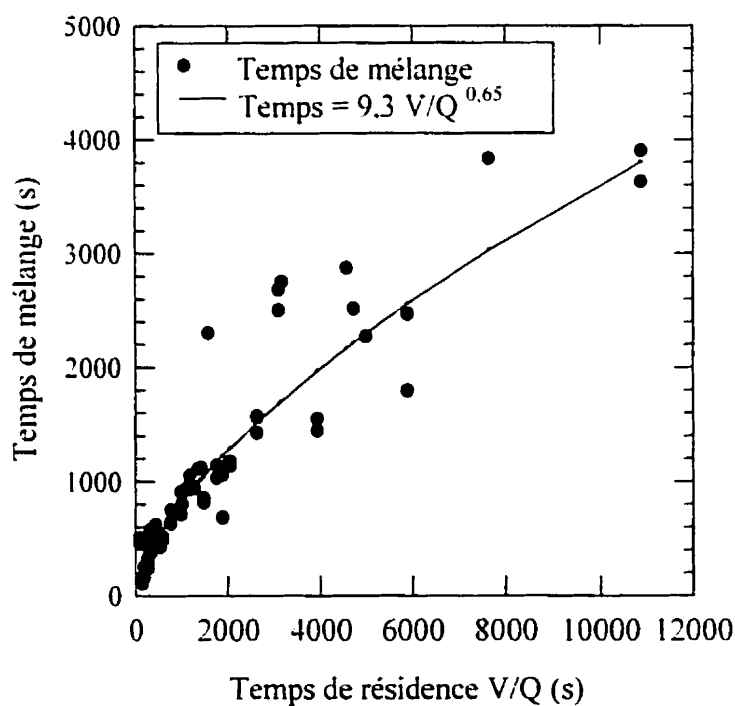


Figure 5-33 Temps de mélange en fonction du temps de résidence pour le système modèle

La figure 5-34 présente les temps de mélange des lits de racines comparés au système modèle. Pour les temps de mélange du système modèle, seules les valeurs correspondant aux conditions de culture ont été prises en compte, soit un bioréacteur de 10 cm de diamètre et un débit de $0.7 \text{ mL}\cdot\text{s}^{-1}$. On y remarque une grande différence entre les courbes, malgré les efforts consentis pour trouver un système modèle comportant les mêmes caractéristiques que le lit de racines. De plus, on note de grandes variations entre les cultures. On peut tout de même observer en général la tendance croissante du temps de mélange en fonction de l'épaisseur du lit dans le cas des racines comme dans celui du système modèle.

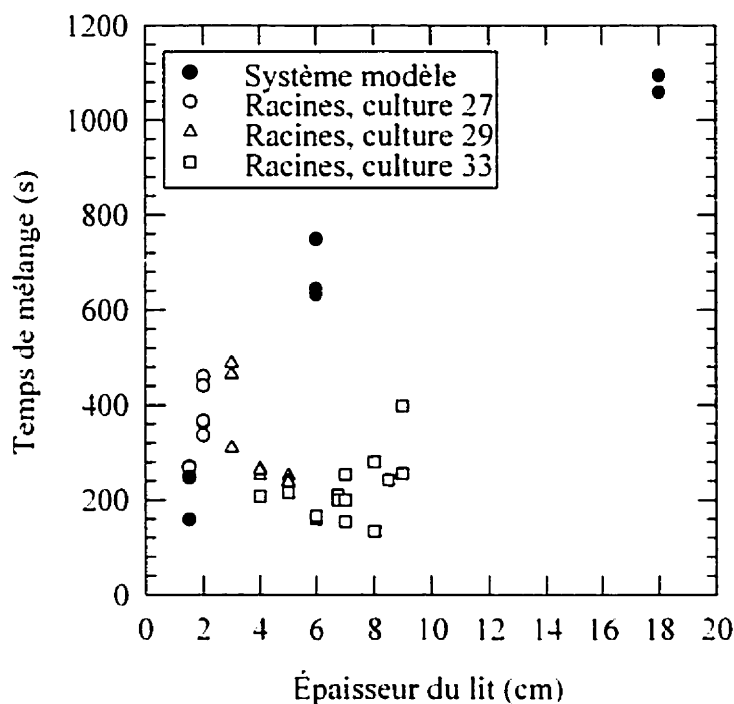


Figure 5-34 Comparaison entre les temps de mélange du système modèle et des cultures de racines en fonction de l'épaisseur du lit

Plusieurs facteurs expliquent la grande différence entre les temps de mélange du système modèle et ceux des lits de racines. Tout d'abord, les racines ayant poussé en lit dans un bioréacteur sont probablement très différentes des racines provenant des flacons agités qui ont servi à choisir le système modèle, ce qui a pu conduire à un mauvais choix. Deuxièmement, lors du choix du système modèle, les variables utilisées comme critères de sélection étaient les rétentions liquide et gazeuse en mode submergé, ce qui n'était peut-être pas les meilleurs critères. La rétention liquide dynamique en mode percolation aurait probablement permis d'avoir un critère de sélection encore plus

pointu quoique, lors des essais, la mesure de la perméabilité dynamique semblait amplement suffisante.

Une autre explication de ces écarts est également possible. En comparant les courbes de DTS des lits de racines à celles du système modèle (annexe E), on remarque que les courbes des lits de racines présentent des traînées beaucoup plus importantes. Ceci est probablement dû au fait que les racines absorbent le traceur salin très rapidement après l'injection et le relarguent lentement à mesure que le liquide statique ambiant en est lavé. Par ailleurs, cette absorption rapide du traceur par les racines provoque un débalancement dans leur équilibre osmotique. Il est donc possible qu'une racine qui traverse de bas en haut le lit exsude des ions dans le bas du bioréacteur pour contrebalancer le déséquilibre osmotique provenant du haut du bioréacteur. Cet effet pourrait donc induire des temps de mélange beaucoup plus rapides dans les lits de racines à cause de ce pseudo transport interne d'ions.

La figure suivante présente une comparaison entre les temps de mélange du système modèle et des racines avec garnissages, pour des bioréacteurs de 25 cm de diamètre et un débit de liquide de $0.7 \text{ mL}\cdot\text{s}^{-1}$. Le temps de mélange pour les racines avec garnissages est présenté seulement en fonction du temps de culture puisqu'il n'y a pas vraiment d'épaisseur de lit (les racines étant distribuées dans tout le volume du bioréacteur par les garnissages).

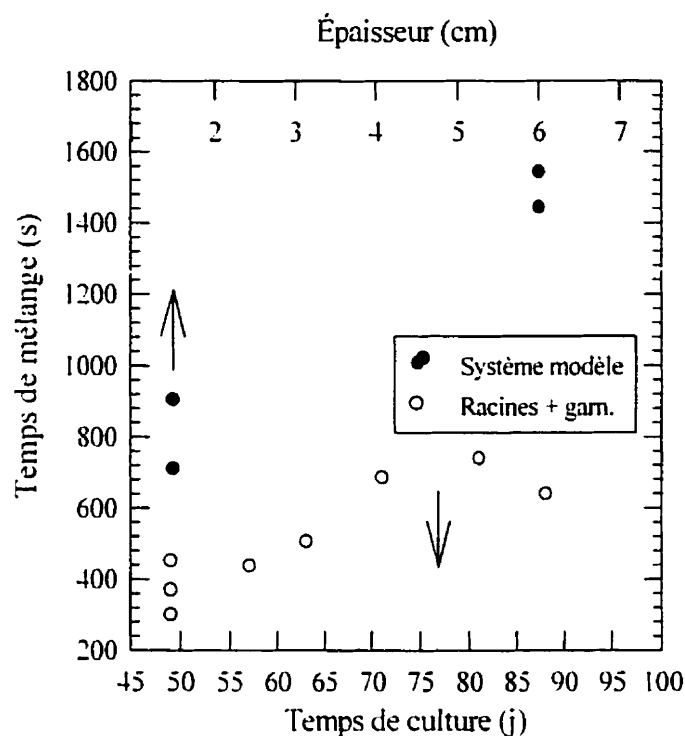


Figure 5-35 Temps de mélange pour un lit de racines avec garnissages en fonction du temps de culture et dans le cas du système modèle, en fonction de l'épaisseur

Ici encore, on observe une différence marquée entre le comportement des racines et celui du système modèle. On voit dans les deux cas se dégager très clairement la même tendance d'augmentation du temps de mélange. On peut aussi dire que la tendance du temps de mélange pour le système modèle est environ le double du temps de mélange noté dans le cas des racines avec garnissages. Cet écart peut facilement s'expliquer par la différence de structure entre le système modèle et le lit de racines avec garnissages. En effet, le système modèle présente une structure globale très homogène contrairement au lit de racines avec garnissages qui est très hétérogène, avec des amas de racines à

plusieurs endroits du bioréacteur, surtout au centre. La partie supérieure du bioréacteur est couverte par un lit de racines qui devient plus dense vers la fin de la culture. De la même façon que pour le lit de racines simple, ceci explique le plafonnement de la courbe du temps de mélange en fin de culture. Une nouvelle culture serait utile pour démontrer avec certitude que le système modèle peut représenter le comportement d'un bioréacteur de racines à garnissages.

Afin d'illustrer la variabilité inhérente aux cultures sur garnissages, la figure 5-36 présente le temps de mélange de différentes cultures de racines avec garnissages et ce, pour plusieurs réplicats. Trois différents types de garnissages ont été utilisés dans un bioréacteur de 10 cm de diamètre. Les temps de mélange varient grandement d'une culture à l'autre selon la façon dont les racines sont accrochées aux garnissages. Cette variabilité peut être minimisée par une mise à l'échelle du bioréacteur, car l'effet de la paroi et celui de l'inoculation se trouvent ainsi diminués (l'inoculation des petits bioréacteurs est très difficile puisque les racines ont tendance à tomber au fond du bioréacteur sous les secousses des manipulations).

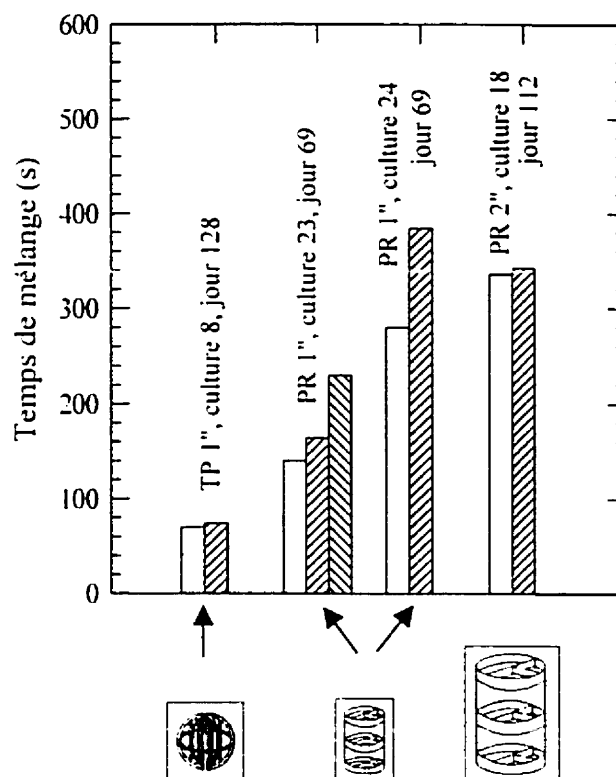


Figure 5-36 Temps de mélange pour différentes cultures sur garnissages. Volume du bioréacteur égal à 1,3 L pour les garnissages de 1" et 2,4 L pour les garnissages de 2".

5.4.4.1 Étude du type d'alimentation liquide

La figure 5-37 compare les temps de mélange pour deux modes d'alimentation liquide dans un réacteur avec système modèle. On y observe que le mode d'alimentation aléatoire « goutte à goutte » entraîne des temps de mélange plus élevés que le mode d'alimentation brouillard. Ainsi, une moins bonne distribution fournit un mélange de liquide moins efficace dans le lit. Il est donc important de favoriser la meilleure distribution du liquide possible afin de diminuer les temps de mélange.

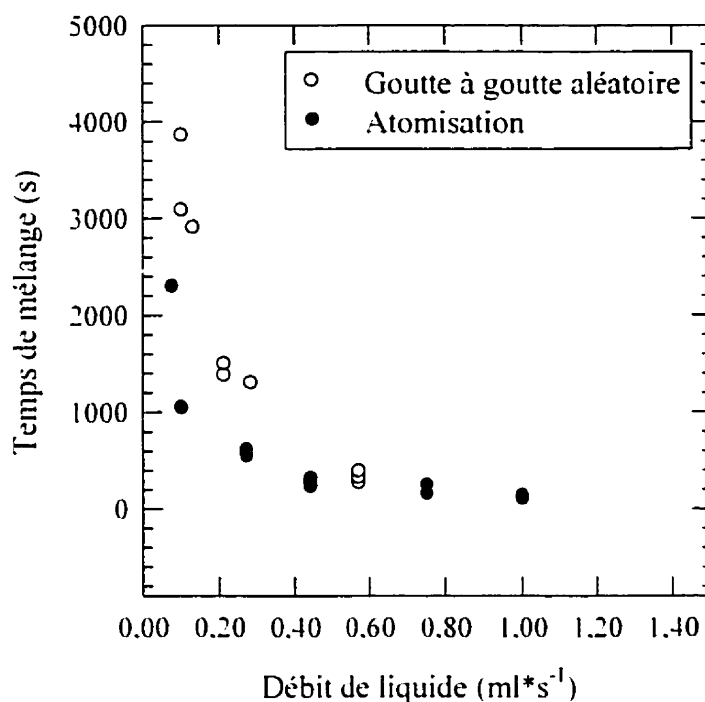


Figure 5-37 Temps de mélange en fonction du débit de liquide pour deux modes d'alimentation liquide pour le système modèle (épaisseur = 1,5 cm).

5.4.5 Transfert d'oxygène

Des essais ont été effectués afin de mesurer le coefficient de transfert d'oxygène dans le système modèle pour différentes hauteurs de lit et différents débits de liquide et dans un lit de racines pour différentes hauteurs de lit. On retrouve en annexes G et H les données brutes de transfert d'oxygène.

Malheureusement, la plupart des coefficients de transfert d'oxygène n'ont pu être calculés à partir des modèles 4-16 et 4-21. En effet, la réponse des essais

expérimentaux était très lente, beaucoup plus lente que la dynamique des modèles, d'où l'impossibilité d'utiliser ces modèles pour trouver les coefficients de transfert d'oxygène.

Afin de traiter ces données expérimentales, il faudrait modifier le modèle pour tenir compte du fait que C^* n'est probablement pas constant dans le temps. En effet, puisque l'alimentation gazeuse n'était pas à contre-courant, le gaz à l'intérieur du lit devait être assez loin de la saturation, et donc l'échange entre le gaz et le liquide statique beaucoup moins important que ne le prévoit les modèles.

Pour les expériences à venir, il faudrait améliorer l'alimentation gazeuse afin d'avoir un C^* constant dans le temps et dans le volume du réacteur et de pouvoir utiliser les modèles développés.

CHAPITRE 6 - CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS

6.1 CONCLUSIONS

Ces travaux de maîtrise proposaient de contribuer au développement d'un bioréacteur à garnissages pour la culture de racines transformées. Dans ce but, quatre étapes ont été nécessaires :

- l'identification d'un système modèle non vivant capable de remplacer adéquatement les racines de carotte,
- le choix d'un garnissage comme support de culture,
- la caractérisation du développement spatial des racines en croissance sur les garnissages et enfin sur
- l'étude de l'hydrodynamique du bioréacteur.

La revue de la littérature a montré l'intérêt pour les cultures de racines transformées et la difficulté de concevoir un bioréacteur qui convienne parfaitement à ce type culture. Elle a également mis en lumière les avantages du bioréacteur ruisselant avec garnissages qui a été utilisé dans cette étude.

La première partie de l'analyse des résultats a permis d'identifier un modèle non vivant ayant les mêmes caractéristiques qu'un lit de racines de carotte provenant d'un flacon agité. Il s'agit de la corde de jute coupée en bouts de 8 à 10 cm, séparés en leurs trois brins et façonnés en petites boules pour donner une densité de lit de $0,16 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Le

choix de ce matériau a été basé sur la comparaison des caractéristiques de rétention liquide et gazeuse et de perméabilité des différents systèmes étudiés. Les valeurs de référence utilisées pour la comparaison ont été mesurées sur un lit de racines cultivées en flacon agité d'une densité de 0.6 à $0.7 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ WW où la porosité était égale à $0.14 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$, la rétention liquide statique entre 0.76 et $0.82 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ et la perméabilité entre 2.2×10^{-10} et $4 \times 10^{-10} \text{ m}^2$.

La deuxième partie de l'analyse a servi à identifier le garnissage qui favorise le mieux le développement des cultures vivantes en bioréacteur. Deux types de garnissages de deux grandeurs différentes ont été testés en culture et la sélection s'est faite selon les critères suivants: la qualité de l'accrochage des racines sur le garnissage, la distribution des racines dans le bioréacteur et le degré de remplissage dans le garnissage. Le garnissage qui s'est montré le plus performant est le *Try pack* de 2" de diamètre.

Cette étape de la recherche a également servi à mettre en lumière l'importance de la qualité de l'inoculation du bioréacteur pour favoriser l'accrochage et la distribution des racines dans le bioréacteur. De petits inocula sont à conseiller puisqu'ils permettent de développer un lit plus uniforme et moins dense.

La troisième partie de la recherche a été consacrée à l'étude de la distribution spatiale des racines sur le garnissage durant les différentes étapes de leur croissance. Pour les deux expériences réalisées, les racines se sont développées suivant la même tendance.

c'est-à-dire qu'elles ont tout d'abord utilisé l'ensemble de l'espace latéral à leur disposition, puis le lit s'est densifié. Durant le développement latéral, les racines se dirigent vers le bas, mais dès que le lit se densifie un peu, elles s'orientent davantage vers le haut où les nutriments frais se retrouvent en plus grande abondance.

La quatrième partie de l'analyse des résultats a permis de démontrer que, pour tous les systèmes étudiés, qu'il s'agisse des cultures de racines ou du modèle non vivant, l'hydrodynamique du système suit le modèle des deux réacteurs parfaitement agités (CSTR) en série de volumes différents. Le développement d'une méthode de déconvolution des courbes de distribution des temps de séjour (DTS) a de plus permis de dissocier l'effet des parois du réacteur de l'effet du lit.

Par ailleurs, des courbes de DTS « échelon » ont été réalisées sur les cultures afin de valider la méthode par « injection » de traceur. Une fois dérivées, ces courbes échelons ont montré une grande similitude avec les courbes injection. Les méthodes expérimentales utilisées dans cette recherche semblent donc satisfaisantes.

La cinquième section de ce travail a été consacrée à l'étude du nombre de Péclet (Pe) calculé à partir des paramètres τ_1 et τ_2 du modèle des 2 CSTR en série de volumes différents. Dans les trois cas étudiés, soient le système modèle, le lit de racines et le lit de racines sur garnissages, les Pe obtenus sont du même ordre de grandeur et petits, en

bas de 10, ce qui dénote une dispersion rapide du traceur et un écart important par rapport à l'écoulement piston.

La sixième étape de ce projet a porté sur l'étude des temps de mélange dans les bioréacteurs à partir de l'analyse des courbes de DTS. Une corrélation entre le temps de mélange et le temps de résidence (volume/débit) a d'abord été établie pour le système modèle : $\text{temps} = 9.3 (V/Q)^{0.65}$. De plus, il a été observé que le mode d'alimentation par atomisation favorise un mélange plus efficace du liquide dans le bioréacteur que le mode du goutte à goutte aléatoire. Par ailleurs, les temps de mélange du lit de racines sans garnissage se sont avérés très différents de ceux du système modèle. Quant à l'étude du lit de racines sur garnissages, on a observé que les temps de mélange de ce système étaient deux fois plus courts environ que ceux du système modèle. De plus, il faut souligner que les temps de mélange varient considérablement d'une culture à l'autre selon la répartition et l'accrochage des racines dans le bioréacteur.

Enfin, il est à noter que l'étude hydrodynamique des systèmes a nécessité la préparation de nombreuses cultures. Par exemple, pour un lit de racines de carotte sans garnissage dans un bioréacteur de 3.6 L, il a fallu 90 jours de culture pour atteindre une densité de $0.6 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ WW et une masse finale de 811 g WW. Et pour un lit de racines sur garnissages dans un bioréacteur de 20 L, une masse de 626 g WW a été obtenue après 88 jours de culture.

La septième section de ce travail a été consacrée à l'étude du transfert d'oxygène. Un modèle de transfert d'oxygène a été développé mais il a été impossible de l'utiliser pour trouver les coefficients de transfert d'oxygène. En effet, l'alimentation gazeuse n'était pas adéquate lors des expériences, ce qui a provoqué des réponses trop lentes pour que le modèle puisse être utilisé.

6.2 RECOMMANDATIONS

Au terme de cette recherche, il semble approprié de suggérer que les modifications suivantes soient apportées au design du bioréacteur, lors d'expérimentations futures, afin de favoriser la croissance des racines. Tout d'abord, l'alimentation gazeuse à contre courant en différents points dans le bioréacteur (afin d'obtenir un C^* constant) favoriserait le transfert d'oxygène dans le système. De plus, il serait important de trouver une méthode d'inoculation facile à mettre à l'échelle et qui permette aux racines de rester bien en place sur les garnissages durant l'expérimentation. Cette méthode permettrait de maximiser la distribution des racines dans le bioréacteur ainsi que le remplissage des garnissages. Une solution à envisager pourrait être d'opérer le bioréacteur comme une colonne à bulles durant quelques jours après l'inoculation (Ramakrishnan *et al.*, 1994) ou encore d'inoculer le bioréacteur avec des garnissages dans lesquels des racines seraient déjà en croissance.

Il serait également intéressant de poursuivre le travail exploratoire de la présente recherche en faisant des essais hydrodynamiques supplémentaires sur les cultures de racines sur garnissages afin d'établir avec certitude la comparaison entre le comportement du bioréacteur et le système modèle.

L'étude du transfert d'oxygène étant restée incomplète, il serait très approprié de la poursuivre. Afin d'utiliser les données expérimentales de cette recherche, il faudrait modifier le modèle développé afin d'avoir une concentration en oxygène dans le gaz C^* variable dans le temps, ce qui permettrait de rapprocher le modèle des conditions réelles d'expérimentation. Une fois le nouveau modèle validé avec les courbes du système modèle, les courbes du lit de racines pourraient être traitées en tenant compte de la respiration. Ainsi, il serait possible de calculer des épaisseurs de lit ou des masses de racines maximales pour différentes conditions de culture. Pour les prochaines expériences, il faudrait accorder une attention spéciale à l'alimentation gazeuse afin d'avoir un C^* constant dans le temps et le volume du bioréacteur.

RÉFÉRENCES

- ANDRADE, G., MIHARA, K.L., *et al.* (1997). "Bacterial from rhizosphere and hydrosphere soils of different arbuscular-mycorrhizal fungi." *Plant. Soil* 192: 71-79.
- ARORA, D.K., RAI, B., *et al.* (1991). *Handbook of Applied Mycology*. Volume 1: Soil and Plants. New York, Marcel Dekker Publisher.
- BÉCARD, G. et FORTIN, J.A. (1988). "Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots." *New Phytol.* 108: 211-218.
- BEG, S.A., HASSAN, M.M., NAQVI, M.S.M. (1996). "Hydrodynamics and mass transfer in a cocurrent packed column : a theoretical study. " *The Chemical Engineering Journal*. 63 : 93-103.
- BÉLANGER, M.-C. (1994). *Hydrodynamique d'un biofiltre à tourbe opéré en mode percolation avec aération forcée*. Maîtrise en génie chimique. Montréal. École Polytechnique de Montréal.
- BENNETT, A. et GOODRIDGE, F. (1970). *Trans. Inst. Chem. Eng.*, 48.
- BETHLENFALVAY, G.J. et LINDERMAN, R.G. (1992). "Mycorrhizae and crop productivity." Dans *V.A mycorrhizae in sustainable agriculture*. Benthlenfalvay, G.J. et Linderman, R.G. éditeurs. ASA special publ. No. 54 : 1-27. Madiso. WI.

BHADRA, R., VANI, S., *et al.* (1993). "Production of indole alkaloids by selected hairy root lines of *Catharanthus roseus*." *Biotechnology and Bioengineering* 41: 581-592.

BUITELAAR, R.M., LANGENHOFF, A.A.M., *et al.* (1991). "Growth and thiophen production in hairy roots of *Tagetes patula* in various two-liquid-phase bioreactors." *Enzyme Microb. Technol.* 13: 487-494.

CARVALHO, E.B. et CURTIS, W.R. (1998). "Characterization of fluid-flow resistance in root cultures with a convective flow tubular bioreactor." *Biotechnology and Bioengineering* 60(3).

CARVALHO, E.B., HOLIHAN, S., *et al.* (1998). "Effect of root morphology on reactor design for production of chemicals". *Hairy Roots - Culture and Applications*. P.M. Doran, Harwood academic publishers.

CHABOT, S., BÉCARD, G., *et al.* (1992). "Life cycle of *Glomus intraradices* in root organ culture." *Mycologia* 84: 315-321.

CHARPENTIER, J.C., BAKOS, M., LE GOFF, P. (1971). "Hydrodynamics of two-phase concurrent down flow in packed-bed reactors. Gas-liquide flow regimes. Liquid axial dispersion and dead zones. " Proc. deuxième conférence sur "*Quelques applications de la chimie physique*." Veszprem, Hongrie. 2 : 31-47.

CHATTERJEE, C., CORRELL, M.J., *et al.* (1997). "Simplified acoustic window mist bioreactor." *Biotechnology Techniques* 11(3): 155-158.

DIIORIO, A.A., CHEETHAM, R.D., *et al.* (1992). "Growth of transformed roots in a nutrient mist bioreactor: Reactor Performance and Evaluation." *Applied Microbiology Biotechnology* 37: 457-462.

DIXON, R.A., Ed. (1985). *Plant cell culture, a practical approach*, IRL press limited.

DUGASSA, D.G., GRUNEWALDT-STÖCKER, G., *et al.* (1995). "Growth of *Glomus intraradices* and its effects on linseed (*Linum usitatissimum* L.) in hydroponic culture." *Mycorrhiza* 5: 279-282.

DURAND, S. (1997). *Étude du comportement hydrodynamique et du coefficient de transfert d'oxygène dans un lit compact de racines de plantes*. Projet de fin d'étude. Département de Génie Chimique, École Polytechnique de Montréal.

FLORES, H.E., HOY, M.W., *et al.* (1987). "Secondary metabolites from root cultures." *Trends Biotechnol.* 5: 64-69.

GAUDETTE, M. (1997). *Mise au point et validation d'un procédé de production de champignons endomycorhiziens en bioréacteur*. Maîtrise en génie chimique. Montréal, École Polytechnique de Montréal.

GOTO, S. et SMITH, J.M. (1975). "Trickle-bed reactor performance." *AIChE Journal*, 21 : 706-713.

GOTO, S., LEVEC, J. et SMITH, J.M. (1975). "Mass transfert in packed beds with two-phase flow." *Ind. Eng. Chem. Proc. Des. Dev.*, 14 : 473-478.

GREEN, K.D. et THOMAS, N.H. (1996). "An integrated "root tube" bioreactor/separator for transformed root cultures." *Journal of Fermentation and Bioengineering* 81(5): 453-457.

HILTON, M.G. et RHODES, M.J.C. (1990). "Growth and hyoscyamine production of 'hairy root' cultures of *Datura stramonium* in a modified stirred tank reactor." *Applied Microbiology and Biotechnology* 33: 132-138.

HITAKA, Y., KINO-OKA, M., *et al.* (1997). "Effect of liquid flow on culture of red boot hairy roots in single columnne reactor." *Journal of Chemical Engineering of Japan* 30(6): 1070-1075.

HOLMES, P., LI, S.L., *et al.* (1998). "Drip-tube technology for continuous culture of hairy roots with integrated alkaloid extraction". *Hairy Roots - Culture and Applications*. P.M. Doran. Harwood academic publishers.

HONDA, H., HATTORI, T., *et al.* (1997). "Production of regenerated plantlet using shaking vessel-type bioreactor." *Journal of Chemical Engineering of Japan* 30(1): 179-182.

HONG, Y.C., LABUZA, T.P., *et al.* (1989). "Growth kinetics of strawberry cell suspension cultures in shake flask, airlift, stirred-jar, and roller bottle bioreactors." *Biotechnology Progress* 5(4).

