

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE

Département du génie de l'environnement

**Laboratoire des Biotechnologies Environnementales et de Génie des Procédés
(BIOGEP)**



MEMOIRE DE MAGISTER

Présenté par

AMROUCHE Dahbia

Pour l'obtention du Grade de Magister

En Génie de l'Environnement Option Biotechnologie Environnementale

THEME

**Photobioproduction d'hydrogène
par Rhodobacter sphaeroides CIP 60.6.**

Soutenue le : 16/01/2008 devant le jury composé de :

Mr KERBACHI	Professeur à l'ENP	Président
Mme N. ABDI	Maître de conférences à l'ENP	Promotrice
Mr H. LOUNICI	Maître de conférences à l'ENP/UMMTO	Promoteur
Mr N. MAMERI	Professeur à l'ENP	Examineur
Mr R. BOUARAB	Maître de conférences à l'ENP	Examineur
Mr M.S. BENHABILES	Chargé de cours à l'UMMTO	Examineur

Année Universitaire 2007-2008

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE

Département du génie de l'environnement

**Laboratoire des Biotechnologies Environnementales et de Génie des Procédés
(BIOGEP)**



MEMOIRE DE MAGISTER

Présenté par

Mme AKROUM née AMROUCHE Dahbia

Pour l'obtention du Grade de Magister

En Génie de l'Environnement Option Biotechnologie Environnementale

THEME

**Photobioproduction d'hydrogène
par Rhodobacter sphaeroides CIP 60.6.**

Soutenue le : 16/01/2008 devant le jury composé de :

Mr KERBACHI	Professeur à l'ENP	Président
Mme N. ABDI	Maître de conférences à l'ENP	Promotrice
Mr H. LOUNICI	Maître de conférences à l'ENP/UMMTO	Promoteur
Mr N. MAMERI	Professeur à l'ENP	Examineur
Mr R. BOUARAB	Maître de conférences à l'ENP	Examineur
Mr M.S. BENHABILES	Chargé de cours à l'UMMTO	Examineur

Année Universitaire 2007-2008

ملخص

الهدف من هذا البحث هو إنتاج ضوئي حيوي لغاز الهيدروجين بواسطة بكتريا رودوباكتر سفيريويدس عزلة رقم CIP 60.6. تم استخدام مفاعل ضوئي حيوي اسطواني لإنتاج غاز الهيدروجين تحت ظروف لاهوائية تحت الضوء. قمنا بتصميم وإنشاء مفاعل ضوئي حيوي انبوبي لولبي مسطح لزيادة سرعة إنتاج غاز الهيدروجين. داخل هذان المفاعلان، تم بحث تأثير شدة الإضاءة على النمو، الرقم الهيدروجيني (pH) والكمية الكلية لغاز الهيدروجين المنتج. وتمت أيضا دراسة تأثير الرقم الهيدروجيني، سرعة المزج، التركيز الخلوي وكمية الأصباغ. النتائج المحصلة عليها توضح أن سرعة النمو و سرعة إنتاج غاز الهيدروجين تتزايد بتزايد شدة الإضاءة إلى غاية التشبع. إنتاج غاز الهيدروجين يمكن أن يكون في مرحلة النمو اللوغارتمية و مرحلة النمو القصوى. لوحظ أن استخدام المفاعل الضوئي الحيوي الانبوبي اللولبي يزيد من سرعة إنتاج غاز الهيدروجين بنسبة 50 % تحت الشدة الضوئية الضعيفة و بنسبة 34% تحت الشدة الضوئية العالية.

كلمات مفاتيح: رودوباكتر سفيريويدس، إنتاج ضوئي حيوي لغاز الهيدروجين، مفاعل ضوئي حيوي، التشبع الضوئي، الأصباغ.

RÉSUMÉ

Le but de ce travail est la photobioproduction de l'hydrogène par une bactérie photofermentaire *Rhodobacter sphaeroides* CIP 60.6. Un photobioréacteur cylindrique parfaitement agité a été utilisé pour la production de l'hydrogène dans des conditions d'anaérobiose en présence de lumière. Un photobioréacteur tubulaire plan enroulé en spirale avec agitation par pompage a été conçu et construit pour augmenter le taux de production de l'hydrogène. Dans ces réacteurs, l'effet de l'intensité lumineuse sur les caractéristiques de croissance, le pH et la production de l'hydrogène ont été examinés. L'effet du pH, de l'agitation, de la concentration cellulaire et de la quantité des pigments ont été également étudiés. Les résultats obtenus montrent que le taux de la croissance cellulaire et de la production de l'hydrogène augmente avec l'intensité lumineuse jusqu'à saturation. L'hydrogène peut être produit durant la phase logarithmique et la phase stationnaire de la croissance. Il a été observé que l'utilisation du photobioréacteur tubulaire augmente le taux de production de l'hydrogène par *Rhodobacter sphaeroides* CIP 60.6 de 50 % pour les faibles intensités et de 34 % pour des hautes intensités, comparé au réacteur cylindrique parfaitement agité.

Mots clés : *Rhodobacter sphaeroides*, production photobiologique d'hydrogène, photobioréacteur, saturation de lumière, pigments.

ABSTRACT

The aim of this work is the photobioproduction of hydrogen by photofermentative bacteria *Rhodobacter sphaeroides* CIP 60.6. A column photobioreactor perfectly shaken was used for investigating hydrogen production by grown under anaerobic and illumination conditions. A plate tubular rolled up in spiral photobioreactor with mixing by pumping was designed and constructed for the enhancement of the hydrogen production rate. In these reactors, the effect of light intensity on the growth characteristics, pH measurements, and total hydrogen production were investigated. The effect of pH, mixing, cells amount and pigment amount were also studied. The results show that the rate of growth and hydrogen production increase with the increasing of light intensity and reach saturation. Hydrogen gas can be produced in both logarithmic phase and stationary phase of growth. It was observed that using of the tubular photobioreactor enhance the hydrogen production rate of *R. sphaeroides* CIP 60.6. It produced 50% more hydrogen than column reactor at the small intensity and 34% at the highest intensity.

Key words: *Rhodobacter sphaeroides*, photobiological hydrogen production, photobioreactor, light saturation, pigments.

*À mes très chers parents Mr et Mme Amrouche,
À mes très chers beaux parents Mr et Mme Akreum,
À mon très cher mari Mr H. Akreum,
À ma très chère sœur Nabila,
À mes très chers frères Seddik, Abd el hadi et Khalil,
À mes très chères belles sœurs,
À mes très chers beaux frères,
À toute ma famille,
À tous ceux qui auront le plaisir de lire ce mémoire.*



*"La science, son goût est amer au début
mais à la fin, plus doux que le miel"*

*Plat à décor épigraphique
XI-XIIème siècle*

Le Louvre - Arts de l'Islam

Remerciements

Ce travail a été effectué au sein du laboratoire des biotechnologies environnementales et génie des procédés de l'École Nationale Polytechnique (ENP) sous la direction de Madame N. ABDI, maître de conférences à l'ENP, qu'elle trouve ici l'expression de toute ma gratitude pour les conseils avisés et l'encouragement constant qu'elle n'a cessé de me prodiguer tout au long de cette étude.

Je souhaite également remercier Monsieur H. LOUNICI, maître de conférences à l'ENP, qui a co-encadré ce travail, pour l'aide et tous les conseils qu'il m'a apportés.

Mes remerciements les plus sincères sont adressés à Monsieur N. MAMERI, professeur à l'ENP, pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail et l'aide scientifique qu'il m'a apportée. Je suis très honoré de sa présence dans le jury.

Mes vifs remerciements vont aussi à Monsieur KERBACHI, professeur à l'ENP, qui ma fait l'honneur de présider le jury.

J'exprime ma grande gratitude à Monsieur R. BOUARAB, maître de conférence, pour l'honneur qui m'a fait en acceptant de faire partie du jury.

Je remercie également Monsieur M.S. BENHABILES, chargé de cours à l'université de Tizi Ouzou, qui a accepté de juger ce travail.

Je dois exprimer toute ma reconnaissance à Monsieur H. AKROUM, Chargé de cours à l'université de Boumerdes, pour l'aide scientifique et technique, pour le soutien moral, pour la patience et la compréhension et tous les conseils qu'il m'a apportés ainsi que pour le temps qu'il a su m'accorder.

Je tiens à remercier Monsieur A. PAUSS, professeur à l'université de Compiègne, France, pour son aide. Merci à Monsieur BAZAR, chercheur à l'université d'Ankara, Turc et à Monsieur S. DEMENTIN, docteur au CNRS, France, pour leurs aides documentaires et scientifiques. Merci également à Monsieur HOCINE, chargé de cours à l'université de Tizi Ouzou, pour l'aide technique.

Merci également aux personnels de SOMIVER, division verre technique de Thénia, Boumerdes, pour leurs patience, compréhension et aide.

Je remercie toute l'équipe du laboratoire biotechnologies environnementales et génie des procédés de l'École Nationale Polytechnique (ENP).

Que mes amis de l'USTHB, de SONATRACH CRD, de l'institut Pasteur et de l'ENP, trouvent ici ma gratitude pour leur compréhension, leur aide, leur ambiance bien sympathique et leurs soutien matériel et moral qui n'ont cessé de m'apporter tout au long de l'élaboration de ce travail.

Je ne peux citer tout le monde, mais tous ceux qui ont contribué de façon ou d'une autre soient assurés de ma reconnaissance.

« Merci sincèrement pour votre confiance et votre important soutien moral »

Mme AKROUM AMROUCHE Dabbia

Sommaire

Introduction	1
Chapitre I. Energie et développement durable	3
I.1. Les différentes sources d'énergie primaire.....	3
I.1.1. Ressources énergétiques renouvelables.....	3
I.1.1.1. Le rayonnement solaire.....	3
1.1. Rayonnement solaire au sol.....	3
1.2. L'ensemble des cycles hydrologiques.....	3
1.3. L'énergie hydraulique	3
1.4. L'énergie éolienne.....	3
1.5. L'énergie de la houle.....	4
1.6. Biomasse.....	4
I.1.1.2. La géothermie.....	4
I.1.1.3. Les interactions gravitationnelles « Terre Lune Soleil »	4
I.1.1.4. Les déchets.....	5
I.1.2. Ressources énergétiques non renouvelables.....	5
I.1.2.1. Pétrole	5
I.1.2.2. Charbon.....	6
I.1.2.3. Le gaz naturel.....	6
I.1.2.4. Nucléaire.....	7
I.1.2.5. La fusion.....	7
I.2. Les différentes formes d'énergie.....	7
I.3. Aspect économique	8
I.4. Aspect environnementale.....	9
Chapitre II. L'hydrogène : vecteur énergétique	10
II.1. Découverte.....	10
II.2. Propriétés	10
II.3. Les enjeux.....	11
II.4. La production de l'hydrogène.....	11
II.4.1. La production de l'hydrogène à partir des énergies fossiles (non renouvelables)...11	
4.1.1. Le reformage du gaz naturel.....	11
4.1.2. Gazéification et cokéfaction du charbon.....	12
4.1.3. L'oxydation partielle des fuels fossiles.....	12
4.1.4. Craquage catalytique des hydrocarbures.....	12
4.1.5. Déshydrogénation d'éthyle benzène.....	12
4.1.6. Reformage solaire- thermal des fuels fossiles avec le dioxyde de carbone....13	
II.4.2. L'électrolyse.....	13
II.4.3. La production de l'hydrogène à partir des énergies renouvelables.....13	
4.3.1. La production de l'hydrogène à partir de l'eau.....	13
4.3.1.1. La photoélectrolyse.....	13
4.3.1.2. La thermolyse.....	13
4.3.1.3. Cycles thermochimiques.....	13
4.3.2. La production biologique de l'hydrogène.....	13
II.5. Stockage et transport de l'hydrogène.....	15
II.5.1. Stockage.....	15
5.1.1. Stockage à l'état gaz (compression)	15

5.1.2. Stockage à l'état liquide.....	15
5.1.3. Stockage à l'état mélange liquide / sol.....	15
5.1.4. Hydrures métalliques.....	15
II.5.2. Transport.....	15
II.6. Les applications de l'hydrogène.....	15
II.6.1. Transport.....	16
II.6.2. Pile à combustible	16
II.6.3 Autres utilisations.....	17
Chapitre III. La bioproduction de l'hydrogène.....	18
III.1. Les microorganismes producteurs de l'hydrogène.....	18
III.1.1. Les microorganismes photosynthétiques.....	18
III.1.1.1. Les microalgues et les cyanobactéries.....	18
1.1.1. Les algues vertes.....	18
1.1.2. Les cyanobactéries.....	19
1.1.3. Perspectives et recherches.....	20
III.1.1.2. Les bactéries anoxygéniques phototrophes.....	21
1.2.1. Production de l'hydrogène par photo –fermentation.....	21
1.2.2. Perspectives et recherches.....	22
III.1.2. Les bactéries fermentaires.....	22
1.2.1. Production d'hydrogène par fermentation.....	22
1.2.2. Perspectives et recherches.....	23
III.1.3. Les Systèmes hybrides utilisant les organismes fermentaires et Photosynthétiques (Co-culture).....	23
III.2 Etude comparative.....	24
2.1 Les voies métabolique de production de l'hydrogène.....	24
2.2. Les taux de production de l'hydrogène.....	25
2.3. Avantages et inconvénients.....	25
III.3. Les bioréacteurs utilisés pour la production biologique de l'hydrogène.....	26
3.1. Les différents type de photobioréacteur.....	26
3.1.1. Réacteur à colonne vertical (cylindrique).....	26
3.1.2. Réacteur plan (panneau).....	26
3.2. Avantages et inconvénients.....	28
III.4. Avantages des méthodes biologiques de production d'hydrogène.....	28
Chapitre IV. Rhodobacter sphaeroides.....	29
IV.1. Taxonomie.....	29
1.1. Rhodobacter sphaeroides.....	29
1.2. Classification.....	29
1.3. Critères taxonomiques.....	29
IV.2. Physiologie de croissance.....	30
2.1. Localisation.....	30
2.2. Besoins nutritionnels.....	30
IV.3. Métabolisme et mécanisme de photosynthèse.....	31
3.1. Métabolisme.....	31
3.2. Mécanisme de photosynthèse, de respiration et de transfert d'électrons.....	33
3.2.1. La membrane photosynthétique.....	33
3.2.2. L'appareil photosynthétique.....	33
3.2.2.1. Bactériochlorophylle – caroténoïde (le complexe antennaire LHs).....	33
3.2.2.2. Le centre réactionnel (CR).....	34

3.2.2.3. Les caroténoïdes.....	35
3.2.2.4. Les facteurs affectant la synthèse des pigments.....	35
3.2.3. Mécanisme de photosynthèse, de respiration et de transfert d'électrons.....	35
IV.4. La production biologique de l'hydrogène par <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	37
4.1. Métabolisme.....	37
4.2. Les enzymes responsables de la production de l'hydrogène.....	37
4.2.1. La nitrogénase.....	37
4.2.2. Hydrogénase.....	38
4.2.3. Etude comparative.....	38
4.3. Mécanisme de production de l'hydrogène.....	39
4.4. Recherches et développements.....	40
Chapitre V. Matériels et méthodes.....	43
V.1. La bactérie <i>Rhodobacter sphaeroides</i> CIP 60.6 (DSM 158).....	43
V.2. Culture de la bactérie <i>Rhodobacter sphaeroides</i> et conditions de croissance.....	43
V.2.1. Préparation des milieux de croissance.....	43
2.1.1. Le milieu Sistrom A.....	43
2.1.2. Le milieu asy.....	44
V.2.2. Revivification et activation de la bactérie lyophilisée <i>Rhodobacter sphaeroides</i> CIP 60.6.....	45
2.2.1. Sur milieu liquide.....	46
2.2.2. Sur milieu solide.....	46
V.2.3. Caractérisation de la souche.....	47
2.3.1. Observation des colonies.....	47
2.3.2. Teste de mobilité.....	47
2.3.3. Coloration Gram.....	47
V.2.4. Etude de la croissance bactérienne au cours du métabolisme respiratoire et photosynthétique.....	47
V.2.5. Etude de la cinétique de croissance dans les milieux asy et Sistrom A.....	48
V.3. Conservation des bactéries.....	48
V.4. La production de l'hydrogène par <i>Rhodobacter sphaeroides</i> CIP60.6.....	48
V.4.1. Préparation de la préculture de <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	48
V.4.2. Préparation du milieu de production de l'hydrogène (le milieu gL).....	48
V.4.3. Préactivation à la production et optimisation de l'âge de la culture.....	49
V.4.4. Production de l'hydrogène dans les photobioréacteurs.....	49
4.4.1. Production de l'hydrogène dans le réacteur cylindrique parfaitement agité.....	49
4.4.1.1. Description du réacteur.....	49
4.4.1.2. Procédure expérimentale.....	50
4.4.1.3. Conditions de culture.....	50
4.4.1.4. Optimisation et étude de l'effet de l'intensité lumineuse sur la cinétique de croissance cellulaire et de production de l'hydrogène.....	50
4.4.1.5. Etude de l'évolution et effet du pH sur la production de l'hydrogène.....	51
4.4.1.6. Effet de l'agitation sur la production de l'hydrogène.....	51
4.4.2. Profil de l'intensité lumineuse dans le photobioréacteur en fonction de l'évolution de la concentration cellulaire.....	51
4.4.3. Conception d'un réacteur tubulaire plan avec agitation par pompage (réacteur à jet).....	51
4.4.3.1. Description du photobioréacteur.....	51
4.4.4. Production de l'hydrogène dans le réacteur tubulaire plan avec agitation par pompage (réacteur à jet).....	52
4.4.4.1. Procédure opératoire.....	52

4.4.4.2. Optimisation et étude de l'effet de l'intensité lumineuse sur la cinétique de croissance et de production de l'hydrogène.....	52
4.4.4.3. Effet de l'intensité lumineuse du jour sur la cinétique de croissance et de production de l'hydrogène.....	52
4.4.4.4. Etude de l'évolution et effet du pH sur la production de l'hydrogène.....	52
4.4.4.5. Effet de pompage sur la production de l'hydrogène.....	52
V.5. Mesure du taux de la croissance cellulaire.....	54
V.6. Mesure du volume d'hydrogène.....	54
V.6. 1. Principe.....	54
V.6.2. Description du système.....	54

Chapitre VI. Résultats et discussions.....

55

VI.1. Revivification, caractérisation et étude de la cinétique de croissance de Rhodobacter sphaeroides CIP 60.6, en mode photohétérotrophe et chimiohétérotrophe...	55
1.1. Revivification de Rhodobacter sphaeroides CIP 60.6.....	55
1.2. Caractérisation des bactéries.....	55
1.2.1. L'arrangement des bactéries en colonies sur milieu solide.....	55
1.2.2. La mobilité.....	57
1.2.3. Coloration Gram.....	57
1.2.4. Observation au microscope électronique à balayage.....	57
1.3. Etude de la croissance bactérienne au cours du métabolisme respiratoire et photosynthétique.....	58
1.4. Etude de la cinétique de croissance dans le milieu Sistrom A et le milieu Asy.....	59
VI.2. Préactivation à la production de l'hydrogène.....	60
VI.3. Production de l'hydrogène par Rhodobacter sphaeroides CIP 60.6 dans un réacteur cylindrique parfaitement agité.....	62
3.1. Effet de l'intensité lumineuse sur la croissance bactérienne et la production de l'hydrogène.....	62
3.1.1. Etude de la relation entre les cinétiques de croissance et de production.....	62
3.1.2. Effet de l'intensité lumineuse sur la croissance bactérienne.....	66
3.1.3. Effet de l'intensité lumineuse sur la cinétique de production de l'hydrogène.....	67
3.2. Evolution et effet du pH sur la production de l'hydrogène.....	68
3.3. Cinétique de croissance et de production de Rhodobacter sphaeroides CIP 60.6 dans le réacteur cylindrique parfaitement agité.....	71
3.4. Etude comparative des taux de production de l'hydrogène de la souche CIP60.6 avec différentes souches de Rhodobacter sphéroïdes.....	73
3.5. Effet de l'agitation sur la production de l'hydrogène.....	73
VI.4. Profil de l'intensité lumineuse au sein du réacteur.....	75
VI.5. Production de l'hydrogène par Rhodobacter sphaeroides CIP 60.6 dans un réacteur tubulaire plan à jet (agitation par pompage).....	77
5.1. Effet de l'intensité lumineuse sur la production de l'hydrogène et sur la croissance bactérienne.....	77
5.1.1. Etude de la relation entre la cinétique de croissance et de production.....	77
5.1.2. Effet de l'intensité lumineuse sur la croissance bactérienne.....	80
5.1.3. Effet de l'intensité lumineuse sur la cinétique de production de l'hydrogène.....	81
5.2. Evolution et effet du pH sur la production de l'hydrogène.....	82
5.3. Cinétique de croissance et de production dans le réacteur tubulaire plan à jet.....	86
VI.6. Etude comparative entre le réacteur cylindrique parfaitement agité et le réacteur tubulaire plan à jet.....	88
6.1. Le volume totale d'hydrogène produit et le temps de retard.....	88

6.1.1. Le volume total d'hydrogène produit.....	88
6.1.2. Le temps de retard.....	88
6.2. Efficacité de conversion du substrat par Rhodobacter sphaeroides CIP 60.6.....	89
6.3. Effet des paramètres physico-chimiques sur la cinétique bactérienne.....	90
6.4. Etude comparative entre les cinétiques de croissance et de production dans le réacteur cylindrique parfaitement agité et le réacteur tubulaire plan à jet.....	90
6.5. Effet de la concentration en biomasse et en pigments sur le taux de production de l'hydrogène à différentes intensités lumineuses.....	92
Conclusion.....	93
Bibliographie.....	95

Liste des figures

I. Energie et développement durable

Figure I.1. Sources et répartition quantitative annuelle des énergies renouvelables.....	5
Figure I.2. Le schéma énergétique.....	7
Figure I.3. Conversion des six principales formes d'énergie.....	8
Figure I.4. Origine des ressources primaires satisfaisant les besoins énergétiques actuels....	8
Figure I.5. Répartition par mode de la consommation mondiale d'énergie primaire.....	9

II. L'hydrogène : vecteur énergétique

Figure II.1. Reformage solaire- thermal des fuels fossiles avec le dioxyde de carbone.....	13
Figure II.2. Triangle énergétique.....	14
Figure II.3. La pile à combustible.....	16

III. La bioproduction de l'hydrogène

Figure III.1. Biophotolyse directe.....	19
Figure III.2. Biophotolyse indirecte.....	20
Figure III.3. Production de l'hydrogène par photofermentation.....	22
Figure III.4. La co-culture des organismes producteurs d'hydrogène.....	24
Figure III.5. Photobioréacteurs utilisés pour la bioproduction d'hydrogène.....	27

IV. *Rhodobacter sphaeroides*

Figure IV.1. Division binaire chez <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	29
Figure IV.2 Cycle d'acide citrique (TCA) chez <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	32
Figure IV.3. Invaginations membranaire renfermant l'appareil photosynthétique.....	33
Figure IV.4. (a) Structure tridimensionnelle, (b) Topographie à grande résolution des différents composants de l'appareil photosynthétique de <i>Rhodobacter sphaeroides</i> ...	34
Figure IV.5. Structure tridimensionnelle du centre réactionnel.....	34
Figure IV.6. (a) Spectre d'absorption des composants de l'appareil photosynthétique, (b) Effet de l'oxygène sur la synthèse des composants de l'appareil photosynthétique.....	35
Figure IV.7. Mécanisme de photosynthèse et de transfère d'électrons.....	36
Figure IV.8. Mécanisme de production de l'hydrogène chez <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	39
Figure IV.10. Principe des systèmes hybrides des bactéries fermentaires et photo-Fermentaires « <i>Rhodobacter sphaeroides</i> ».....	41

V. Matériels et méthodes

Figure V.1. Revivification de la bactérie lyophilisée <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	46
Figure V.2. Réacteur cylindrique parfaitement agité.....	50
Figure V.3. Réacteur tubulaire plan avec agitation par pompage (réacteur à jet).....	53

VI. Résultats et discussions

Figure VI.1. (a) Croissance en anaérobiose, (b) Croissance en aérobie.....	56
Figure VI.2. Différenciation de la membrane cellulaire en présence. (a) en présence d'oxygène, (b) en absence d'oxygène.....	56
Figure VI.3. Coloration et observation au microscope photonique.....	57
Figure VI.4. Observation au microscope électronique à balayage de <i>Rhodobacter sphaeroides</i> CIP 60.6.....	58
Figure VI.5. La cinétique de croissance en aérobie (♦) et en anaérobiose (□).....	58

Figure VI.6. Les milieux de croissance en aérobiose. (a) en aérobiose, (b) en anaérobiose..	59
Figure VI.7. Etude de la cinétique de croissance dans le milieu Siström A (♦) et milieu asy (□).....	60
Figure VI.8. Préactivation à la production d'hydrogène.....	61
Figure VI.9. Cinétique de croissance bactérienne (■) et de production de l'hydrogène (◇) à une intensité lumineuse de 1000 Lux.....	62
Figure VI.10. La cinétique de croissance bactérienne (■) et de production de l'hydrogène (◇) à une intensité lumineuse de 2500 Lux.....	63
Figure VI.11. La cinétique de croissance bactérienne (■) et de production de l'hydrogène (◇) à une intensité lumineuse de 4500 Lux.....	64
Figure VI.12. La cinétique de croissance (■) et de production (◇) à une intensité lumineuse de 8500 Lux.....	64
Figure VI.13. Effet de l'intensité lumineuse sur la croissance bactérienne. (◇) 1000Lux ; (■) 2500 Lux ; (▲) 4500Lux ; (○) 8500 Lux.....	66
Figure VI.14. Effet de l'intensité lumineuse sur la cinétique de production d'hydrogène. (◇) 1000 Lux ; (■) 2500 Lux ; (▲) 4500Lux ; (○) 8500 Lux.....	67
Figure VI.15. Evolution du pH à différentes intensités lumineuses en fonction du temps. (♦) 1000 Lux ; (■) 2500 Lux ; (▲) 4500Lux ; (○) 8500 Lux.....	68
Figure VI.16. Evolution du pH en fonction du temps sous une intensité de 1000Lux. (◇) Hydrogène ; (■) densité cellulaire ; (▲) pH.....	69
Figure VI.17. Evolution du pH en fonction du temps sous une intensité de 2500Lux. (◇) Hydrogène ; (■) densité cellulaire ; (▲) pH.....	69
Figure VI.18. Evolution du pH en fonction du temps sous une intensité de 4500Lux. (◇) Hydrogène ; (■) densité cellulaire ; (▲) pH.....	70
Figure VI.19. Evolution du pH en fonction du temps sous une intensité de 8500Lux. (◇) Hydrogène ; (■) densité cellulaire ; (▲) pH.....	70
Figure VI.20. Taux maximal de la croissance bactérienne (■) et de la production (◇).....	72
Figure VI.21. Effet de l'agitation sur la production d'hydrogène. (♦) Sans arrêt d'agitation ; (□) avec arrêt d'agitation ; (A) durant l'arrêt d'agitation.....	74
Figure VI.22. Le profil de l'intensité lumineuse au sein du réacteur. (◇) 1.98 ; (■) 1.40 ; (▲) 0.573.....	75
Figure VI.23. La cinétique de croissance et de production à une intensité lumineuse de 2000 Lux. (▲) H ₂ ; (■) DO.....	77
Figure VI.24. La cinétique de croissance et de production à une intensité lumineuse de 4500 Lux. (▲) H ₂ ; (■) DO.....	78
Figure VI.25. La cinétique de croissance et de production à une intensité lumineuse de 8500 Lux. (▲) H ₂ ; (■) DO.....	79
Figure VI.26. La cinétique de croissance et de production à une intensité lumineuse de 20000 Lux. (▲) H ₂ ; (■) DO.....	79
Figure VI.27. Effet de l'intensité lumineuse sur la cinétique de la croissance bactérienne. (■) 2000Lux ; (▲) 4500Lux ; (○) 8500Lux ; (▲) 20000 Lux	80
Figure VI.28. Effet des intensités lumineuses sur la couleur des suspensions bactériennes (a)20000Lux ; (b) 8500Lux ; (c) 4500Lux.....	81
Figure VI.29. Effet de l'intensité lumineuse sur la cinétique de production d'hydrogène. (■) 2000Lux ; (▲) 4500Lux ; (○) 8500Lux ; (♦) 20000 Lux	82
Figure VI.30. Evolution du pH à différentes intensités lumineuses en fonction du temps. (■) 2000Lux ; (▲) 4500Lux ; (○) 8500Lux ; (▲) 20000 Lux	83

Figure VI.31. Evolution du pH en fonction du temps sous une intensité de 2000Lux. (◇) Hydrogène ; (▲) densité cellulaire ; (■) pH.....	83
Figure VI.32. Evolution du pH en fonction du temps sous une intensité de 4500Lux. (◇) Hydrogène ; (▲) densité cellulaire ; (■) pH.....	84
Figure VI.33. Evolution du pH en fonction du temps sous une intensité de 8500Lux. (◇) Hydrogène ; (▲) densité cellulaire ; (■) pH.....	84
Figure VI.34. Evolution du pH en fonction du temps sous une intensité de 20000Lux. (◇) Hydrogène ; (▲) densité cellulaire ; (■) pH.....	85
Figure VI.35. Taux maximal de la croissance bactérienne (□) et de la production d'hydrogène (◆).....	86
Figure VI.36. (a) Volume total produit ; (b) Temps de retards dans le réacteur tubulaire et le réacteur cylindrique à différentes intensités lumineuses.....	89
Figure VI.37. Etude comparative entre les cinétiques de croissance (□, ■) et de production (○, ●) dans le réacteur cylindrique parfaitement agité (symbole vide) et le réacteur tubulaire plan.....	91
Figure VI.38. Gain en termes de biomasse (◆) et produit (□) dans le réacteur tubulaire comparé au réacteur cylindrique à différentes intensités lumineuses.....	92

Liste des tableaux

III. La bioproduction de l'hydrogène

Tableau III.1. Les voies métaboliques de production biologique d'hydrogène.....	24
Tableau III.2. Avantages et inconvénients des différents processus biologique utilisés pour la production d'hydrogène.....	25
Tableau III.3. Les photobioréacteurs utilisés pour la production biologique d'hydrogène.	28

IV. *Rhodobacter sphaeroides*

Tableau IV.1. Quelques éléments nécessaires à la croissance de <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	30
Tableau IV.2. Les caractéristiques enzymatiques de la nitrogénase et l'Hydrogénase.....	38
Tableau IV.3. Résultats d'utilisation des substrats complexes pour la production de l'hydrogène par différentes souches de <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	41

V. Matériels et méthodes

Tableau V.1. Préparation d'1 litre du milieu Sistrom A 10X.....	43
Tableau V.2. Solution des éléments en trace (100 ml).....	44
Tableau V.3. Solution de vitamines (100 ml).....	44
Tableau V.4. Préparation d'1L du milieu Sistrom A (1X).....	44
Tableau V.5. La composition chimique du milieu basal.....	45
Tableau V.6. La composition chimique du milieu asy.....	45
Tableau V.7. La composition chimique du milieu gL.....	49

VI. Résultats et discussions

Tableau VI.1. Temps nécessaire à la revivification de <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	55
Tableau VI.2. Taux maximaux et Productivités totales de croissance et de production du réacteur cylindrique parfaitement agité.....	71
Tableau VI.3. Production de l'hydrogène par différentes souches de <i>Rhodobacter sphaeroides</i> (<i>R. sp</i>).....	73
Tableau VI.4. Taux de production en présence et en l'absence d'agitation.....	74
Tableau VI.5. Les taux maximaux et les productivités totales de croissance et de production du réacteur tubulaire à jet.....	87
Tableau VI.6. Gamme de pH affectant l'activité enzymatique de la nitrogénase et de l'hydrogénase.....	90

Introduction

De nos jours, l'énergie et l'environnement sont les deux soucis les plus importants sur le plan de l'économie mondiale.

L'utilisation des énergies fossiles conduit à l'épuisement de précieuses ressources naturelles ainsi qu'à de violentes pollutions par les rejets de gaz à effet de serre. Jusqu'à aujourd'hui, la compétitivité des énergies fossiles avait marginalisé le recours aux énergies propres alternatives telles que l'énergie éolienne, la géothermie, l'énergie solaire ou l'utilisation de la biomasse.

A présent, l'hydrogène est un carburant propre et efficace, largement accepté comme un remplaçant potentiel de carburants de fossiles. Cependant, si dans l'avenir l'hydrogène doit remplacer ces carburants, il doit être produit de façon renouvelable et à grande échelle, par des processus environnementalement bénins [1].

Actuellement, environ 90 % de l'hydrogène est produit par la réformation du gaz naturel avec la vapeur d'eau à haute température. L'électrolyse de l'eau doit aussi être mentionnée [2]. Les méthodes photoélectrochimiques et photobiologiques peuvent être employées pour la conversion de l'énergie solaire, une source d'énergie renouvelable la plus abondante sur terre, en une énergie chimique sous forme d'hydrogène [2,3].

À cet égard, au cours de ces dernières années, la production photobiologique d'hydrogène reçoit une attention considérable par plusieurs chercheurs dans le monde ainsi que dans la recherche solaire basée sur l'énergie biotechnologique comme une source potentielle de carburant renouvelable.

Plusieurs types de microorganismes comme les bactéries photosynthétiques, les cyanobactéries, les algues ou les bactéries fermentatives sont généralement utilisées pour la production biologique d'hydrogène. Les bactéries photosynthétiques sont des organismes aquatiques trouvées dans un grand choix d'environnements, incluant les systèmes d'eau douce et marine [4]. Parmi les bactéries photosynthétiques, on trouve *Rhodobacter sphaeroides*, une candidate favorable à la production à grande échelle en raison de sa haute activité dans la production de l'hydrogène dans des conditions anaérobiques et de sa capacité d'employer une large variété de substrats, pour la croissance et la production de l'hydrogène. C'est la bactérie la plus prometteuse [1, 2, 5].

C'est dans ce cadre que s'inscrit notre sujet d'étude. Nous nous proposons de réaliser la photo- bioproduction d'hydrogène par *Rhodobacter sphaeroides* CIP 60.6. Pour ce faire, nous avons utilisé deux photobioréacteurs : L'un cylindrique, l'autre tubulaire ; c'est un plan enroulé en spirale que nous avons conçu au sein du Laboratoire des Biotechnologies Environnementales et Génie des Procédés à l'École Nationale Polytechnique d'Alger. Plusieurs paramètres ont été étudiés, dans le but d'optimisation, l'âge de la culture, l'intensité lumineuse, l'effet de l'environnement physiologique (pH et agitation) sur la production.

Ce mémoire est organisé en six chapitres :

Le premier chapitre présente les différentes sources et formes d'énergie, suivie d'une étude économique et environnementale ;

Le deuxième chapitre concerne l'hydrogène : vecteur énergétique ;

Le troisième chapitre est consacré à la bioproduction de l'hydrogène. Les différents microorganismes, leurs mécanismes de production, les inconvénients rencontrés, la rentabilité, les photobioréacteurs employés seront présentés ;

Le quatrième chapitre décrit la taxonomie, le métabolisme et le mécanisme de photosynthèse et de production de l'hydrogène par *Rhodobacter sphaeroides*, une bactérie pourpre photosynthétique non sulfureuse (PNS) ; ainsi qu'un ensemble de travaux scientifiques réalisés pour l'amélioration de la production de l'hydrogène ;

Le cinquième chapitre décrit le matériel et les méthodes utilisés. Nous présentons le plan opératoire tout en discutant le choix des conditions opératoires (milieu, Température, pH et source lumineuse) ;

Le sixième chapitre présente les résultats obtenus lors de la production photo biologique de l'hydrogène par *Rhodobacter sphéroïdes* CIP 60.6

I. Energie et développement durable

Tous les êtres vivants ont pour caractéristique essentielle, la croissance et la production, qui nécessitent de l'énergie [6].

Dans ce chapitre, nous présentons les sources d'énergies primaires utilisées aujourd'hui dans le monde, et abordons les problèmes actuels liés à l'énergie face à la situation mondiale et à son évolution.

I.1. Les différentes sources d'énergie primaire

Les énergies primaires sont des énergies naturelles non transformées [7].

Leurs sources dans le monde sont diverses, on distingue deux types de sources d'énergie primaires :

- Renouvelables ;
- Non renouvelables.

I.1.1. Ressources énergétiques renouvelables

Les ressources énergétiques renouvelables sont, à notre échelle de temps, celles qui sont dispensées continûment (avec des cycles réguliers) par la nature.

I.1.1.1. Le rayonnement solaire

1.1. Rayonnement solaire au sol

L'énergie reçue à la surface de la terre (au total $720 \cdot 10^{15}$ kWh) varie, par m^2 et par an, entre 900 kWh et $2300 \cdot 10^{15}$ kWh. Une grande partie est captée par les océans et peut être exploitée sous forme d'énergie thermique des mers soit environ $80 \cdot 10^{12}$ kWh, essentiellement dans les zones tropicales [7]. Les panneaux solaires, par le biais des cellules photovoltaïques, convertissent l'énergie lumineuse en électricité [8, 9].

1.2. L'ensemble des cycles hydrologiques

L'ensemble des cycles hydrologiques traite environ $360 \cdot 10^{12}$ kWh annuels. L'évaporation de l'eau (principalement des océans) conduit à des précipitations canalisées ensuite par les rivières et les fleuves. Les vents et la houle résultent également de ces cycles et constituent également une source d'énergie exploitable [7].

1.3. L'énergie hydraulique

La plus ancienne et la plus connue des applications de l'énergie hydraulique est le moulin à eau. Aujourd'hui les centrales hydroélectriques permettent de canaliser l'eau vers une turbine reliée à un alternateur et de générer de l'électricité. Selon leur taille, ces centrales peuvent alimenter des maisons ou être connectées à un réseau [10].

L'énergie hydraulique récupérable atteint $40 \cdot 10^{12}$ kWh et la valeur techniquement exploitable vaut, selon les estimations, entre 15 et $20 \cdot 10^{12}$ kWh (8kWh déjà estimés économiquement rentables).

1.4. L'énergie éolienne

L'énergie éolienne, également exploitée depuis longtemps (propulsion à voile, moulins à vent, pompes à eau) [9], représente une ressource énorme, $32 \cdot 10^{15}$ kWh/an, dont la part terrestre exploitable est estimée à $50 \cdot 10^{12}$ kWh/an.

Une grande partie se trouve « off-shore » ($100 \cdot 10^{12}$ kWh/an accessibles), en effet les vents soufflent beaucoup plus fort au large et, surtout, plus régulièrement [7].

1.5. L'énergie de la houle

L'énergie de la houle (due à l'action du vent sur la surface des mers et des océans) accessible est évaluée à $1 \cdot 10^{12}$ kWh/an. La puissance moyenne par mètre de front de vague possède des valeurs comprises entre 10 et 100 kW selon les sites.

1.6. Biomasse

Il s'agit du produit de la photosynthèse. La part renouvelable annuellement (environ 20%) de la biomasse représente une énergie d'environ $800 \cdot 10^{12}$ à $900 \cdot 10^{12}$ kWh. On estime que la part aisément exploitable atteint $60 \cdot 10^{12}$ kWh [7].

Elle couvre aujourd'hui une grande partie des besoins de chaleur, notamment dans les pays en voie de développement où le bois de chauffage participe à la déforestation. Une meilleure exploitation des sous produits de l'agriculture et une gestion durable des forêts devraient permettre son essor dans de nombreux pays. Mais, à de rares exceptions près, on ne fait pas rouler de voiture avec des fétus de paille [8, 9].

I.1.1.2. La géothermie

Le noyau terrestre en fusion dégage une énergie annuelle d'environ $300 \cdot 10^{12}$ kWh (flux géothermique variant de 0,05 à 1 W/m², ce qui est très faible par rapport au rayonnement solaire : plus de 10 000 fois plus). Les réserves exploitables avec les technologies actuelles sont d'environ $40 \cdot 10^9$ kWh en haute énergie (150 à 350°C, utilisée pour la production d'électricité) et $300 \cdot 10^9$ kWh en basse énergie (50 à 90°C pour le chauffage).

I.1.1.3. Les interactions gravitationnelles Terre-Lune-Soleil

Les marées résultent des interactions terre lune soleil. L'énergie annuelle dissipée dans les courants de marée représente environ $25 \cdot 10^{12}$ kWh. La partie exploitable est assez difficile à déterminer, dans les zones à forte marée présentant un étranglement, on l'estime entre $270 \cdot 10^9$ et $500 \cdot 10^9$ kWh. Mais on imagine aujourd'hui placer des turbines sous-marines à la façon des éoliennes qui permettent d'accroître le potentiel tout en réduisant les contraintes environnementales.

Il est à noter que ce ne sont pas forcément les sources les plus importantes en quantité qui sont les plus rentables ou les plus avantageuses. Les meilleures sources renouvelables dépendent de nombreux paramètres, notamment des particularités du site. Ainsi, toutes les sources évoquées trouvent des débouchés. Leur exploitation massive peut aussi être source de perturbation de l'environnement et/ou subir le refus de la population. L'énergie la moins coûteuse, notamment pour l'environnement restera toujours celle que l'on ne consomme pas !

Un trop faible rendement de conversion est parfois opposé aux systèmes de conversion des ressources renouvelables. Cette critique est généralement sans fondement ; en effet, lorsque l'on exploite des ressources renouvelables, un faible rendement est souvent gage d'une moindre perturbation [7].

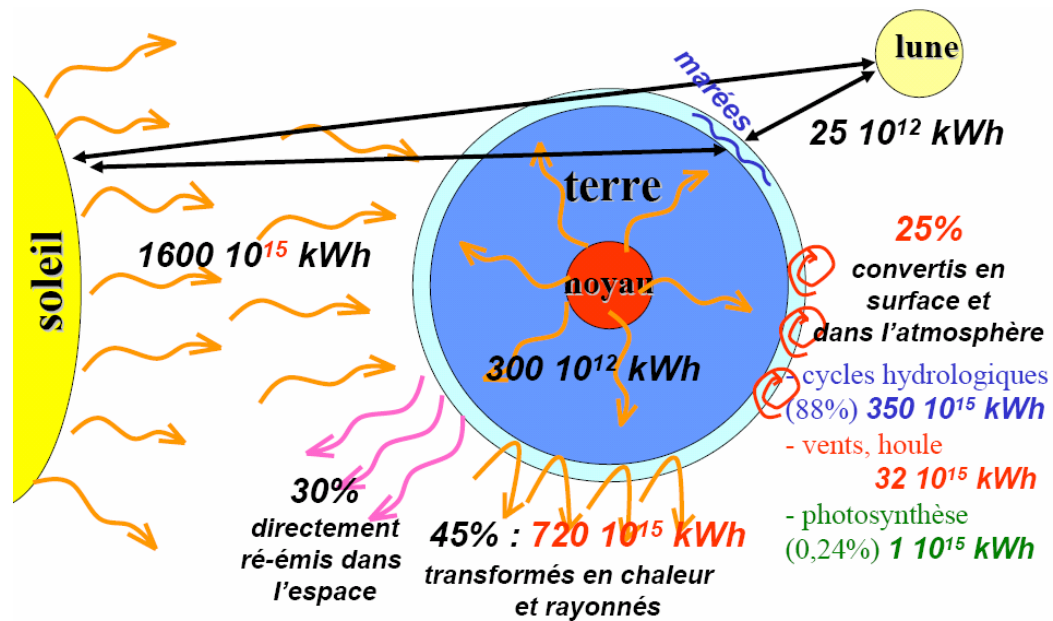


Figure I.1. Sources et répartition quantitative annuelle des énergies renouvelables [8]

I.1.1.4. Les déchets

C'est un véritable trésor, largement sous-exploité. Brûlés dans des incinérateurs, couplés à des centrales électriques, ou, plus écolo, fermentés dans des cuves de compostage industrielles pour produire l'électricité, les engrais « naturel » et les biocarburants [8]: Tout carburant issu de synthèse biologique actuelle par opposition aux carburants fossiles issus du pétrole, du gaz ou du charbon, est appelé biocarburant, on cite le bioéthanol, biogaz, bio-méthanol, biodiméthyléther et bio-hydrogène [11]. Ces déchets commencent à intéresser les états et les collectivités locales [8].