HOOGENDOORN, C.J. et LIPS, J. (1965). *Can. J. Chem. Eng.*, 43.

HUNG, L.L.L. et SYLVIA, D.M. (1988). "Production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus inoculum in aeroponic culture." *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 353-357.

JOLICOEUR, M. (1998). *Optimisation de la production de champignons endomycorhiziens en bioréacteur*. Doctorat en génie chimique. École Polytechnique de Montréal - Université de Montréal.

JOLICOEUR, M., WILLIAMS, R.D., *et al.* (1999). "Production of *Glomus intraradices* propagules, an arbuscular mycorrhizal fungus, in a airlift bioreactor." *Biotechnology and Bioengineering* 63(2): 224-232.

JU, L.K., LEE, J.F., *et al.* (1991). "Enhancing oxygen transfer in bioreactors by perfluorocarbon emulsions." *Biotechnol. Prog.* 7: 323-329.

JUNG, K.-H., KWAK, S.-S., *et al.* (1998). "Procedure for biomass estimation considering the change in biomass volume during high density culture of hairy roots." *Journal of Fermentation and Bioengineering* 85(4): 454-457.

KANOKWAREE, K. et DORAN, P.M. (1998). "Application of membrane tubing aeration and perfluorocarbon to improve oxygen delivery to hairy root cultures." *Biotechnology Progress* 14: 479-486.

KARAMANEV, D.G., *et al.* (1994). "Hydrodynamic characteristics of a trickling bed of peat moss used for biofiltration of wastewater." *The Canadian Journal of Chemical Engineering* 72 : 411-417.

KESSELL, R.H.J. et CARR, A.H. (1972). "The effect of dissolved oxygen concentration on growth and differentiation of Carrot (*Daucus carota*) tissues." *J Exp Bot* 23: 996-1007.

KHASA, P., FURLAN, V., *et al.* (1990). "Effets de différentes espèces de champignons endomycorhiziens sur la croissance de dix espèces de plantes tropicales au Zaïre." *Tropicultura* 8: 159-164.

KIM, Y.H. et YOO, Y.J. (1993). "Development of a bioreactor for high density culture of hairy roots." *Biotechnology Techniques* 7(12): 859-862.

KINO-OKA, M., HONGO, Y., *et al.* (1992). "Culture of red beet hairy root in bioreactor and recovery of pigment released from the cells by repeated treatment of oxygen starvation." *Journal of Chemical Engineering of Japan* 25(5): 490-495.

KINO-OKA, M. et TONE, S. (1996). "Extracellular production of pigment from red beet hairy roots accompanied by oxygen starvation." *Journal of Chemical Engineering of Japan* 29(3): 488-493.

KONDO, O., HONDA, H., *et al.* (1989). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32: 291-294.

KWOK, K.H. et DORAN, P.M. (1995). "Kinetic and stoichiometric analysis of hairy roots in a segmented bubble column reactor." *Biotechnol. Prog.* 11: 429-435.

LEVENSPIEL, O. (1972). *Chemical reaction engineering*. Deuxième édition. John Wiley & Sons.

LEVENSPIEL, O. (1989). *The chemical reactor omnibook*. Corvallis, Oregon.

LIU, C.Z., WANG, Y.C., *et al.* (1998). "Production of artemisinin by hairy root cultures of *Artemisia annua* L in bioreactor." *Biotechnology Letters* 20(3): 265-268.

MACEK, T.E., KOTRBA, P., *et al.* (1998). "Accumulation of cadmium ions by root cultures." *Hairy roots - Culture and Applications*. P.M. Doran, Harwood academic publishers.

MCKELVEY, S.A., GEHRIG, J.A., *et al.* (1993). "Growth of plant root cultures in liquid- and gas-dispersed reactor environments." *Biotechnology Progress* 9: 317-322.

MICHELL, R.W. et FURZER, I.A. (1972). "Mixing in trickle flow through packed beds." *Chem. Eng. J.*, 4 : 53-63.

MILLNER, P.D. et KITT, D.G. (1992). "The Beltsville method for soilless production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi." *Mycorrhiza* 2: 9-15.

MOSSE, B. et THOMPSON, J.P. (1984). "Vesicular-arbuscular endomycorrhizal inoculum production. I. Exploratory experiments with beans (*Phaseolus vulgaris*) in nutrient flow culture." *Can J Bot* 62: 1523-1530.

MUGNIER, J. et MOSSE, B. (1987). "Vesicular-arbuscular mycorrhizal infections in transformed Ri T-DNA roots grown axenically." *Phytopathology* 77: 1045-1050.

MUGNIER, J. (1988). "Establishment of new axenic hairy root lines by inoculation with *Agrobacterium rhizogenes*." *Plant Cell Reports* 7: 9-12.

MUGNIER, J. (1998). "Mycorrhizal interactions and the effects of fungicides, nematicides and herbicides on hairy root cultures". *Hairy Roots - Culture and Applications*. P.M. Doran. Harwood academic publishers.

MURANAKA, T., OHKAWA, H., *et al.* (1993). "Continuous production of scopolamine by a culture of *Duboisia leichhardtii* hairy root clone in a bioreactor system." *Applied Microbiology and Biotechnology* 40: 219-223.

NEWELL, B., BAILEY, J., *et al.* (1998). "Characterising bioreactor mixing with residence time distribution (RTD) tests." *Wat. Sci. Tech.* 37(12): 43-47.

NUUTILA, A.M., TOIVONEN, L., *et al.* (1994). "Bioreactor studies on hairy root cultures of *Catharanthus roseus*: comparison on three bioreactor types." *Biotechnology Techniques* 8(1): 61-66.

NUUTILA, A.M., LINDQVIST, A-S., KAUPPINEN, V. (1997). "Growth of hairy root cultures of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) in three different types of bioreactors. " *Biotechnology Techniques*. 11(6) : 363-366.

PFEFFER, P.E., SHACHAR-HILL, Y., BÉCARD, G., ROLIN, D. et DOUDS, D.D. JR (1998). "Nutrient transport and metabolism in the life cycle of arbuscular mycorrhizae as examined by NMR spectroscopy." *Radical Biology : advances and perspectives on the function of plant roots*. Volume 18. H.E. Flores, J.P. Lynch and D. Eissenstat Eds, Rockville, Maryland, É.U.. 178-187.

PLENCHETTE, C. (1982). "Les endomycorhizes à vésicules et arbuscules (VA) : un potentiel à exploiter en agriculture. " *Phytoprotection*, 63, (2) : 86-108.

PRINCE, C.L., BRINGI, V., *et al.* (1991). "Convective mass transfer in large porous biocatalysts: plant organ cultures." *Biotechno. Prog.* 7: 195-199.

RAMAKRISHNAN, D. et CURTIS, W.R. (1994). "Fluid dynamics studies on plant root cultures for application to bioreactor design", pp. 281-305. Dans : S. Furusaki and D. Ryu (eds),

Advances in plant biotechnology: Production of secondary metabolites. Elsevier Science Publishers B.V., Hollande.

RAMAKRISHNAN, D., SALIM, J., *et al.* (1994). "Inoculation and tissue distribution in pilot-scale plant root culture bioreactors." *Biotechnology Techniques* 8 (9): 639-644.

RAMAKRISHNAN, D., LUYK, D., *et al.* (1999). "Monitoring biomass in root culture systems." *Biotechnology and Bioengineering* 62(6).

REISS, L.P. (1967). "Cocurrent gas-liquid contacting in packed columns." *Ind. Eng. Chem. Proc. Des. Dev.*, 6 : 486-491.

RHODES, M.J.C., ROBINS, R.J., *et al.* (1987). "Secondary product formation using *Agrobacterium rhizogenes*-transformed "hairy root" cultures." *TCA Newsletter* 53: 2-15.

RUSSELL, A.B., THOMAS, C.R. *et* LILLY, M.D. (1994). "The influence of vessel height and top-section size on the hydrodynamic characteristics of airlift fermentors." *Biotechnology and Bioengineering* 43 : 69-76.

SATTERFIELD, C .N. (1975). "Trickle-bed reactors." *AIChE Journal*. 21(2).

SINGH, G., REDDY, R.G., CURTIS, W.R., (1994). "Use of binding measurements to predict elicitor dosage requirements for secondary metabolite production from root cultures." *Biotechnol. Prog.* 10 : 365-371.

SMITH, S.S.E. (1980). "Mycorrhizas of autotrophic higher plants." *Biol. Rev.* 55: 475-510.

ST-ARNAUD, M., HAMEL, C., *et al.* (1994). "Inhibition of *Pythium ultimum* in roots and growth substrate of mycorrhizal *Tagetes patula* colonized with *Glomus intraradices*." *Can. J. Plant Pathol.* 16: 187-194.

ST-ARNAUD, M., HAMEL, C., *et al.* (1995). "Altered growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* in an in vitro dual culture system with the vesicular arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* growing on *Daucus carota* transformed roots." *Mycorrhiza* 5: 431-438.

ST-ARNAUD, M., HAMEL, C., *et al.* (1996). "Enhanced hyphal growth and spore production of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in an in vitro system in the absence of host roots." *Mycol Res* 100: 332-338.

ST-ARNAUD, M., HAMEL, C., *et al.* (1997). "Inhibition of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* in the non-VAM species *Dianthus caryophyllus* by co-culture with *Tagetes patula* companion plants colonized by *Glomus intraradices*." *Can J Bot* 75: 998-1005.

SYLVIA, D.M. et JARSTFER, A.G. (1992). "Sheared roots inocula of vesicular mycorrhizal fungi." *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 229-232.

TAYA, M., YOYAMA, A., *et al.* (1989). "Growth characteristics of plant hairy roots and their cultures in bioreactors." *Journal of Chemical Engineering of Japan* 22(No. 1): 84-88.

TESCIONE, L., CARVALHO, E.B., *et al.* (1995). "Oxygen transfer limitations in pilot-scale reactors for plant roots". *Abstr Kanto Chapter Soc Chem Engineers Meeting*, Kanto, Japan.

TESCIONE, L., RAMAKRISHNAN, D., *et* CURTIS, W.R. (1997). "The role of liquid mixing and gas-phase dispersion in a submerged, sparged root reactor. " *Enzyme Microb. Technol.* 20 : 207-213.

TOIVONEN, L., LAAKSO, S., *et al.* (1992). "The effect of temperature on hairy root cultures of *Catharanthus roseus*: growth, indole alkaloid accumulation and membrane lipid composition." *Plant Cell Rep.* 11: 395-399.

TOIVONEN, L. (1993). "Utilization of hairy root cultures for production of secondary metabolites." *Biotechnol. Prog.* 9(No. 1): 12-20.

TONE, S., TAYA, M., *et al.* (1998). "Alteration of metabolite formation and morphological properties of hairy roots by environmental stimuli. " *Hairy Roots - Culture and Applications*. P.M. Doran, Harwood academic publishers.

TRAPPE, J.M., MOLINA, R., *et al.* (1984). "Reactions of mycorrhizal fungi and mycorrhiza formation to pesticides." *Ann. Rev. Phytopathol.* 22: 331-359.

UOZUMI, N., KOHKETSU, K., *et al.* (1993). "Growth and kinetic parameters of *Ajuga* hairy root in fed-batch culture on monosaccharide medium." *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 57: 155-161.

VAN GULIK, W.M., MEIJER, J.L., TEN HOOPEN, *et al.* (1989). "Growth of a *Catharanthus roseus* cell suspension culture in a modified chemostat under glucose-limiting conditions." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 30 : 270-275.

VAN SWAAIJ, W.P.M., CHARPENTIER, J.C., VILLERMAUX, J. (1969). *Chem. Eng. Sci.*, 24.

VERPOORTE, R., VAN DER HEIJDEN, R., *et al.* (1993). "Plant cell biotechnology for the production of alkaloids: present status and prospects." *Journal of Natural Products* 56(2): 186-207.

WEATHERS, P.J., DIORIO, A., *et al.* (1989). "A bioreactor for differentiated plant tissue." *Proceedings of Biotechnology USA Conference*, San Francisco October 2-4: 247-256.

WEATHERS, P.J., WYSLOUZIL, B.E., *et al.* (1998). "Laboratory-scale studies of nutrient mist reactors for culturing hairy roots". *Hairy Roots - Culture and Applications*. P.M. Doran.

WHITNEY, P.J. (1992). "Novel bioreactors for the growth of roots transformed by *Agrobacterium rhizogenes*." *Enzyme Microb. Technol.* 14.

WILSON, P.D.G. (1998). "The pilot-scale cultivation of transformed roots." *Hairy Roots - Culture and Applications*. P.M. Doran.

WOO, S.H. et PARK, J.M. (1996). "Root culture using a mist culture system and estimation of scale-up feasibility." *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 66: 355-362.

WOOD, T. et CUMMINGS, B. (1992). "Biotechnology and the future of VAM commercialization." *Mycorrhizae in Sustainable Agriculture*. ASA Special Publication 54: 468-487.

YONEMITSU, H., SHIMOMURA, K. , *et al.* (1990). "Lobeline production by hairy root culture of *Lobelia inflata* L." *Plant Cell Reports* 9: 307-310.

YU, S. and DORAN, P.M. (1994). "Oxygen requirements and mass transfer in hairy-root culture." *Biotechnology and Bioengineering* 44: 880-887.

YU, S., MAHAGAMASEKERA, M.G.P., *et al.* (1998). "Oxygen effects in hairy root culture." *Hairy Roots - Culture and Applications*. P.M. Doran. Harwood academic publishers.

ANNEXES A – COMPOSITION DES MILIEUX

Composition des milieux Minimum (Min) et Modified White (MW). Le milieu Min 3s 3N 10 P contient trois fois la concentration en sucrose, trois fois la concentration en calcium et 10 fois la concentration en PO_4^{3-} du milieu minimum.

Sels majeurs	MgSO ₄ *7 H ₂ O 14.6 g KNO ₃ 1.6 g KCl 1.3 g	dans 500 mL	Prendre 25 mL/L
Calcium	Ca(NO ₃) ₂ *4H ₂ O 28.8 g	dans 500 mL	Prendre 5 mL/L
Vitamines	Glycine 1.5 g Thiamine 50 mg Pyridoxine 50 mg Acide nicotinique 250 mg Inositol 25 g	dans 500 mL	Prendre 1 mL/L
Micronutriments	KI 375 mg MnCl ₂ *4H ₂ O 3 g ZnSO ₄ *7H ₂ O 1.325 g H ₃ BO ₃ 0.75 g CuSO ₄ *5H ₂ O 65 mg Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O 1.2 mg	dans 500 mL	Prendre 1 mL/L
NaFe-EDTA	FeSO ₄ -EDTA 4.3 g	dans 1 L	Prendre 1.86 mL/L
PO ₄ ³⁻	Min KH ₂ PO ₄ 0.48 g MW NaH ₂ PO ₄ *2H ₂ O 0.215 g Na ₂ SO ₄ *10H ₂ O 4.53 g	dans 100 mL dans 100 mL	Prendre 1 mL/L Prendre 10 mL/L
Sucrose			Min 10 g/L MW 30 g/L

ANNEXES B – RÉSULTATS DES RÉCOLTES POUR LE CHOIX DU GARNISSAGE

No	Type garn.	Ino- culum (g WW)	Temps de culture (j)	Masse récolte (g WW)	Distribution	Racines	Accrochage	Remplissage
2	TP 2" pla.	20	47	73	Apparence de bonne distribution. Le coeur est dense mais le reste est bien aéré.	Racines très en forme	Très solide. La chute ne dérange pas. Pour séparer deux pack, en tirant c'est très difficile.	7 < 20%; 2 < 50%; 3 100%
3	TP 2" pla.	20	100	124,84			Très bon accrochage. 1% de perte à chaque chute.	1 = 50%; 1 > 50%; 8 < 100%; 2 = 100%
7	TP 1" pla.	10	106	99,68	Beau lit très uniforme.		Les racines sont très solidement accrochées; 1% de perte à chaque chute	3 = 50%; 3 < 100%; 12 = 100%
8	TP 1" alé.	10	128	122,3	Beau lit	Centre et sous le lit un peu foncé.	Moins solide lorsqu'on arrache du lit. Beaucoup de racines restent libres lorsqu'on tire.	Pas dense: 1 = 50%; 4 > 50%; 4 < 100%; 9 = 100%; Dense: 6 = 100%
9	TP 2" alé.	10	46	42	Très peu de colonisation. Beaucoup de racines sur la grille.		En séparant les pack. seuls quelques brins restent sur les pack.	20 < 1%; 4 < 20%
11	TP 2" alé.	20	56	66,4	Beaucoup de racines sur la grille du fond.	Beaucoup de racines mortes sur le dessus.		4 < 1%; 6 < 20%; 1 < 100%
12	PR 1" alé.	10	76	64,6	Le 3/4 des racines est dans le fond, sur la grille; Présence d'un noyau extra dense d'un volume d'un TP 1" d'une masse de 8,38g	Au centre et sur le dessus. vieilles racines mortes. noires	Très accrochées; la chute n'affecte pas; s'enlèvent quand même facilement des pack car peu dense. Aucune différence entre les TP et les PR.	4 = 0%; 7 < 1%; 2 < 20 %; 4 < 50%; 1 = 50%; 3 = 100%; PR 2 = 50%
13	PR 2" alé.	20	56	141	Très peu de colonisation. 47 g de racines juste sur le grillage		Très peu d'accrochage. beaucoup moins que sur les pack.	5 < 1%; 3 < 20%
14	TP 2" alé.	16	61	78,62			Bon accrochage, la chute n'affecte pas.	1 = 0; 5 < 1%; 1 < 20%; 1 = 25%; 3 = 50%;

No	Type garn.	Ino- culum (g WW)	Temps de culture (j)	Masse récolte (g WW)	Distribution	Racines	Accrochage	Remplissage
15	TP 1" pla.	10	58	96.04	Apparence lit très dense uniforme			2 = 25%; 5 = 50%; 2 < 100%; 7 = 100%
23	PR 1" pla.	1	69	109.83			Moins bon accrochage des PR que des TP	1 = 0; 1 < 1%; 1 < 20%; 1 = 25%; 3 = 50%; 4 < 100%; 7 = 100%; PR: 1 = 100%; 1 = 75%
24	PR 1" alé.	1	69	110.62	Pas très dense, beau lit uniforme (grâce au petit inoculum).		Même les racines remplies à 50% ont des racines un peu partout et sont solidement accrochées.	2 < 1%; 7 < 20%; 1 = 25%; 6 = 50%; 1 = 75%; 2 < 100%; 2 = 100%; PR: 1 < 1%; 1 = 100%
26	PR 2" alé.	1	54	53.77			Tiens bien malgré tout, 5 % de perte à chaque chute	1 < 1%; 2 = 50% (pas dense); 1 = 100% (au 3/4 dense)
28	PR 1"-2" pla.	4	60	92			Entre 2 et 5% de perte à chaque chute	1": 4 = 100%; 2": 2 = 50%; 1 = 100%

TP : Tri pack

PR : Pall ring

Pla. : inoculation placée

Alé. : inoculation aléatoire

Correspondance des numéros de culture avec les essais de l'analyse factorielle.

Essais	Culture a	Culture b
1	7	15
2	23	28(1)
3	2	3
4	18	28(2)
5	8	9
6	12	24
7	11	14
8	13	26

ANNEXES C – CALCULS POUR L'ANALYSE FACTORIELLE

Calcul des contrastes, des sommes des carrés et des effets pour le plan factoriel du choix de garnissage

Essais	I	A	B	AB	C	AC	BC	ABC	Y1Moy	Y2Moy	Y3Moy
1	1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	10	10	9
2	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	7	5	10
3	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	10	10	7,5
4	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	9	10	9
5	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	3,5	6	6
6	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	6	6	5
7	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	10	2	3,5
8	1	1	1	1	1	1	1	1	5,5	2	5
Contrastes											
C1	61	-6	8	-5	-11	2	4	-9			
C2	51	-5	-3	5	-19	5	-13	-5			
C3	55	3	-5	3	-16	-2	0	2			
Sommes des carrés											
SS1	930	9	16	6,25	30,25	1	4	20,25			
SS2	650	6,25	2,25	6,25	90,25	6,25	42,25	6,25			
SS3	756	2,25	6,25	2,25	64	1	0	1			
Demi-effets											
DemiE1		-0,75	1	-0,63	-1,38	0,25	0,5	-1,13			
DemiE2		-0,63	-0,38	0,63	-2,38	0,63	-1,63	-0,63			
DemiE3		0,38	-0,63	0,38	-2	-0,25	0	0,25			

ANNEXES D – DONNÉES HYDRODYNAMIQUES

Fichier	Fichier-déconvolué	Diamètre (cm)	Épaisseur (cm)	Culture	Jour	Débit (ml/s)	V/Q (s)	t _m (s)	sigma2 (s ²)	Temps mélange (s)
Système modèle, alimentation brouillard										
DTSJ11		10.0	1.5			0.1	1570.8	1238.0	883485.0	2300.0
DTSJ13		10.0	1.5			0.1	1178.1	1051.0	333275.0	1052.0
DTSJ31	DECJ31	10.0	1.5			0.3	436.3	278.5	44485.0	548.0
DTSJ32	DECJ32	10.0	1.5			0.3	436.3	312.0	54023.0	616.0
DTSJ33	DECJ33	10.0	1.5			0.3	436.3	301.0	66006.0	558.0
DTSJ51	DECJ51	10.0	1.5			0.4	267.8	117.0	9713.0	236.0
DTSJ52	DECJ52	10.0	1.5			0.4	267.8	142.0	12322.0	286.0
DTSJ53	DECJ53	10.0	1.5			0.4	267.8	157.0	16361.0	322.0
DTSJV71	DECJV71	11.0	1.5			0.8	190.1	71.0	2681.0	158.0
DTSJV72	DECJV72	11.0	1.5			0.8	190.1	121.0	9618.0	248.0
DTSJV91	DECJV91	11.0	1.5			1.0	142.6	58.0	1913.0	120.0
DTSJV92	DECJV92	11.0	1.5			1.0	142.6	54.0	1070.0	106.0
DTSJV93	DECJV93	11.0	1.5			1.0	142.6	72.0	2501.0	140.0
DTS6J11		10.0	6.0			0.2	3080.0	1289.0	5223252.0	2498.0
DTS6J12		10.0	6.0			0.2	3141.6	1447.0	616464.0	2748.0
DTS6J13		10.0	6.0			0.2	3080.0	1547.0	1200403.0	2682.0
DTS6J31		10.0	6.0			0.3	1885.0	318.0	45112.0	684.0
DTS6J32		10.0	6.0			0.2	2048.9	547.0	121318.0	1136.0
DTS6J33		10.0	6.0			0.2	2048.9	602.0	143328.0	1172.0
DTS6J51		10.0	6.0			0.4	1178.1	500.0	137574.0	976.0
DTS6J52		10.0	6.0			0.4	1273.6	474.7	79446.0	936.0
DTS6J53		10.0	6.0			0.4	1178.1	502.0	133616.9	934.0
DTS6JV71	DEC6JV71	11.0	6.0			0.8	760.3	353.0	157462.0	748.0
DTS6JV72	DEC6JV72	11.0	6.0			0.8	760.3	310.0	20339.0	644.0
DTS6JV73	DEC6JV73	11.0	6.0			0.8	760.3	302.0	112827.0	632.0
DTS6JV92	DEC6JV92	11.0	6.0			1.0	570.2	257.8	16958.0	504.0
DTS6JV93	DEC6JV93	11.0	6.0			1.0	570.2	235.0	14202.0	482.0
DTS18J11		10.0	18.0			0.1	10874.8	2060.0	767356.0	3900.0
DTS18J12		10.0	18.0			0.1	10874.8	1892.0	1306253.0	3626.0
DTS18J13		10.0	18.0			0.2	7641.7	1886.0	865755.0	3828.0
DTS18J31		10.0	18.0			0.3	4977.9	1106.0	332651.0	2264.0
DTS18J32		10.0	18.0			0.3	4712.4	1312.0	353700.0	2512.0
DTS18J33		10.0	18.0			0.3	4560.4	1650.0	450455.0	2870.0
DTS18J51	DEC18J51	10.0	18.0			0.5	2618.0	860.0	131523.0	1558.0
DTS18J52	DEC18J52	10.0	18.0			0.5	2618.0	739.0	117735.0	1424.0
DTS18J53	DEC18J53	10.0	18.0			0.5	2618.0	832.7	129993.0	1570.0
DTS18J72		10.0	18.0			0.8	1885.0	570.0	77081.0	1094.0
DTS18J73		10.0	18.0			0.8	1885.0	552.0	74377.0	1058.0

Fichier	Fichier-déconvolué	Dia-mètre (cm)	Épais-seur (cm)	Culture	Jour	Dé-bit (ml/s)	V/Q (s)	tm (s)	sigma2 (s ²)	Temps mélan-ge (s)
DTS18J82		10.0	18.0			0.8	1767.2	512.7	70386.0	1032.0
DTS18J83		10.0	18.0			0.8	1767.2	632.0	72193.0	1142.0
DTS4LH1	DEC4LH1	10.0	18.0			1.0	1413.7	446.0	55372.0	1116.0
DTS4LH2		10.0	18.0			1.0	1359.3	491.0	39759.0	1108.0
DTS5lh2		10.0	18.0			1.3	1062.9	356.0	30226.0	924.0
DTS5lh1		10.0	18.0			1.4	1009.8	229.0	28940.0	800.0
DTS2mls1		10.0	18.0			2.5	565.5	183.0	12014.0	516.0
DTS25mls		10.0	18.0			2.7	523.6	159.0	7448.0	426.0
DTSV13		10.0	vide			0.1		390.8	62113.0	
DTSVV33		11.0	vide			0.3		70.0	2858.0	
DTSVV34		11.0	vide			0.3		90.0	3395.0	
DTSV52		10.0	vide			0.5		51.0	1941.0	
DTSV51		10.0	vide			0.5		44.9	1362.5	
DTSV53		10.0	vide			0.5		43.4	2835.0	
DTSVV54		11.0	vide			0.5		47.4	799.0	
DTSVV55		11.0	vide			0.5		42.0	830.0	
DTSVV56		11.0	vide			0.5		39.0	666.0	
DTSVV71		11.0	vide			0.7		107.0	4639.0	
DTSVV72		11.0	vide			0.7		129.0	10397.0	
DTSVV91		11.0	vide			1.0		49.0	684.0	
DTSVV92		11.0	vide			1.0		28.0	252.0	
DTSVV93		11.0	vide			1.0		58.0	832.0	
SerInj4		2.6	1.5	Jute		0.1	79.6	212.0	64145.0	452.0
SerInj5		2.6	1.5	Jute		0.1	79.6	230.0	76157.0	504.0
SerInj6		2.6	6.0	Jute		0.1	318.6	217.0	62969.0	470.0
SerInj8		2.6	6.0	Jute		0.1	318.6	180.0	47497.0	374.0
LabInj2	LabDec2	25.0	1.5	Jute		0.8	981.8	300.0	132709.0	710.0
LabInj3	LabDec3	25.0	1.5	Jute		0.8	981.8	381.0	214259.0	904.0
LabInj4	LabDec4	25.0	1.5	Jute		0.5	1472.6	364.0	198068.0	852.0
LabInj5	LabDec5	25.0	1.5	Jute		0.5	1472.6	381.0	217326.0	816.0
LabInj6	LabDec6	25.0	6.0	Jute		0.8	3927.0	678.0	565859.0	1444.0
LabInj7		25.0	6.0	Jute		0.8	3927.0	719.0	641036.0	1544.0
LabInj10		25.0	6.0	Jute		0.5	5890.5	1246.0	1967486.0	1792.0
LabInj11		25.0	6.0	Jute		0.5	5890.5	1109.0	1781124.0	2466.0
LabInjV1		25.0	Vide			0.5		63.0	5831.0	
LabInjV2		25.0	Vide			0.5		67.0	6759.0	
LabInjV3		25.0	Vide			0.8		69.0	9397.0	
LabInjV4		25.0	Vide			0.8		60.0	7476.0	
Système modèle, alimentation gouttes à gouttes aléatoire										
TR011		10.0	vide			0.4		291.3	22171.0	