I.1.2. Ressources énergétiques non renouvelables

Les ressources énergétiques non renouvelables, comme leur nom l'indique, sont épuisables à notre échelle. Les carburants fossiles (charbon, pétrole, gaz naturel...) sont eux-mêmes issus de l'action du rayonnement solaire sur le carbone et la vie (photosynthèse) pendant des centaines de millions d'années.

Il s'agit d'une part des carburants fossiles : pétrole, charbon et gaz naturel, pour les plus connus et d'autre part des combustibles nucléaires pour la fission, aujourd'hui l'uranium. La biomasse mal exploitée et non renouvelée peut parfois s'inscrire également dans cette catégorie [7].

I.1.2.1. Pétrole

Le pétrole est un mélange d'hydrocarbures liquides issu de la décomposition d'anciens organismes marins. Sa formation est vieille de 65 à 225 millions d'années. Des restes de micro-organismes animaux et végétaux se sont accumulés au fond des océans pendant des millions d'années, et se sont mélangés à des sédiments pour former des roches mères. Avec le temps, elles se sont enfoncées dans l'écorce terrestre et ont subi des modifications dues à l'évolution des conditions du milieu. Des réactions chimiques complexes ont en effet été induites, menant à la formation du pétrole et de ses différents intermédiaires : kérogène (diagenèse, transformation biochimique), hydrocarbures liquides ou gazeux (catagenèse) puis azote et méthane (métagenèse, craquage des molécules d'hydrocarbures). Le pétrole brut formé est ensuite remonté vers la surface de la terre (ou sur le fond des océans). Lors de sa migration, il a pu être arrêté par des roches imperméables, et s'est alors concentré pour former des poches, réservoirs actuels de pétrole [10].

Pendant longtemps, la prospection pétrolière intensive (essentiellement basée sur des analyses géologiques permettant de détecter le pétrole dans les couches rocheuses souterraines) a révélé, en moyenne chaque année, l'équivalent de ce qui avait été consommé l'année précédente. Depuis 1970, la part du pétrole, dans le bouquet énergétique global, est passée de 45% de l'énergie primaire à environ 30% aujourd'hui, mais en valeur absolue sa consommation a doublé ! Depuis plus de 20 ans, nous consommons plus de pétrole que nous n'en découvrons. L'échéance d'exploitation, qui a reculé durant des décennies, approche désormais rapidement. Il en est de même pour le gaz et l'uranium. Toutes ces ressources ont constitué une solution de facilité (extraction, stockage...) et ont eu l'avantage d'un « faible » coût économique.

Les carburants fossiles représentent un enjeu politico-économique majeur et sont ainsi l'objet de convoitises permanentes, surtout le pétrole qui est aujourd'hui l'incontournable ressource dans le domaine des transports. Comme plus de 65% des réserves sont concentrées au Moyen-Orient, on comprend aisément les raisons des conflits à répétition qui s'y déroulent. Rappelons qu'en 2003, on envisageait un pétrole à 50\$ le baril pour 2050... L'augmentation des prix agit comme une contre réaction et permettra sans doute de ralentir la consommation, mais quoi qu'il en soit, les ressources iront en s'amenuisant et les prix poursuivront inexorablement leur croissance chaotique.

I.1.2.2. Charbon

Le charbon s'est formé il y a plus de 280 millions d'années, dans une atmosphère chargée en gaz carbonique, à partir de débris végétaux qui se sont accumulés, ont fermenté et ont été enfouis dans les sédiments.

Les réserves de charbon sont encore très importantes (surtout en Amérique du Nord, en Inde et en Chine) et leur exploitation va connaître probablement une forte croissance au cours de ce siècle. Mais cela ne sera possible qu'à condition de sérieusement dépolluer sa combustion. Des solutions industrielles de piégeage du CO₂ commencent d'ailleurs à émerger et pourraient créer une révolution dans le secteur énergétique... si les surcoûts restent compatibles avec le marché du moment. Car toutes les augmentations des coûts de production à partir des combustibles fossiles vont rendre plus compétitives les solutions à base de ressources renouvelables, par exemple le piégeage et le stockage du CO₂, envisagés dans les cas d'exploitation à grande échelle (par exemple en production d'électricité), pourraient coûter encore plus cher, de l'ordre de 70 € par tonne, ce qui serait encore pire économiquement [7].

I.1.2.3. Le gaz naturel

Issu de la transformation naturelle pendant des millions d'années de matières organiques, le gaz naturel, essentiellement composé de méthane, possède la même origine que le pétrole. Il peut être extrait directement d'un gisement ou issu du raffinage du pétrole grâce au procédé de distillation fractionnée. Le gaz naturel est la source d'énergie fossile qui a connu la plus forte progression depuis les années 70. Elle représente aujourd'hui le cinquième de la consommation mondiale et est la deuxième source d'énergie la plus utilisée après le pétrole (IEA, 2002) [10]. Sa facilité d'utilisation, sa propreté relative, ses avantages économiques (efficacité dans la production d'électricité) et écologiques font que le gaz naturel est l'énergie fossile la plus prometteuse de ce siècle [12]. Sa part devrait augmenter dans le bilan énergétique mondial en passant de 23% en 2000 à 27% en 2020. Les progrès technologiques améliorent constamment l'efficacité des techniques d'extraction, de transport, et de stockage. De plus, par rapport aux autres énergies fossiles, sa combustion a un faible impact sur l'environnement. Un inconvénient reste que le cours du gaz est soumis à des fluctuations importantes, plus ou moins indexé sur le cours du pétrole selon les pays [10].

I.1.2.4. Nucléaire

L'uranium 235 utilisé dans les réactions de fission nucléaire est issu de l'uranium naturel lui-même épuisable, mais il y est contenu en très faibles proportions (0,7%) [7].

Même en considérant la valeur ultime de 6 millions de tonnes (actuellement acceptée), la valeur énergétique des ressources en uranium (en fissionnant l'isotope 235, réacteurs EPR) ne pourra jamais satisfaire qu'une faible part des besoins mondiaux. En effet, la fission nucléaire ne représente aujourd'hui qu'une part d'environ 7% de la consommation primaire mondiale. Si l'on devait actuellement doubler la production mondiale d'électricité d'origine nucléaire, les ressources ultimes seraient épuisées en moins de 40 ans... [8]

D'après la banque Scotia, les prix devraient dépasser 40 \$US la livre d'ici la fin de 2006, approchant ou dépassant le pic historique de 43,4 \$US atteint en mai 1978. Quant à l'uranium 238, très abondant dans l'uranium naturel (99%), il est transformable en matière fissile dans les réacteurs à neutrons rapides (surgénérateurs). Il offrirait, si les surgénérateurs fonctionnaient à l'échelle industrielle, une réserve de 80.10^{15} kWh (7000 Gtep). Mais il faudrait d'abord que cette technologie soit réellement sûre et économique, ce qui est encore loin d'être le cas. En outre, elle continuerait à produire des déchets dangereux [7].

I.1.2.5. La fusion

La fusion est censée nous libérer à la fois des problèmes de ressources et de déchets. Mais les ressources ne sont de toute façon pas illimitées et les déchets risquent fort d'être au rendez-vous car les matériaux très fortement irradiés du réacteur nécessiteront des remplacements fréquents et constitueront à leur tour des déchets. Enfin, il n'est en tout cas pas évident que cette filière atteindra un jour la maturité industrielle car les problèmes fondamentaux et technologiques sont très loin d'être résolus [7,8].

I.2. Les différentes formes d'énergie

L'énergie est une entité multiforme qui peut se transformer sous de très divers aspects. Toute fois, les sources énergétiques constituent ce que l'on appelle le mix ou le bouquet énergétique, (Figure I.2)

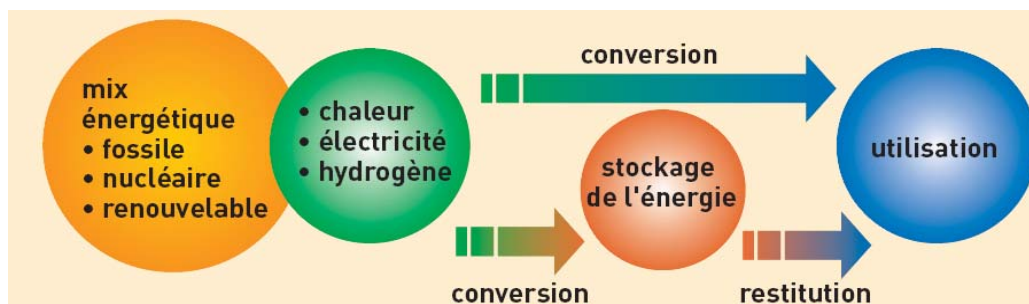


Figure I.2. Le schéma énergétique [13]

Le transport d'énergie est assuré par l'intermédiaire des vecteurs énergétiques. A l'heure actuelle, les deux principaux vecteurs sont l'électricité et la chaleur. Mais demain un nouveau vecteur pourrait devenir prépondérant : L'hydrogène qui serait convertie en électricité et en chaleur grâce aux piles à combustion [13].

Pour la plus part des applications, il est nécessaire de convertir l'énergie afin de la rendre compatible avec l'usage envisagé. Bien évidemment la nature, très ingénieuse, a mis au point les tout premiers « convertisseurs énergétiques » qui sont les être vivants, telles que les plantes, les algues et les bactéries qui assurent la conversion de l'énergie rayonnante en une énergie chimique (Figure I.3).

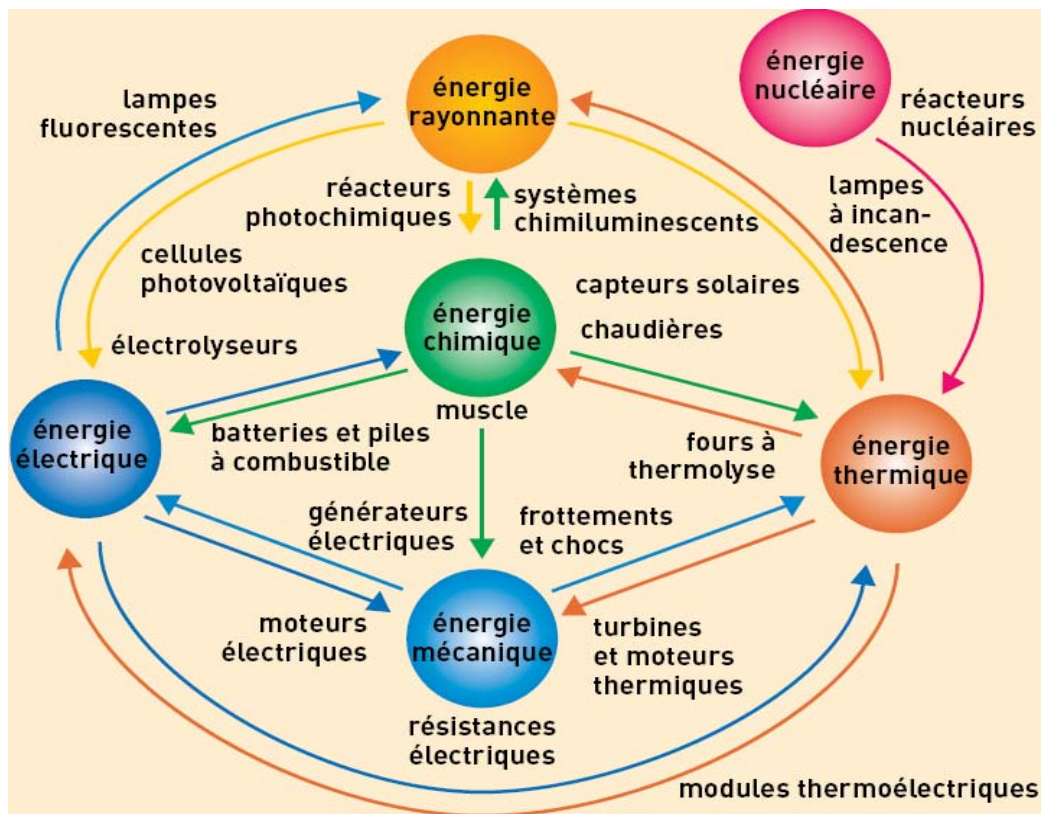


Figure I.3. Conversion des six principales formes d'énergie [13].

I.3. Aspect économique

Le 20ème siècle aura, sans doute, été celui de la prise de conscience planétaire, notamment des limites des capacités de la terre suite à l'épuisement des ressources énergétiques non renouvelables qui ont servi au développement de la civilisation industrielle actuelle.

La flambée des coûts, déjà amorcée et qui va sans doute s'amplifier, conduira à changer de ressources pour se tourner vers des solutions moins coûteuses : celles d'origine renouvelable !

Sur les 12 Gtep consommés, plus de 80% sont d'origine non renouvelable, (Figure I.4). La part non commerciale de l'énergie (biomasse), rarement prise en compte dans les documents officiels, est considérée ici. Elle représente très approximativement 12% de l'énergie primaire au niveau mondial, mais sa part atteint 40 à 90% dans les pays en voie de développement. Le taux de croissance global est actuellement de 1,8% par an [7].

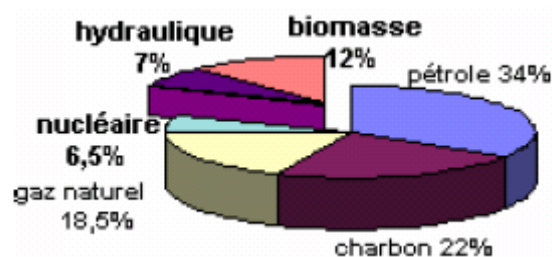


Figure I.4. Origine des ressources primaires satisfaisant les besoins énergétiques actuels [7,8].

Nous avons maintenant conscience qu'un raisonnement à l'échelle planétaire est indispensable bien que ce soit souvent à l'échelle des nations que peuvent se prendre les décisions politiques et à l'échelle des citoyens que les pratiques peuvent influencer nos modes de consommation, (Figure I.5) [8].

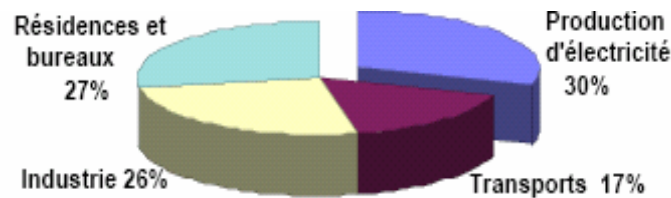


Figure I.5. Répartition par mode de la consommation mondiale d'énergie primaire [7].

Nous avons vu précédemment que la consommation planétaire annuelle d'énergie primaire, aux alentours de l'an 2000, était de 140.10^{12} kWh. Bien que les scénarios mondiaux soient nombreux (Agence Internationale de l'Energie, Conseil Mondial de l'Energie...), ils s'accordent tous pour prévoir une croissance de la consommation mondiale, croissance qui sera plus ou moins forte selon les options prises : plus environnementales ou plus économistes [7].

Les principales projections pour les marchés globaux des énergies fossiles dans le monde énergétique sont d'assurer une balance continue entre l'alimentation et la demande avec un prix modéré. Les réserves actuelles sont approximativement, 50 ans pour le pétrole, 70 ans pour le gaz et 300 ans pour le charbon [14].

Cependant ces dernières années, les prévisions de croissance énergétique ont été revues à la baisse, ce qui pourrait refléter un début de prise de conscience. On commence notamment à comprendre que les diverses pollutions vont coûter très cher et que les changements énergétiques (modes de production et consommation) peuvent être générateurs de nouvelles richesses et d'emplois [7].

I.4. Aspect environnemental

La température de notre planète résulte de l'équilibre entre le flux de rayonnement qui lui parvient du soleil et le flux du rayonnement infrarouge envoyé vers l'espace. Le phénomène d'effet de serre est lié à la présence dans l'atmosphère de certains gaz, qui piègent ce rayonnement émis par la terre, et retiennent ainsi la chaleur du soleil. Cela permet à notre planète de garder une température moyenne de 15°C . Sans effet de serre, la température moyenne à la surface de la Terre serait de -18°C , il nous protège également des rayonnements dangereux du Soleil et notamment des ultraviolets. Les gaz responsables de l'effet de serre sont essentiellement la vapeur d'eau, le méthane (CH_4), le gaz carbonique (CO_2), l'oxyde nitreux (N_2O), l'ozone troposphérique (O_3) et divers aérosols [15].

Une extraordinaire corrélation entre la consommation de carburants fossiles et la concentration de CO_2 dans l'atmosphère a été démontrée et constitue l'une des preuves les plus tangibles de l'impact des activités humaines [8].

Les manipulations énergétiques des humains conduisent à l'épuisement de précieuses ressources naturelles ainsi qu'à de violentes pollutions dont les rejets de gaz à effet de serre. Il ne subsiste aujourd'hui plus beaucoup de doute sur le fait que les activités humaines [7], dont la combustion massive (de l'ordre de 80%) et des combustibles fossiles [16], sont responsables d'une très sensible augmentation de l'effet de serre naturel, c'est-à-dire d'un accroissement de la température moyenne à la surface du globe [7], d'environ $0,6^{\circ}\text{C}$ au cours du 20ème siècle. La plupart des modèles prévoient que le double de la concentration de CO_2 actuelle conduirait, à la fin du 21ème siècle, à une élévation de la température de l'ordre de 2 à 3°C , avec des conséquences sur l'environnement telles que :

- la fonte des glaces polaires ;
- la montée du niveau de la mer ;
- la modification des courants marins ;
- l'augmentation des précipitations... [15].

II. L'hydrogène : vecteur énergétique

Le thème de l'économie de l'hydrogène est devenu dans ces cinq dernières années l'une des questions les plus débattues dans les milieux spécialisés de l'énergie [17]. Il est considéré comme :

- Un vecteur énergétique le plus apte à répondre aux exigences socioéconomiques, environnementales et industrielles actuelles indemnes de toute pollution [18] ;
- Un potentiel substitutionnel des fuels fossiles.

Généralement, presque tout l'hydrogène produit est lié à la conception des fuels fossiles [19]. Pour autant d'anticipation de nouveaux systèmes énergétiques, plus conviviaux pour l'environnement naturel, comprenant une place importante de l'hydrogène-énergie, ne semble pas faiblir de moins si on tient à la rivalité entre les états unis, japon et l'Union Européenne dans leurs programmes de recherche et développement pour l'hydrogène [17]. Cependant et si l'hydrogène remplace les fuels fossiles, il sera le carburant de l'avenir, si l'on veut contribuer à la sauvegarde de l'environnement [18].

L'hydrogène se présente aujourd'hui comme un candidat potentiel en tant que vecteur d'avenir. Les enjeux d'une future société « hydrogène » et l'état de l'art concernant les techniques et technologies associées à l'hydrogène, de sa production à son utilisation, sont donc l'étude dont fait l'objet ce chapitre.

II.1. Découverte

Il n'est pas inutile de rappeler que l'hydrogène a déjà vécu une histoire importante en tant que vecteur énergétique. Celle-ci a commencé peu après sa découverte par Cavendish, en 1766, et avant même qu'il soit baptisé par Lavoisier, en 1787.

II.2. Propriétés

L'utilisation d'hydrogène est très demandée comme milieu de stockage d'énergie, il est donc nommé « l'hydrogène économique » [20], vu ses propriétés, dont on cite :

- L'hydrogène moléculaire est un élément très abondant dans l'univers, il constitue les trois quarts de toutes les matières. L'atmosphère contient 0.07% d'hydrogène, alors que la surface de terre contient 0.14% d'hydrogène [16]. L'atome d'hydrogène, sous forme d'eau, est très abondant sur terre ;
- Sa molécule est la plus énergétique ; 120Mj/Kg, soit 2,2 fois le gaz naturel. L'hydrogène a un contenu énergétique de 39.4 W/kg, tandis que le charbon, selon sa forme, oscille dans la fourchette 7.8-8.7 KWh/Kg, soit environ 5 fois moins par unité de masse [18]. ;
- C'est le plus léger des gaz, ce qui est un facteur positif vis-à-vis de sa capacité énergétique par rapport à son poids comparé aux autres fuels [20] ;
- Il n'est ni polluant, ni toxique;
- En dehors d'une situation dite « confinée », c'est à dire emprisonner avec de l'air dans un volume fermé, l'hydrogène est moins dangereux que le gaz naturel.
- Ses modes de production sont variés et il est le combustible idéal des piles à combustible, le moyen le plus efficace pour convertir l'énergie chimique en énergie électrique [18,20].
- L'hydrogène produit à partir des énergies renouvelables semble être la solution parfaitement compatible avec l'environnement tenant compte de son caractère inépuisable et des avancés techniques et technologiques qui améliorent sa performance et sa compétitivité [6].

Cependant l'hydrogène présente également des inconvénients : il est explosif, particulièrement inflammable dans l'air, et c'est aussi un gaz d'une faible densité conduisant à une dispersion rapide dans l'atmosphère, ce qui implique que son stockage sous forme gazeuse est délicat [15].

II.3. Les enjeux

L'approvisionnement futur en énergie est confronté au triple problème :

- De l'épuisement et/ou du renchérissement des hydrocarbures fossiles ;
- De l'environnement ;
- Des problèmes de sécurité d'approvisionnement.

L'hydrogène apparaît comme un bon candidat « un vecteur énergétique du futur » car il est adapté :

- A la plupart des sources d'énergie primaire pour sa production (des hydrocarbures fossiles jusqu'aux sources renouvelables et nucléaires pour le long terme);
- Comme source d'énergie chimique idéale pour les piles à combustibles, les moteurs thermiques et dans le domaine de la dépollution [21].

II.4. La production d'hydrogène

Deux grands modes de production d'hydrogène existent à ce jour, ou sont en cours de développement. Elles sont basées sur l'utilisation :

- Des combustibles fossiles ;
- Ou encore des énergies renouvelables.

Les différents procédés pouvant être mis en œuvre varient en terme de matière première, de complexité, de rendement, de pureté et de coût de l'hydrogène obtenu.

II.4.1. La production d'hydrogène à partir des énergies fossiles (non renouvelables)

La voie la plus commune de production de l'hydrogène repose sur l'utilisation des ressources fossiles, et plus spécifiquement des hydrocarbures. Actuellement, 48% de l'hydrogène mondial est produit à partir du gaz naturel, 30% à partir du pétrole (la plupart du temps consommé dans les raffineries) et 18% à partir du charbon [10].