Fichier	Fichier-décon-volué	Dia-mètre (cm)	Épais-seur (cm)	Culture	Jour	Dé-bit (ml/s)	V/Q (s)	tm (s)	sigma2 (s ²)	Temps mélan-ge (s)
TR012		10,0	vide			0,4		310,2	22714,0	
TR021		10,0	vide			0,3		642,5	83108,0	
TR022		10,0	vide			0,3		650,0	89054,0	
TR31		10,0	1,5	Jute		0,3	420,8	319,5	157361,0	1306,0
TR32		10,0	1,5	Jute		0,2	561,0	660,6	167366,0	1388,0
TR33		10,0	1,5	Jute		0,2	561,0	743,7	189578,0	1504,0
TR121		10,0	1,5	Racines		0,3	462,0	759,9	87844,0	1300,0
TR122		10,0	1,5	Racines		0,3	462,0	710,2	104581,0	1464,0
TR123		10,0	1,5	Racines		0,2	521,3	297,6	39430,0	746,0
TR21		10,0	1,5	Jute		0,6	206,7	100,0	3160,0	272,0
TR22		10,0	1,5	Jute		0,6	206,7	143,0	5801,0	330,0
TR23		10,0	1,5	Jute		0,6	206,7	148,0	6659,0	396,0
TR111		10,0	1,5	Racines		0,5	258,9	248,0	12133,0	746,0
TR112		10,0	1,5	Racines		0,5	258,9	252,0	11316,0	674,0
TR113		10,0	1,5	Racines		0,5	258,9	192,0	8063,0	616,0
TR41		10,0	1,5	Jute		0,1	1178,1	1164,0	433843,0	3090,0
TR43		10,0	1,5	Jute		0,1	906,2	1092,0	312263,0	2910,0
TR44		10,0	1,5	Jute		0,1	1178,1	1312,0	487894,0	3866,0
TR131		10,0	1,5	Racines		0,1	1683,0	1817,0	956388,0	4220,0
TR132		10,0	1,5	Racines		0,1	1143,8	2195,9	1427238,0	4924,0
Lit de racines										
LitInjV1		11,0	vide	Vide		0,7		33,0	477,0	
LitInjV2		11,0	vide	Vide		0,7		40,2	1248,0	
LitInjV3		11,0	vide	Vide		0,7		35,7	967,0	
LitInj3	Litdec3	11,0	1,5	27,0	15,0	0,7	203,6	123,0	7230,0	246,0
LitInj4	Litdec4	11,0	1,5	27,0	15,0	0,7	203,6	122,0	6242,0	270,0
LitInj5	Litdec5	11,0	1,5	27,0	15,0	0,7	203,6	160,0	15497,0	268,0
LitInj6	Litdec6	11,0	2,0	27,0	22,0	0,7	271,5	166,0	19183,0	362,0
LitInj7	Litdec7	11,0	2,0	27,0	22,0	0,7	271,5	143,0	11113,0	336,0
LitInj8	Litdec8	11,0	2,0	27,0	22,0	0,7	271,5	160,0	15228,0	366,0
LitInj18	Litdec18	11,0	2,0	27,0	27,0	0,7	271,5	224,0	30065,0	460,0
LitInj19	Litdec19	11,0	2,0	27,0	27,0	0,7	271,5	233,0	35865,0	440,0
LitInj9	Litdec9	11,0	3,0	29,0	16,0	0,7	407,3	156,0	14504,0	310,0
LitInj10	Litdec10	11,0	3,0	29,0	16,0	0,7	407,3	226,0	27992,0	488,0
LitInj11	Litdec11	11,0	3,0	29,0	16,0	0,7	407,3	223,0	39463,0	464,0
LitInj12	Litdec12	11,0	4,0	29,0	26,0	0,7	543,0	140,0	14364,0	266,0
LitInj13	Litdec13	11,0	4,0	29,0	26,0	0,7	543,0	166,0	25264,0	252,0
LitInj14	Litdec14	11,0	4,0	29,0	26,0	0,7	543,0	162,0	29194,0	262,0
LitInj15	Litdec15	11,0	5,0	29,0	37,0	0,7	678,8	120,0	10129,0	252,0
LitInj16	Litdec16	11,0	5,0	29,0	37,0	0,7	678,8	101,0	5064,0	240,0

Fichier	Fichier-déconvolué	Dia-mètre (cm)	Épais-seur (cm)	Culture	Jour	Dé-bit (ml/s)	V/Q (s)	tm (s)	sigma2 (s ²)	Temps mélan-ge (s)
LitInj17	Litdec17	11.0	5.0	29.0	37.0	0.7	678.8	104.0	5753.0	238.0
LitInj22	Litdec22	11.0	4.0	33.0	37.0	0.7	543.0	97.0	3380.0	208.0
LitInj25	Litdec25	11.0	5.0	33.0	37.0	0.7	678.8	108.0	8762.0	216.0
LitInj27	Litdec27	11.0	6.0	33.0	45.0	0.7	814.6	78.0	3950.0	160.0
LitInj28	Litdec28	11.0	6.0	33.0	45.0	0.7	814.6	75.0	2517.0	166.0
LitInj29	Litdec29	11.0	6.8	33.0	51.0	0.7	916.4	93.0	3329.0	200.0
LitInj30	Litdec30	11.0	6.8	33.0	51.0	0.7	916.4	102.0	2584.0	210.0
LitInj31	Litdec31	11.0	6.8	33.0	51.0	0.7	916.4	94.0	4336.0	200.0
LitInj32	LitDec32	11.0	7.0	33.0	58.0	0.7	950.3	128.0	33498.0	200.0
LitInj33	LitDec33	11.0	7.0	33.0	58.0	0.7	950.3	78.0	9398.0	154.0
LitInj34	Litdec34	11.0	7.0	33.0	58.0	0.7	950.3	118.0	18293.0	254.0
LitInj36	Litdec36	11.0	8.0	33.0	67.0	0.7	1086.1	68.0	5968.0	134.0
LitInj37	Litdec37	11.0	8.0	33.0	67.0	0.7	1086.1	141.0	30226.0	280.0
LitInj38	Litdec38	11.0	9.0	33.0	78.0	0.7	1221.9	133.0	21468.0	256.0
LitInj39	Litdec39	11.0	9.0	33.0	78.0	0.7	1221.9	213.0	70088.0	398.0
LitInj40	Litdec40	11.0	8.5	33.0	74.0	0.7	1154.0	124.0	19783.0	242.0
LitEch2		11.0	4.0	29.0	26.0	0.7	543.0	203.0	10118.0	
LitEch3		11.0	5.0	29.0	37.0	0.7	678.8	278.0	44411.0	
SerInj1		2.6	7.0	30.0	45.0	0.1	371.7	176.0	10690.0	300.0
SerInj2		2.6	7.0	30.0	45.0	0.1	371.7	144.0	3428.0	270.0
SerInj3		2.6	7.0	30.0	45.0	0.1	371.7	177.0	18639.0	352.0
Lit de racines sur garnissages										
20InjV1		23.5		Vide		0.5		84.0	3982.0	
20InjV2		23.5		Vide		0.5		119.0	6476.0	
20InjV3		23.5		Vide		0.5		158.0	9678.0	
20InjV4		23.5		Pack Vides		0.5		304.0	29009.0	684.0
20InjV5		23.5		Pack Vides		0.5		404.0	43188.0	
20InjV6		23.5		Pack Vides		0.5		139.0	6236.0	278.0
20InjV7		23.5		Pack Vides		0.5		186.0	15587.0	370.0
20InjV8		23.5		Pack Vides		0.7		91.0	1592.0	188.0
20InjV9		23.5		Pack Vides		0.9		97.0	2172.0	222.0
20InjV10		23.5		Pack Vides		0.7		68.0	1973.0	164.0
20InjV12		23.5		Pack Vides		0.7		344.0	50239.0	668.0
20InjV13		23.5		Pack Vides		0.7		254.0	17529.0	606.0
20InjV15		23.5		Vide		0.7		106.0	7479.0	
20InjV16		23.5		Vide		0.7		111.0	6360.0	
20InjV17		23.5		Vide		0.7		307.0	66911.0	
20InjV18		23.5		Vide		0.7		166.0	2954.0	
20InjV19		23.5		Vide		0.7		144.0	7674.0	
20InjV20		23.5		Vide		0.7		196.0	19199.0	

Fichier	Fichier-déconvolué	Diamètre (cm)	Épaisseur (cm)	Culture	Jour	Débit (ml/s)	V/Q (s)	tm (s)	sigma2 (s ²)	Temps mélange (s)
20InjV21		23,5		Vide		0,5		162,0	10365,0	
20InjV22		23,5		Vide		0,5		166,0	17205,0	
20InjV23		23,5		Vide		0,5		194,0	39321,0	
20Inj3	20Dec3	23,5		34,0	49,0	0,7		217,0	17972,0	452,0
20Inj4	20Dec4	23,5		34,0	49,0	0,7		177,0	3788,0	370,0
20Inj5	20Dec5	23,5		34,0	49,0	0,7		192,0	10626,0	300,0
20Inj7	20Dec7	23,5		34,0	57,0	0,7		213,0	19582,0	438,0
20Inj8	20Dec8	23,5		34,0	63,0	0,7		243,0	19842,0	506,0
20Inj9	20Dec9	23,5		34,0	71,0	0,7		351,0	48552,0	686,0
20Inj10	20Dec10	23,5		34,0	81,0	0,7		369,0	69987,0	740,0
20Inj11	20Dec11	23,5		34,0	88,0	0,7		375,0	89242,0	640,0
20ÉchV1		23,5		Vide		0,5		195,0	3124,0	
20ÉchV2		23,5		Vide		0,5		231,0	11734,0	
20ÉchV3		23,5		Pack Vides		0,5		244,0	3013,0	
20ÉchV4		23,5		Pack Vides		0,9		167,0	3034,0	
20ÉchV5		23,5		Pack Vides		0,9		170,0	14961,0	
20ÉchV6		23,5		Pack Vides		0,7		326,0	24686,0	
20ÉchV7		23,5		Pack Vides		0,7		416,0	18457,0	
20Éch1		23,5		34,0	22,0	0,7		111,0	4595,0	
20Éch2		23,5		34,0	49,0	0,7		306,0	2826,0	

Lit de racines sur garnissages (essais hydrodynamiques lors des cultures pour le choix de garnissage)

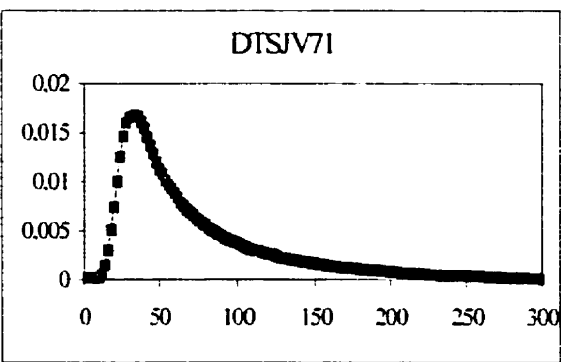
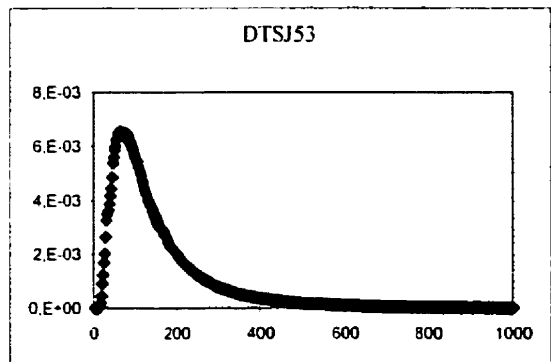
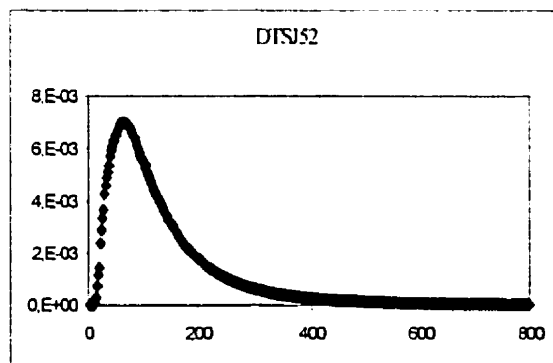
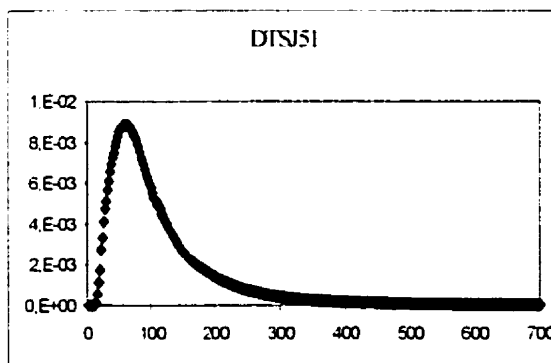
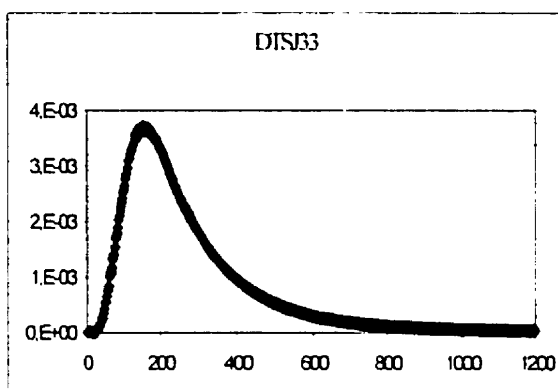
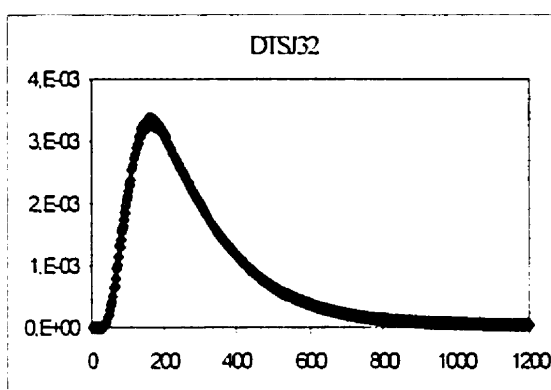
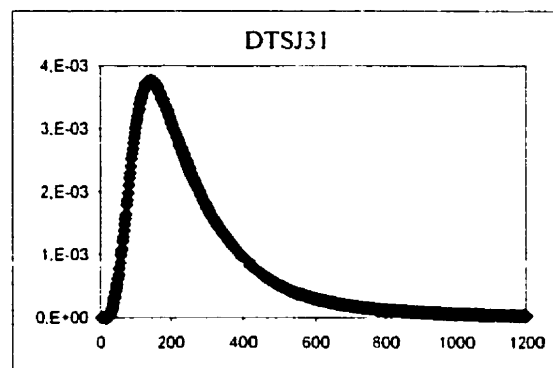
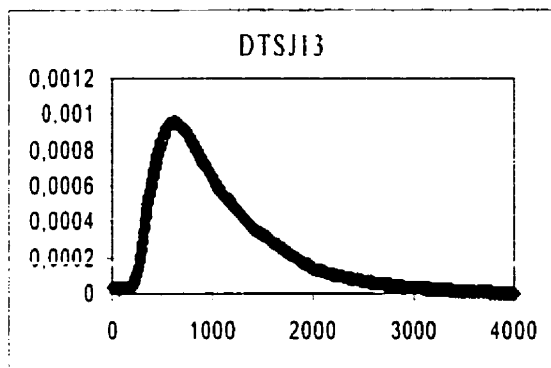
Fichier	Culture	Type Garn.	Diam. Garn.	Inoculation	Racines	Jour	tm (s)	sigma2 (s ²)	Tmélange (s)
Pac8Inj1	8	TP	1"	aléatoire		128	41	814	74
Pac8Inj3	8	TP	1"	aléatoire		128	44	1524	70
Pac18Inj1	18	PR	2"	placée		112	139	8788	342
Pac18Inj2	18	PR	2"	placée		112	145	7853	336
Pac23Inj1	23	PR	1"	placée	myco	69	176	9379	384
Pac23Inj2	23	PR	1"	placée	myco	69	133	4964	280
Pac24Inj1	24	PR	1"	aléatoire	myco	69	119	4596	140
Pac24Inj2	24	PR	1"	aléatoire	myco	69	82	5438	164
Pac24Inj3	24	PR	1"	aléatoire	myco	69	117	13536	230
Pac18Éch	18	PR	2"	placée		112	164	61657	
Pac24Éch	24	PR	1"	aléatoire	myco	69	263	15233	

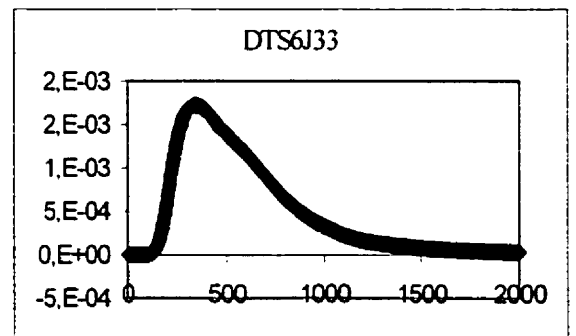
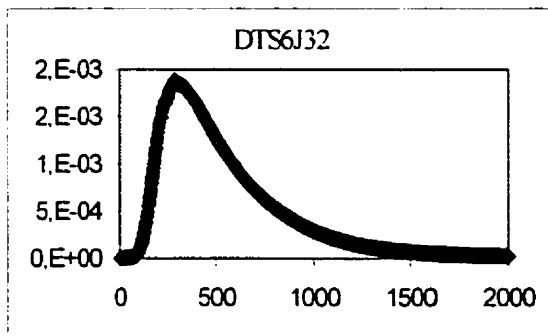
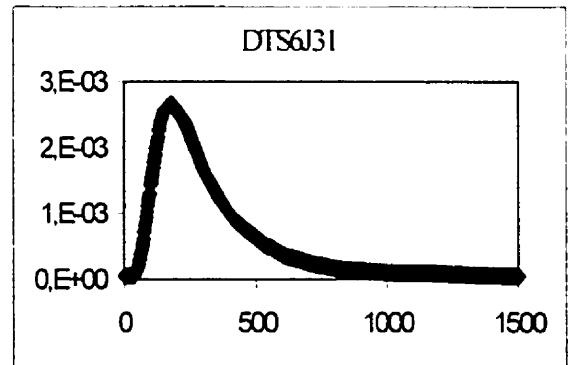
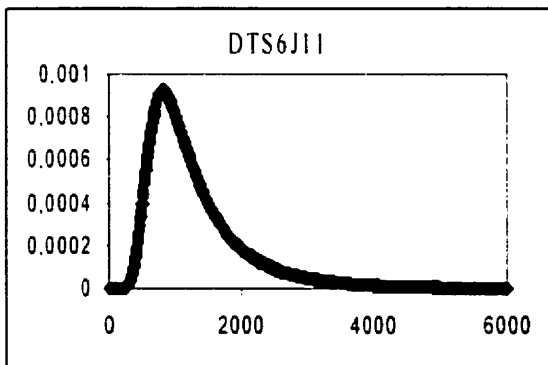
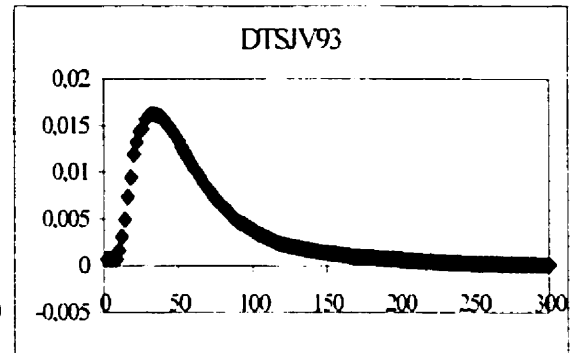
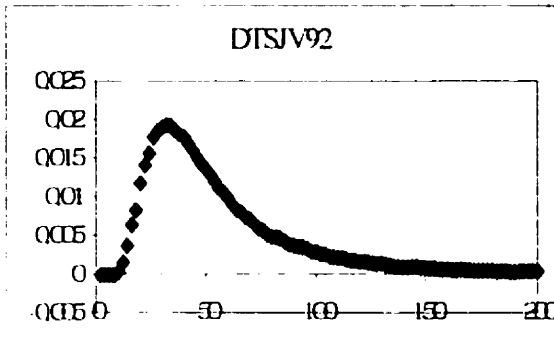
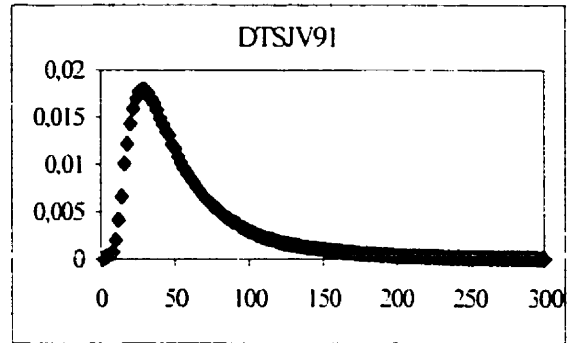
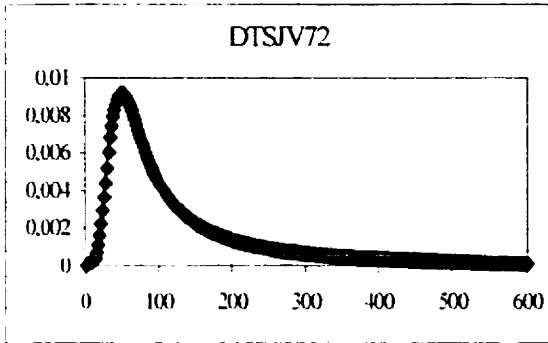
Courbes de DTS déconvoluées (nombre de Péclet, τ_M , σ_M^2 calculés à partir de τ_1 et τ_2 du modèle des 2 CSTR en série)

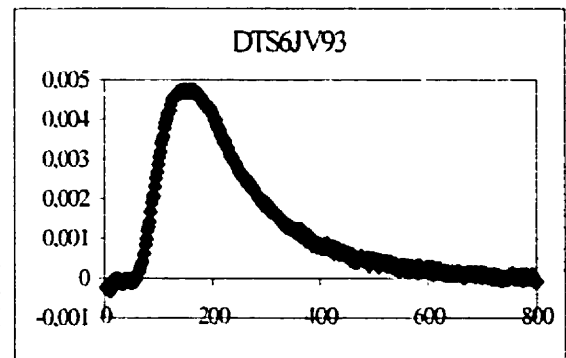
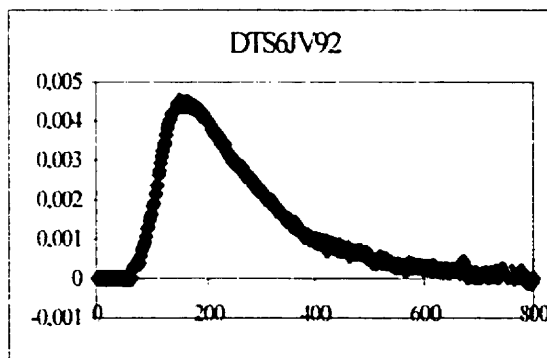
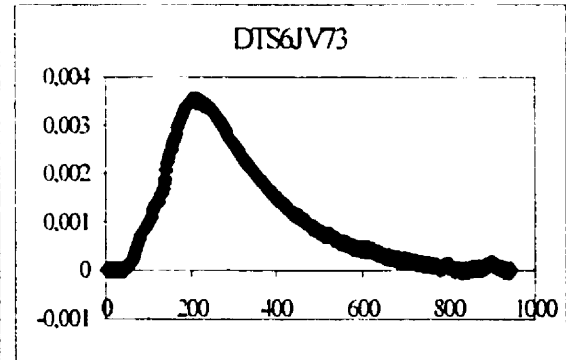
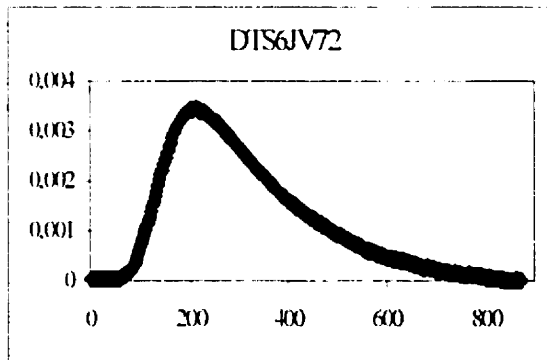
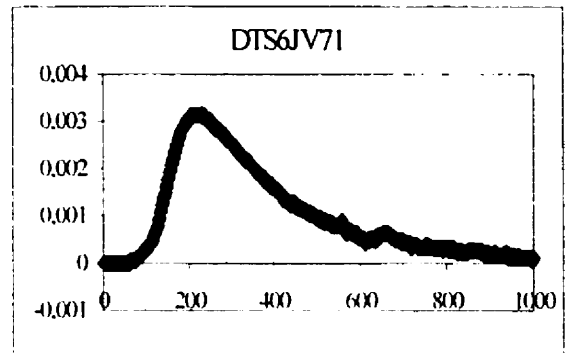
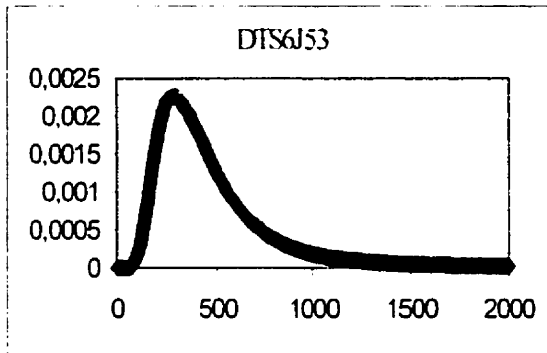
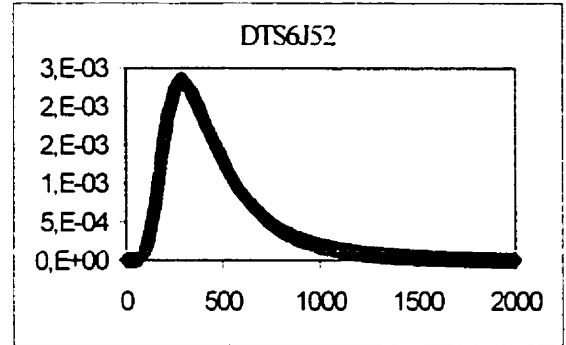
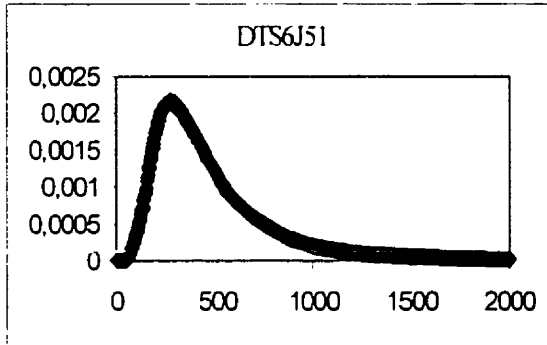
Fichier	α	τ_1	τ_2	τ_M	σ_M^2	Pe
Système modèle						
DECJ31	20,0	73,5	84,2	177,7	12490	3,7
DECJ32	20,0	89,7	99,9	209,1	18020	3,5
Fichier						
DECJ33	20,0	77,8	88,8	186,6	13940	3,7
DECJ51	4,0	20,8	35,4	60,2	1683	2,9
DECJ52	4,0	15,5	60,6	80,1	3910	1,7
DECJ53	4,0	33,5	45,9	83,4	3231	2,9
DECJV71	4,0	10,0	15,0	29	325	3,9
DECJV72	4,0	10,0	60,0	74	3700	1,3
DECJV91	0,0	6,2	25,1	31,3	675	1,2
DECJV92	0,0	13,6	13,7	27,3	372,65	2,6
DECJV93	0,0	9,7	25,7	35,4	753,03	1,8
DEC6JV71	90,0	112,7	123,6	326,3	27990	6,4
DEC6JV72	70,0	107,0	118,8	295,8	25560	5,6
DEC6JV73	70,0	95,0	122,2	287,2	23960	5,7
DEC6JV92	70,0	72,3	82,8	224,9	12020	7,3
DEC6JV93	60,0	65,3	76,3	201,6	10060	6,9
DEC18J51	250,0	298,9	298,9	847,7	178600	6,9
DEC18J52	150,0	298,0	298,1	746,1	177700	5,0
DEC18J53	200,0	323,0	323,1	846,1	20870	67,6
DEC4LH1	350,0	162,0	177,4	689,4	57720	15,4
Lit de racines						
Litdec3	20,0	18,0	28,0	66	1108	6,7
Litdec4	20,0	24,9	24,9	69,7	1236	6,7
Litdec5	26,0	24,7	24,0	74,7	1186	8,3
Litdec6	14,0	18,0	40,0	72	1924	4,1
Litdec7	16,0	24,0	26,0	66	1252	5,8
Litdec8	18,0	8,0	70,0	94	4944	2,1
Litdec18	20,0	46,0	61,7	127,7	9729	1,8
Litdec19	26,0	26,0	28,0	80	1460	7,6
Litdec9	20,0	30,0	31,0	81	1861	5,9
Litdec10	20,0	8,0	120,0	147,7	14170	1,5
Litdec11	12,0	12,0	25,0	49	769	5,0
Litdec12	8,0	24,0	25,0	57	1201	4,1
Litdec13	8,0	16,0	22,5	46	762,3	4,3
Litdec14	4,0	25,0	26,0	55	1301	3,3