4.1.1. Le reformage du gaz naturel

A l'heure actuelle, la méthode de production de l'hydrogène la plus courante est cependant le reformage du gaz naturel, essentiellement composé de méthane, qui consiste à convertir ce dernier grâce à de la vapeur d'eau [17] et de la chaleur, en plus du nickel qui joue le rôle de catalyseur :



Le produit résultant de cette réaction est connu comme gaz de synthèse ou syngaz, car il peut être utilisé pour la préparation de plusieurs produits commerciaux tels, l'ammoniac, le méthane et plusieurs autres produits.

Pour augmenter le taux de conversion, un reformage de la vapeur d'eau avec le monoxyde de carbone «Le vaporeformage » est réalisé à travers la réaction de conversion du gaz à l'eau [20] :



Il s'agit d'une technique bien maîtrisée et communément utilisée, avec un rendement énergétique élevé, de l'ordre de 80%. Bien que ce ne soit actuellement pas le cas, utilisée en mode de production stationnaire cette technique permettrait en principe le captage à la source du CO_2 . A terme, elle ne réglerait cependant pas l'épuisement des réserves fossiles [17]. Ce processus n'est pas environnementale vue le taux d'émission du CO_2 [20].

4.1.2. Gazéification et cokéfaction du charbon

La plus ancienne méthode est bien la gazéification du charbon [20], il sera converti en un mélange gazeux contenant de l'hydrogène 60%, CO , CO_2 , NH_3 et quelques fois de l'azote.

La cokéfaction du charbon, consiste à éliminer les matières volatiles du charbon par sa distillation (pyrolyse) dans des fours, à 1100-1300°C pendant 16-20h, par les gaz à combustion [6]. En général, les gaz majoritaires sont l'hydrogène, le méthane et le monoxyde de carbone, typiquement 50, 35 et 08% respectivement.

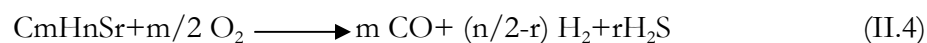
Alternativement, quant le charbon réagit avec la vapeur d'eau « Hydro-gazéification », la réaction se déroule ainsi :



La combustion du charbon ou du coke dans l'air est trop exothermique, elle est approximativement de l'ordre de 1200°C. La valeur calorique résultante dépend du gaz utilisé, soit l'oxygène pur ou le mélange air oxygène [20].

4.1.3. L'oxydation partielle des fuels fossiles

On utilise un procédé thermique qui consiste à oxyder partiellement des hydrocarbures (gaz naturel, pétrole brut, ...) à une température de 1100-1500°C, sous quelques bars de pression 60-80bars, en présence de modérateurs de température (azote, vapeur d'eau, dioxyde de carbone) [6,20]. La réaction se déroule ainsi [6] :



4.1.4. Craquage catalytique des hydrocarbures

L'hydrogène peut être également produit par une décomposition thermo-catalytique directe (craquage) des hydrocarbures [20].

Le craquage catalytique s'applique, à des charges qui sont des distillats, sous vide et à une température de 500°C en présence de catalyseurs fluides tel, le silicate d'alumine en poudre, dans un réacteur fluidisé où, on convertie les hydrocarbures lourds en produits légers : gaz liquéfié et carburants à indice d'octane élevé. Le gaz obtenu renferme environ 20% d'hydrogène, à savoir qu'un mélange gazeux air-oxygène augmente le taux de production d'hydrogène [6,20].

4.1.5. Déshydrogénation d'éthyle benzène

Lors de la fabrication du styrène par déshydrogénation de l'éthyle benzène, on produit un gaz riche en hydrogène 85% [6].

4.1.6. Reformage solaire- thermal des fuels fossiles avec le dioxyde de carbone

Ce processus offre une grande efficacité thermique et une importante réduction d'émission du dioxyde de carbone. Cependant, les émissions peuvent être sous forme concentrées et elles sont donc très disposées à la séquestration (Figure II.1) [20].

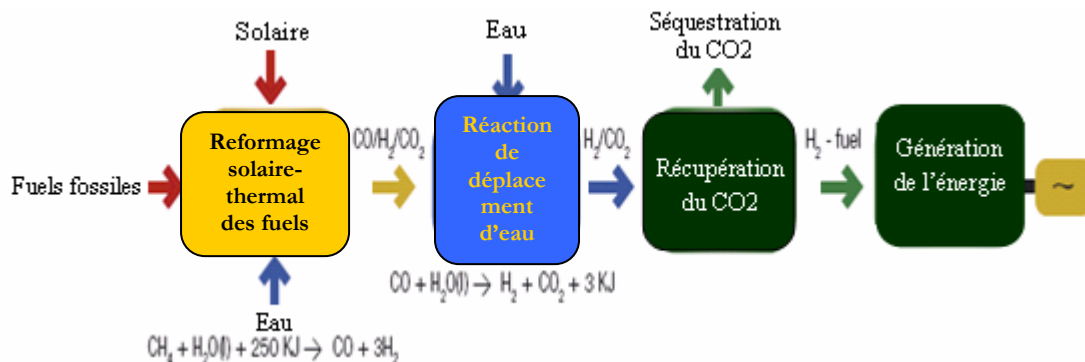
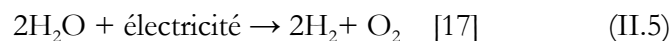


Figure II.1. Reformage solaire- thermal des fuels fossiles avec le dioxyde de carbone [20]

II.4.2. L'électrolyse

L'électrolyse de l'eau permet le stockage d'énergie électrique, sous une forme chimique stable qui, le moment voulu, peut à nouveau être transformée en électricité ou en chaleur.



L'efficacité nette de la production d'hydrogène en utilisant l'électricité générée à partir des sources fossiles est de l'ordre de 40-50%. Cependant, avec les avancées et la compatibilité de l'électrolyse de l'eau avec les futures technologies de génération d'électricité, il est devenu possible d'atteindre une efficacité de 90% [20].

L'électricité obtenue par des énergies renouvelables permet de générer de l'hydrogène par électrolyse, comme celle obtenue de l'énergie lumineuse par les cellules photovoltaïques (Figure II.3).

II.4.3. La production de l'hydrogène à partir des énergies renouvelables

L'hydrogène produit à partir d'énergies renouvelables peut être considéré comme le type même de système énergétique propre et neutre pour l'environnement. Énergie solaire, énergie éolienne, énergie hydraulique peuvent être utilisées indirectement pour produire l'hydrogène.

4.3.1. La production de l'hydrogène à partir de l'eau

L'eau est une autre forme de stockage de l'hydrogène. Ce mode de production nécessite de l'énergie électrique, chimique, lumineuse ou thermique qui elles même étaient produites à partir des énergies renouvelables. Selon l'énergie utilisée, on distingue les modes de production suivants :

4.3.1.1. Photoélectrolyse

La photoélectrolyse de l'eau est un processus à travers lequel la lumière est directement utilisée pour la décomposition de l'eau en hydrogène et en oxygène. Cette méthode nécessite des semi-conducteurs sensibles à la lumière « cellule photo électrochimique » en jonction avec l'eau à décomposer [22], (Figure II.2).

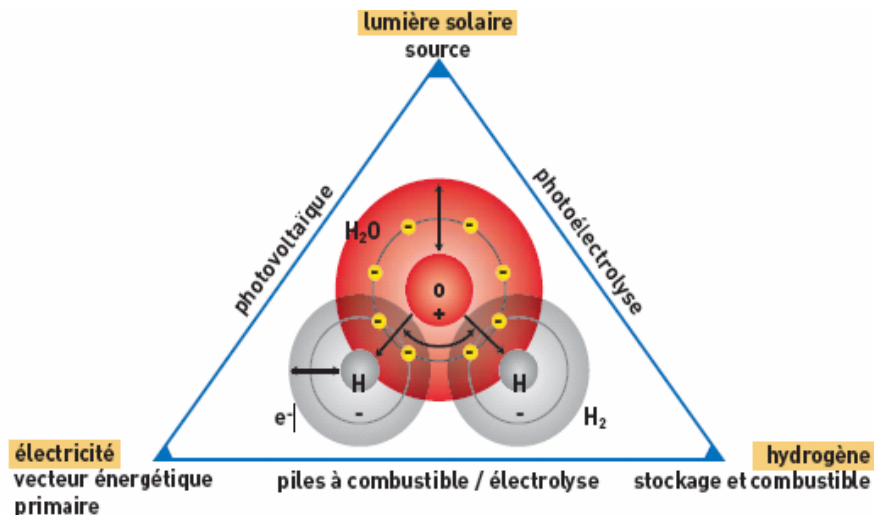


Figure II.2. Triangle énergétique [13]

4.3.1.2. La thermolyse

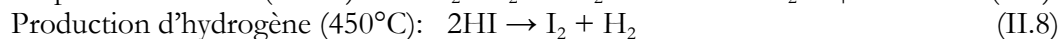
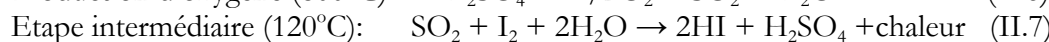
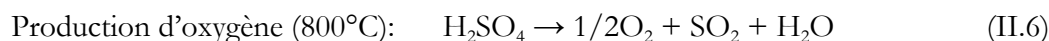
La thermolyse de l'eau est une réaction hautement endothermique. A 1500°C la vapeur d'eau commence à se dissocier en hydrogène et en oxygène ; cette production augmente avec la diminution de pression. Pour une complète dissociation d'eau (100% d'efficacité), la température doit être excessive, elle est de l'ordre de 3200°C. L'utilisation de catalyseurs, pour cette production, permet de réduire la température.

Il est possible d'atteindre une efficacité de 20% pour la conversion de l'énergie solaire. Les radiations reçues par les panneaux solaires peuvent être séparé en radiation d'infrarouge, générant une température d'au moins 300°C et des radiations visibles / UV qui ont un effet de décomposition de l'eau et production d'hydrogène.

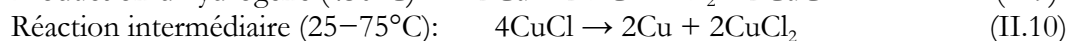
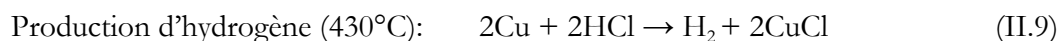
4.3.1.3. Cycles thermochimiques

C'est une méthode à la fois exo et endothermique, présentant une efficacité de 40-50%. Ce processus se déroule de la manière suivante [20]:

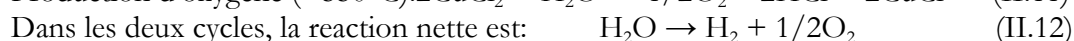
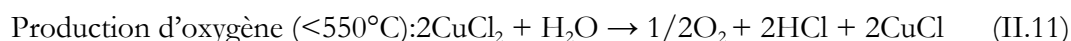
- **Cycle d' Iode de soufre**



- **Cycle de Chlore de cuivre**



La réaction (II.9) est un processus électrochimique qui prend place dans le milieu aqueux.



4.3.2. La production biologique d'hydrogène

La photosynthèse reste la principale source d'énergie pour l'humanité [13], elle est la base de toute vie sur terre. Au cours de ce processus l'eau ou le substrat carboné sera décomposé pour la production d'hydrogène qui à son tour sera mixé avec le dioxyde de carbone pour la production

de carbohydrates [20]. Cependant, l'énergie solaire constitue le moteur de cette production [13]. Ce mode de production s'inscrit dans notre cadre d'étude, il sera abordé en détails dans les chapitres suivants.

II.5. Stockage et transport de l'hydrogène

II.5.1. Stockage

Selon les contraintes liées à son rythme de production, à son transport et à son utilisation, différentes méthodes de stockage de l'hydrogène sont envisageables (compression, liquéfaction, stockage en hydrures), chacune avec ses propres avantages et inconvénients. Etant donné la très faible densité de l'hydrogène, elles font les unes et les autres l'objet de consommations énergétiques non négligeables [17].

5.1.1. Stockage à l'état gaz (compression)

Le stockage du gaz comprimé est utilisé depuis plus de 100 ans. Les matériaux fréquemment utilisés dans la construction de bonbonnes et de contenants à haute pression sont le fer, l'aluminium et les matériaux composites. Ces pressions se situent typiquement entre 207 bars et 690 bars.

5.1.2. Stockage à l'état liquide

La liquéfaction de l'hydrogène se produit en refroidissant le gaz sous son point d'ébullition à (-252.7°C). On peut donc éliminer le problème de l'utilisation de gaz sous pression en le stockant sous forme de liquide cryogénique. Le stockage cryogénique de l'hydrogène permet son transport par camion, train et bateau. Plusieurs procédés industriels utilisent l'hydrogène livré sous forme liquide.

5.1.3. Stockage à l'état mélange liquide/solide

L'hydrogène liquide brusquement soumis à un vide s'évapore en se refroidissant, pouvant entraîner une baisse de température sous son point de fusion (-259.2°C). Ceci provoque une solidification partielle. Le mélange de solide et de liquide qui en résulte en un stockage plus dense d'hydrogène augmente sensiblement sa densité énergétique volumétrique.

5.1.4. Hydrures métalliques

Les hydrures métalliques permettent de stocker les atomes d'hydrogène dans des espaces interatomiques d'une matrice constituée d'un métal granulaire. Différentes méthodes peuvent être utilisées et à cette effet, l'hydrogène est libéré en réchauffant la matrice ; de tels systèmes sont fiables et compacts, mais souvent chers et lourds [6].

II.5.2. Transport

Dans le cas d'une méthode de production centralisée il se pose enfin la question du transport et de la distribution de l'hydrogène qui peut se faire soit par : Pipeline ; bateaux ; camions. Pour lequel d'importants investissements doivent également être engagés [17].

II.6. Les applications de l'hydrogène

L'hydrogène peut être utilisé dans plusieurs domaines, à savoir :

II.6.1. Transport

L'utilisation de l'hydrogène comme carburant automobile est une alternative très sérieusement étudiée. Pour les moteurs à combustion interne, il semble peu avantageux en termes de consommation d'énergie et de rejet de polluants. En effet, l'hydrogène est capable de produire de la chaleur par combustion directe mais cette réaction génère de l'eau et de l'oxyde d'azote. Il apparaît plus intéressant d'utiliser l'hydrogène dans les piles à combustible, pour produire de l'électricité, avec comme seul résidu de l'eau.

Associé aux piles à combustible, l'hydrogène pourrait :

- remplacer le couple classique hydrocarbures/système de combustion des moteurs, soit une véritable rupture technologique et économique ;
- renforcer l'indépendance énergétique des pays importateurs en rompant le monopole des hydrocarbures comme source d'énergie dans les transports ;
- limiter les émissions de gaz à effet de serre.

De plus, l'utilisation de la pile à combustible dans le domaine des transports contribuera aussi à :

- améliorer la qualité de vie en ville, grâce au silence des véhicules et à la suppression des émissions polluantes locales (NOx, particules...) [10].

Plusieurs fabricants automobiles importants ont déjà développé des prototypes de véhicules fonctionnant à l'hydrogène [23].

II.6.2. Pile à combustible

La prise de conscience des conséquences écologiques de la consommation mondiale d'énergie à accélérer la recherche des technologies de conversion de l'énergie [6].

C'est en 1839 que le gallois William Grove concrétisa le principe de la pile à combustible, il est généralement décrit comme l'inverse de celui d'une électrolyse. Plus précisément, il s'agit d'une combustion électrochimique contrôlée d'oxygène et d'hydrogène, avec production simultanée d'électricité, d'eau et de chaleur, selon une réaction chimique globale universellement connue :



Cette réaction s'opère au sein d'une structure essentiellement composée de deux électrodes (l'anode et la cathode) séparées par un électrolyte (Figure II.3) ; elle intervient dans une gamme de température de 70 - 1000°C. Selon le niveau de température retenu, la nature de l'électrolyte et des électrodes, les réactions chimiques intermédiaires mises en jeu varient mais le principe général est inchangé [24].

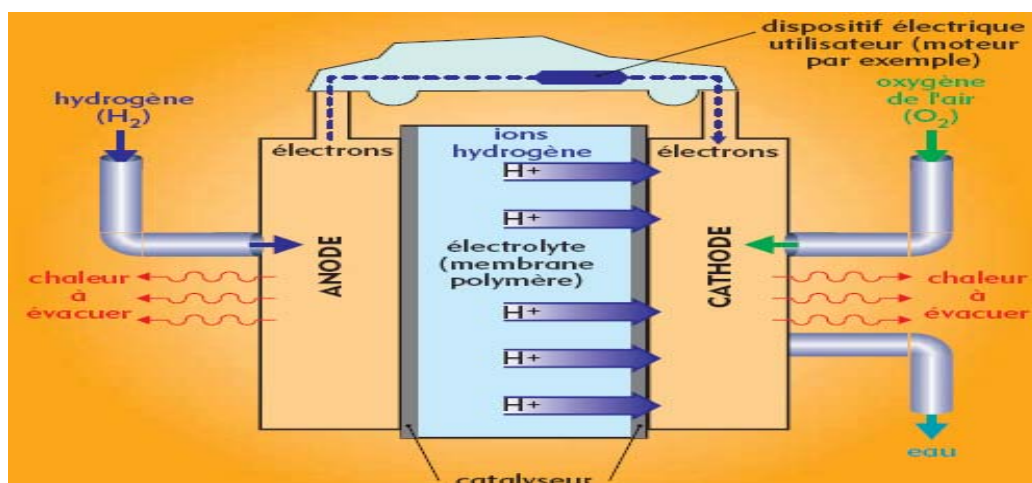
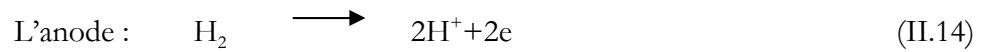


Figure II.3. La pile à combustible [24]

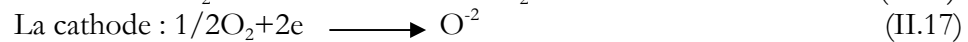
Les principales piles utilisées actuellement sont :

- Les piles à électrolytes solides (PEMFC : pile à membrane échangeuse de protons) qui fonctionnent à 80°C avec un électrolyte en polymère [10], selon ces deux réactions [24] :



La technologie PEMFC a été retenue pour équiper les véhicules de l'avenir et concentrer actuellement la plus grande part des efforts de recherches et de développements dans le monde.

- Les piles à oxyde solide (SOFC) sont quand à elles destinées aux applications stationnaires, et permettent d'utiliser directement le gaz naturel sans reformage, grâce à une température de fonctionnement élevée (de l'ordre de 800°C) [10], comme suit [24] :



Le rendement global de ces dernières pourrait atteindre 80%. Les obstacles au développement des piles à combustibles restent essentiellement d'ordre technologique (miniaturisation, usure rapide des matériaux, amélioration des rendements, baisse des coûts de fabrication). De nombreux progrès ont déjà été réalisés, et sont encouragés par l'annonce de l'utilisation de l'hydrogène dans un proche avenir [10].

II.6.3 Autres utilisations

L'usage de l'hydrogène est très demandé dans l'industrie des procédés chimiques (production d'ammonium, de HCl et de méthanol), de pétrochimie (convertir le pétrole d'une basse qualité en fuels), plastiques, de métaux et de verre. La valeur élevée de sa chaleur spécifique fait que l'hydrogène est utilisé dans les pompes à chaleur ainsi que dans les processus de refroidissement et de transfert de chaleur [6,20].

III. La bioproduction de l'hydrogène

La production biologique d'hydrogène, se caractérise par un processus environnemental inoffensif, réalisé dans des conditions opératoires douces, avec des ressources renouvelables.

Les microorganismes photosynthétiques comme les bactéries pourpres, les cyanobactéries et les algues ou encore comme les microorganismes fermentaires comme *E.coli* et *E aerogenes* sont utilisées pour la production de l'hydrogène [19]. Il est donc apparu primordial de développer une recherche relative à la production de l'hydrogène [18] par plusieurs laboratoires dans le monde.

III.1. Les microorganismes producteurs de l'hydrogène

III.1.1. Les microorganismes photosynthétiques

Les algues et certaines bactéries utilisent la photosynthèse pour convertir l'énergie solaire en énergie chimique, dont l'apport est indispensable au monde vivant [25].

La production de l'hydrogène, chez ces microorganismes photosynthétiques, est un phénomène complexe qui implique de nombreuses réactions métaboliques. Ces organismes sont capables d'utiliser l'énergie lumineuse pour convertir les composés de réserves endogènes, les substrats exogènes ou l'eau en hydrogène. Ils possèdent en effet diverses enzymes, hydrogénases et/ou nitrogénases, qui peuvent interagir avec certains transporteurs d'électrons impliqués dans la chaîne photosynthétique, pour réduire les protons en hydrogène moléculaire.

La production d'hydrogène photobiologique met en jeu une partie des mécanismes du processus de la photosynthèse oxygénique ou anoxygénique, respectivement chez les cyanobactéries/microalgues et les bactéries photosynthétiques. Ces dernières utilisent la lumière et le carbone organique (photofermentation), tandis que les cyanobactéries et les microalgues peuvent utiliser la lumière et le CO₂ comme seule source de carbone pour produire de l'hydrogène (photolyse de l'eau directe ou indirecte), en conditions d'anaérobiose [10].

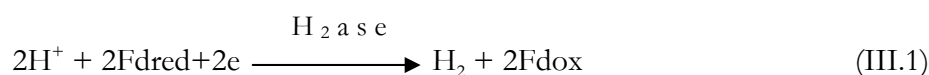
III.1.1.1. Les microalgues et les cyanobactéries

1.1.1. Les algues vertes

Les algues vertes sont des organismes eucaryotes photoautotrophes oxygéniques. L'appareil photosynthétique et les voies métaboliques sont similaires à ceux des plantes. La photosynthèse nécessite les chloroplastes qui constituent les photosystèmes PSI et PSII et les complexes pigments- protéines contenant la chlorophylle a et b. Les algues sont très abondantes sur terre, principalement dans les eaux douces et les eaux de mer [26].

En 1942, Gaffron et Rubbin étaient les premiers à avoir observé la production de l'hydrogène par les algues vertes, *Scenedesmus obliquus*, après une phase d'anaérobiose. Elles décomposent la molécule d'eau en hydrogène et en oxygène (biophotolyse directe).

L'enzyme impliqué dans cette réaction est une Fe-hydrogénase [16, 27,28] (Figure III.1) ; à titre d'exemple nous citons *Chlamydomonas reinhardtii*. La réaction s'écrit comme suit [27, 28] :



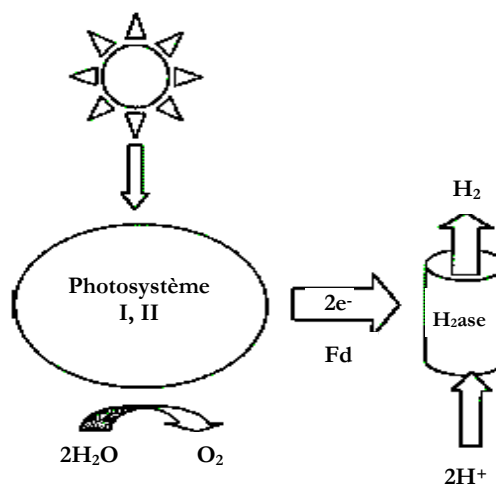


Figure III.1. Biophotolyse directe [27]

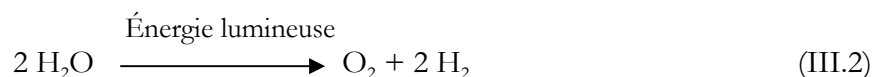
Cette hydrogénase étant extrêmement sensible à l' O_2 , elle n'est donc active qu'en conditions anaérobies. Une fois activée, elle est capable d'utiliser le pouvoir réducteur produit par la photosynthèse et donc d'induire un dégagement d' H_2 à la lumière. Cette production s'accompagne d'un dégagement d' O_2 ; la production d' H_2 photoinduite est rapidement inhibée et se limite donc en conditions normales à un phénomène transitoire [29].

1.1.2. Les cyanobactéries

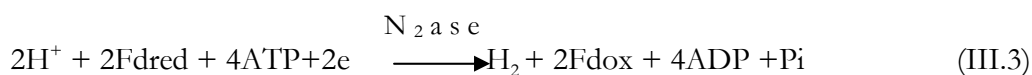
Les cyanobactéries représentent un large groupe de microorganismes photoautotrophes dont beaucoup sont capables de fixer l'azote atmosphérique. Les évidences fossiles ont déterminé que les cyanobactéries existent depuis 3 milliards d'années et sont donc les premiers à avoir produit l'oxygène sur terre. L'appareil photosynthétique est similaire à celui des chloroplastes et la différence principale est le système pigmentaire. Les cyanobactéries dépendent de la chlorophylle a et du complexe protéique phycobilines, caroténoïdes ainsi que de l'énergie lumineuse ; ils ne contiennent pas de chlorophylles b [26].

Chez ces cyanobactéries fixatrices d'azote, comme chez les bactéries photosynthétiques, la production d'hydrogène est principalement associée à la nitrogénase et l'hydrogène produit est souvent dégradé par une hydrogénase « uptake » associée. Une hydrogénase réversible permettant l'oxydation ou la synthèse de l'hydrogène est présente, cependant les réactions catalysées par les hydrogénases chez les cyanobactéries et bactéries photosynthétiques ne sont généralement pas en faveur de la production d'hydrogène. Il faut préciser que les hydrogénases chez les cyanobactéries sont de type Ni/Fe.

Le pouvoir réducteur et l'énergie (ATP) nécessaires à la formation de l'hydrogène par la nitrogénase sont fournis directement par les réactions liées à la lumière. L'énergie lumineuse captée par les organismes permet l'induction d'une réaction de dissociation des molécules d'eau et d'un transfert d'électrons au travers de la chaîne photosynthétique qui s'accompagne d'un transfert de protons. La force protomotrice ainsi créée est à l'origine de la synthèse d'ATP. L'équation de la réaction de ce processus (biophotolyse directe) est la suivante [30] :



La production d'hydrogène par biophotolyse chez les cyanobactéries fixatrices d'azote est catalysée par la nitrogénase selon la réaction suivante [28] :



Les enzymes productrices d'hydrogène étant fortement sensibles à l'oxygène, et l'oxygène étant un produit de la photosynthèse oxygénique, certains organismes ont développé des stratégies temporelles pour se protéger de l'inactivation. Certaines cyanobactéries séparent physiquement le dégagement d'oxygène et l'activité de la nitrogénase. On rencontre chez ces organismes, une différenciation de deux types de cellules :

1. **Les hétérocystiques** : ce sont les cellules végétatives à l'intérieur desquelles se déroulent la photosynthèse et les cellules spécialisées, hétérocystes, à l'intérieur desquelles fonctionne la nitrogénase alors protégée de l'oxygène par une paroi cellulaire épaisse et imperméable du fait qu'elle ne possède pas de PSII. Les cellules végétatives fournissent en partie aux hétérocystes le pouvoir réducteur (sous forme de composés carbonés) et l'ATP nécessaires aux réactions de réduction.
2. **Les non hétérocystiques** : ne possèdent pas cette adaptation ; et séparent donc dans le temps le dégagement d'oxygène et l'activité de la nitrogénase au cours biophotolyse indirecte (deux périodes éclairées et sombres). Nous citons comme exemple *Nostoc muscorum* qui réalise une biophotolyse indirecte [10,30].

1.1.3. Perspectives et recherches

L'objectif à terme est d'éviter l'inhibition de l'hydrogénase par l'oxygène et d'augmenter le taux de production d'hydrogène. Plusieurs travaux convergent vers cette approche [31,27];

Dans une première approche, les systèmes de production d' H_2 actuellement les plus efficaces utilisant les algues et les cyanobactéries reposent sur une séparation temporelle (biophotolyse indirecte):

- Dans une première phase les conditions sont favorables à la photosynthèse, permettant la croissance et l'accumulation de réserves ;
- Dans une deuxième phase, il se produit une étape de fermentation pour le déplacement de l'oxygène produit, et enfin dans une dernière étape il y a production d'hydrogène en présence de lumière [31,27] (Figure III.2)

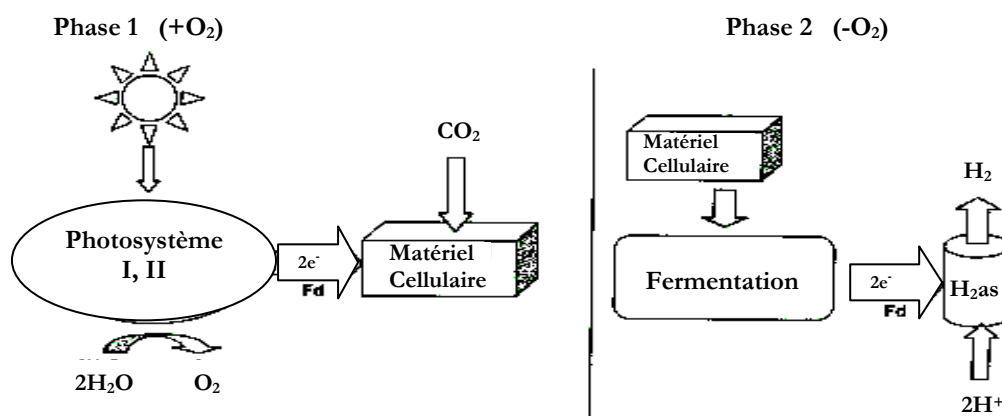
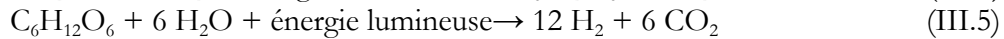
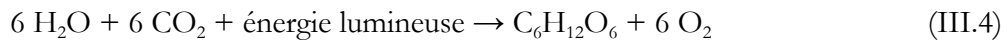


Figure III.2. Biophotolyse indirecte [27]

- Par ailleurs cette deuxième étape peut être éliminée par l'inhibition du PSII, permettant le maintien des algues en anoxie et la production d' H_2 . En effet, dans des conditions où le photosystème II (PSII) n'est pas actif, comme lors d'une carence en soufre ou en présence d'un inhibiteur, il y a production d' H_2 en présence de lumière sans dégagement d' O_2 [29,30, 32].

Les équations des réactions alors mises en jeu sont les suivantes (biophotolyse indirecte) :



Le $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ joue le rôle de transporteur d'électrons intermédiaires entre la photosynthèse et les réactions de production d'hydrogène séparées spatialement ou temporairement. Ces équations représentent un maximum théorique de conversion des substrats en hydrogène [10,30]. Pratiquement une augmentation du taux de production est observée chez *Gloeocapsa alpicola* (cyanobacters) [30] et chez *Chlamydomonas reinhardtii* (algues) [29].

Une seconde approche, est de sélectionner des hydrogénases résistantes à l'oxygène [80], comme celle de *Ralstonia eutropha* une bactérie aérobie ou bien effectuer des mutations pour réduire la sensibilité des enzymes [33]. Le développement d'un système d'expression purification-mutation permet l'étude cinétique et biophysique de la protéine native et des mutants obtenus par mutagenèse dirigée. Une meilleure résistance à l'oxygène constitue en effet le facteur déterminant pour une utilisation performante de cette hydrogénase dans des applications industrielles de production de l'hydrogène [21].

III.1.1.2. Les bactéries anoxygéniques phototrophes

1.2.1. Production d'hydrogène par photo-fermentation

Les bactéries photosynthétiques peuvent produire de l'hydrogène par photo-fermentation, processus selon lequel plusieurs substrats peuvent être utilisés [16] tels que les acides organiques (bactéries pourpres non sulfureuses) ou les composés sulfatés réduits (bactéries vertes ou pourpres sulfureuses) qui seront convertis en H_2 et CO_2 /composés sulfatés oxydés [10].

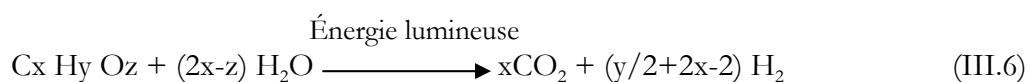
Cette production d'hydrogène est associée à l'action de la nitrogénase [34], une enzyme dont la fonction première est de réduire l'azote atmosphérique N_2 en ammoniac. Cependant, en absence d'azote, en conditions d'anaérobiose et en présence de lumière, elle catalyse la réduction des protons en hydrogène en utilisant l'énergie chimique de la cellule, selon la réaction (III.3) [35].

La présence d'une seconde classe d'enzymes, les Ni-Fe hydrogénases, a également été observée chez les bactéries photosynthétiques. Certaines d'entre elles sont dites « uptake » puisque leur fonction métabolique est de consommer une partie de l'hydrogène produit, pour maintenir la balance énergétique. Elles régénèrent les protons et les électrons pour reformer l'énergie nécessaire à la réaction que catalyse la nitrogénase.

Nitrogénase et hydrogénase « uptake » sont donc étroitement liées. Il faut noter que la nitrogénase et l'hydrogénase sont extrêmement sensibles à l'oxygène et actives uniquement en conditions anoxygènes [1].

La dégradation des composés organiques ou des composés sulfatés réduits par les bactéries photosynthétiques libère des électrons, qui sont ensuite pris en charge par les transporteurs de la chaîne photosynthétique, et dirigés vers la nitrogénase grâce à l'énergie lumineuse (Figure III.3). Ces électrons à bas potentiel sont alors utilisés pour la production de l'hydrogène. L'ATP, nécessaire au fonctionnement de l'enzyme, est générée par le transfert cyclique des électrons au niveau de cette chaîne [10,1].

Le processus de production de l'hydrogène par photofermentation est donc conduit par la lumière et est ATP-dépendant. L'équation de la réaction de conversion d'un substrat organique en hydrogène est la suivante [1] :



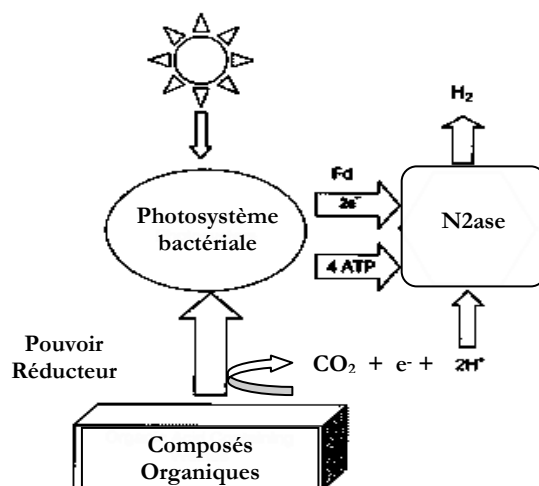


Figure III.3. Production de l'hydrogène par photofermentation. [10,27]

1.2.2. Perspectives et recherches

Dans le but d'augmenter le taux de production de l'hydrogène par les bactéries photohétérotrophes, plusieurs travaux concernent :

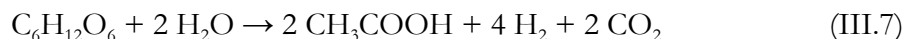
- L'optimisation des paramètres physicochimiques en présence de *Rhodobacter capsulatus* [36] ;
- Les modifications génétique, il s'agit de :
 - Réduction du nombre de pigments synthétisés [37];
 - Déficit du gène codant pour la synthèse de l'hydrogénase « uptake » (Hup-) chez *Rhodobacter sphaeroides* KD131 [38].
- Les systèmes hybrides (Co-cultures) [39].

Toutes ces applications seront abordées en détails dans le chapitre suivant.

III.1.2. Les bactéries fermentaires

1.2.1. Production d'hydrogène par fermentation

La fermentation est un processus indépendant de la lumière et qui se déroule dans des conditions d'anaérobiose stricte. Il est utilisé par les bactéries hétérotrophes mésophiles anaérobies strictes tel que *Clostridium acetobutylicum*. La production d'hydrogène est réalisée par la dégradation de substrats organiques en hydrogène, dioxyde de carbone et acides organiques ou alcools [21,10], selon la réaction suivante [35]:



Le mécanisme de production de l'hydrogène est biocatalysé par des enzymes dites hydrogénases qui présentent une grande sensibilité à l'oxygène.

Il existe deux types d'hydrogénases, les [Fe]-hydrogénases contenant uniquement des noyaux fer-soufre, et les [Ni-Fe]-hydrogénases possédant en plus, du nickel dans leur site actif. Chez *C. acetobutylicum*, une [Ni-Fe]-hydrogénase et une [Fe]-hydrogénase sont présentes sous forme soluble dans le cytoplasme.

Toutefois, les [Fe]-hydrogénases sont les hydrogénases les plus intéressantes pour la production de l'hydrogène car leur activité de synthèse d' H_2 à partir de la ferrédoxine, leur substrat physiologique, est environ 100 fois plus élevée que celle des [Ni-Fe]-hydrogénases [21].

Enfin, Théoriquement, le rendement de production de l'hydrogène est de 4H_2 par mole de glucose consommé, si le glucose est complètement métabolisé. Dans ce processus anaérobie,

l'hydrogène, le dioxyde de carbone et l'acétate sont ainsi produits [40]. C'est le cas de *C. acetobutylicum* optimisée à 37°C [21].

L'accumulation des composés organiques issus de la fermentation inhibent la croissance et la production de l'hydrogène [30, 40]. Cependant, il est difficile d'atteindre une complète dégradation du glucose en CO₂ et en hydrogène à travers une fermentation anaérobie. [40]

1.2.2. Perspectives et recherches

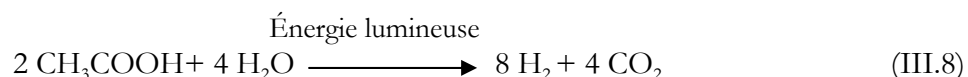
De grands axes de recherche ont été privilégiés pour augmenter le rendement de production d'hydrogène. Il s'agit de :

- L'étude du fonctionnement des hydrogénases, catalyseurs de la synthèse de la molécule d'hydrogène ;
- L'optimisation de la souche *C. acetobutylicum* par voie métabolique pour atteindre un rendement maximal de conversion du glucose en hydrogène [21] ;
- Le développement d'un système hybride, avec les organismes phototrophes, pour une complète dégradation des sous produits de la fermentation [40].

III.1.3. Les Systèmes hybrides utilisant les organismes fermentaires et photosynthétiques (Co-culture)

Lors de la fermentation, la durée de production de l'hydrogène est limitée par l'accumulation des sous produits qui augmentent le pH du milieu, conduisant à une inhibition de la croissance et de la production de l'hydrogène chez les bactéries fermentaires. Cependant le développement d'un système hybride, bactéries fermentaires et bactéries photosynthétiques (bactéries phototrophes et algues), maximise la production d'hydrogène [40]. Ces dernières dégradent les sous-produits de la fermentation, lors de la photofermentation et de la fermentation (au cours de la deuxième étape de production), respectivement [40,41].

Au cours de ce processus microbiologique, les voies métaboliques se déroulent selon les deux équations, (III.7) et (III.8) [40]:



Théoriquement, le nombre de moles produits est de 12 moles d'hydrogène / 1 mole de glucose (4 moles + 8moles).

Au cours de la photosynthèse les organismes phototrophes produisent les substrats carbonés (glucose) dont ont besoin les bactéries fermentaires [32]. C'est dernières dégradent ce substrat en acides organiques, hydrogène et CO₂.

Il est difficile d'atteindre une complète dégradation du glucose en CO₂ et hydrogène, cependant, c'est aux microorganismes photofermentaires de dégrader les produits de la fermentation pour une meilleure productivité et une complète dégradation [16] ; (Figure III.4).

Mi-Sun kim et al, (2005) [41] et Kaushik Nath et al, (2005) [40] ont travaillé sur ce type de système de Co-culture avec *Chlamydomonas reinhardtii*, *Clostridium butyricum* et *Rhodobacter sphaeroides* KD 131, *Enterobacter cloacae* DM 11.

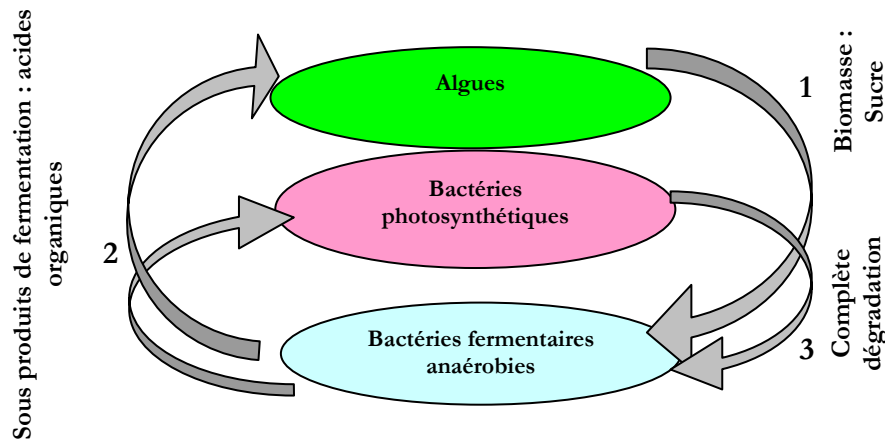


Figure III.4. La co-culture des organismes producteurs d'hydrogène

III.2. Etude comparative

D'un point de vue global, comparativement aux autres moyens de production d'hydrogène, la production par voie biologique présente des rendements faibles. Toutefois, basée sur un processus entièrement propre et renouvelable, ce mode de production reste l'une des voies alternatives les plus attrayantes à long terme dans le contexte énergétique et environnemental actuel [10].

2.1. Les voies métaboliques de production biologique d'hydrogène

Les voies métaboliques de production biologique d'hydrogène chez les différents types de microorganismes fermentaires et photosynthétiques sont représentées dans le tableau III.1, ci-dessous.

Tableau. III.1. Les voies métaboliques de production biologique d'hydrogène [31]

Processus	Réaction générale	Microorganismes
Biophotolyse directe	$2 \text{ H}_2\text{O} + \text{ lumière } \longrightarrow 2 \text{ H}_2 + \text{ O}_2$	Microalgues
Photo-fermentation	$\text{CH}_3\text{COOH} + 2 \text{ H}_2\text{O} + \text{ lumière } \longrightarrow 4 \text{ H}_2 + 2 \text{ CO}_2$	Bactéries pourpres Microalgues
Biophotolyse indirect	$6 \text{ H}_2\text{O} + 6 \text{ CO}_2 + \text{ lumière } \rightarrow \text{ C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6 \text{ O}_2$	Microalgues Cyanobactéries
	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 2 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow 4 \text{ H}_2 + 2 \text{ CH}_3\text{COOH} + 2 \text{ CO}_2$	
	$2 \text{ CH}_3\text{COOH} + 4 \text{ H}_2\text{O} + \text{ lumière } \rightarrow 8 \text{ H}_2 + 4 \text{ CO}_2$	
	Reaction totale: $12 \text{ H}_2\text{O} + \text{ lumière } \rightarrow 12 \text{ H}_2 + 6 \text{ O}_2$	
Evaporation	$\text{CO} + \text{ H}_2\text{O} \rightarrow \text{ CO}_2 + \text{ H}_2$	Bactéries : Fermentaires Photosynthétiques
Fermentation	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 2 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow 4 \text{ H}_2 + 2 \text{ CH}_3\text{COOH} + 2 \text{ CO}_2$	Bactéries: Fermentaires Méthanogéniques
	$2 \text{ CH}_3\text{COOH} \rightarrow 2 \text{ CH}_4 + 2 \text{ CO}_2$	
Fermentation	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow 12 \text{ H}_2 + 6 \text{ CO}_2$	Bactéries fermentaires

2.2. Les taux de production d'hydrogène

Les rendements de production biologique de l'hydrogène, varient en fonction des microorganismes utilisés.

Pour un même genre, le taux de production diffère d'une espèce à une autre, et d'une sous espèce à une autre. Théoriquement, l'efficacité de conversion de l'énergie lumineuse est plus importante chez les bactéries photofermentaires comparées aux algues [42].

*Pour les bactéries fermentaires ce taux varie de 22-55 ml d'H₂/l/h (Zaborsky 1998, Myake et al, 2001) [32].

*Pour les algues tel *Chlamydomonas reinhardtii*, ce taux varie de 2 à 2,5 ml d'H₂/ l .h-1 (Kosourov et al 2002, Melis et al, 2000) [10].