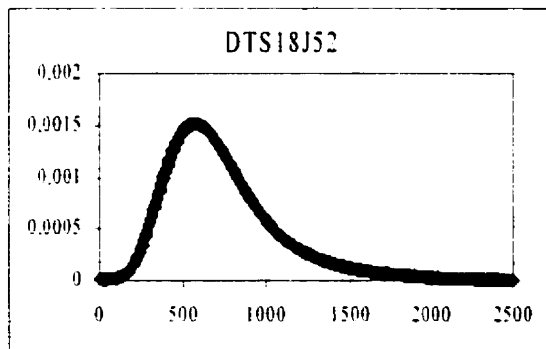
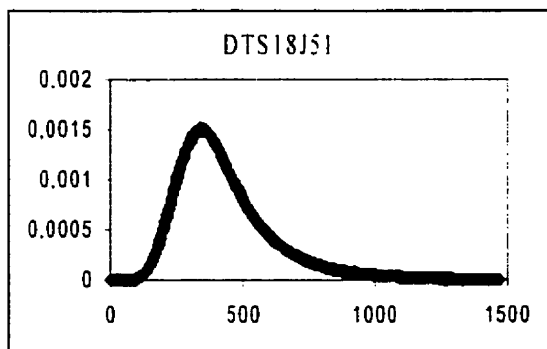
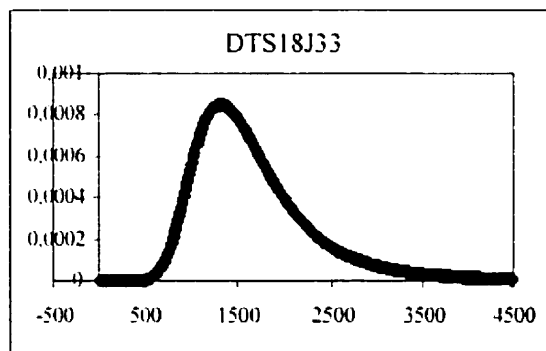
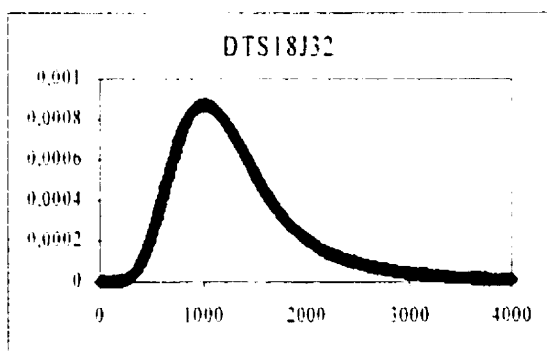
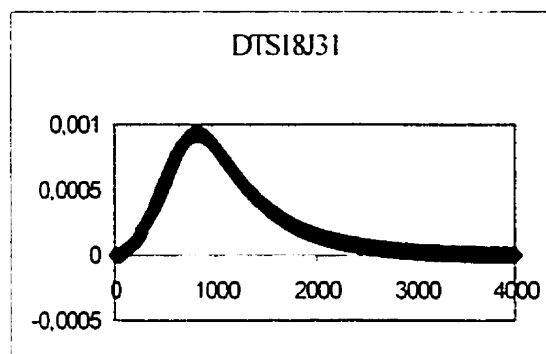
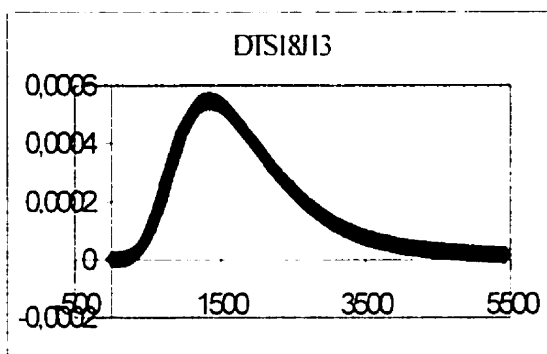
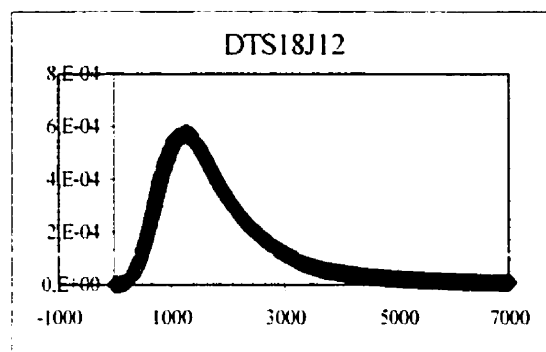
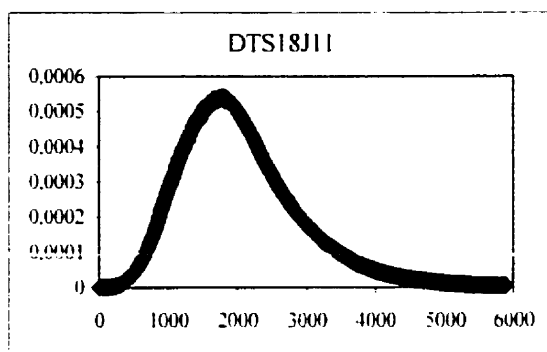
Fichier	α	τ_1	τ_2	τ_{11}	σ^2_{11}	Pe
Litdec15	8.0	20.0	23.0	51	929	4.3
Litdec16	10.0	18.0	20.0	48	724	5.1
Litdec17	8.0	10.5	28.0	46.5	893.2	3.5
Litdec22	20.0	10.0	20.0	50	500	8.9
Litdec25	10.0	18.0	20.0	48	724	5.1
Litdec27	10.0	12.0	14.0	36	340	6.4
Litdec28	10.0	11.0	13.0	34	290	6.8
Litdec29	18.0	16.0	17.0	51	545	8.4
Litdec30	24.0	19.0	20.0	63	761	9.3
Litdec31	12.0	18.9	18.9	49.7	1711	1.2
LitDec32	14.0	12.0	16.0	42	400	7.7
LitDec33	14.0	11.0	12.0	37	265	9.2
Litdec34	20.0	22.0	24.0	66	1060	7.1
Litdec36	16.0	10.9	10.9	37.8	236.53	11.0
Litdec37	20.0	22.0	32.0	73.8	1468	6.2
Litdec38	32.0	25.0	26.0	83	1301	9.5
Litdec39	40.0	25.0	65.0	130	4849	5.8
Litdec40	32.0	18.0	22.0	72	808	11.7
LabDec2	20.0	16.7	200.3	237	40390	1.1
LabDec3	20.0	28.4	298.8	347.2	90070	0.9
LabDec4	20.0	10.0	200.0	220.6	32360	1.4
LabDec5	20.0	122.1	132.1	274.2	32360	3.3
LabDec6	150.0	160.0	300.0	610	115600	5.2
Lit de racines avec garnissages						
20Dec3	6.0	12.0	20.0	38	544	4.0
20Dec4	8.0	10.3	31.1	49.5	1076	3.2
20Dec5	8.0	10.0	25.0	43	725	3.8
20Dec7	4.0	5.3	26.0	35.3	703.668	2.0
20Dec8	18.0	8.0	40.0	66	493	16.6
20Dec9	20.0	59.6	68.3	147.9	8217	4.0
20Dec10	20.0	13.0	102.6	135.6	10700	1.9
20Dec11	24.0	44.2	54.5	122.7	5690	4.0
Pac8Dec1	4.0	15.9	15.9	35.8	504.66	3.8
Pac8Dec3	2.0	9.0	9.0	20	163.26	3.6
Pac18De1	16.0	5.0	70.0	37	4924	-3.0
Pac18De2	20.0	10.3	82.0	112.3	6823	2.2
Pac23De1	20.0	55.0	65.3	140.3	7288	4.1
Pac23De2	30.0	24.0	36.6	90.6	1916	7.4
Pac24De1	16.0	10.7	44.0	70.7	2046	3.5
Pac24De2	8.0	10.0	13.0	31	269	5.9
Pac24De3	4.0	14.0	15.0	33.0	421.0	3.9

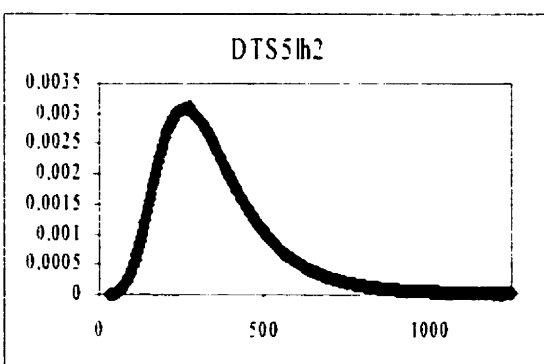
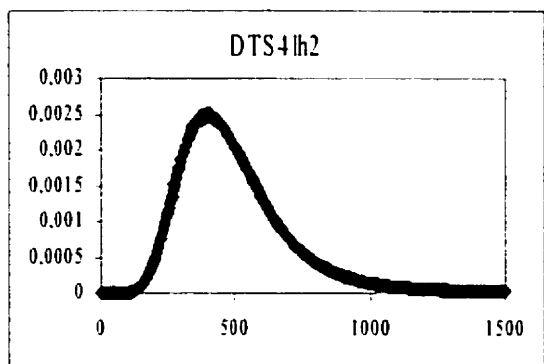
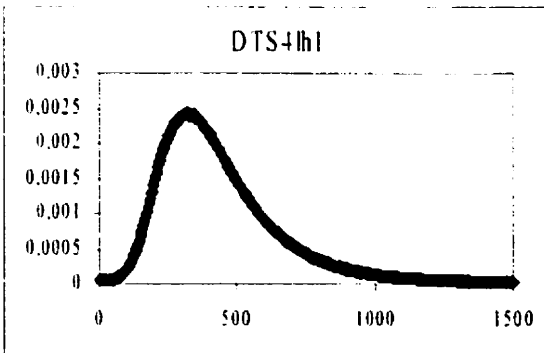
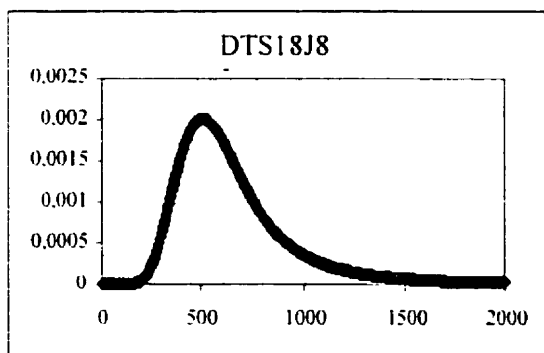
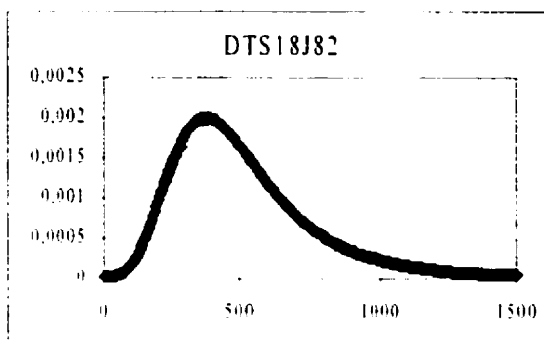
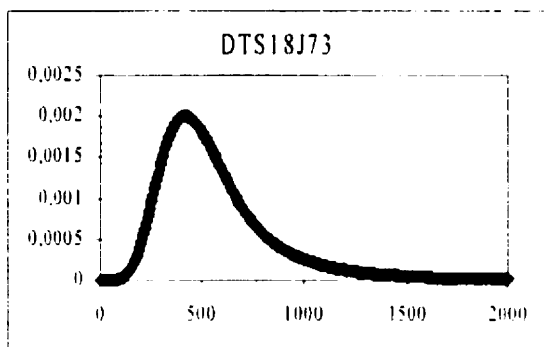
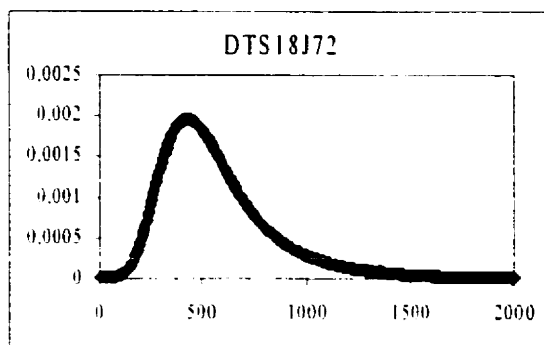
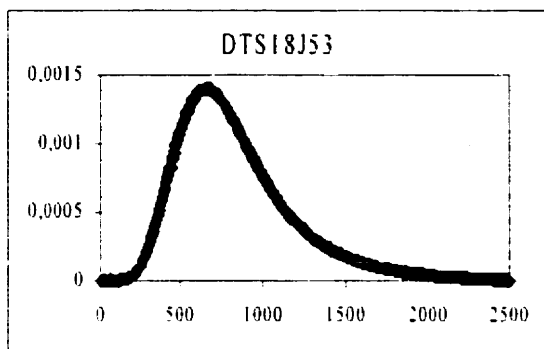
ANNEXES E – COURBES DE DTS : $E(t)$ EN FONCTION DU TEMPS

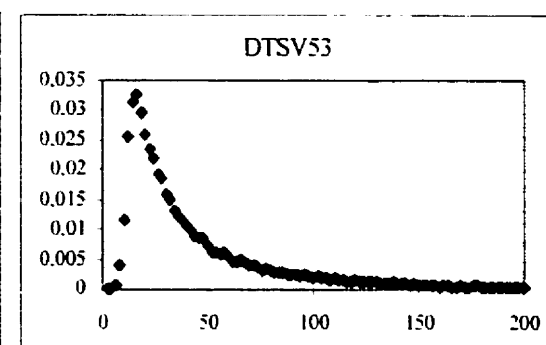
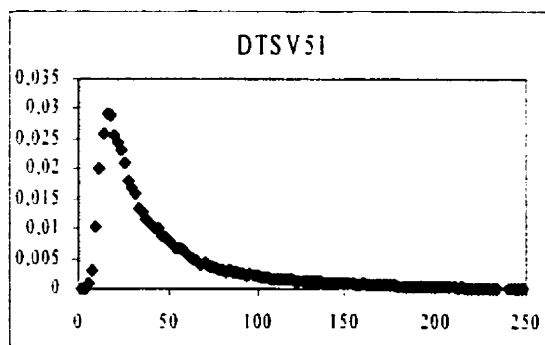
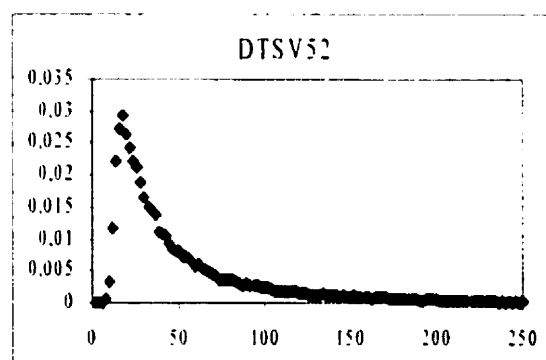
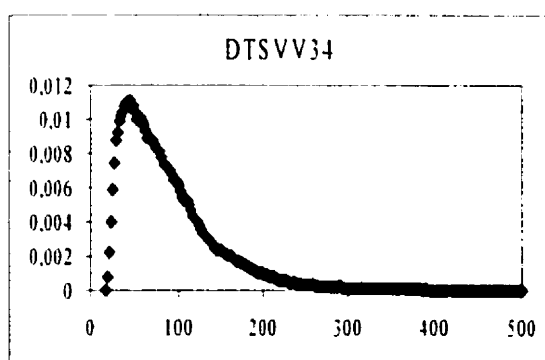
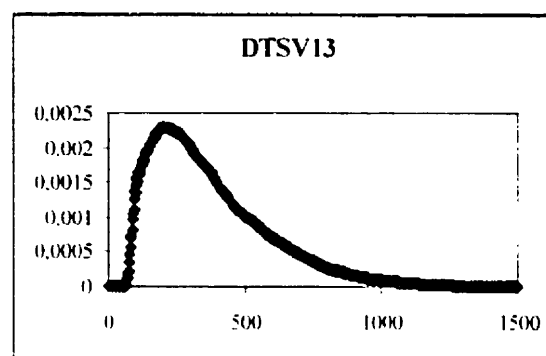
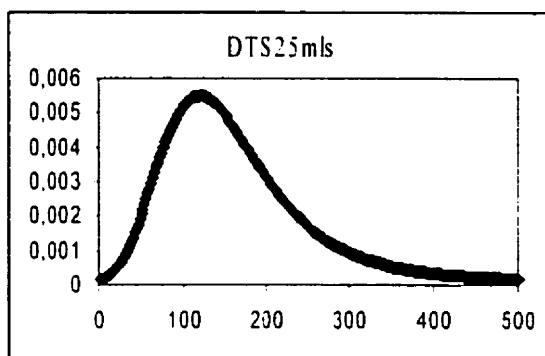
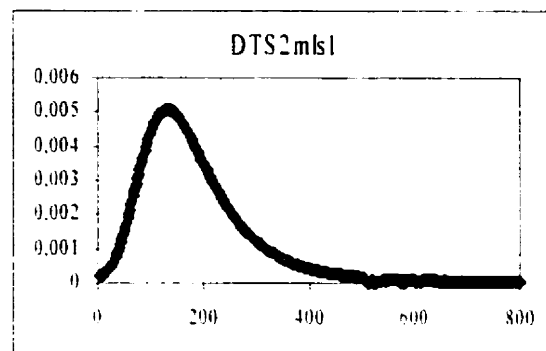
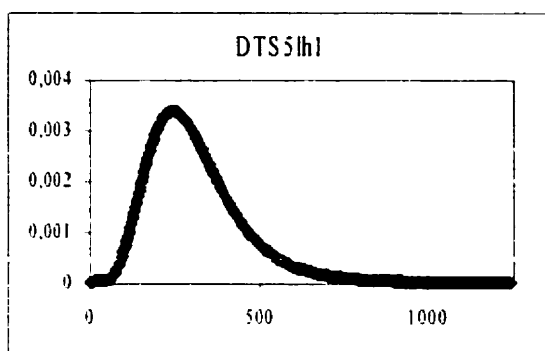


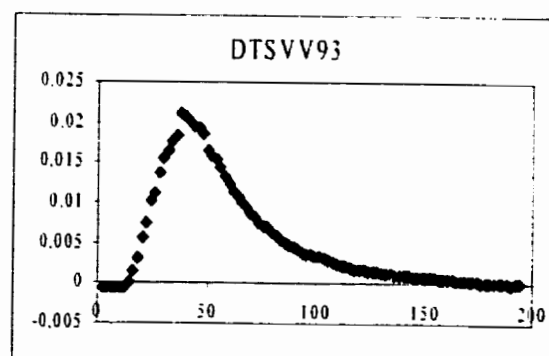
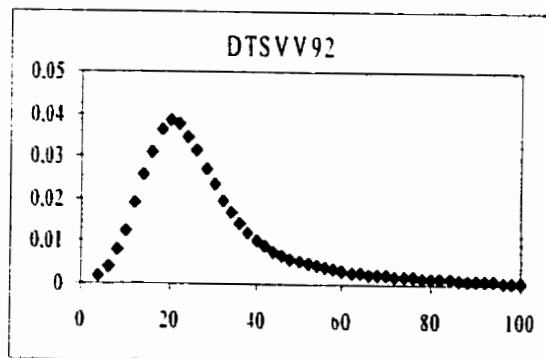
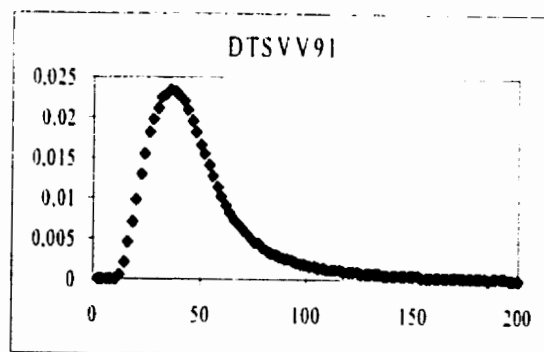
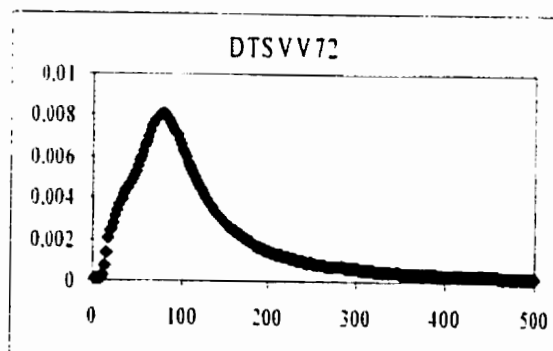
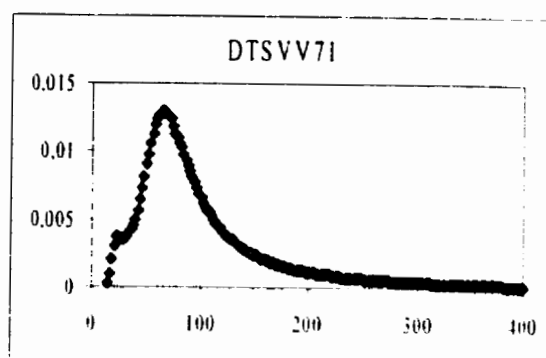
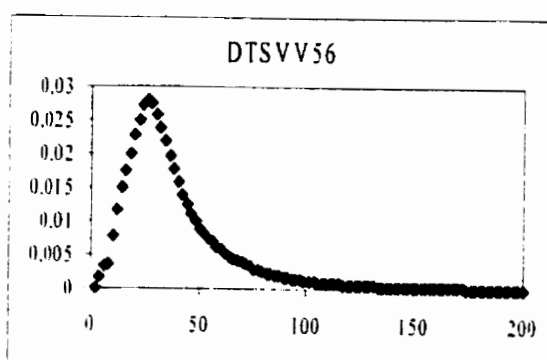
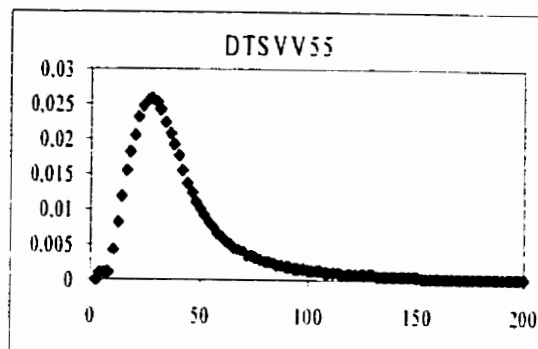
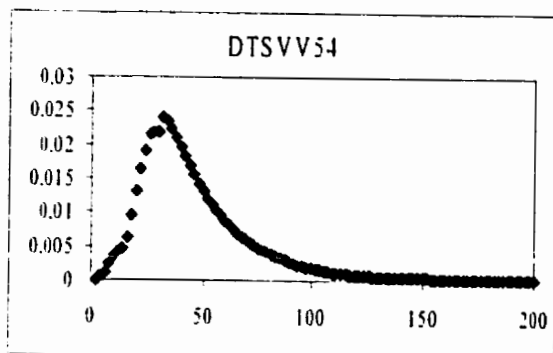


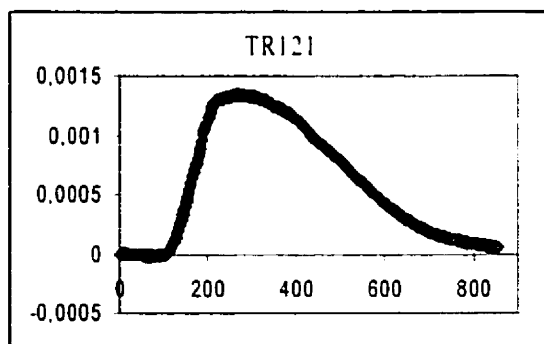
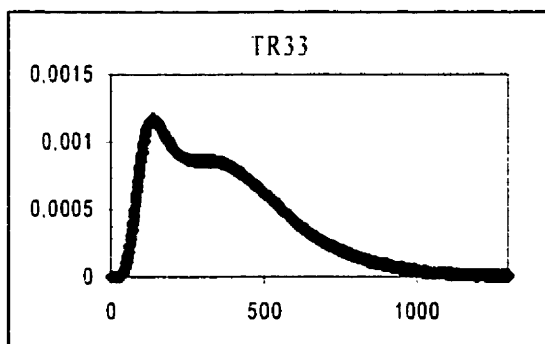
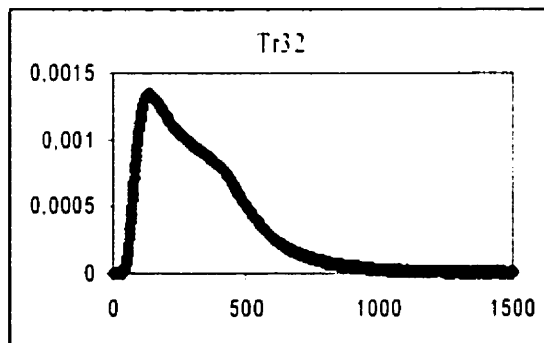
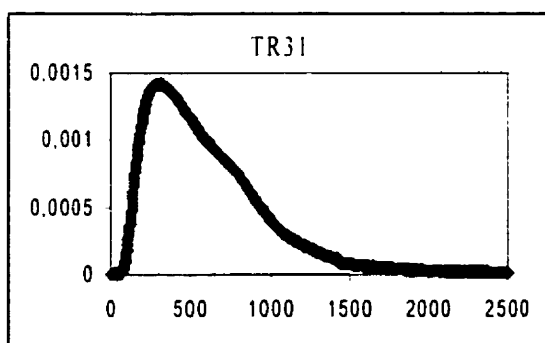
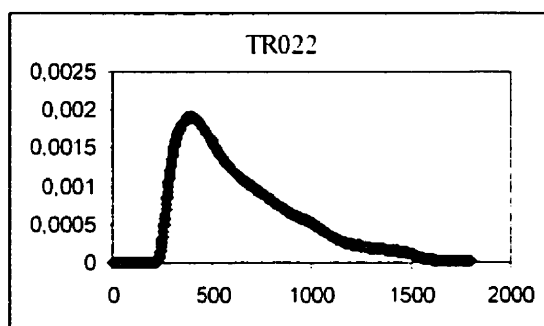
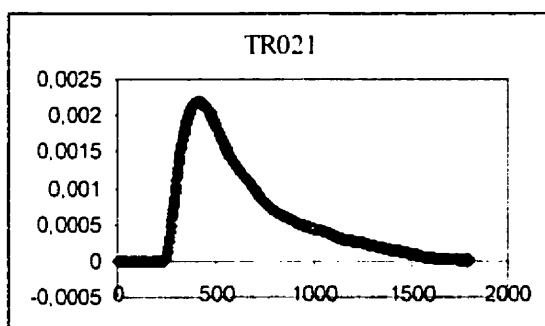
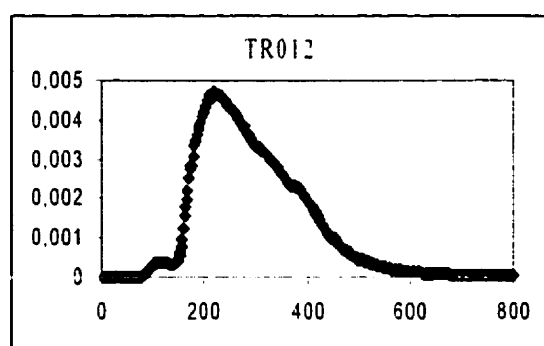
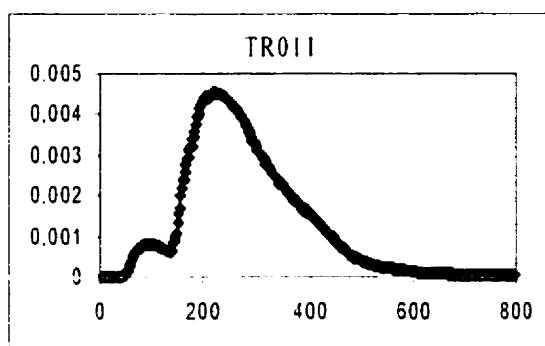