*Pour les cyanobactéries, par exemple la souche mutante *Anabaena*, le taux de production est de 14,9 ml d'H₂/l .h-1 (Lindblad et al, 2002) [10].

*Pour les bactéries photosynthétiques, dont La plupart sont des bactéries pourpres non sulfureuses du genre *Rhodobacter*, ce taux de production varie de 2 ml/l/h chez *Rhodomonas* [1] à 80 ml/l/h (Ooshima et al, 1998; Tsygankov et al, 1998) chez *Rhodobacter capsulatus* [10].

2.3. Avantages et inconvénients

L'utilisation de chacun de ces microorganismes pour la production d'hydrogène présente des avantages et des inconvénients, voir tableau III.2.

Tableau III.2. Avantages et inconvénients des différents processus biologique utilisés pour la production d'hydrogène [16].

Microorganisme	Avantages	Inconvénients
Algues vertes	-Peuvent produire de l'hydrogène à partir de l'eau	-Présence de lumière ; -Production d'inhibiteur de production (l'oxygène).
Cyanobactéries	-Peuvent produire de l'hydrogène à partir de l'eau ; -La nitrogénase a la capacité de production de l'hydrogène et la fixation d'azote moléculaire	-Présence de lumière ; -La présence d'une hydrogénase uptake consommatrice d'hydrogène ; -Production d'inhibiteur de production (30% d'oxygène est produit).
Bactéries photosynthétiques	-Peuvent produire de l'hydrogène en présence de plusieurs substrats carbonés ; - pas de production d'oxygène	-Présence de lumière ;
Bactéries fermentaires	- une production sans lumière ; -Peuvent produire de l'hydrogène en présence de plusieurs substrats carbonés ; - pas de production d'oxygène	-Les produits de fermentation doivent subir un traitement pour éviter les risques de pollution d'eau.

III.3. Les bioréacteurs utilisés pour la production biologique d'hydrogène

La recherche et la pratique ont abouti à plusieurs définitions différentes des bioréacteurs. On emploie la définition suivante :

"Bioréacteurs sont des enfouissements où le complément contrôlé de l'eau ou de déchets liquides non dangereux, accélère la décomposition des déchets et la génération de gaz d'enfouissement.» [43].

Les bioréacteurs sont essentiels pour la production biologique d'hydrogène. Ces réacteurs doivent être transparents puisque la lumière (du soleil ou d'une source artificielle) est un paramètre essentiel pour la croissance et la production de l'hydrogène d'où l'appellation de photobioréacteur.

Un réacteur conçu pour la production photobiologique de l'hydrogène doit satisfaire plusieurs conditions :

- 1) Aucune perte en ce qui concerne l'hydrogène produit ;
- 2) Une bonne stérilisation ;
- 3) Maximiser la lumière incidente.

3.1. Les différents types de photobioréacteur

Plusieurs types de bioréacteurs ont été utilisés pour la production de l'hydrogène. On distingue deux types de photobioréacteurs (PBRs) :

- a/ Réacteur à colonne vertical (cylindrique),
- b/ Réacteur plat [30].

3.1.1. Réacteur à colonne vertical (Cylindrique)

Un exemple de ce type de PBR est celui employé pour la production de l'hydrogène en présence de bactéries phototrophes anoxygéniques [2,44] (Figures III.5d et III.5f) et en présence d'algues [28], (Figure III.5 e). Cette colonne de réacteur est composée d'un cylindre de verre entouré par une veste d'eau.

3.1.2. Réacteur plat (Panneau)

Ce type de réacteur est employé pour la production d'hydrogène en présence de bactéries phototrophes anoxygéniques [45, 41] (Figure III.5 a et III.5 b) et d'algues [46], (Figure III.5 c). Il est constitué d'un écran plat typique PBR composé de deux compartiments placés côte à côte :

- Le compartiment de devant contient la culture bactérienne.
- Le compartiment de derrière contient un bain-marie pour maintenir la température de la culture constante.

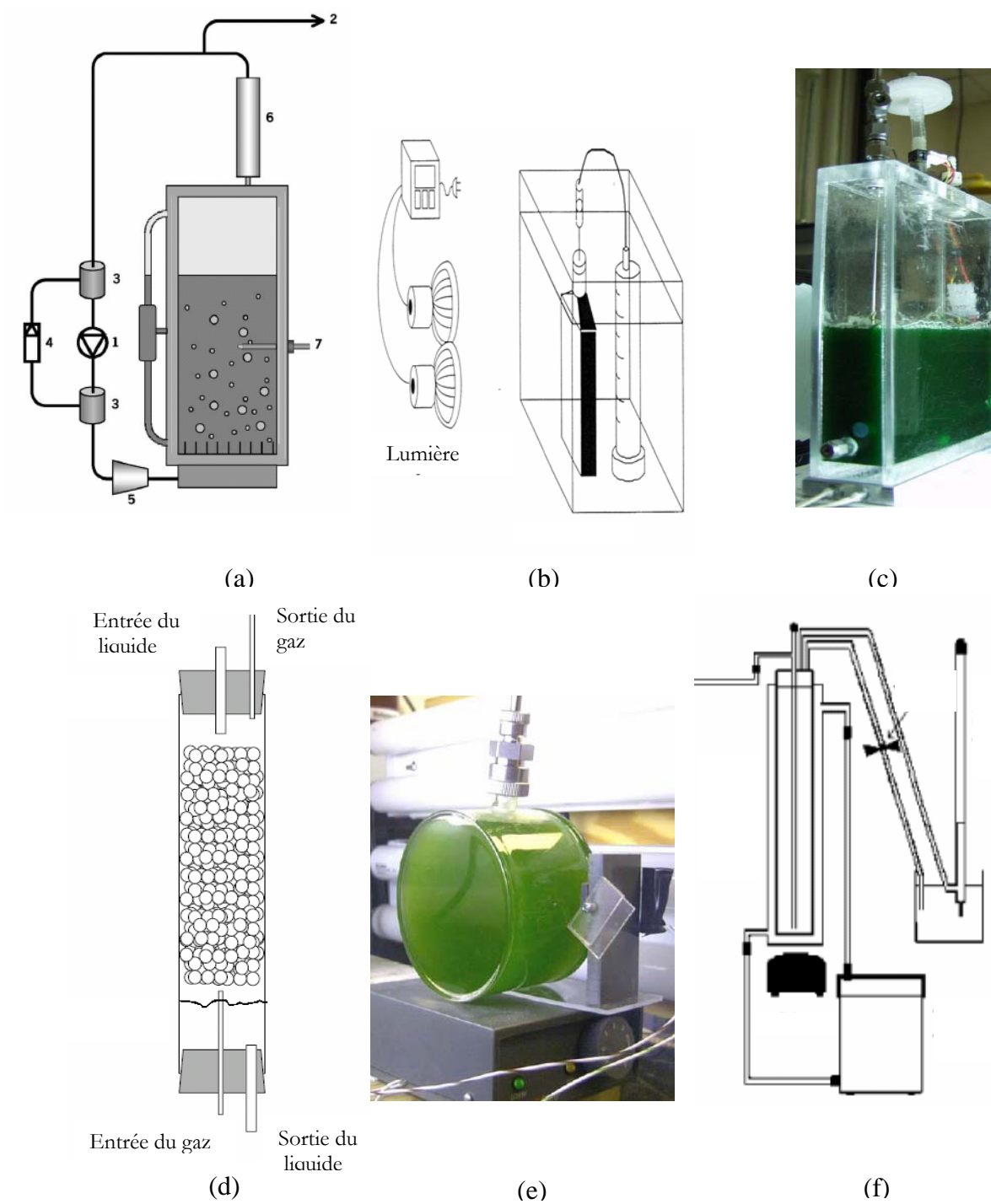


Figure III.5. Photobioréacteurs utilisés pour la bioproduction d'hydrogène [2, 28, 41, 44, 45, 46]

3.2. Avantages et inconvénients

Ces réacteurs présentent chacun des avantages et des inconvénients, tableau III.3.

Tableau III.3. Les photobioréacteurs utilisés pour la production biologique d'hydrogène [30].

Type de Bioréacteurs	Avantages	Inconvénients
Colonne verticale (Cylindrique)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Conception simple et avantageuse financièrement 2. Taux plus grand de transfert de masse de bulle dans les colonnes. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Manque de contrôle sur la lumière rayonnante. 2. Grandes fluctuations dans la productivité.
Réacteur plat (Panneau)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Plus grand contrôle de la lumière incidente. 2. Contrôle efficace de la pression du gaz. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Le coût de production est élevé. 2. Conception compliquée et plus de maintenance.

III.4. Avantages des méthodes biologiques de production d'hydrogène

Certains microorganismes phototrophes peuvent produire de l'hydrogène, évitant le recours aux énergies à haut niveau du vapo-cracking et de l'électrolyse, qui font aujourd'hui appel à des ressources non renouvelables [47]. Les méthodes biologiques de production d'hydrogène (H₂) fournissent l'avantage d'avoir la capacité d'exploiter efficacement l'énergie solaire aisément disponible à la surface de la terre. L'énergie annuelle disponible de la lumière du soleil est estimée à 4×10^{24} J tandis que l'énergie disponible de toutes les provisions de sources de carburants fossiles est estimée à 3×10^{24} J [28].

Pour cela, la voie biologique est explorée par différents laboratoires dans le monde [47], pour mieux comprendre les possibilités d'ingénierie et l'optimisation de la production biologique d'hydrogène [48].

Cependant, la production d'hydrogène par les microorganismes est un domaine actif de recherche de base et appliqué. Les gouvernements du Japon, de Turc et des États-Unis, par exemple, soutiennent les programmes de recherche et développement appliqué. D'autres pays soutiennent aussi la recherche fondamentale [22]. Pour Jack Legrand (professeur à l'université de Nantes), «les besoins énergétiques de la France pourraient être comblés en couvrant avec cette micro algue, *Chlamydomonas reinhardtii*, 1% de la surface du territoire» [10].

La réalisation de procédés pratiques pour la production photobiologique de l'hydrogène employant l'énergie solaire aboutirait à une source principale, un vecteur énergétique durable et renouvelable, sans émissions de gaz de serre ou de pollution environnementale [22].

IV. Rhodobacter sphaeroides

Depuis sa première description par Van Neil en 1944, *Rhodobacter sphaeroides*, dont l'origine est nommée *Rhodospseudomonas sphaeroides*, est devenue le centre bioénergétique de plusieurs laboratoires dans le monde. Elle est capable d'acquérir de l'énergie par plusieurs méthodes [49].

Elle présente également la capacité de produire de l'hydrogène [34, 37] d'où l'intérêt qui lui a été porté dans le cadre de ce travail.

Dans ce présent chapitre, nous présentons la taxonomie, la physiologie, le métabolisme, le mécanisme de photosynthèse, de transfert d'électrons et de production d'hydrogène de cette bactérie.

IV.1. Taxonomie

2.1. Rhodobacter sphaeroides

Rhodobacter sphaeroides, une bactérie photosynthétique pourpre non sulfureuse et non oxygénique. Les bactéries non oxygéniques seraient les plus anciennes sur le plan évolutif, leur mécanisme de photosynthèse est fondamentalement anaérobie, non producteur d'oxygène [4, 13].

1.2. Classification

Une bactérie, Proteobacteria, Rhodobacterales, Rhodobacteraceae, Rhodobacter, Rhodobacter sphaeroides [50].

1.3. Critères taxonomiques

Rhodobacter sphaeroides, est une bactérie pourpre, ovoïde, Gram négative [40], mobile par son flagelle unidirectionnel qui produit des rotations dans le sens d'une aiguille d'une montre. Ce moteur s'arrête périodiquement au moment où la cellule doit changer de direction, ce qui explique son mécanisme chimiotactique nécessaire pour son métabolisme. Celui-ci nécessite un apport de chimioeffecteurs tel que les acides organiques, par exemple : l'acide succinique, du fait que le système complexe sensoriel de *Rhodobacter sphaeroides* répond dans les deux cas à l'augmentation et la diminution des gradients de concentration des attracteurs avec des sensibilités différentes [51].

Chez cette bactérie, la reproduction se fait par division binaire [52] (Figure IV.1). Elle est capable de dégrader une variété de substrats azotés contenant des complexes aromatiques, de pyridine, d'acide nicotinique, de guanine et d'uracile [53].



Figure IV.1. Division binaire chez *Rhodobacter sphaeroides* [54]

IV.2. Physiologie de croissance

La croissance d'un microorganisme peut être considérée comme une série d'interactions entre les cellules et l'environnement. Le milieu apportant les éléments nécessaires à la croissance étant lui-même modifié par le métabolisme des cellules [55].

2.1. Localisation

Les bactéries pourpres non sulfureuses prédominent dans la vase, l'eau des lacs et des étangs où la matière organique est abondante et le niveau en soufre est faible [56]. Elles vont donc pouvoir proliférer à une certaine distance de la surface aquatique en fonction des critères suivants :

- La concurrence des algues et des cyanobactéries est moins vive ;
- Le milieu est appauvri en oxygène grâce à l'action des autres microorganismes, ce qui gêne le mouvement des prédateurs planctoniques qui se nourrissent de bactéries ;
- Elles profitent des émanations de gaz carbonique, d'hydrogène et d'acides organiques qui proviennent des fermentations du fond ;
- Elles sont capables de s'adapter à un faible éclaircissement [4].

2.2. Besoins nutritionnels

Le milieu de culture doit apporter tous les éléments nécessaires aux synthèses cellulaires et aux besoins énergétiques du microorganisme. A savoir que les sulfures inhibent la croissance cellulaire, alors que l'abondance en matières organiques et un faible taux de soufre favorise leur croissance [13].

Le tableau IV.1 présente quelques éléments chimiques nécessaires à la croissance de *Rhodobacter sphaeroides* et le rôle biologique apporté par chaque élément.

Tableau IV.1. Quelques éléments nécessaires à la croissance de *Rhodobacter sphaeroides* [55, 57].

Eléments chimiques	Rôle biologique
Carbone (succinate, lactate...)	Source de carbone, source d'énergie...
Azote	Synthèse de vitamine, d'acide aminé et de nucléotide...
Potassium (KH ₂ PO ₄)	Régulation, effecteurs d'enzyme...
Magnésium	Activateur d'enzyme glycolytique, régulateur des ATPase membranaires...
Calcium (CaCl ₂)	Favorise le maintien de l'intégrité cellulaire...
Zinc (ZnSO ₄)	Indispensable dans la glycolyse, stimule la pénétration de certains oses, stimule l'action du magnésium... [55]
Fer (FeSO ₄ · 7H ₂ O)	Participe au site de certaines enzymes, ex ; Hydrogénase...
Molybdate (Na ₂ Mo O ₄ · 2H ₂ O)	Participe au site de la nitrogénase et joue le rôle de cofacteur pour certaines enzymes DMSO réductase periplasmique, on parle de molybdoenzyme [57]
Thiamine (Vitamine B₁)	Métabolisme respiratoire, photosynthétique, de la glycolyse et des lipides...
Acide nicotinique	Impliqué par l'intermédiaire de NAD ⁺ dans la synthèse de l'ATP
Biotine	Facteur de croissance, impliqué dans de nombreux réactions anaboliques, synthèse des bases puriques et pyrimidiques, des nucléotides, des protéines, des polysaccharides et des acides gras...[55]

Les vitamines sont obligatoires pour une préservation des bactéries à long terme ; sans vitamines, les bactéries commencent à décliner et les colonies commencent à perdre leurs caractéristiques [19].

IV.3. Métabolisme et mécanisme de photosynthèse

3.1. Métabolisme

Rhodobacter sphaeroides est une bactérie trop remarquable par sa diversité métabolique [58]. Elle peut croître selon diverses voies métaboliques :

- **Phototrophe** : se déroule en présence de lumière et en l'absence d'oxygène (Photosynthèse) ;
 - **Photohétérotrophe** : en utilisant plusieurs composants organiques comme sources de carbone et une source de force réductrice ;
 - **Photoautotrophe** : en utilisant le CO₂ comme source de carbone et l'hydrogène comme force réductrice.

- **Chimiotrophe** : se déroule en absence de lumière et présence d'oxygène (respiration) ;
 - **Chimiohétérotrophe** : en utilisant plusieurs composants organiques comme sources de carbone et une source de force réductrice ;
 - **Chimioautotrophe** : en utilisant le CO₂ comme source de carbone et l'hydrogène comme force réductrice.

- **Fermentaire** : se déroule en absence de lumière, en absence d'oxygène [49] et en présence d'un accepteur d'électron tel que le diméthyl sulfoxyde DMSO [59].

C'est une bactérie capable de fixer l'azote, de biosynthétiser la vitamine B₁₂ et l'hydrogène [58].

Les bactéries pourpres non sulfureuses sont capables d'utiliser une différente variété de substrats comme source de carbone et d'azote. Les voies biochimiques utilisées sont vastes et peuvent différer d'une espèce à une autre et d'une souche à une autre.

La figure IV.2 représente un schéma simplifié du cycle du carbone chez ces bactéries avec une accentuation sur les propriétés de *Rhodobacter sphaeroides* [1].

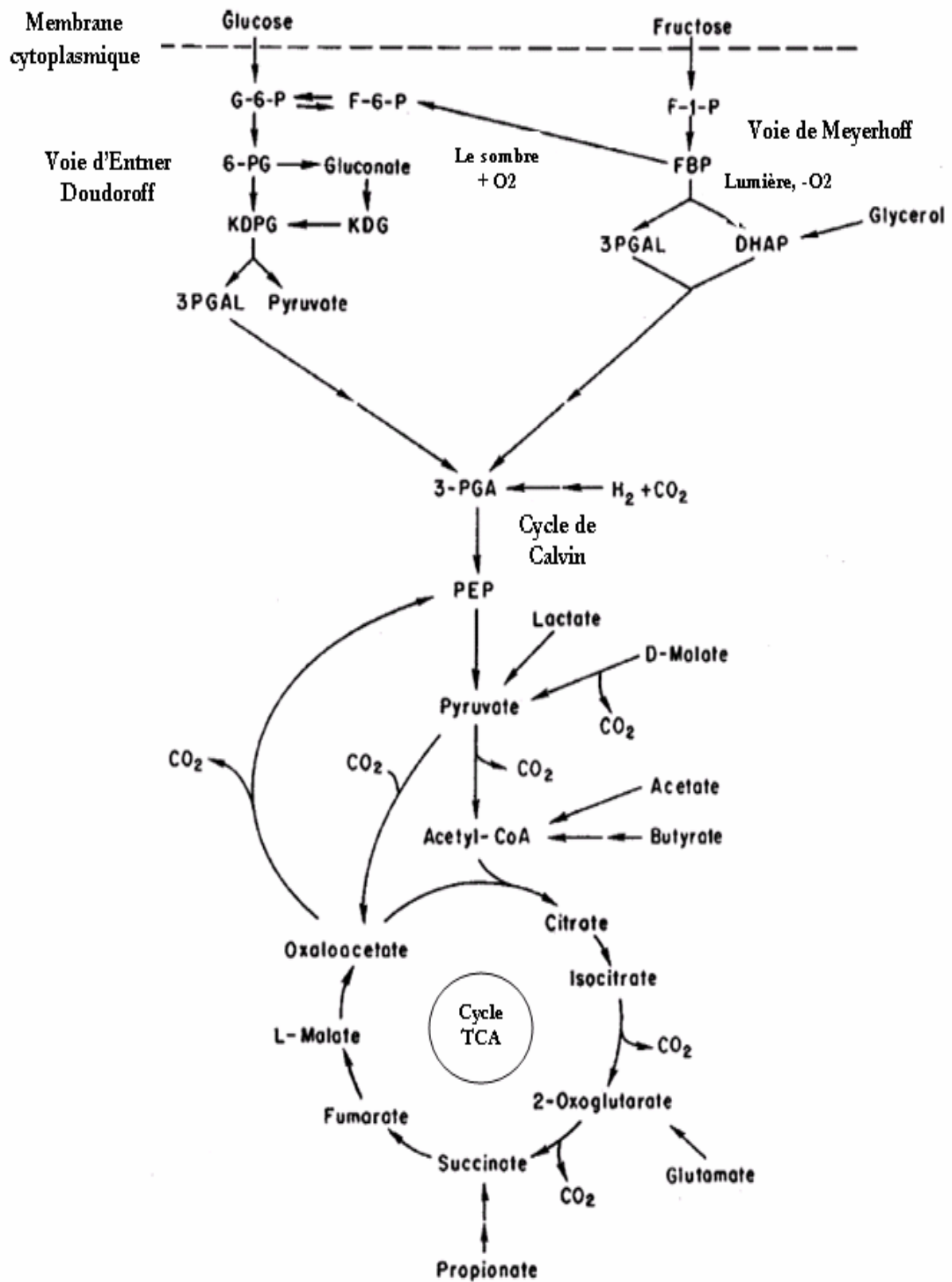


Figure IV.2. Cycle d'acide citrique (TCA) chez *Rhodobacter sphaeroides* [1].

3.2. Mécanisme de photosynthèse, de respiration et de transfert d'électrons

La photosynthèse est une conversion d'énergie particulièrement efficace. Une énergie lumineuse ($h\nu$) parvenant au pigment récepteur γ réalise une excitation, forme très labile d'énergie photochimique qui est transmissible de molécule en molécule. Sa transformation en énergie électrochimique (corps réducteurs à bas potentiel) doit être aussi rapide que possible [4].

3.2.1. La membrane photosynthétique

Rhodobacter sphaeroides, est une bactérie photosynthétique ayant une organisation typique de la membrane cellulaire [60]. Elle présente des invaginations membranaires intracytoplasmiques (ICM) développés vers l'intérieur de la cellule conduisant à un entassement de vésicules biochimiquement différenciées où l'on trouve des pigments chlorophylliens [4] (Figure IV.3)



Figure IV.3. Invaginations membranaire renfermant l'appareil photosynthétique [61]

Chez ces bactéries, la membrane photosynthétique est appelée **chromatophore**, elle est le site privilégié où s'effectuent les mécanismes de la photosynthèse [4, 37].

3.2.2. L'appareil photosynthétique

Ces bactéries utilisent la lumière pour alimenter leur métabolisme et donc développent un appareil hautement efficace constitué de multiples protéines.