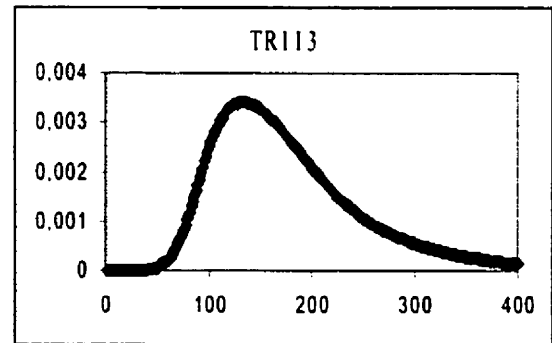
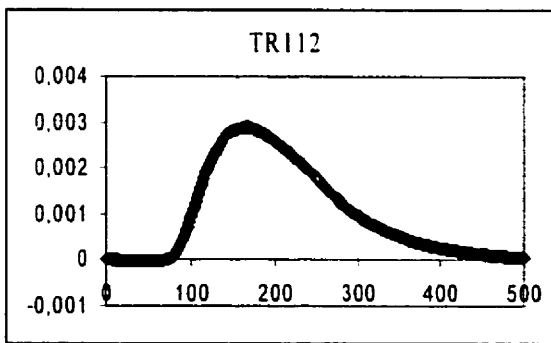
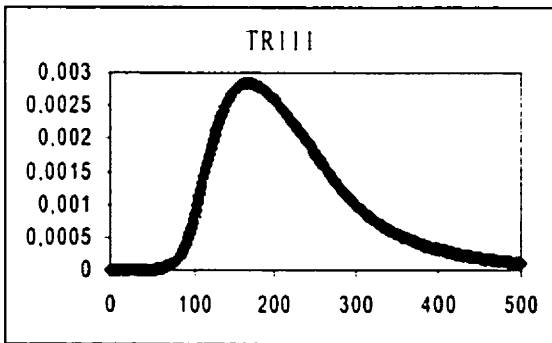
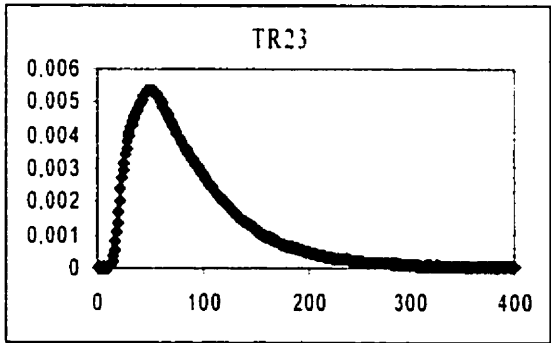
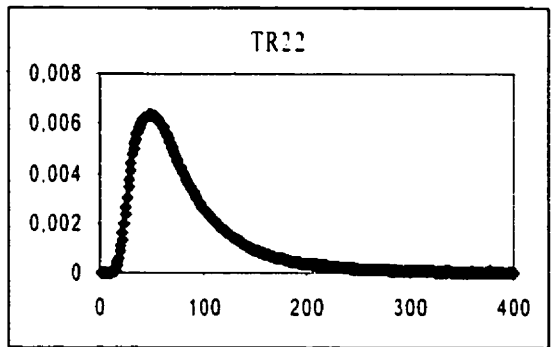
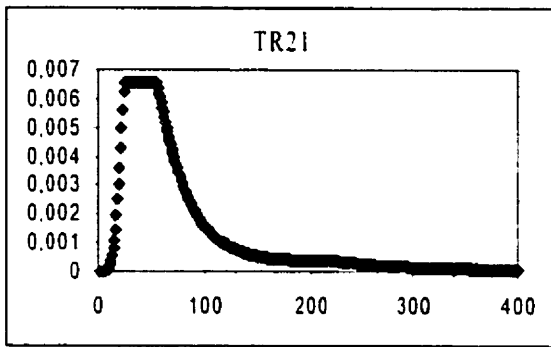
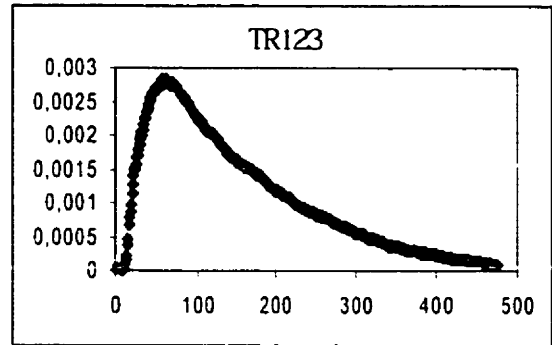
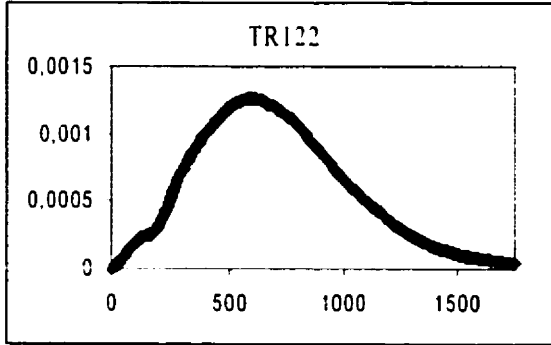


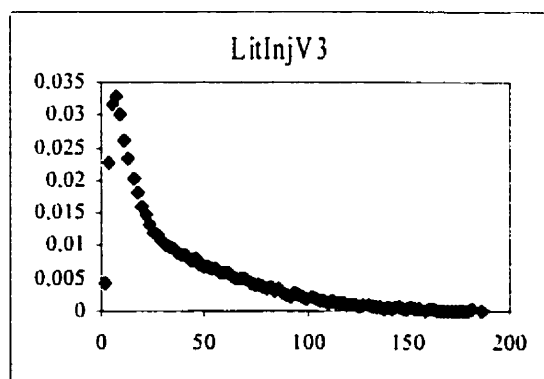
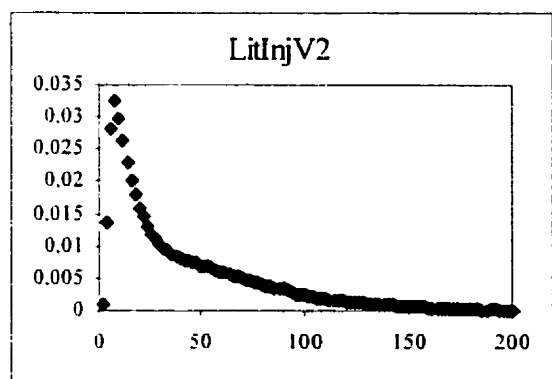
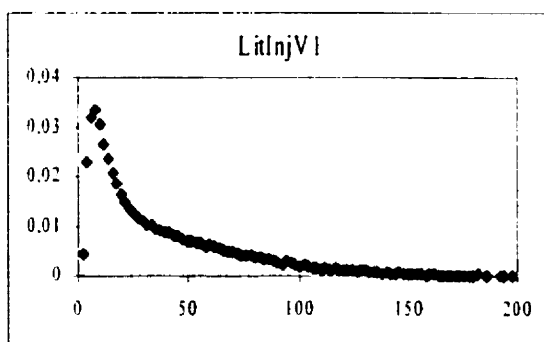
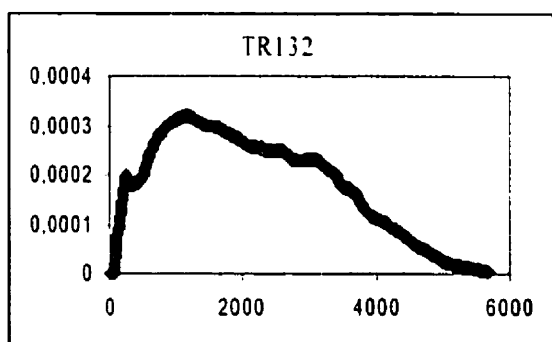
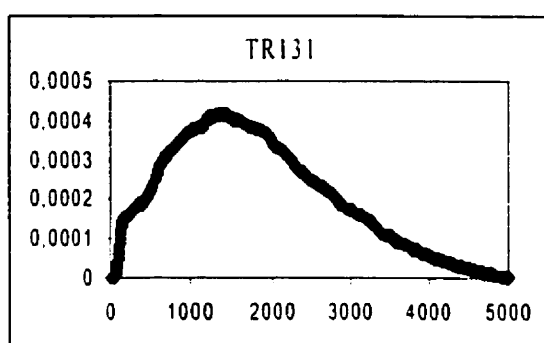
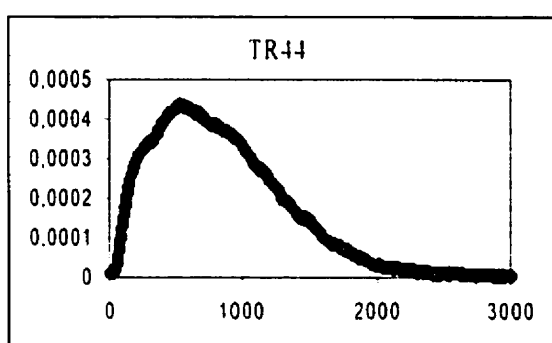
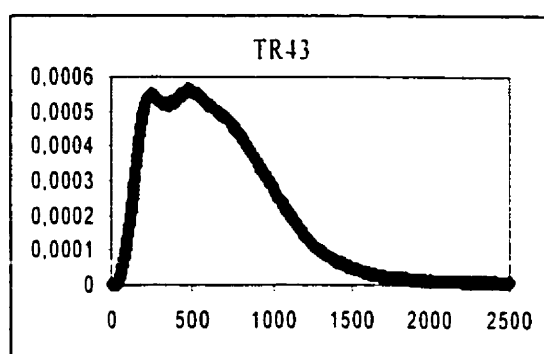
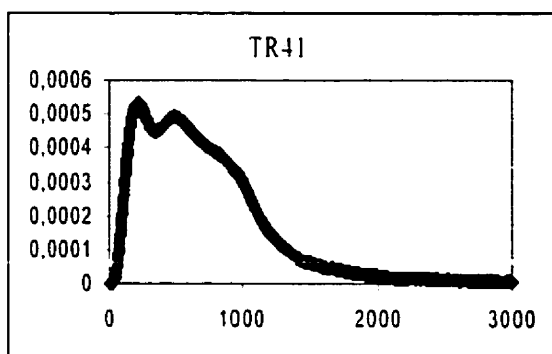


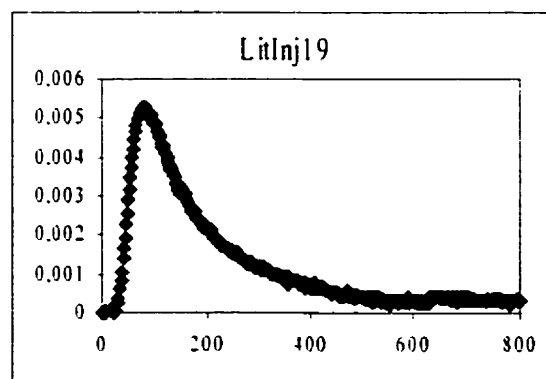
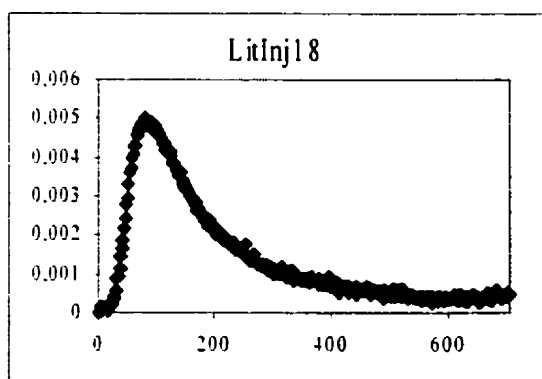
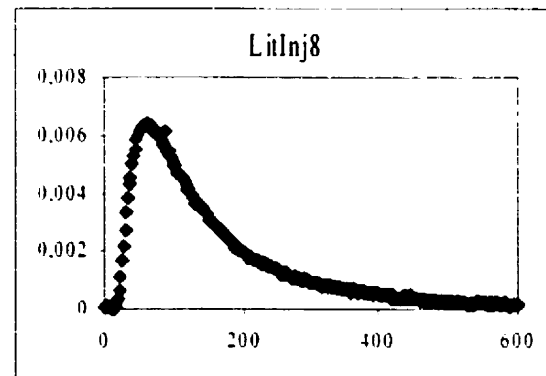
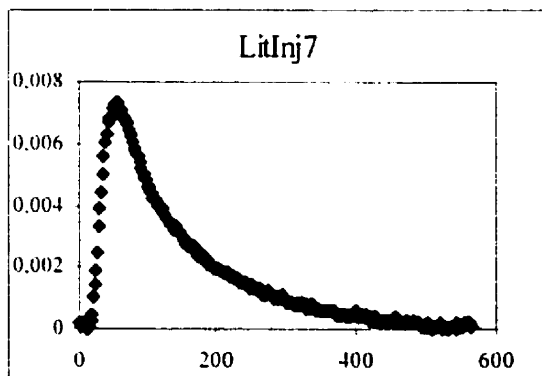
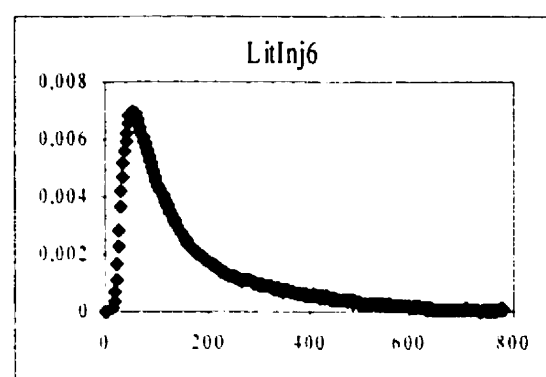
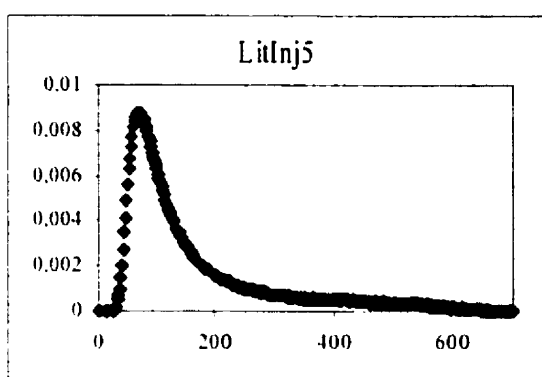
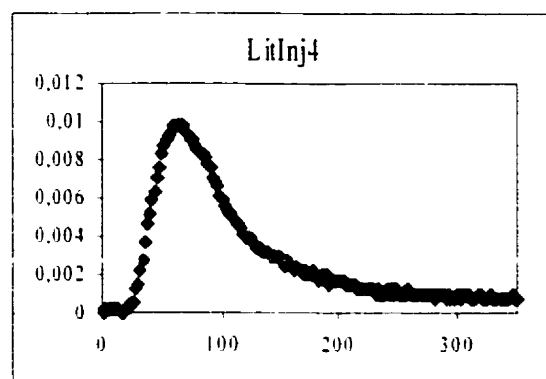
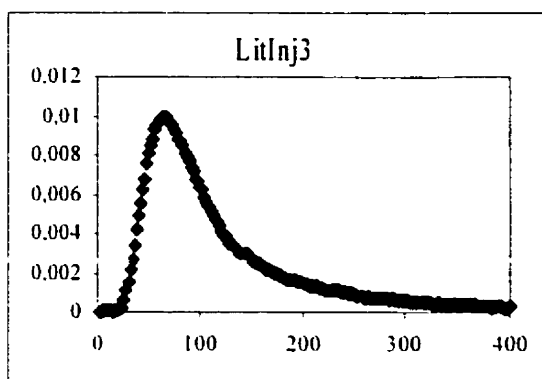


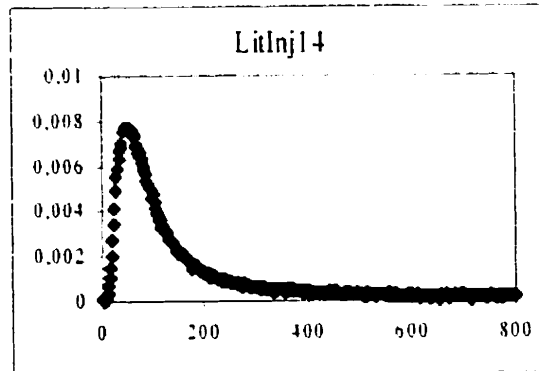
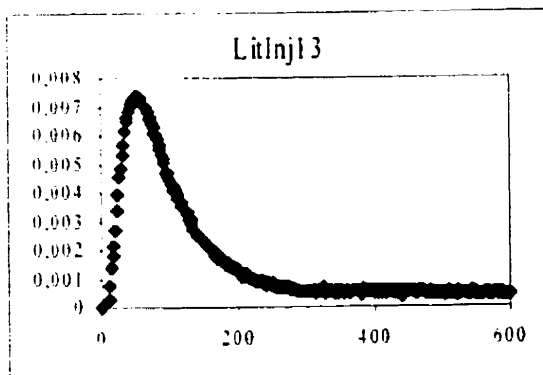
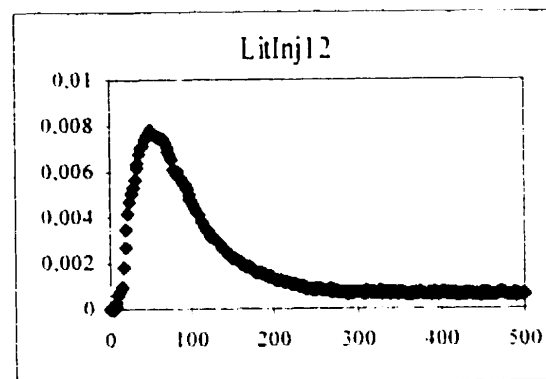
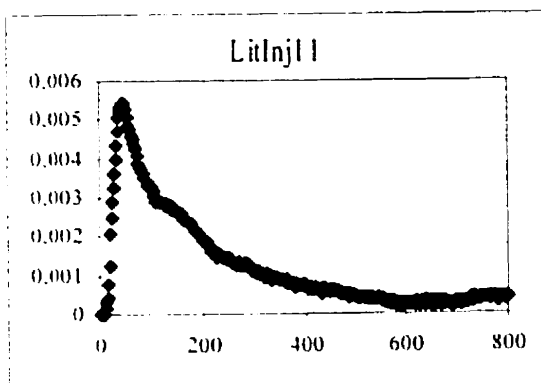
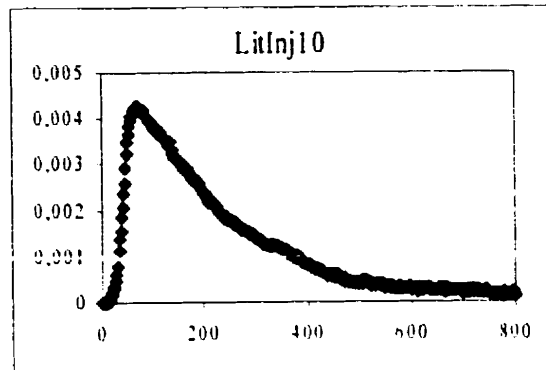
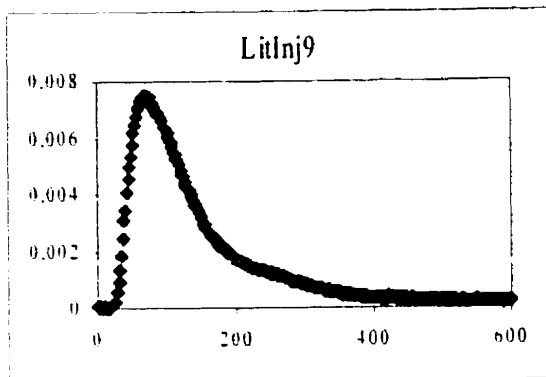


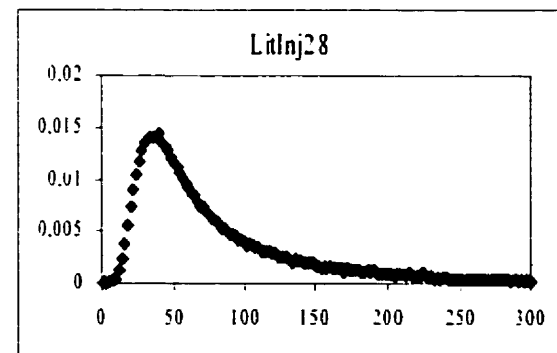
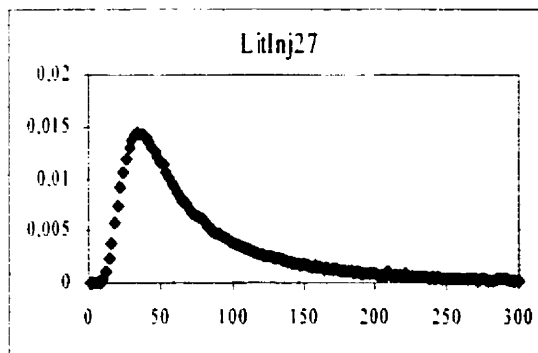
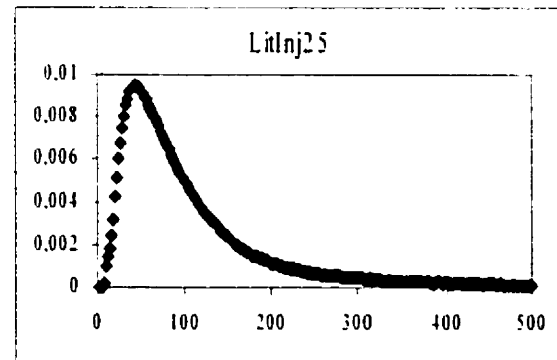
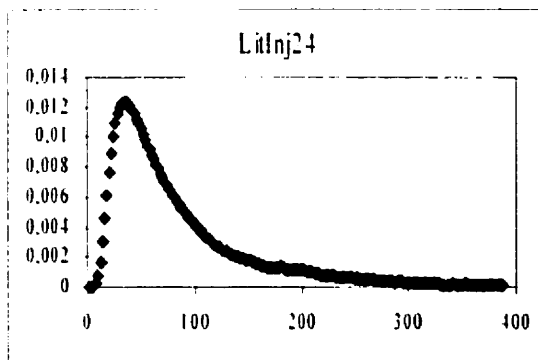
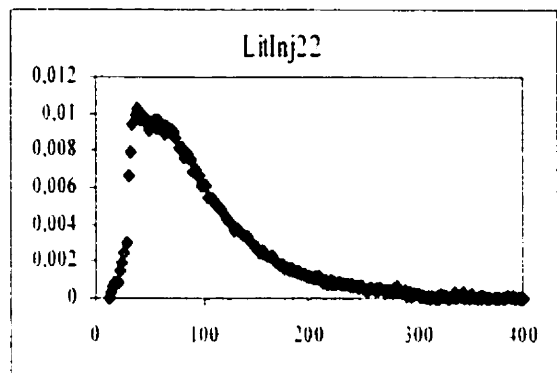
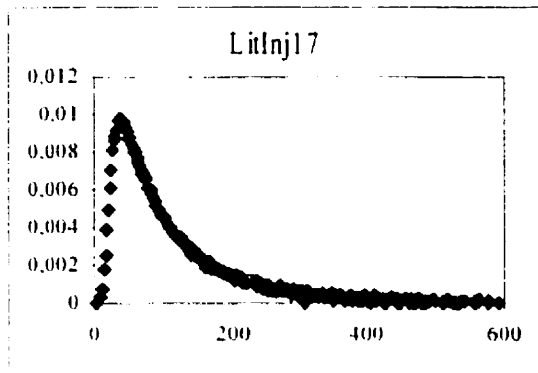
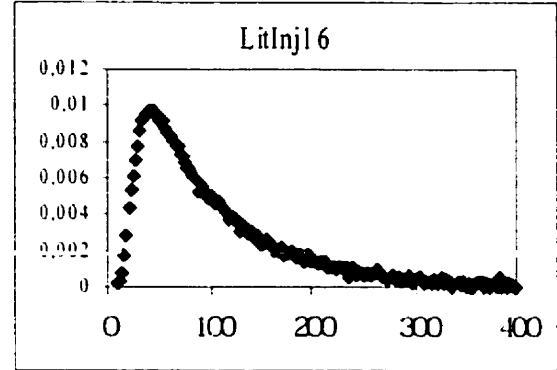
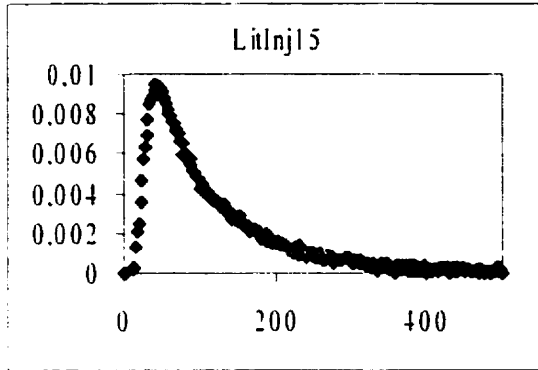


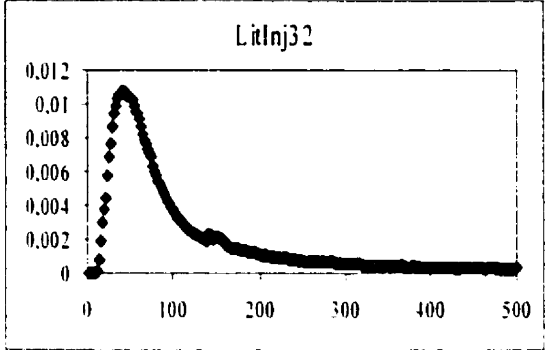
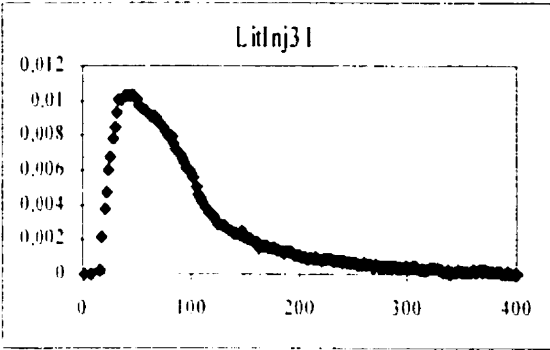
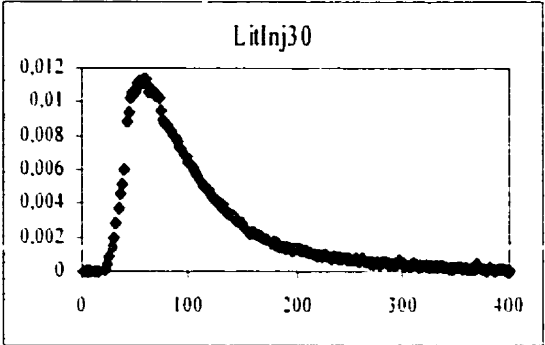
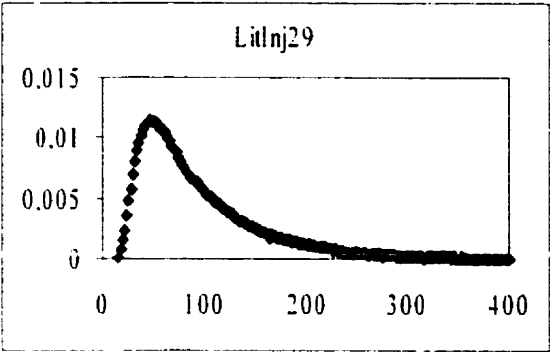


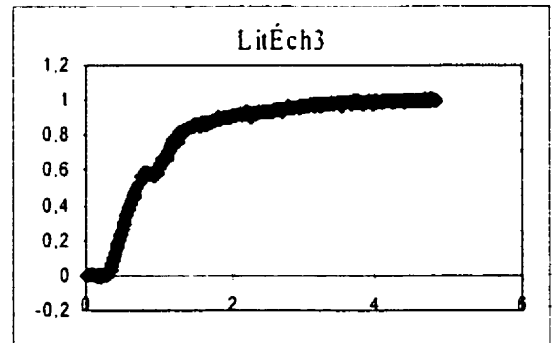
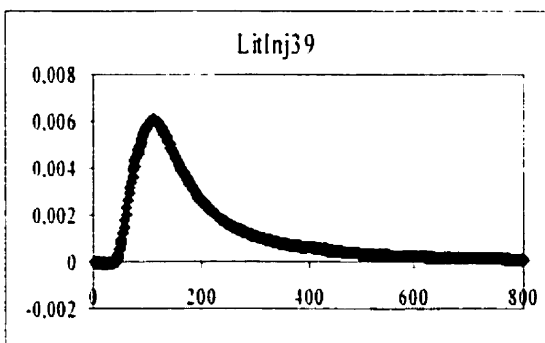
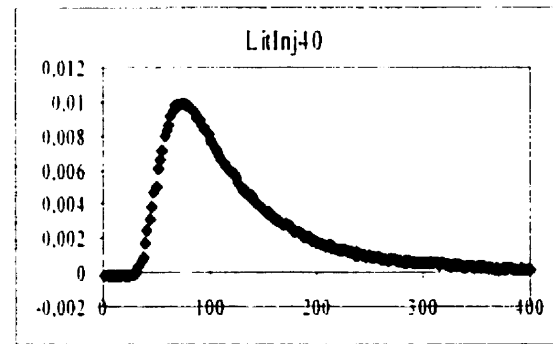
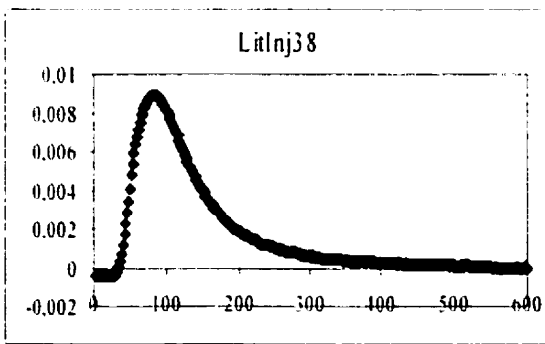
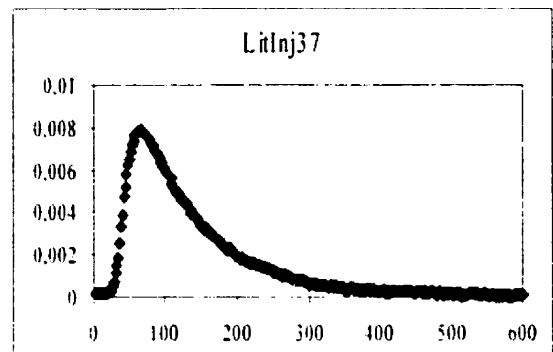
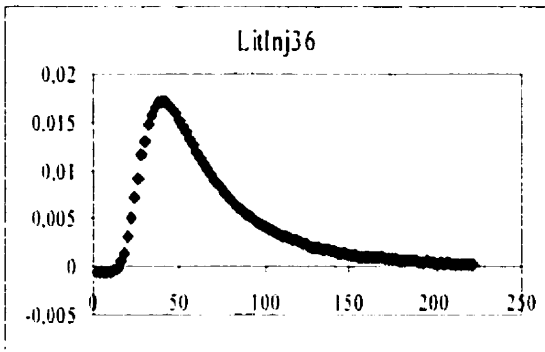
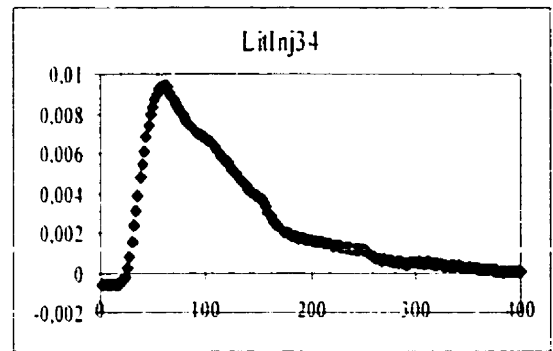
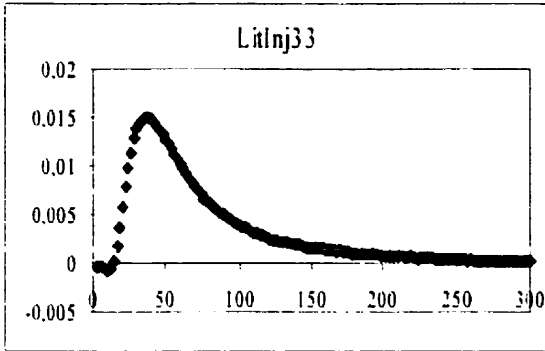


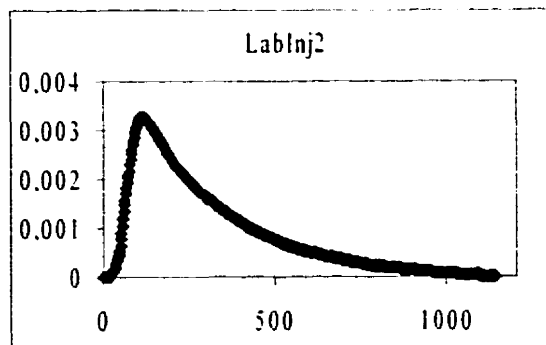
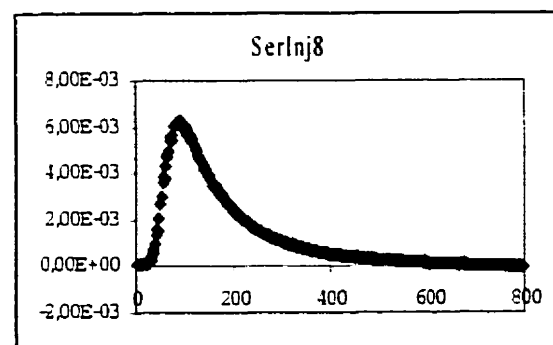
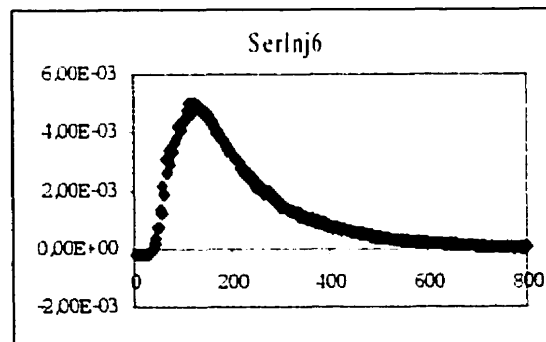
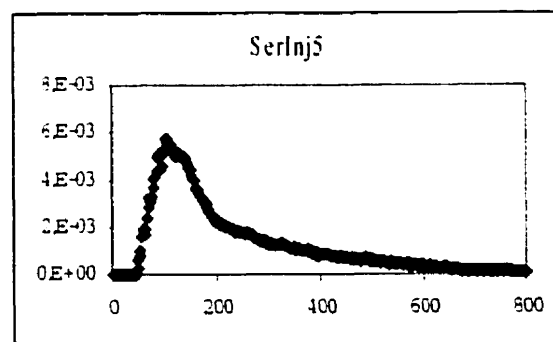
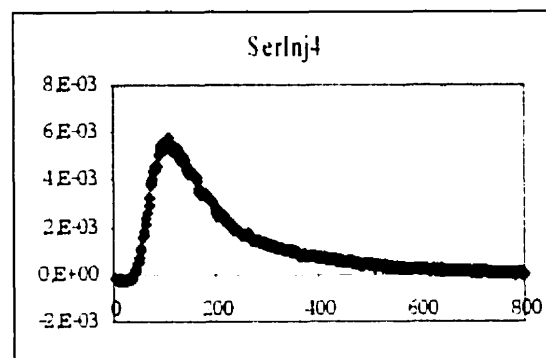
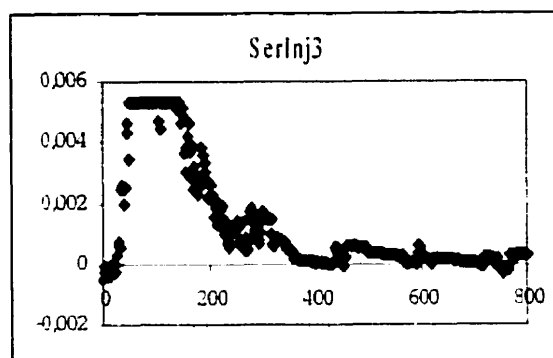
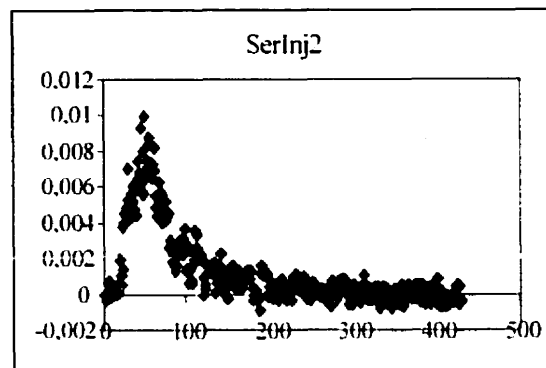
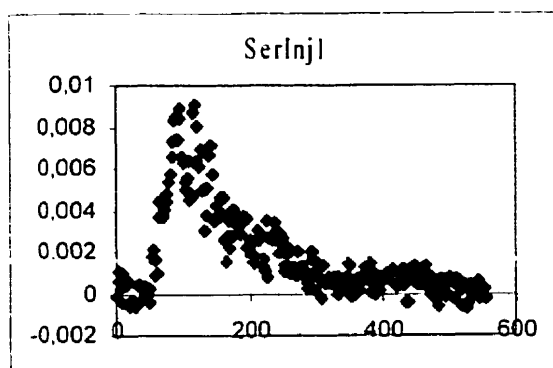


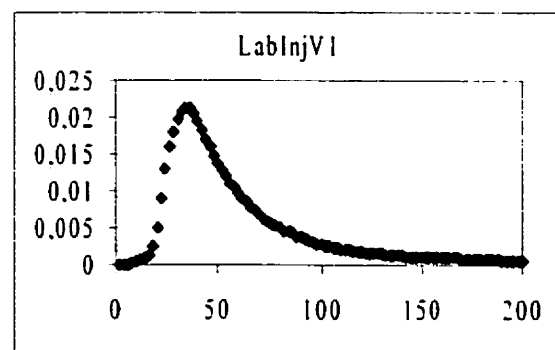
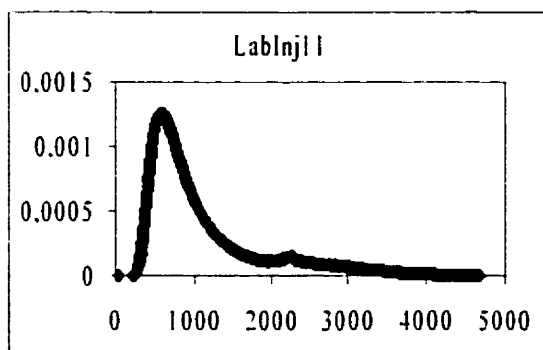
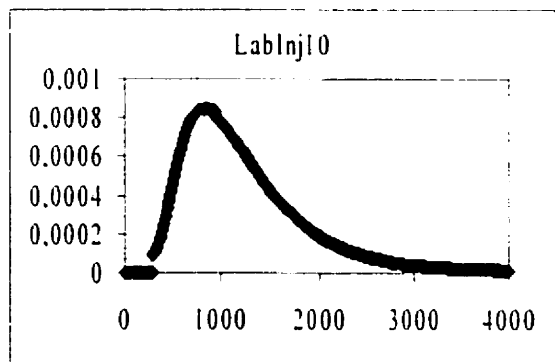
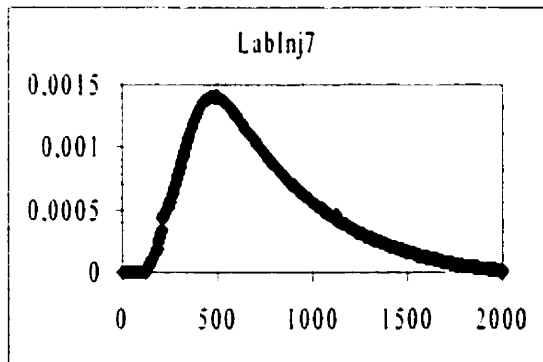
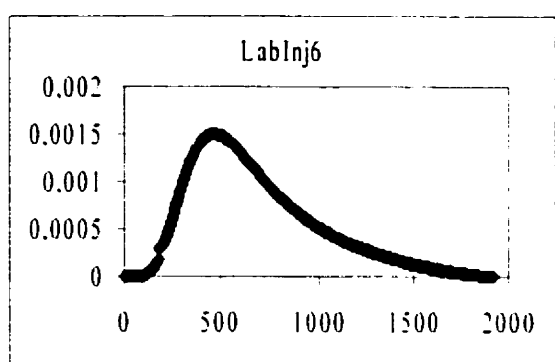
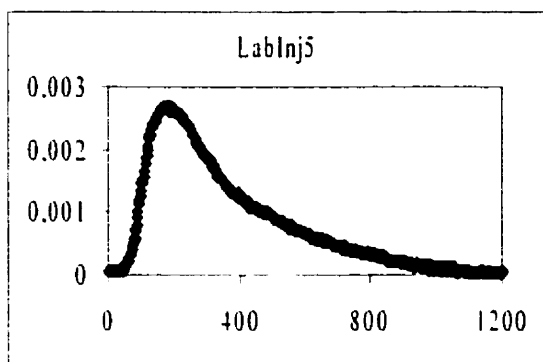
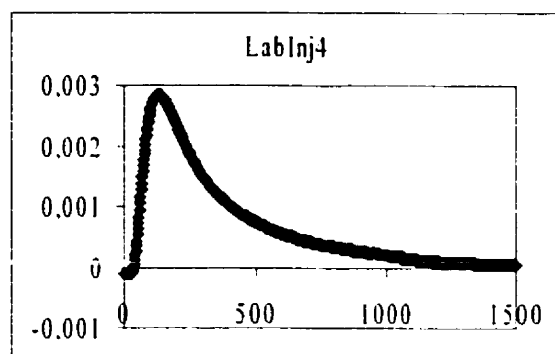
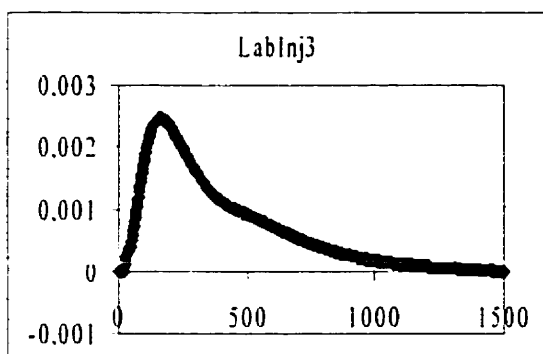


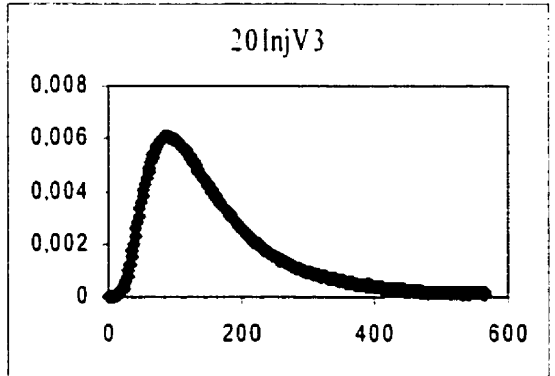
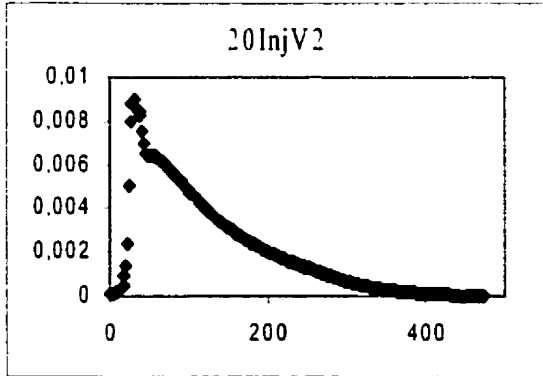
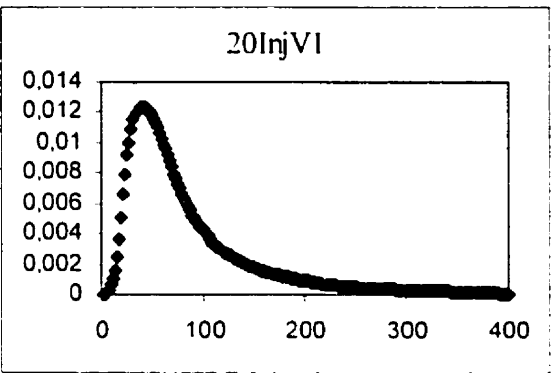
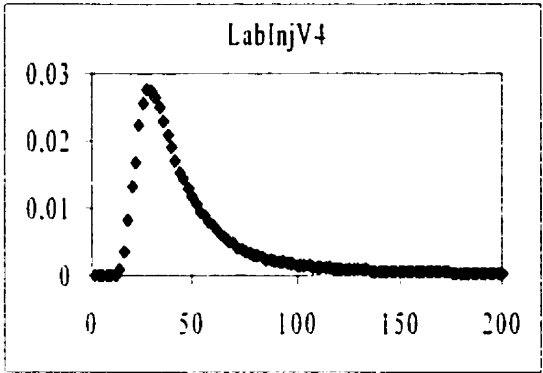
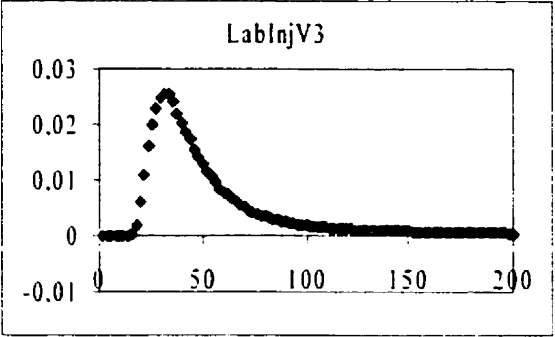
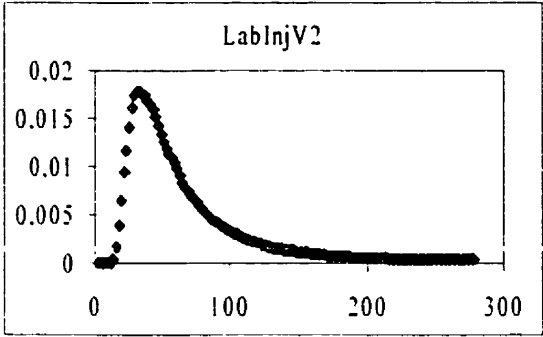


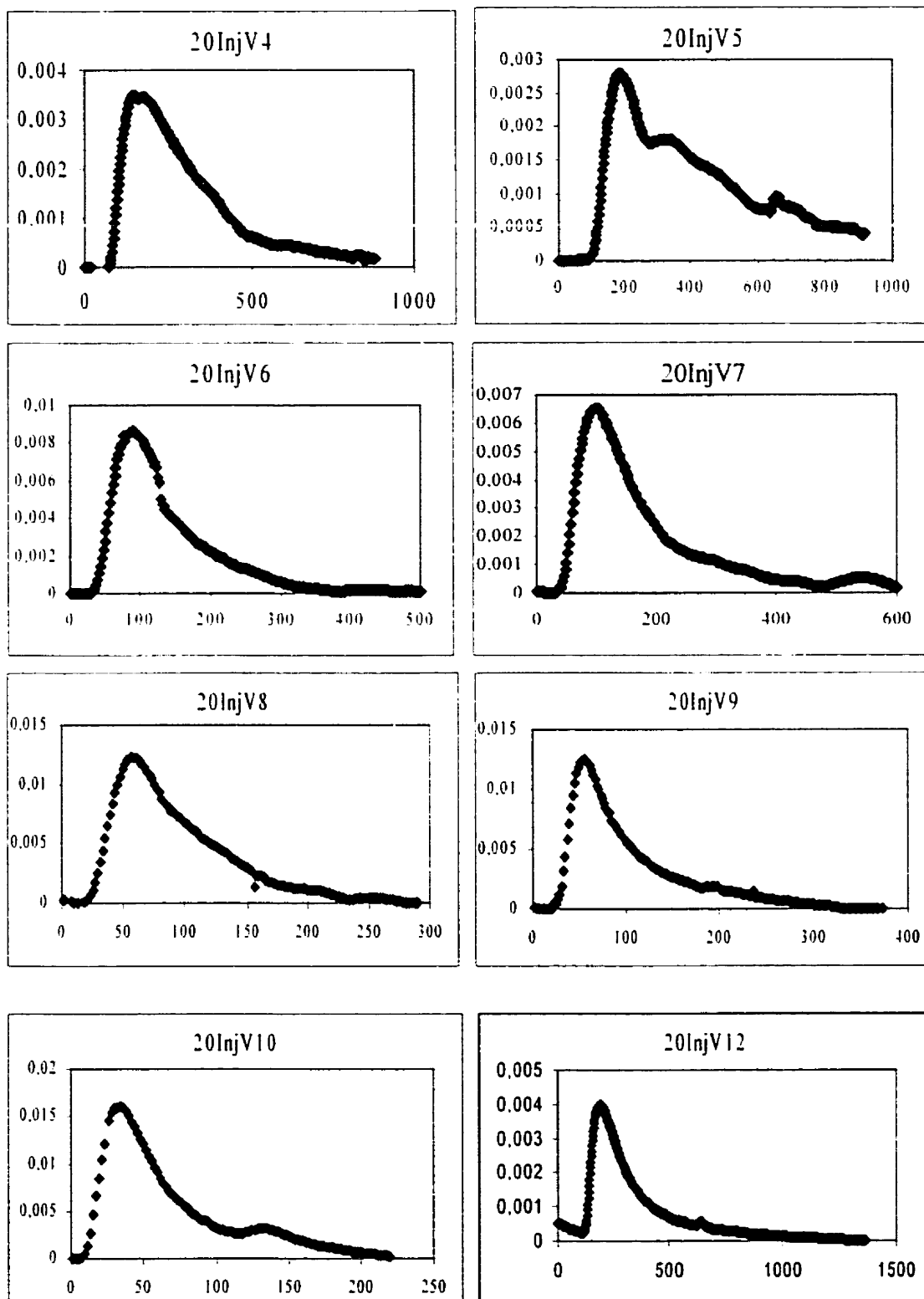


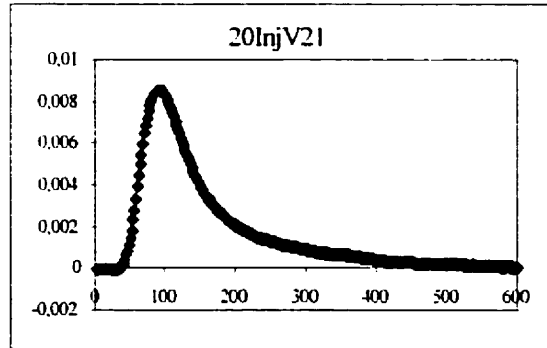
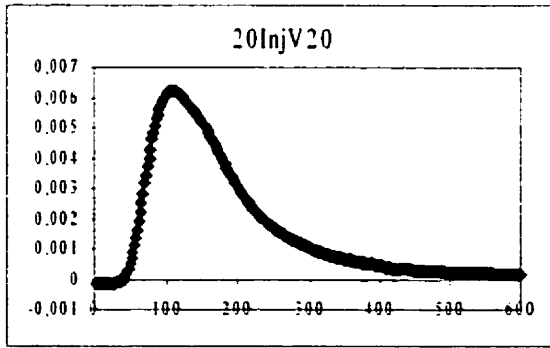
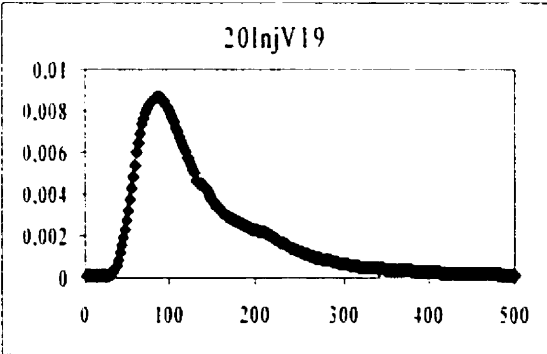
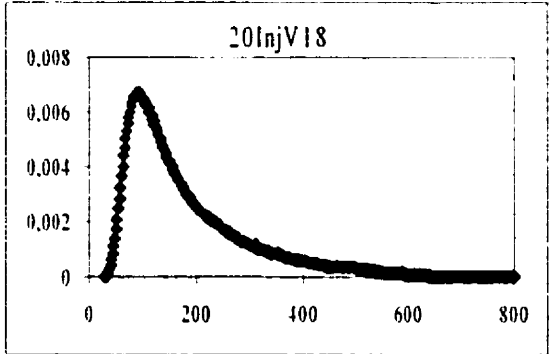
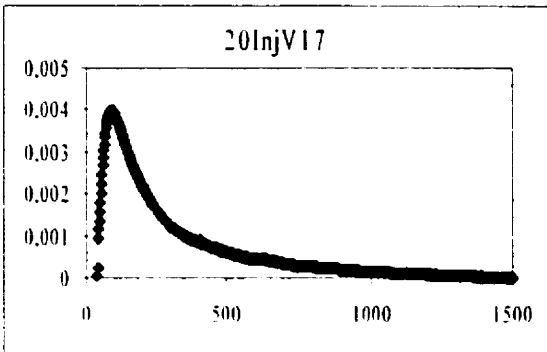
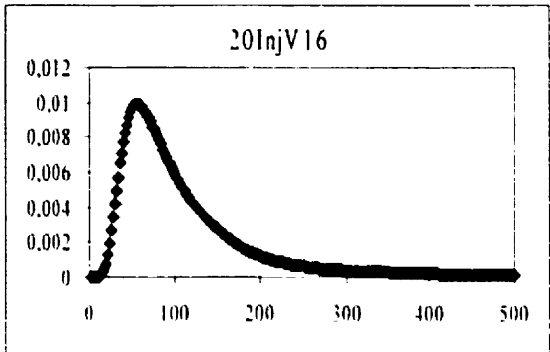
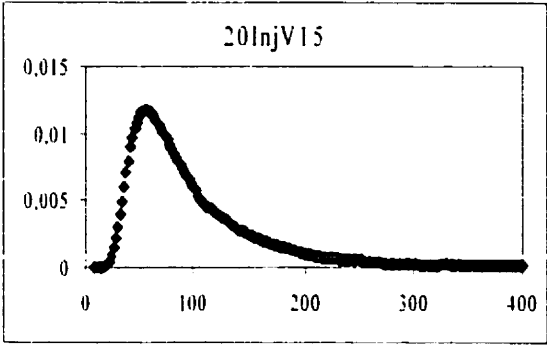
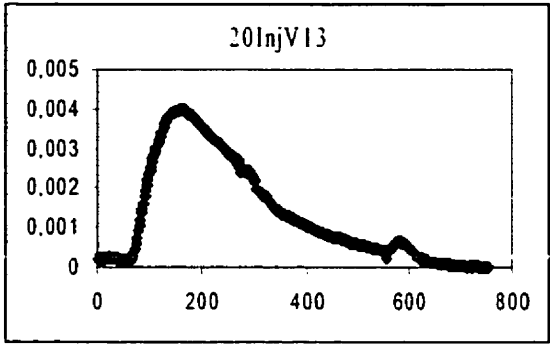