L'unité photosynthétique (PSU) de ces bactéries est un assemblage nanométrique dans les membranes intracytoplasmiques constituée de deux types de complexe protéines pigments :

- Les bactériochlorophylles - caroténoïdes « LHs » ;
- Le centre réactionnel photosynthétique « CR » [62,63].

Une nappe du complexe protéique contenant de la bactériochlorophylle entoure les centres réactionnels et joue le rôle d'antenne qui capte la lumière [4] ; elle transfère l'énergie d'excitation au CR, qui sert à amorcer un processus de séparation de charge [63].

3.2.2.1. Bactériochlorophylle – caroténoïde (le complexe antennaire LHs)

Il y a deux sortes de complexes antennaires, LH1 (B875) et LH2 (B800-B850) :

- Les LH1 entourent directement les centres réactionnels formant le « Cœur CR-LH ». Chaque LH1 possède des polypeptides α et β , la bactériochlorophylle B875 et un nombre équivalent de caroténoïdes.
- Les LH2 renferment la plus grande partie de la bactériochlorophylle B850 et B800, avec une quantité comparable de caroténoïdes [4, 64, 65,66].

La figure IV.4 représente l'organisation de l'appareil photosynthétique au sein de la membrane.

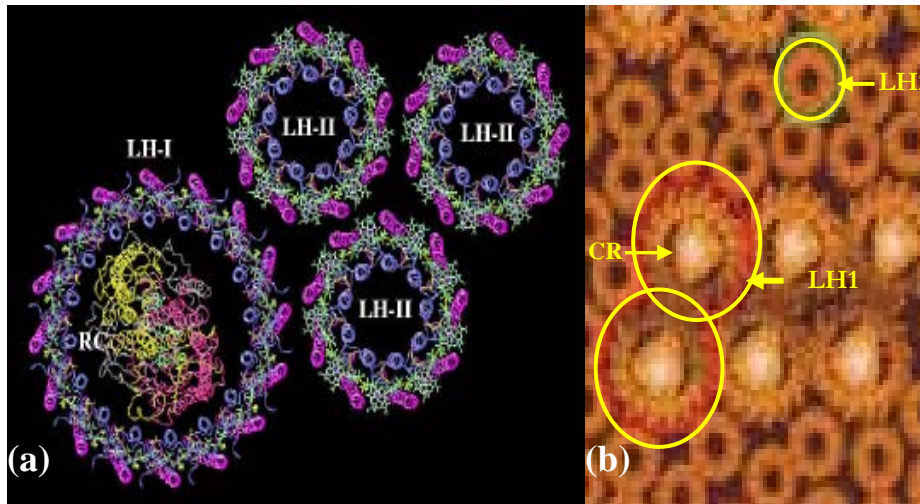


Figure IV.4. (a) Structure tridimensionnelle [61]
(b) Topographie à grande résolution des différents composants de l'appareil photosynthétique de *Rhodobacter sphaeroides* [66]

3.2.2.2. Le centre réactionnel (CR)

Le centre réactionnel contient :

- Quatre molécules de bactériochlorophylle et deux molécules de bactériophéophytine (molécule de bactériochlorophylle ne contenant pas de magnésium) ;
- Une molécule de ménaquinone (Q) ;
- Une molécule d'ubiquinone (QH₂) ;
- Un fer non hème présent sur le côté cytoplasmique de la membrane.

Ces composants sont liés de manière covalente aux deux sous unités (L et M) de la protéine du centre réactionnel. Une autre sous unité protéique transmembranaire (H) est attachée au complexe (L-M). Une molécule de caroténoïde est liée à chaque particule du centre réactionnel [67,68] (Figure IV.5)

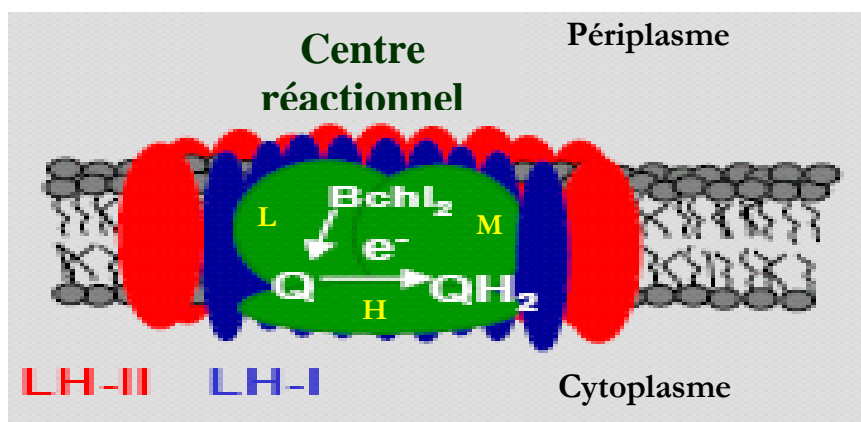


Figure IV.5. Structure tridimensionnelle du centre réactionnel [61]

3.2.2.3. Les caroténoïdes

Les caroténoïdes possèdent trois fonctions principales :

- Elles participent à la collecte de la lumière aux niveaux des antennes dans la région spectrale 400-550nm, complémentaire à celle de la bactériochlorophylle qui absorbe efficacement les radiations situées dans l'infrarouge (Figure IV.6a)
- Elles protègent l'appareil photosynthétique des entités réactives engendrées par photooxydation [4] ;
- La couleur des bactéries et leur spectre d'absorption n'est pas seulement liée aux bactériochlorophylles, les pigments accessoires comme les caroténoïdes y contribuent fortement [13, 69].

3.2.2.4. Les facteurs affectant la synthèse des pigments

D'une façon générale trois facteurs tendent à affecter la formation des pigments et le développement des membranes photosynthétiques. Ils s'agit de :

1. Une élévation de température ;
2. Une augmentation de l'intensité lumineuse ;
3. Une montée de la pression partielle de l'oxygène [4].

Ce dernier facteur exerce l'effet le plus sévère et inhibe la synthèse du pigment [56] (Figure IV.6b).

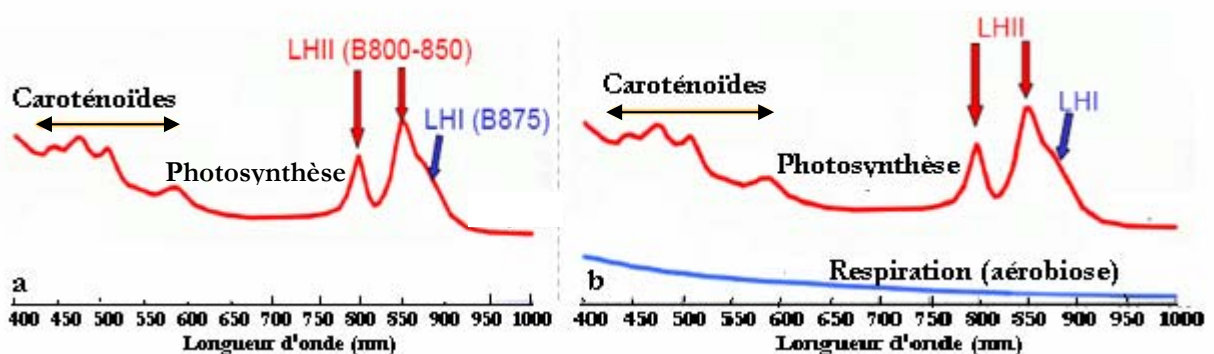
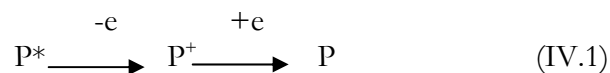


Figure IV.6. (a) Spectre d'absorption des composants de l'appareil photosynthétique
(b) Effet de l'oxygène sur la synthèse des composants de l'appareil photosynthétique. [70]

3.2.3. Mécanisme de photosynthèse, de respiration et de transfert d'électrons

L'énergie lumineuse captée par les pigments antennaires est canalisée vers les centres réactionnels qui constituent le siège d'oxydoréduction [4].



P : Pigment des centres réactionnels ;

P* : Etat excité ;

P⁺ : Forme cationique [68].

Les molécules de bactériochlorophylles sont appariées et partagent la fonction de donneur photochimique d'électrons. Une des bactériophéophytines intervient comme transporteur intermédiaire d'électrons entre les bactériochlorophylles et la ménaquinone (Q). Ces électrons vont à l'ubiquinone (QH₂) [67,68].

Lorsque les quinones sont réduites, l'accepteur secondaire expédie les électrons :

- Vers un système qui fabrique des coenzymes réduits de type NADH ou NADPH nécessaires à l'assimilation du CO_2 [4] ;
- Vers le complexe cytochrome b-c₁ où leur passage aboutit à l'exclusion des protons [67,68]. La valeur théorique est de 4H^+ par paires d'électrons. Tout ce qui faut pour créer une force proton- motrice, ΔP , autorisant ultérieurement une synthèse de l'ATP.

Le transfert des électrons pousse les protons vers l'intérieur des cavités cytoplasmiques membranaires qui communiquent avec des périplasmiques, établissant ainsi une force proton-motrice. **L'ATP synthétase** (ou ATP ase) effectue en sens inverse une translocation de protons vers le cytoplasme et catalyse la synthèse de l'ATP à partir de l'ADP et phosphate [4] (Figure IV.7)

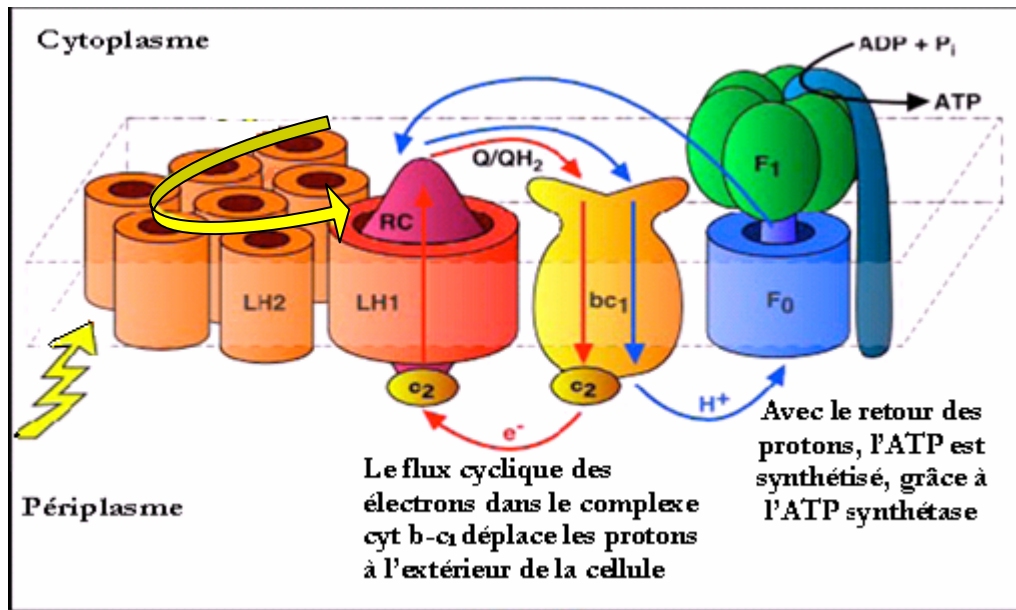


Figure IV.7. Mécanisme de photosynthèse et de transfert d'électrons [4,53]

Chaque fois que le centre réactionnel cède un électron destiné à réduire l'accepteur primaire, il se trouve du même coup déficitaire et incapable de fonctionner à nouveau dans cet état. Il lui faut donc récupérer un électron.

Cette restriction peut avoir lieu par le canal du complexe membranaire b-c₁ et se fait habituellement par l'intermédiaire d'un cytochrome soluble de type c. Il y a des pertes en cours de route car les électrons de l'accepteur primaire ont été détournés vers la réduction d'une ferrédoxine (Fd) ou vers la transformation du NAD^+ en NADH [4]. Ce déficit peut être comblé par une source d'électrons externe : hydrogène, composants organiques comme l'acide succinique, l'acide lactique, ou l'acide malique... [26].

Au cours de la respiration, les cytochromes b et c (composants communs de la photosynthèse et de la respiration) sont conservés, alors que les bactériochlorophylles et les caroténoïdes sont inhibés.

En présence d'oxygène, le cytochrome c₂ transfère les électrons de l'ubiquinone- cytochrome c₂ oxydoréductase (le complexe cytochrome b-c₁) vers le cytochrome a-a₃ oxydase terminale. Dans les conditions de photosynthèse, le cytochrome c₂ fonctionne pour compléter la chaîne de photophosphorylation cyclique par le transfert des électrons du complexe cytochrome b-c₁ pour réduire le centre réactionnel photo- oxydé [59,68].

IV.4. La production biologique d'hydrogène par Rhodobacter sphaeroides

Les bactéries photosynthétiques telle que *Rhodobacter sphaeroides*, sont des candidates favorables pour la production biologique de l'hydrogène du fait de leur grande efficacité de conversion du substrat et de leur capacité d'utiliser plusieurs variétés de substrats pour la croissance et la production de l'hydrogène. Cependant, il est important de connaître leur métabolisme, les enzymes et le mécanisme de production de l'hydrogène.

4.1. Métabolisme

Au cours du métabolisme photohétérotrophe, les bactéries utilisent le substrat, la lumière et les enzymes, qui constituent la clef de toute biotransformation, pour leur développement.

La production biologique d'hydrogène elle comme toutes réactions biologiques, nécessite des conditions opératoires permettant un bon déroulement voir même, l'optimisation du processus biologique. Elle se déroule en présence :

- D'une source lumineuse ;
- De conditions anaérobies en présence d'un gaz inerte ;
- D'un substrat organique donneur d'électrons exemple ; l'acide lactique... ;
- D'un milieu de production limité en source d'azote.

Dans la littérature plusieurs sources lumineuses, substrats et milieux sont utilisés. Le choix du substrat repose du fait que, si ce substrat favorise la production d'hydrogène ou d'autres produits tels que le Poly Hydroxy Butyrate (PHB). Les substrats appartenant à la catégorie favorisant la production d'hydrogène sont le lactate et le malate [1].

Kaushik Nath et al [40], Harun Koko et al [1] ont déterminé que le glutamate représente une excellente source d'azote pour cette production, il pourra également être utilisé comme une source de carbone.

Le cycle d'acide citrique (TCA) (Figure IV. 2), la membrane photosynthétique et les enzymes jouent un rôle important dans le mécanisme de production de l'hydrogène [1].

4.2. Les enzymes responsables de la production de l'hydrogène

4.2.1. La nitrogénase

La nitrogénase est un complexe métalloenzyme convertissant l'azote en ammoniac avec l'hydrolyse de l'ATP. La protéine-Fe et la protéine MoFe sont les composants cruciaux de la nitrogénase. La protéine-Fe fonctionne comme réductase ATP-dépendante pour la protéine MoFe. La protéine MoFe fournit un centre catalytique pour la réduction de l'azote. La protéine-Fe est réduite par la ferrédoxine et transfère des électrons à la protéine MoFe, qui est liée avec l'hydrolyse de l'ATP. Les électrons sont finalement transférés à l'azote au site catalytique de la protéine MoFe aboutissant à la formation de molécules d'ammoniac [71]. L'oxygène et l'ammoniac constituent des inhibiteurs de l'activité enzymatique. Une grande quantité en ATP et de force réductrice augmente l'efficacité de l'activité de la nitrogénase [1,42].

La production de l'hydrogène par *Rhodobacter sphaeroides* est associée principalement et complètement à l'action de la nitrogénase ; cette enzyme catalyse la production de l'hydrogène en absence d'azote et en absence d'oxygène (Figure III.3) selon la réaction chimique (III.3).

Au cours de notre travail, les milieux de préactivation et de production étaient barbotés avec un gaz inerte, l'argon. Ce barbotage a pour rôle :

- D'éliminer l'oxygène inhibiteur de l'activité enzymatique [42] ;

- D'éviter l'inhibition de l'activité enzymatique de la nitrogénase, en présence d'une concentration élevée en ammoniac [34] ;
- De diriger l'activité enzymatique vers la production d'hydrogène seul.

Cependant, la production d'hydrogène est performé en utilisant l'argon, pour l'élimination des produits d'inhibition.

En absence d'azote moléculaire, l'ammoniac n'est pas produit contrairement à l'hydrogène, selon ces deux équations [35] :

En présence de N₂ :



En absence de N₂ (sous argon) :



Miyake et al, Segers et Verstraete [34] ont déterminé qu'une bonne production d'hydrogène se déroule dans des milieux de très faibles concentrations en NH₄ comprises entre 0 et 10 mM.

4.2.2. Hydrogénase

L'hydrogénase est une enzyme protéine- nickel, elle a la capacité de produire et de consommer l'hydrogène moléculaire. La production de l'hydrogène est attribuée à la nitrogénase, puisque l'activité de production par l'hydrogénase est négligeable comparée à celle de la nitrogénase productrice d'hydrogène [2] et à celle de l'hydrogénase consommation d'hydrogène. Cependant, elle constitue un antagonisme métabolique de la nitrogénase.

Le monoxyde de carbone, l'oxygène et l'EDTA (acide éthylènediaminetétraacétique) inhibent l'activité de cette enzyme. Une limitation en nickel peut atténuer la synthèse de cette enzyme [1].

4.2.3. Etude comparative

Une étude comparative entre la nitrogénase, enzyme productrice d'hydrogène et l'hydrogénase, enzyme consommatrice d'hydrogène, est représentée dans le tableau IV.2.

Tableau IV.2. Les caractéristiques enzymatiques de la nitrogénase et l'Hydrogénase [1]

Propriétés	Nitrogénase	Hydrogénase
Substrats	ATP, H ⁺ ou N ₂ , Électrons	H ₂
Produits	H ₂ ou NH ₄ ⁺	H ⁺ , électrons
Nombre de protéines	deux (Mo-Fe et Fe)	Un
Composants métalliques	Mo, Fe	Ni, Fe, S
Temperature optimale	30°C (<i>A. vinelandii</i>)	55°C (<i>R. rubrum</i>) 70°C (<i>R. capsulatus</i>)
pH optimal	7.1-7.3 (<i>A. vinelandii</i>)	6.5-7.5 (<i>R. sulfidophilus</i>)
Inhibiteurs, répresseurs	N ₂ (production d'H ₂ Seul), NH ₄ ⁺ , O ₂	CO, EDTA, O ₂ , présence de composants organiques
Stimulateurs	Lumière Rapport C/N élevé	H ₂ (<i>R. sphaeroides</i>) Absence des composants organiques

4.3. Mécanisme de production de l'hydrogène

Le substrat carboné utilisé pour la production de l'hydrogène entre dans le cycle de l'acide citrique (TCA) où il est oxydé lors de la production du CO_2 , H_2 et d'électrons. Parallèlement la membrane photosynthétique convertit l'énergie lumineuse en ATP. Cette ATP induit l'activité de la nitrogénase en présence des protons et des électrons.

Les protons sont produits en partie par le cycle TCA présenté dans la figure IV.2, le reste est alimenté par l'action de l'ATP synthétase qui fait partie de l'appareil photosynthétique.

Finalement la nitrogénase réduit les protons en molécules d'hydrogènes. L'hydrogénase fonctionne dans le sens inverse, elle consomme l'hydrogène pour la production d'électrons, de protons et d'ATP.

Le transfert d'électrons du cycle TCA vers la nitrogénase s'accompagne d'une oxydo-réduction consécutive des transporteurs d'électrons, qui sont la nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) et une ferrédoxine (Fd). Cette voie de transfert est représentée par le schéma suivant :



Le mécanisme de production de l'hydrogène chez *Rhodobacter sphaeroides* est illustré dans la Figure IV.8.

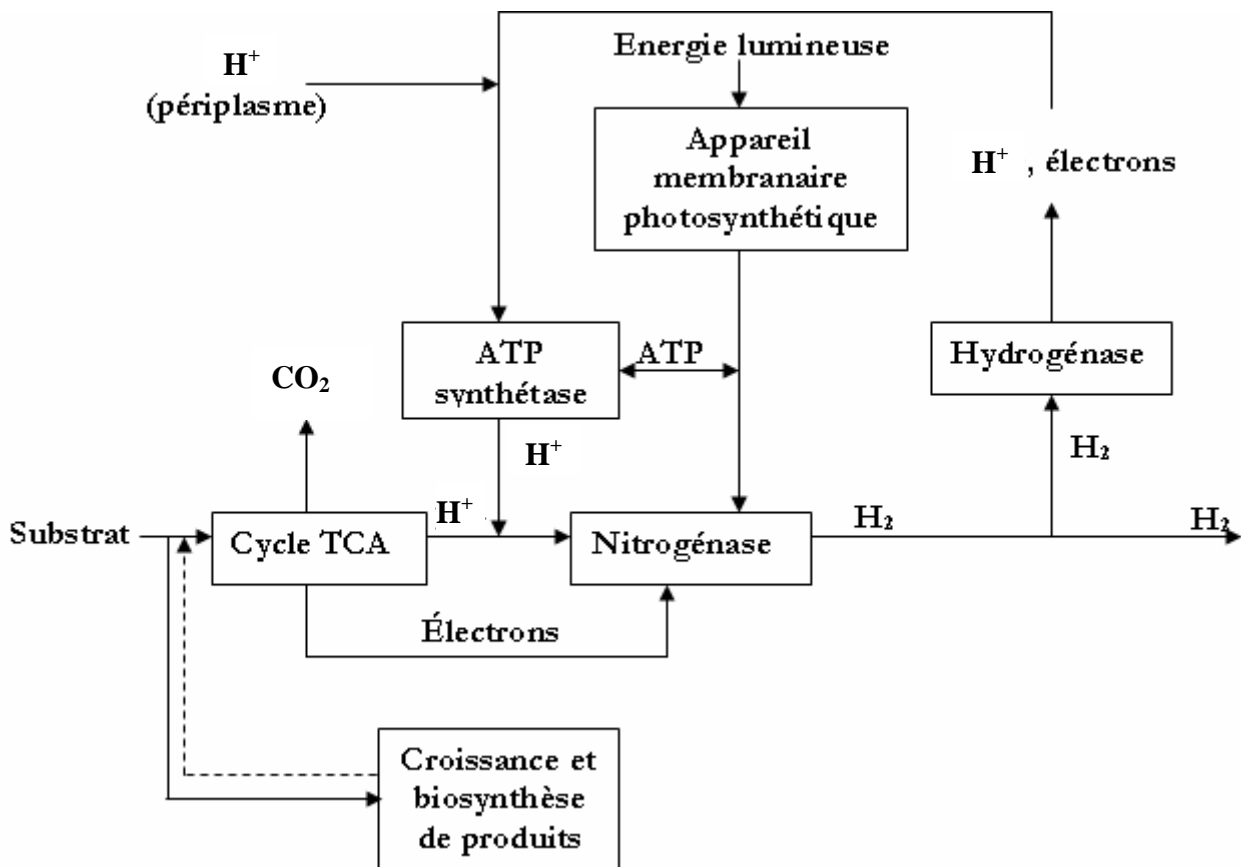


Figure IV.8. Mécanisme de production de l'hydrogène chez *Rhodobacter sphaeroides* [1]

4.4. Recherches et développements

Des travaux récents ont portés sur l'optimisation de la production biologique de l'hydrogène. Ils concernent :

4.4.1. La modification génétique

Dont le but est d'augmenter le taux de production de l'hydrogène en effectuant des manipulations génétiques sur *Rhodobacter sphaeroides* qui conduit à :

- Une inhibition de l'activité de l'hydrogénase par l'addition d'EDTA ;
- Une augmentation de l'efficacité de conversion du substrat en hydrogène par la répression de la synthèse de PHB (poly β hydroxy butyrate), un produit dont le substrat favorise sa production [1] ;
- Ou bien des deux, par la délétion des deux gènes Hup SL et Phb_c codants pour la synthèse de l'hydrogénase et de PHB synthétase, respectivement. Une augmentation de 1.32 à 3.34 ml H₂/mg poids sec cellulaire est observée [38].