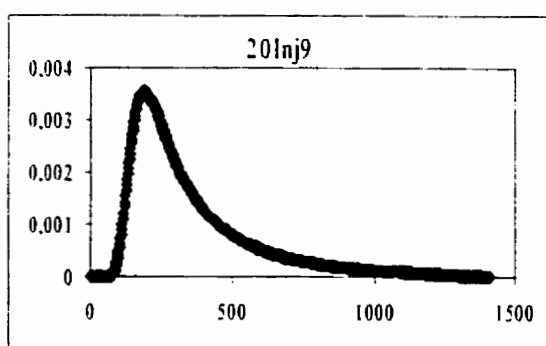
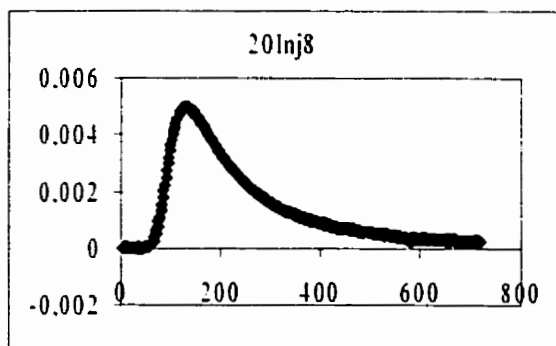
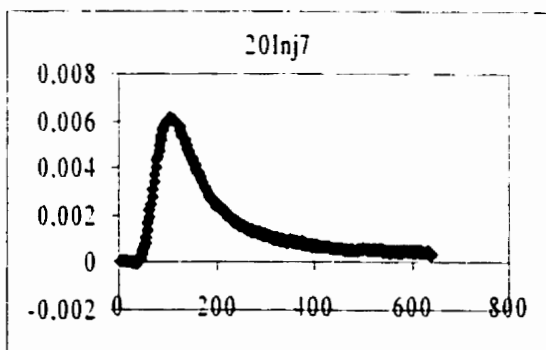
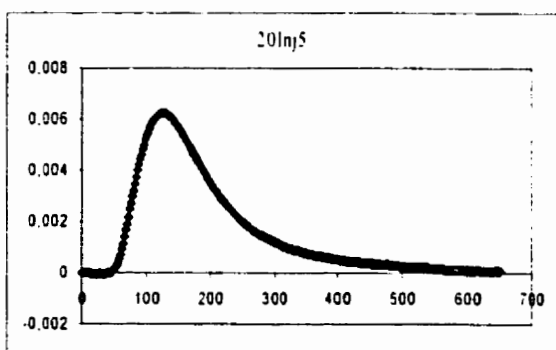
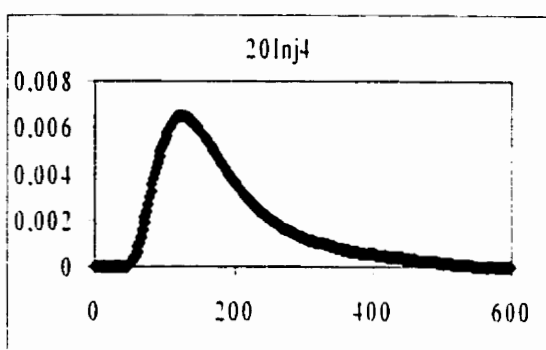
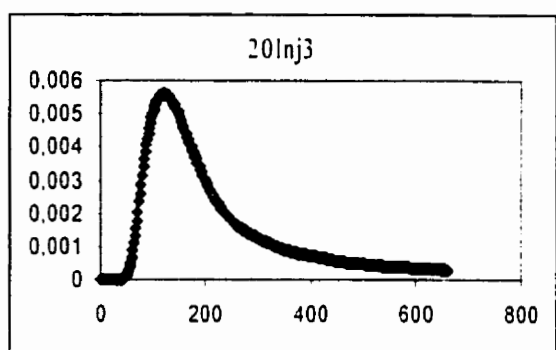
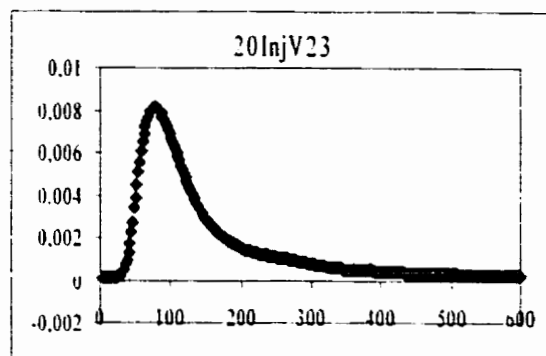
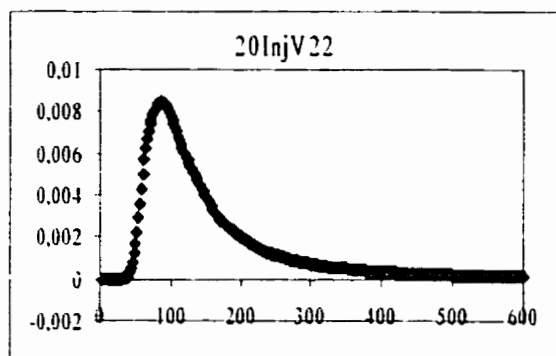


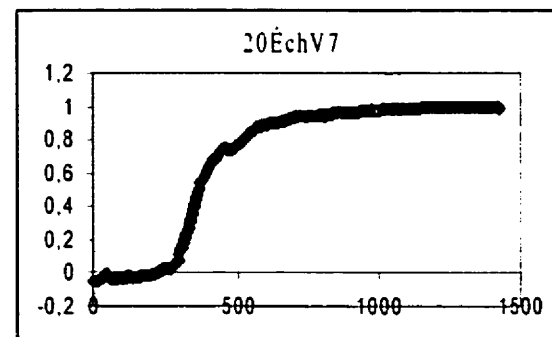
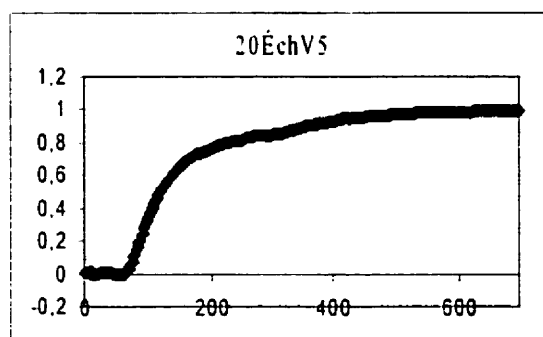
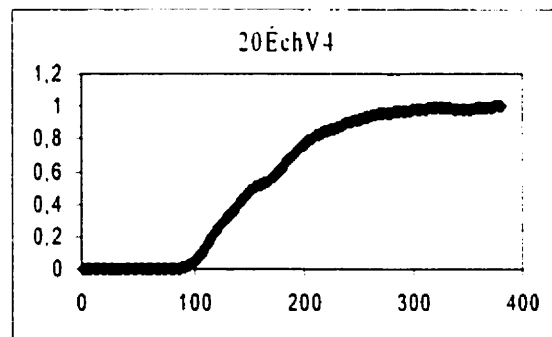
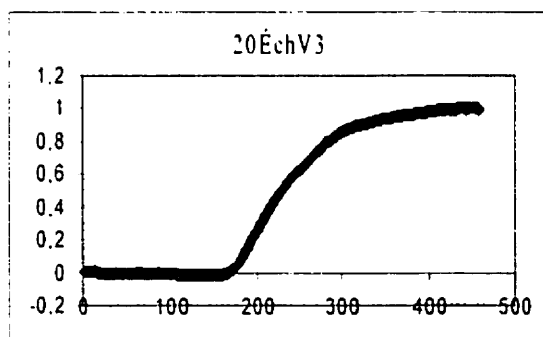
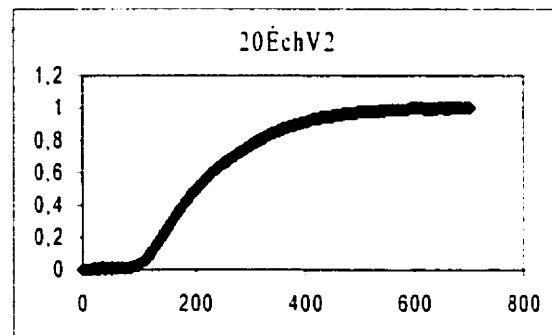
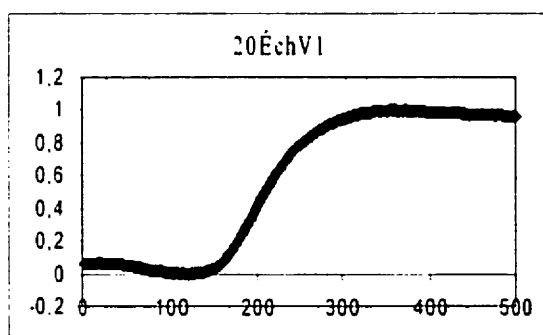
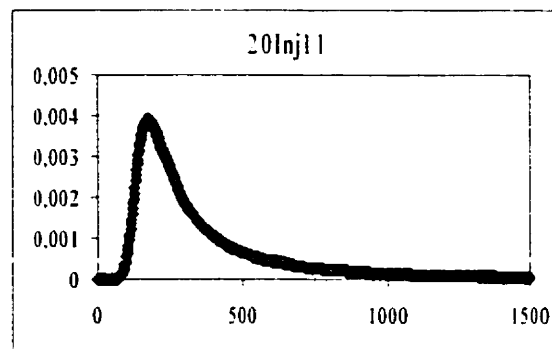
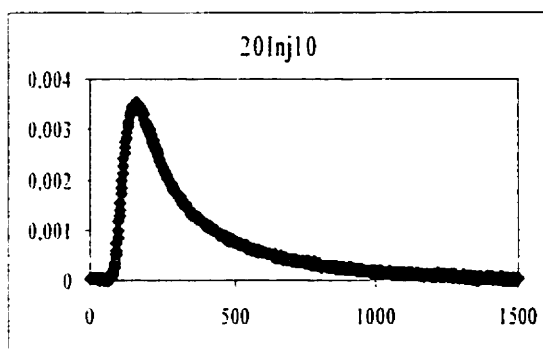


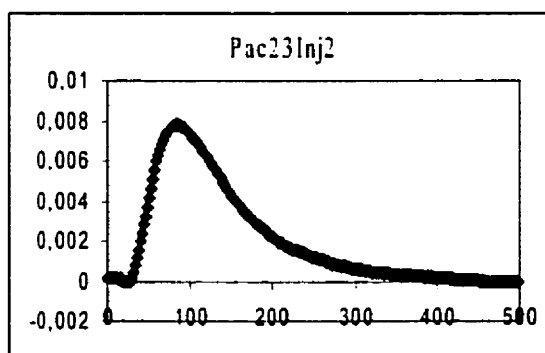
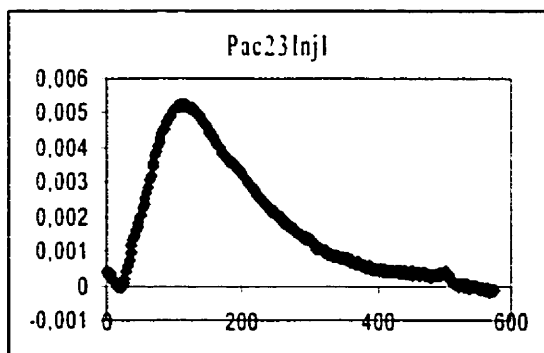
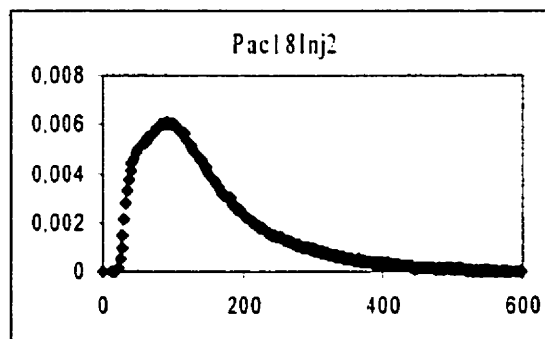
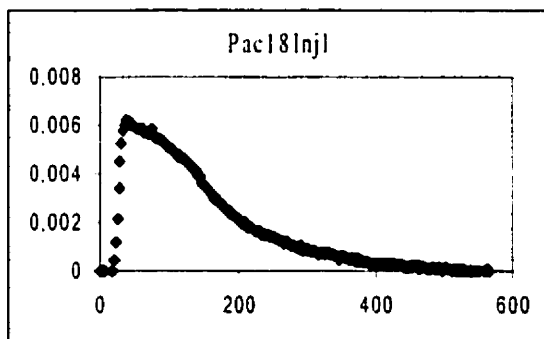
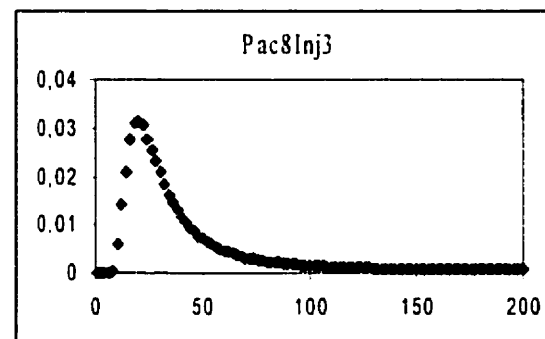
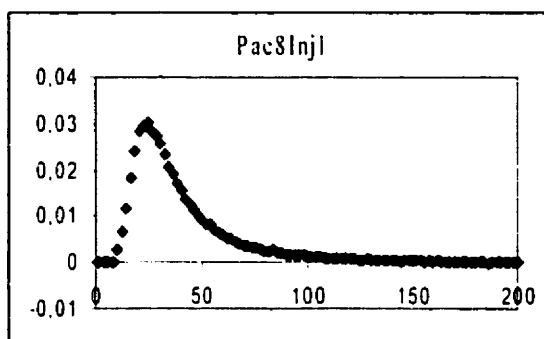
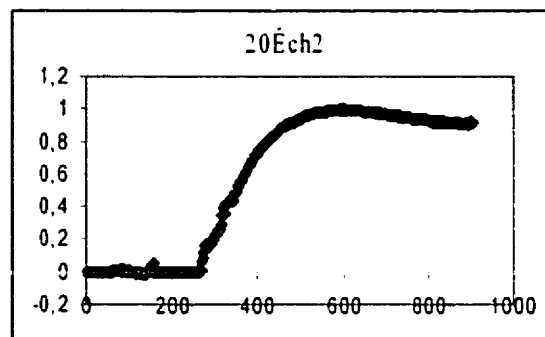
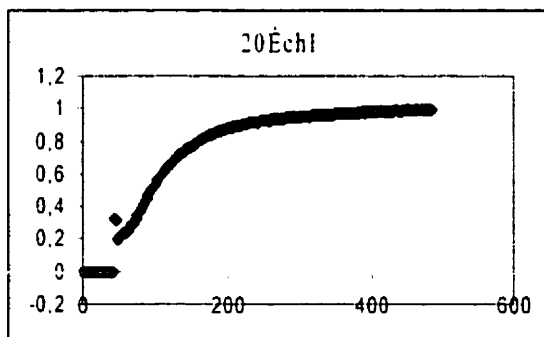


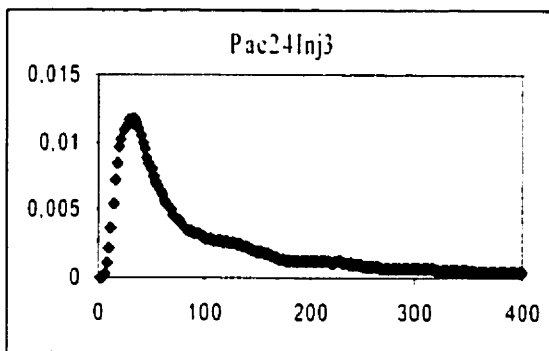
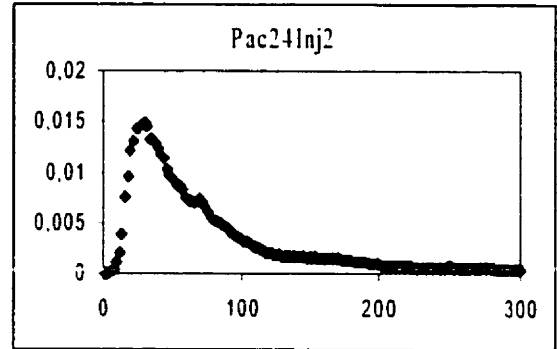
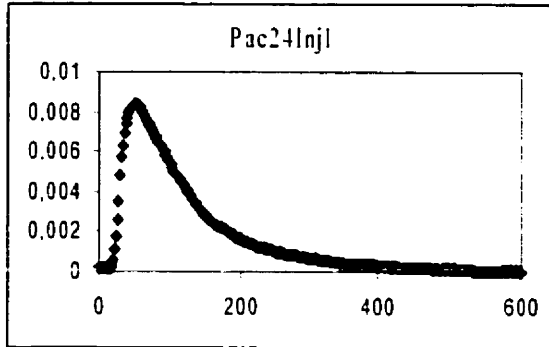




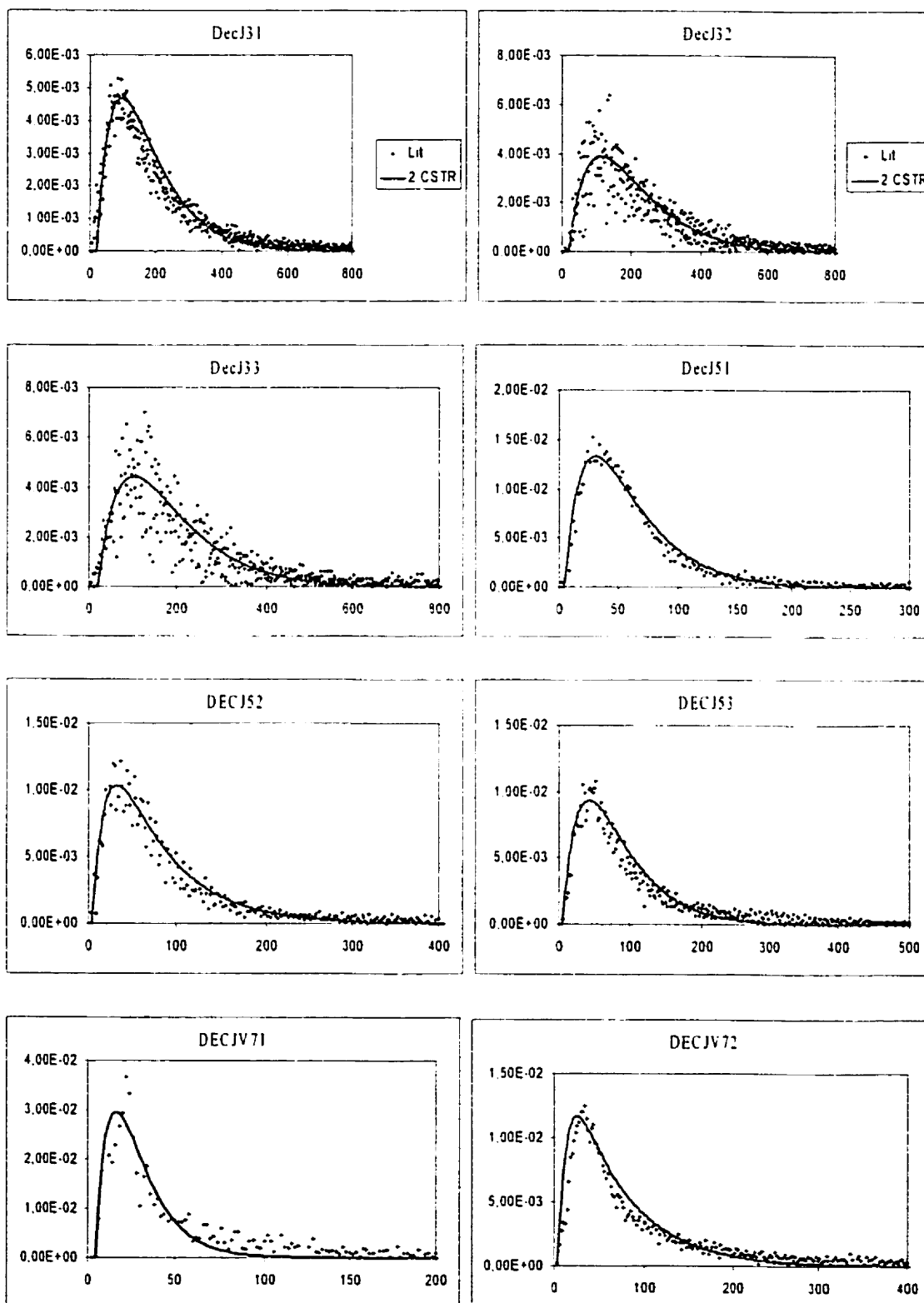


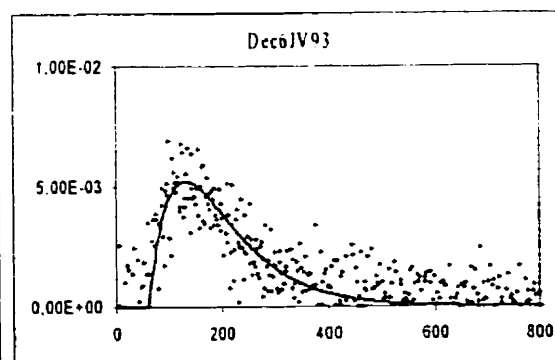
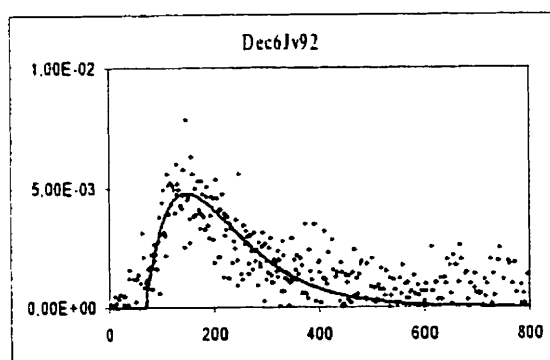
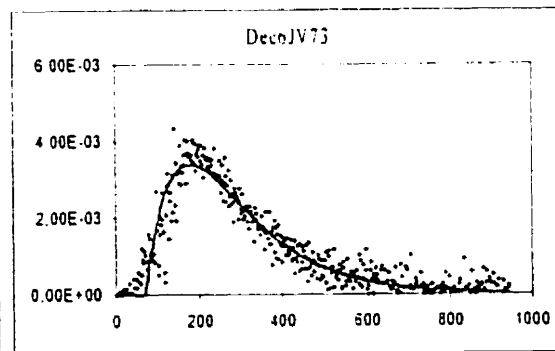
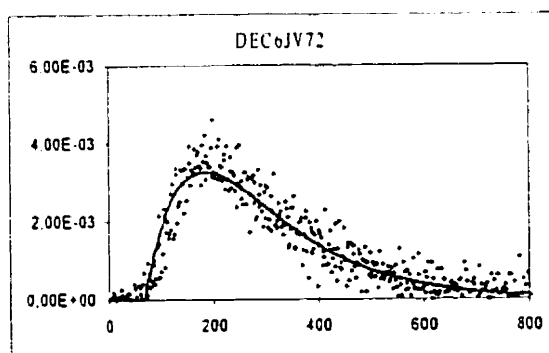
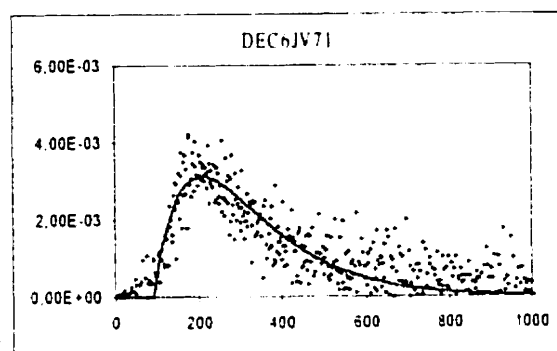
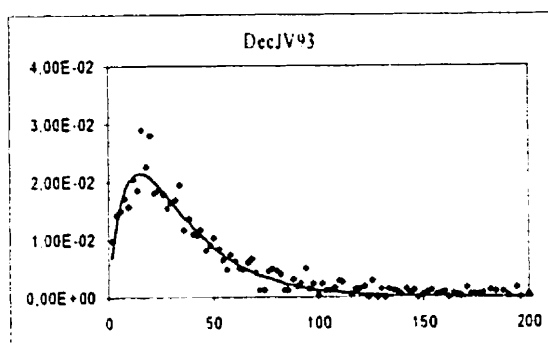
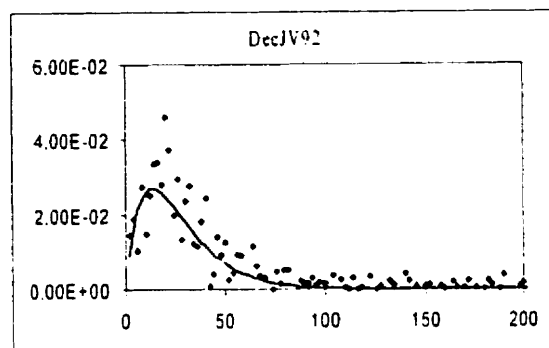
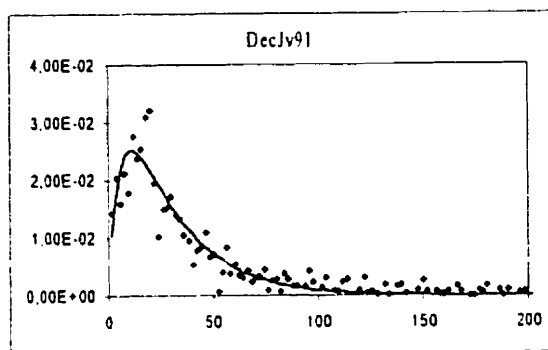


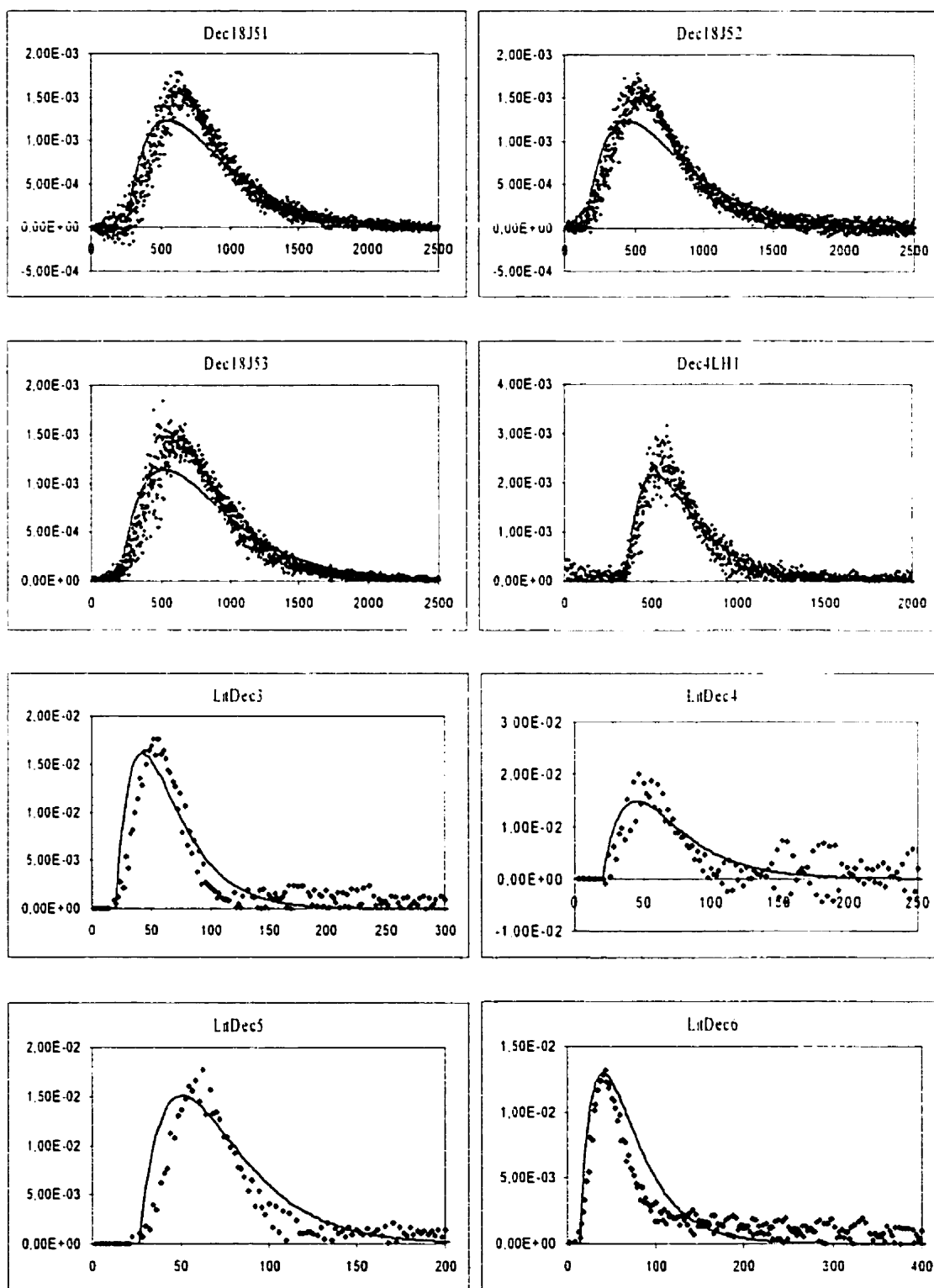


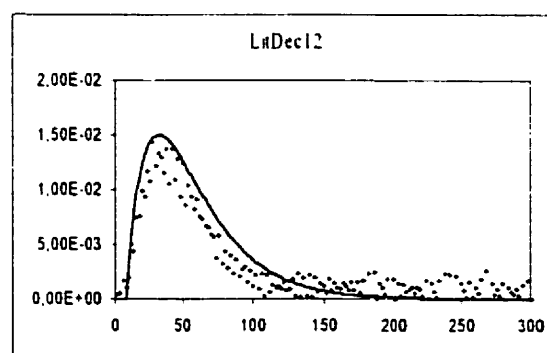
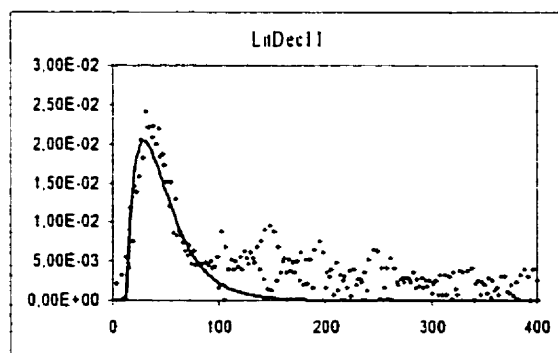
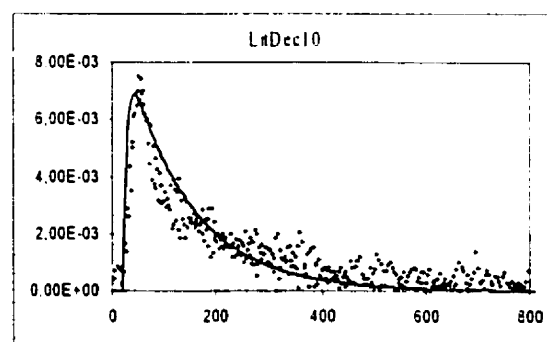
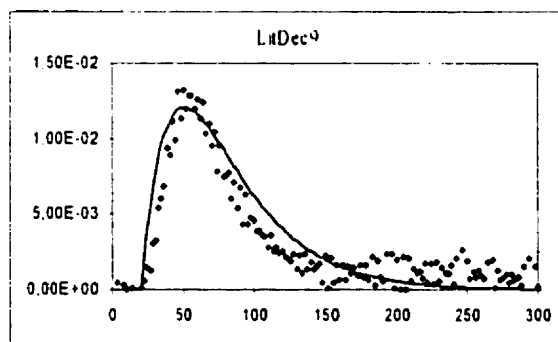
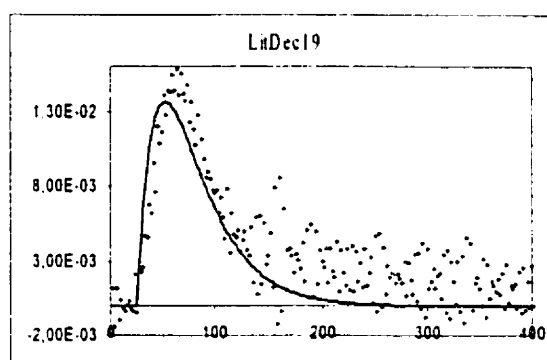
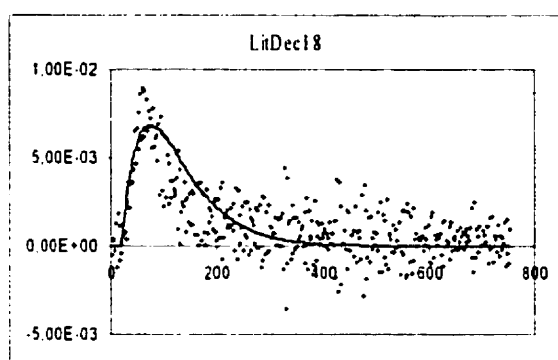
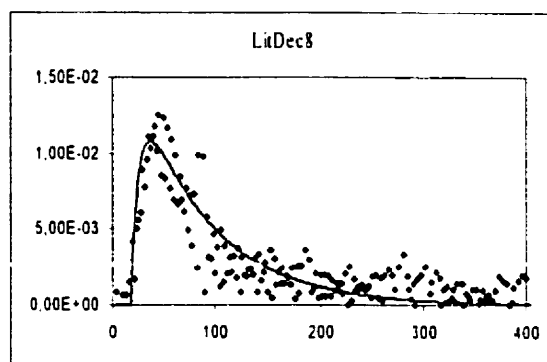
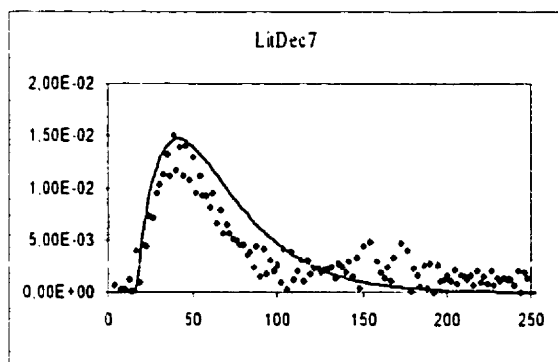


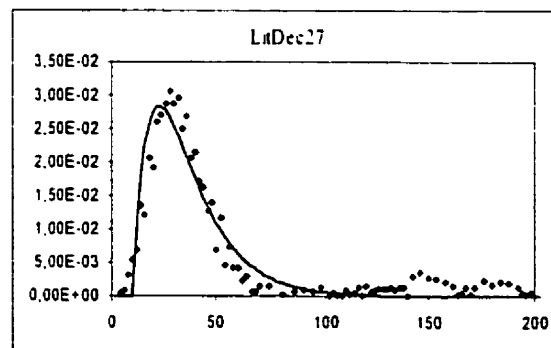
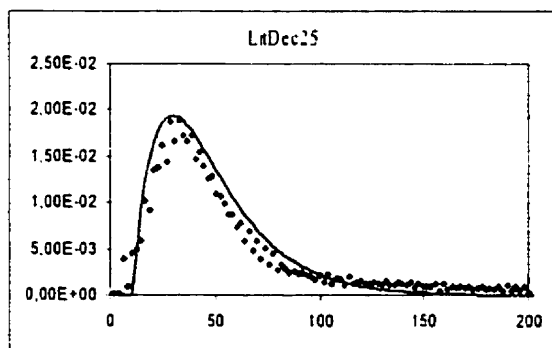
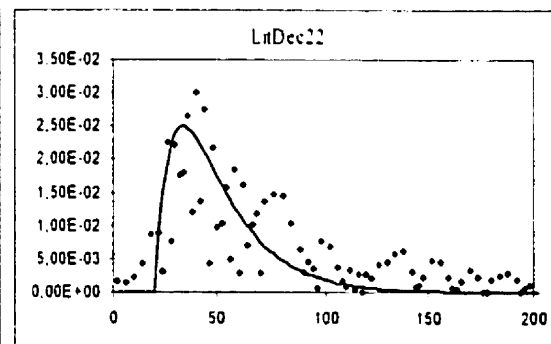
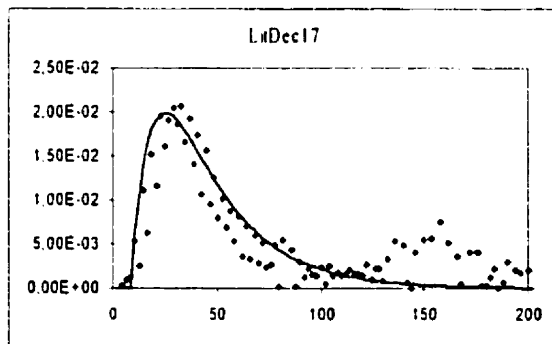
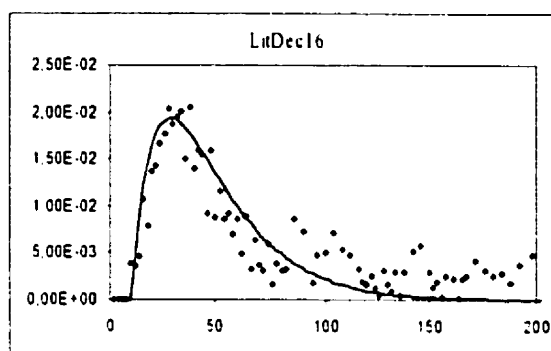
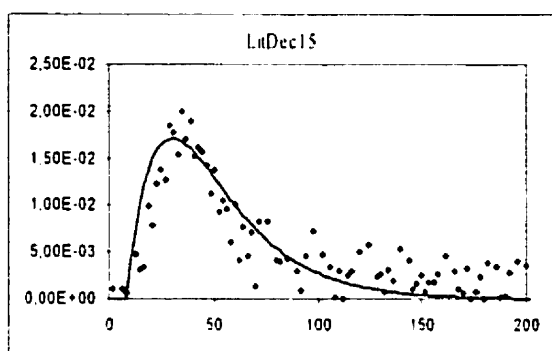
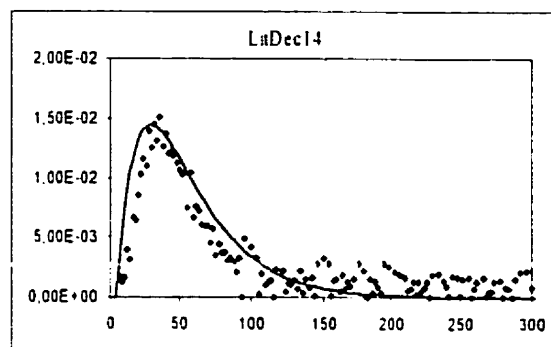
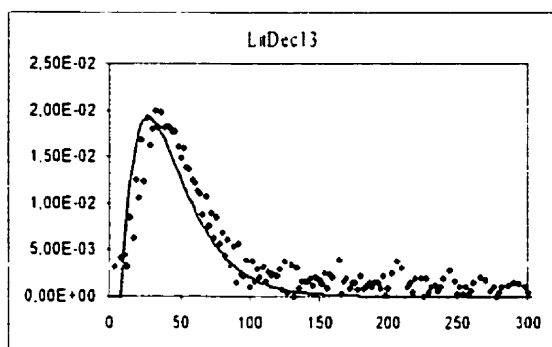
**ANNEXES F – COURBES DE DTS DÉCONVOLUÉES ET
MODÈLE DES 2 CSTR EN SÉRIE DE VOLUMES DIFFÉRENTS**

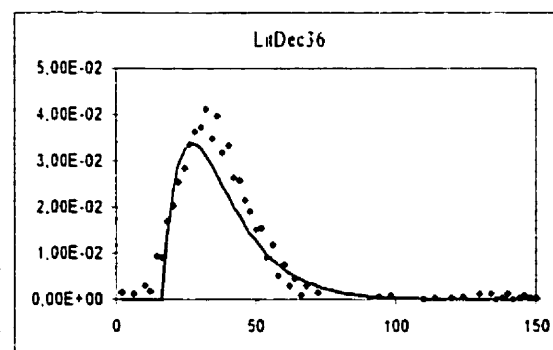
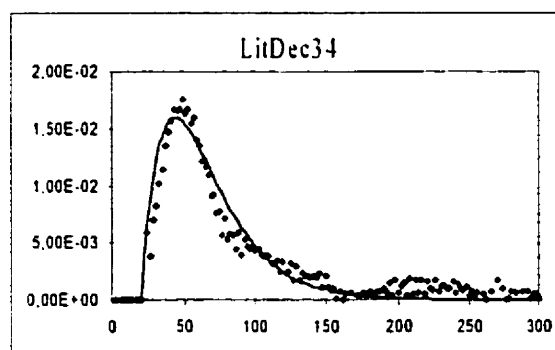
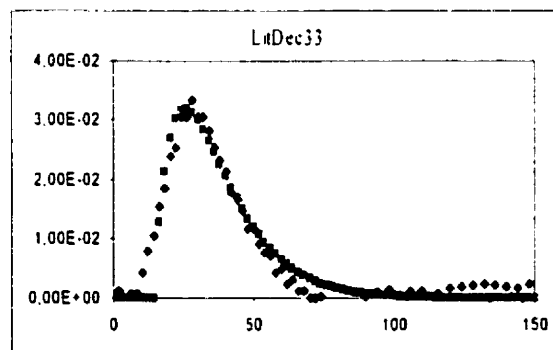
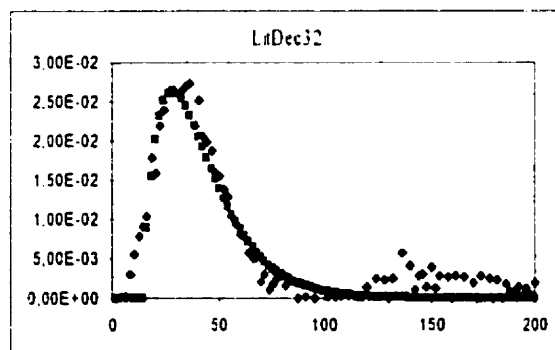
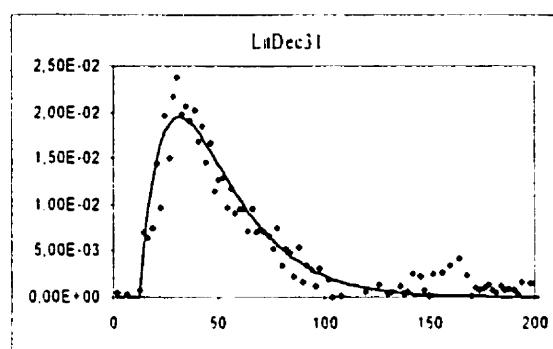
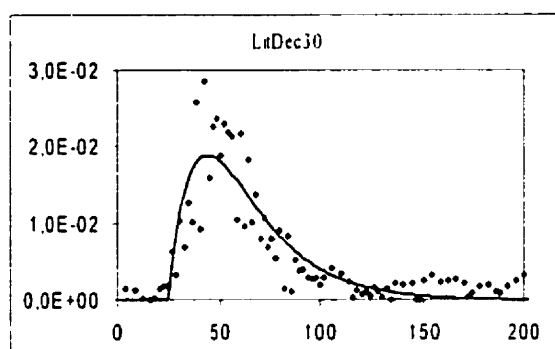
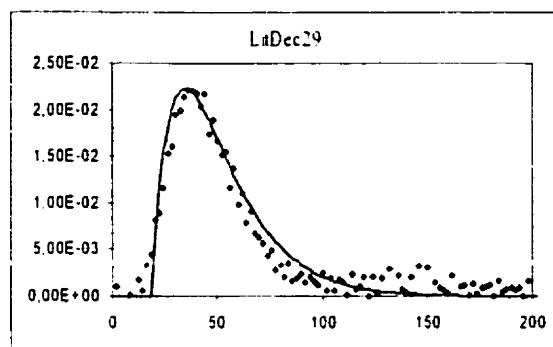
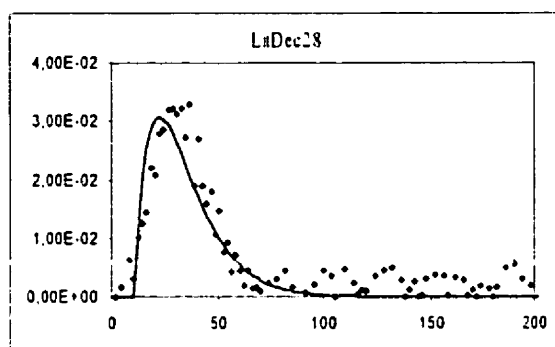


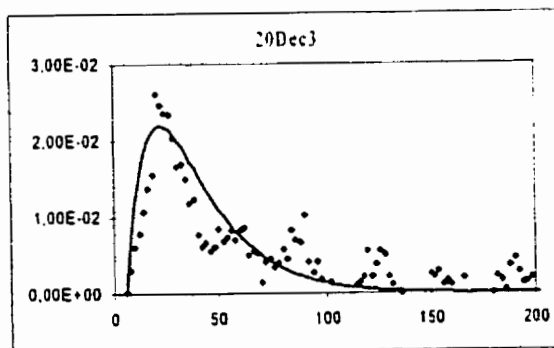
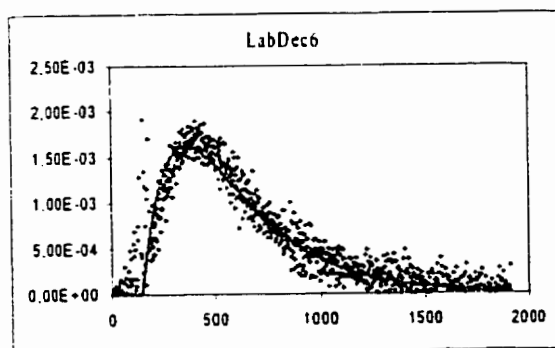
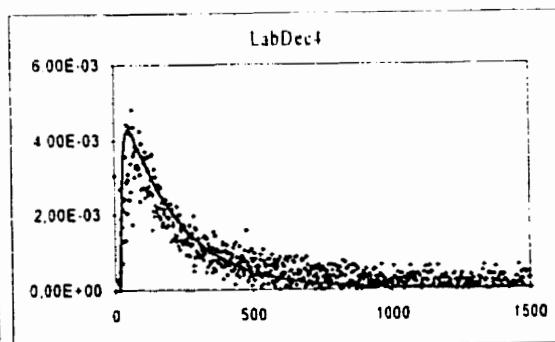
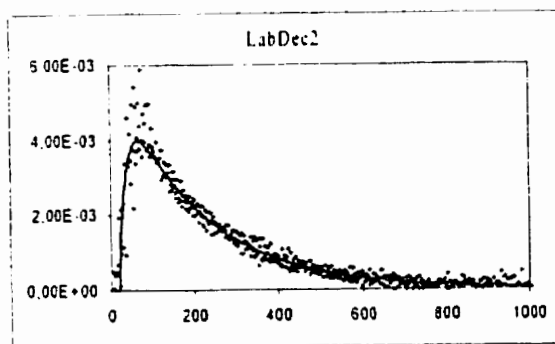
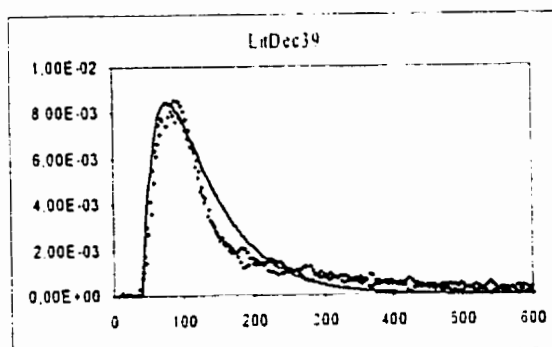
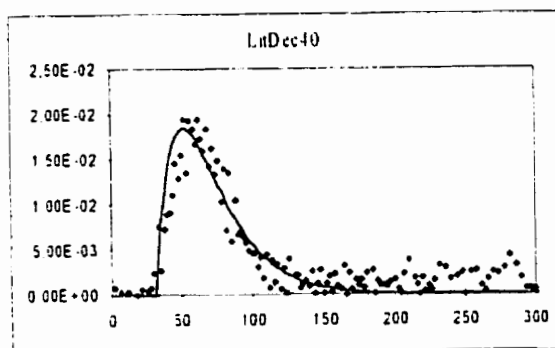
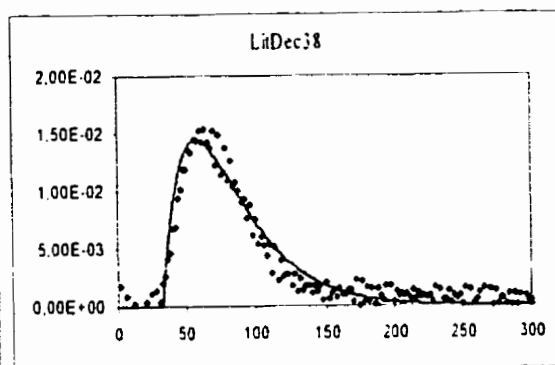
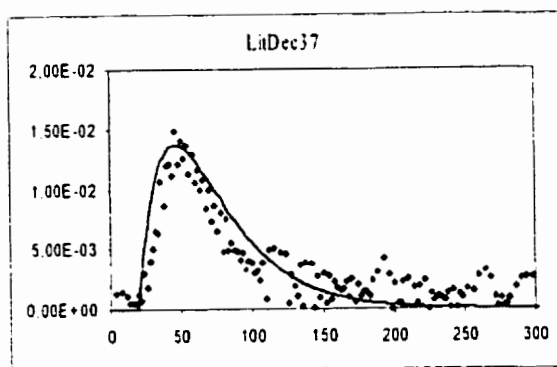


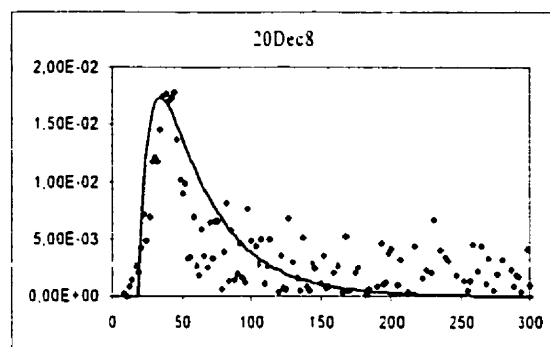
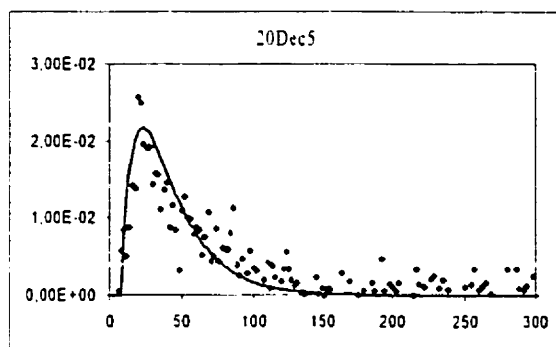












ANNEXES G – DONNÉES DE TRANSFERT D'OXYGÈNE

Système modèle

Fichier	Alimentation	Vide/Jute	Épaisseur (cm)	Débit(l/h)	τ (h)
O2V11	Brouillard	Vide	0	0,432	0,111
O2V12	Brouillard	Vide	0	0,4284	0,111
O2V13	Brouillard	Vide	0	0,576	0,069
O2V14	Brouillard	Vide	0	0,576	0,069
O2V31	Brouillard	Vide	0	1,08	0,042
O2V32	Brouillard	Vide	0	1,08	0,042
O2V33	Brouillard	Vide	0	1,08	0,042
O2V94	Brouillard	Vide	0	3,6	0,014
O2V95	Brouillard	Vide	0	3,6	0,014
O2V96	Brouillard	Vide	0	3,6	0,014
O215J11	Brouillard	Jute	1,5	1,296	0,319
O215J12	Brouillard	Jute	1,5	1,944	0,222
O215J13	Brouillard	Jute	1,5	0,54	0,222
O215J14	Brouillard	Jute	1,5	1,944	0,222
O215J31	Brouillard	Jute	1,5	1,044	0,069
O215J32	Brouillard	Jute	1,5	1,188	0,061
O215J41	Brouillard	Jute	1,5	1,44	0,049
O215J42	Brouillard	Jute	1,5	1,476	0,049
O215J51	Brouillard	Jute	1,5	1,728	0,035
O215J91	Brouillard	Jute	1,5	3,276	0,021
O215J94	Brouillard	Jute	1,5	3,6	0,014
O26J11	Brouillard	Jute	6	0,468	0,444
O26J12	Brouillard	Jute	6	0,468	0,444
O26J13	Brouillard	Jute	6	0,432	0,444
O26J14	Brouillard	Jute	6	0,396	0,444
O26J31	Brouillard	Jute	6	1,116	0,160
O26J33	Brouillard	Jute	6	1,152	0,160
O26J51	Brouillard	Jute	6	1,908	0,111
O26J52	Brouillard	Jute	6	1,8	0,111
O26J71	Brouillard	Jute	6	2,7	0,097
O26J91	Brouillard	Jute	6	3,6	0,097
O218J11	Brouillard	Jute	18	0,612	0,361
O218J12	Brouillard	Jute	18	0,612	0,333
O218J13	Brouillard	Jute	18	0,576	0,361
O218J31	Brouillard	Jute	18	0,972	0,361
O218J32	Brouillard	Jute	18	0,972	0,417
O218J33	Brouillard	Jute	18	0,936	0,417

Fichier	Alimentation	Vide/Jute	Épaisseur (cm)	Débit(l/h)	τ (h)
O218J51	Brouillard	Jute	18	1.98	0.222
O218J52	Brouillard	Jute	18	2.124	0.217
O218J53	Brouillard	Jute	18	1.548	0.250
O218J54	Brouillard	Jute	18	1.584	0.250
O218J91	Brouillard	Jute	18	3.96	0.104
O218J92	Brouillard	Jute	18	3.456	0.125
O218J93	Brouillard	Jute	18	3.24	0.139
O218J94	Brouillard	Jute	18	3.24	0.139
O27lh1	Brouillard	Jute	18	5.04	0.069
O21mls1	Brouillard	Jute	18	3.6	0.111
O21mls2	Brouillard	Jute	18	3.6	0.111
O21mls3	Brouillard	Jute	18	9	0.056
O21mls4	Brouillard	Jute	18	8.28	0.069
O2ALV11	Aléatoire	Vide	0	0.612	0.278
O2ALV12	Aléatoire	Vide	0	0.54	0.278
O2ALV13	Aléatoire	Vide	0	0.54	0.278
O2ALV31	Aléatoire	Vide	0	1.332	0.097
O2ALV32	Aléatoire	Vide	0	1.188	0.125
O2ALV33	Aléatoire	Vide	0	0.936	0.181
O2ALV51	Aléatoire	Vide	0	1.692	0.056
O2ALV52	Aléatoire	Vide	0	1.728	0.056
O2ALV54	Aléatoire	Vide	0	1.944	0.042
O2ALV55	Aléatoire	Vide	0	1.908	0.042
O2ALI1J11	Aléatoire	Jute	1.5	0.396	0.333
O2ALI1J12	Aléatoire	Jute	1.5	0.396	0.333
O2ALI1J13	Aléatoire	Jute	1.5	0.396	0.333
O2ALI1J31	Aléatoire	Jute	1.5	1.584	0.056
O2ALI1J32	Aléatoire	Jute	1.5	1.332	0.063
O2ALI1J33	Aléatoire	Jute	1.5	1.296	0.050
O2ALI1J51	Aléatoire	Jute	1.5	1.908	0.050
O2ALI1J52	Aléatoire	Jute	1.5	1.98	0.050
O2ALI1J53	Aléatoire	Jute	1.5	1.908	0.054

Lit de racines de carotte

Fichier	Culture	Jour
LitDO4	27	22
LitDO6	27	22
LitDO7	29	16
LitDO8	29	16
LitDO10	29	26
LitDO10-1	29	26
LitDO12	29	37
LitDO12-2	29	37
LitDO13	33	25
LitDO14	33	25
LitDO15	33	41
LitDO17	33	41
LitDO19	33	90

**ANNEXES H – COURBES DE TRANSFERT D'OXYGÈNE : DO EN FONCTION
DU TEMPS**

La concentration en oxygène dissous est donnée en volts. La relation entre la DO en volts et la DO en mgO_2/L est :

$$\text{DO (mgO}_2/\text{L)} = (8,5 \text{ mgO}_2/\text{L} - 0) / (2,056 \text{ v} - 0,085 \text{ v}) * \text{DO (v)}$$