4.4.2. La modification de l'appareil photosynthétique

Kondo et al (2002) [37], isolent un mutant MTP4 à partir de *Rhodobacter sphaeroides* RV, et observent une réduction des pigments de l'ordre de 41-49%. Avec ce mutant une augmentation de 50% de la production est observée.

Eui-jin Kim et al (2006) [72] isolent un mutant PUC1 à partir de *Rhodobacter sphaeroides* KCTC 12085 présentant une délétion du gène puc BA du complexe B800-B850, conduisant à une augmentation de production de l'hydrogène de deux fois plus.

4.4.3. L'immobilisation

Zhu et al (1999) [34] utilisent *Rhodobacter sphaeroides* RV immobilisée sur un gel composé de chitosan- agar en présence d'ammonium (inhibiteur de la nitrogénase), et observent une augmentation de la production d'hydrogène. Ce gel chargé positivement résiste à la diffusion de l'ammonium et agit comme tampon. Cette méthode présente un avantage important lors de l'utilisation des eaux résiduaires (source de carbone) contenant une concentration importante en ammonium.

4.4.4. L'utilisation d'un substrat complexe

Les eaux résiduaires utilisées comme nutriments pour la production biologique d'hydrogène, jouant un rôle environnementale et économique important. Yetis et al (2000) [73] utilisent les eaux résiduaires d'une raffinerie de sucre, comme source de carbone. Aucune production d'hydrogène n'est observée avec les différentes dilutions de l'eau résiduaire seules. Lorsque 20% de cette eau est utilisée en présence de malate, le taux de production est similaire à celui obtenu lorsque la seule source de carbone est le malate.

Zhu et al (1999) [74] utilisent des eaux résiduaires de tofu riche en glucose, *Rhodobacter sphaeroides* RV immobilisée sur de l'agar produit de l'hydrogène en utilisant plus de 41% du carbone organique.

Eroglu et al (2004) [5] utilisent comme substrat des eaux résiduaires prélevées au niveau des moulins d'huileries en présence de *Rhodobacter sphaeroides* OU.001. La croissance cellulaire est observée à une dilution de 1 à 20% alors que la production de l'hydrogène est obtenue à une dilution inférieure à 4%. Ces mêmes auteurs (2006) [75] observent une augmentation de la production en hydrogène de l'ordre de 50% (V/V), lorsqu'ils utilisent un effluent, issu de la

fermentation des eaux résiduaires produites à partir d'huilerie par des boues activées, comme substrat pour la photofermentation.

L'ensemble des résultats obtenus dans ces travaux est donné dans le tableau IV.3

Tableau IV.3. Résultats d'utilisation des substrats complexes pour la production d'hydrogène par différentes souches de *Rhodobacter sphaeroides*

Source des eaux résiduaires et additives	Souche	Taux de production (ml/ml/h)	Fraction (ml gaz/ml eau résiduaire)	% d'eau résiduaire	Référence
Raffinerie de sucre + malate	OU.001	0.0043	8.6	20	[73]
Usine de tofu	RV	0.059	1.9	100	[74]
Eau résiduaire d'huilerie	OU.001	0.0035	13.9	2	[5]
	OU.001	0.0095	9.8	1	[5]
	OU.001	0.008	29	50	[75]

4.4.5. L'utilisation des systèmes hybrides et des co-cultures des bactéries fermentaires et photofermentaires

Les systèmes hybrides peuvent être utilisés pour augmenter la production de l'hydrogène et assurer une complète dégradation du substrat (équation III.7 et III.8), dont le principe est illustré sur la Figure IV.10.

Kaushik Nath et al (2005) [40] réalisent une production biologique de l'hydrogène en deux étapes :

- La première est une fermentation du glucose par la bactérie *Enterobacter cloacae* DM11, avec un taux de production de 1.86 mol/mol de glucose ;
- La seconde est une photofermentation sur le milieu de fermentation, par *Rhodobacter sphaeroides* OU.001, avec un taux de production de 1.5-1.72 mole/mole de glucose.

Redwood et al (2006) [35] suivent le même principe en utilisant *Escherichia coli* HD 701 pour la fermentation du glucose.

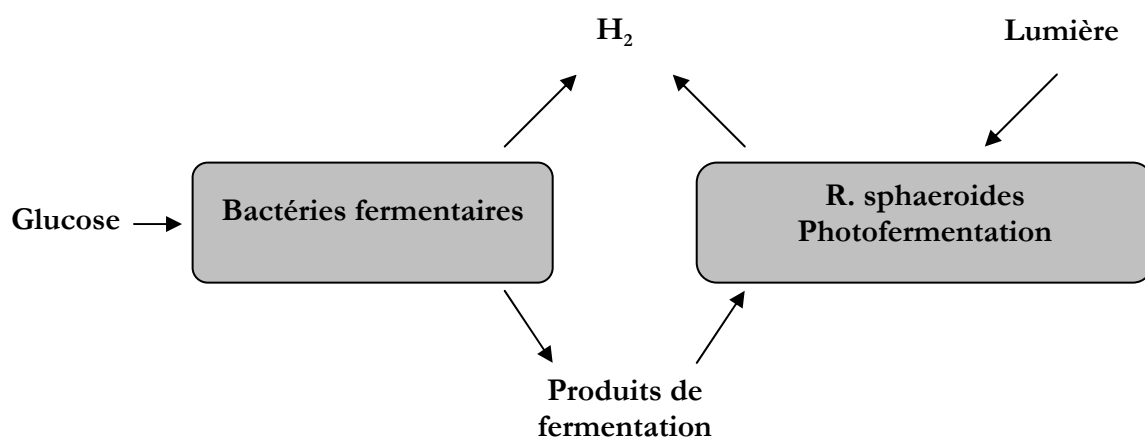


Figure IV.10. Principe des systèmes hybrides des bactéries fermentaires et photofermentaires « *Rhodobacter sphaeroides* »

D'autres chercheurs utilisent des **co- cultures** de bactéries fermentaires (productrices et non productrices d'hydrogène) et photofermentaires.

Frang et al (2006) [76] observent une augmentation de la production, lors d'une co-culture de *Clostridium butyricum* et de *Rhodobacter sphaeroides*.

Pour Yong Zhen Tao et al (2007) [77], le sucrose fermenté par la microflore des boues activés serait utilisé comme substrat (butyrate et acétate) pour la production de l'hydrogène par *Rhodobacter sphaeroides* SH2C. Cette deuxième étape double le rapport molaire d'hydrogène/sucrose.

Yokoi et al (2001) [78] effectuent la production de l'hydrogène à partir d'une co- culture de bactéries fermentaires *Clostridium butyricum* et *Enterobacter aerogenes* en présence d'amidon issu de la pomme de terre. Le milieu de fermentation produit est utilisé pour la production de l'hydrogène par *Rhodobacter sp M19*, permettant ainsi une augmentation de production de 2.4 à 7 moles d'hydrogène/ mole de glucose.

Yasuo Asada et al (2006) [79] effectuent une co- immobilisation des cultures bactériennes, en utilisant une bactérie lactique non productrice d'hydrogène, *Lactobacillus delbrueckii* pour la conversion du glucose en acide lactique ; un substrat favorable pour la production de l'hydrogène par *Rhodobacter sphaeroides*. Le taux de production maximal est de 7.4 moles d'hydrogène/ mole de glucose, avec une dilution au cinquième.

Dans ce présent chapitre, nous avons présenté la bactérie photosynthétique pourpre non sulfureuse, *Rhodobacter sphaeroides*. C'est la bactérie la plus prometteuse pour la photobioproduction de l'hydrogène [2].

V. Matériels et méthodes

V.1. La bactérie *Rhodobacter sphaeroides* CIP 60.6 (DSM 158, ATCC 17023)

Rhodobacter sphaeroides CIP 60.6 est une bactérie photosynthétique pourpre non sulfureuse, obtenue à partir du centre de ressources biologiques de l'institut Pasteur, Paris, France [80]. Elle peut croître à une température de $32 \pm 2^\circ\text{C}$, en présence de lumière, dans des conditions d'anoxie. Le pH initial de son milieu de croissance est de $6,8 \pm 0,2$ [40].

V.2. Culture de la bactérie *Rhodobacter sphaeroides* et conditions de croissance

Les milieux de croissance procurent aux bactéries une source de carbone (succinate de carbone), une source d'azote (sulfate d'ammonium) ainsi que les facteurs de croissance et les oligo-éléments nécessaires à leur développement.

V.2.1. Préparation des milieux de croissance

2.1.1. Le milieu Sistrom A

Le milieu de culture spécifique, utilisé pour la croissance de *Rhodobacter sphaeroides* est le milieu minimal succinate de Sistrom A, décrit par Sistrom en 1962 [81], dans des conditions adéquates de température et de pH. La préparation de ce milieu est donnée dans les Tableaux V.1 à V.4 :

Tableau V.1: Préparation d'1 litre du milieu Sistrom A 10X [81]

Le milieu Sistrom A (10X)	g/l
K ₂ HPO ₄	34.8g
Ou KH ₂ PO ₄	27.2 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	5.0 g
Ou NH ₄ Cl	1.95 g
Acide succinique	40.0 g
Acide L-Glutamique	1.0 g
Acide L-Aspartique	0.4 g
Na Cl	5.0 g
Acide Nitrilotriacétique	2.0 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	3.0 g
Ou MgCl ₂ . 6H ₂ O	2.44 g
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0.334 g
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0.020 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ (solution1%)	0.2 ml
Solution des éléments en trace	1 ml
Solution de Vitamines	1 ml

Ajuster le volume à 1 litre avec de l'eau distillée. Le pH du milieu est de 4.5-4.9. Conserver au réfrigérateur à des usages ultérieurs.

Tableau V.2: Solution des éléments en traces (100 ml)

Eléments en trace	g/0.1l
EDTA	1.7659
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	10.95 g
FeSO ₄ . 7H ₂ O	5.0 g
MnSO ₄ . H ₂ O	1.54 g
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.392 g
Co(NO ₃) ₂ . 6H ₂ O	0.248 g
H ₃ BO ₃	0.114 g

Ajuster le volume à 100 ml avec de l'eau distillée, conserver à 4°C.

Tableau V.3: Solution de vitamines (100 ml)

Vitamines	g/0.1l
Acide nicotinique	1.0 g
Thiamine HCl	0.5 g
Biotine	0.010 g

Ajuster le volume à 100 ml avec de l'eau distillée, conserver à 4°C.

Tableau V.4: Préparation d'1l du milieu Sistrom A (1X)

Le milieu Sistrom A (1X)	Milieu liquide (g/l)	Milieu solide (g/l)
Le milieu Sistrom A (10X)	100 ml	100 ml
Extrait de levure	1 g	1 g
Agar Bactériologique	–	15 g [82]

Compléter le volume à 1 litre avec de l'eau distillée, ajuster le pH à 6.8 avec du NaOH (3N).

2.1.2. Le milieu asy

Ce milieu est préparé à base d'un litre du milieu basal, décrit par Mao et al 1986 [83], (Tableau V.5) auquel on ajoute les composants chimiques donnés dans le Tableau V.6.

Tableau V.5: La composition chimique du milieu basal [79]

La composition chimique	mg/l
KH_2PO_4	8660 mg
K_2HPO_4	7330 mg
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	200 mg
CaCl_2	73 mg
Na_2EDTA	20mg
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	11.8 mg
H_3BO_4	2.8 mg
MnSO_4	2.1 mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.730 mg
$\text{Zn}_2\text{SO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.240 mg
$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	0.40 mg
biotine	0.0015 mg
p-aminobenzoate	0.0015 mg
Nicotinamide (Nicotinate)	0.0015 mg
Thiamine	0.0015 mg

Ajuster le volume à 800 ml avec de l'eau distillée.

Tableau V.6 : La composition chimique du milieu asy [34]

Le milieu asy	Milieu liquide (g/l)
Succinate de sodium	9.8g
Sulfate d'ammonium	1.25g
Extrait de levures	1g

Compléter le volume à 1 litre avec de l'eau distillée, ajuster le pH à 6.8 avec du NaOH (3N).

V.2.2. Revivification et activation de la bactérie lyophilisée *Rhodobacter sphaeroides* CIP 60.6

La mise en culture des bactéries lyophilisées nécessite un milieu d'activation contenant des composants chimiques énergétiques. La revivification de la souche bactérienne s'effectue selon les étapes suivantes. (Figure V.1)

- Après avoir désinfecter la surface du verre à l'alcool, bien limer tout autour de l'étranglement de l'ampoule contenant la bactérie lyophilisée (Figure V.1. (a))
- Provoquer un choc thermique en appliquant, sur le trait de lime, une pipette pasteur coupée court et chauffée au rouge.
- Ouvrir l'ampoule, dans des conditions d'asepsie usuelles, en appuyant légèrement sur la partie supérieure de l'ampoule (Figure V.1. (b))
- Avec une pipette Pasteur contenant environ 0.2ml du milieu Sistrom A (1X), réhydrater le lyophilisat (Figure V.1. (c))
- Ensemencer un milieu approprié, Sistrom A (Figure V.1. (d)), suivants deux modes: ensemencement sur milieu liquide et sur milieu solide.

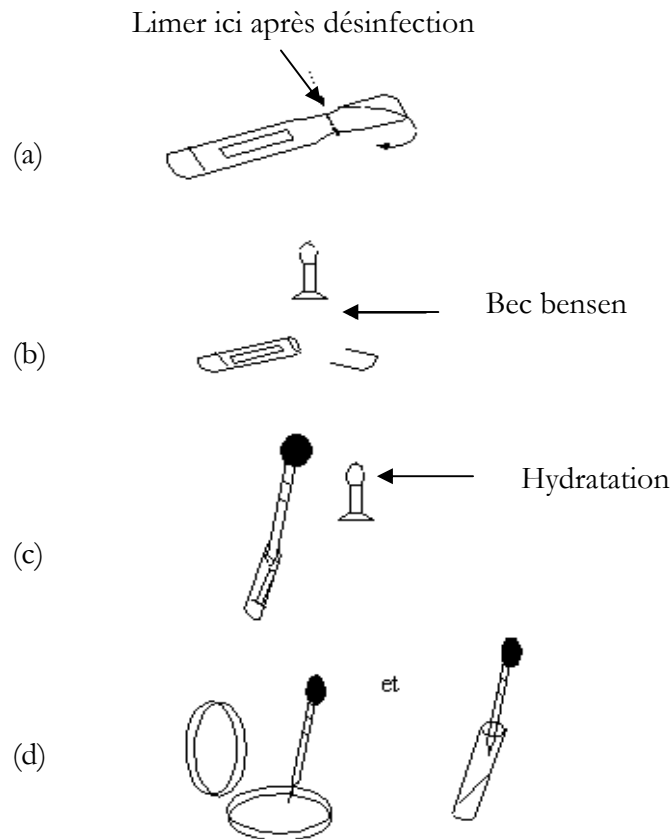


Figure V.1. Revivification de la bactérie lyophilisée *Rhodobacter sphaeroides* [80]

2.2.1. Sur milieu liquide

Un Erlen Meyer de 100ml est rempli avec le milieu de croissance Sistrom A, barboté à l'azote pendant quelques minutes, scellé par un bouchon étanche et autoclavé pendant 20 minutes à 121°C.

Avec une seringue stérile, on prélève 5/6(v/v) du volume total de la souche hydratée et qu'on injecte stérilement dans le milieu liquide de réactivation, incubé à 30°C sous une intensité lumineuse de 1500 lux, mesuré par un luxmètre numérique (Testo 545).

2.2.2. Sur milieu solide

Le volume restant 1/6(v/v) sera utilisé pour des activations en milieu solide, selon deux modes : la respiration et la photosynthèse.

_ Ensemencer en profondeur (anaérobiose), incuber les boîtes renversés à une température de 30°C sous une intensité lumineuse de 1500 Lux (photosynthèse);

_ Ensemencer en surface (aérobiose), incuber les boîtes renversés à une température de 30°C. Les conditions d'obscurité sont obtenus en couvrant les boîtes avec du papier aluminium.

Après incubation et au voisinage du bec bensen, on effectue des repiquages par des ensemencements en strie, à partir des colonies obtenues, dans des conditions de température et de pH adéquates. Une gélose inclinée est recommandée pour la mise en culture de départ.

V.2.3. Caractérisation de la souche

2.3.1. Observation des colonies

Cette observation permet de connaître le diamètre, la forme, l'odeur des colonies et la couleur des pigments.

2.3.2. Teste de mobilité

Observer à l'état frais, entre lame et lamelle ou mieux en gouttes la mobilité des cellules, au microscope photonique Gx400 [56].

2.3.3. Coloration Gram

Cette coloration des cellules bactériennes permet à la fois de connaître la morphologie des bactéries et de les classer en deux groupes en testant la perméabilité pariétale.

Les réactifs utilisés sont:

Le colorant primaire: violet de gentiane phénirique;

Le mordant: Lugol (fixation du colorant);

L'agent de décoloration: Alcool éthylique 96°;

Le colorant de contraste: Fuchsine phéniriquée de Ziehl diluée (coloration des cellules décolorées).

La coloration Gram se fait comme suit:

Étaler le frottis prélever des colonies en aérobiose sur une lame propre;

Fixation;

Recouvrir la lame avec du violet de gentiane pendant deux minutes, jeter l'excès de coloration;

Laisser agir le Lugol pendant une minute, égoutter;

Décolorer deux fois pendant 45 secondes;

Laver abondamment avec de l'eau distillée;

Recolorer à l'aide de la fuchsine;

Laver abondamment avec de l'eau distillée;

Sécher la lame au dessus de la flamme du bec bensen;

Observer au microscope photonique sans lamelle à sec, après la mise au point de l'objectif, déposer une goutte d'huile à immersion sur la lame avant de passer à l'objectif Gx1000 [84, 85].

V.2.4. Etude de la croissance bactérienne au cours du métabolisme respiratoire et photosynthétique

L'étude des modes métaboliques alternatifs de *Rhodobacter sphaeroides* permet de bien connaître cette bactérie.

Pour étudier la cinétique de croissance de *Rhodobacter sphaeroides* CIP 60.6 en présence et en absence de lumière, deux fioles de 200ml contenant le milieu Sistro A sont inoculées stérilement dans des conditions d'anaérobiose en présence de lumière et d'aérobiose en l'absence de lumière à une température 30°C, un pH de 6.8 avec des densités bactériennes de 1.37 et 1.26 respectivement.

Ces conditions sont obtenues en barbotant le milieu de la première fiole avec de l'azote (condition anaérobie), et en couvrant la seconde fiole avec du papier aluminium, tout en permettant un passage aseptique de l'air (condition aérobie).

V.2.5. Etude de la cinétique de croissance dans les milieux asy et Sistrom A

Le milieu de croissance asy contient les mêmes composants chimiques à des concentrations plus ou moins différentes de celles du milieu Sistrom A, qui lui contient, en plus, d'autres éléments chimiques.

L'étude de la cinétique de croissance va nous permettre de déterminer si cette différence a un effet sur l'évolution de la concentration cellulaire en fonction du temps et donc de choisir entre le milieu asy et le milieu Sistrom A, pour la préculture des bactéries destinées à la production de l'hydrogène.

Cette étude est faite dans des conditions d'anaérobioses en présence de lumière à une intensité de 1500 Lux et à une température d'incubation 30°C, pH 6.8.

V.3. Conservation des bactéries

La conservation des bactéries est une étape nécessaire qui suit la revivification, la périodicité des repiquages ou les repiquages successifs se font sur la pente d'une gélose inclinée en tube hermétiquement clos [56].

On prélève avec une pipette Pasteur stérile un petit volume des bactéries repiquées, qu'on ensemence sur la gélosé des tubes inclinés contenant le milieu Sistrom A solide. L'incubation se fait en aérobiose à une température de 30°C, pH 6.8 pendant 24 - 72h dans des conditions d'aérobiose.

Une autre méthode consiste à ensemencer par piqûre centrale un culot de gélose [56]. La culture bactérienne sera ainsi conservée au réfrigérateur à 4°C [86].

La conservation peut être faite également en mélangeant 0.95ml de la culture bactérienne avec 0.05ml de DMSO, suivie d'un stockage à -80°C [52].

*Pour vérifier la pureté des cultures, on ensemence par strie les bactéries sur des boites de Pétri et on effectue la coloration Gram.

V.4. La production d'hydrogène par *Rhodobacter sphaeroides* CIP60.6

V.4.1. Préparation de la préculture de *Rhodobacter sphaeroides*

Un Erlen Meyer de 200 ml est rempli avec du milieu de croissance asy, préalablement préparé, il sera barboté à l'argon et stérilisé à l'autoclave à 121°C pendant 20 minutes sous 1 bar.

Après l'autoclave et au voisinage du bec benzène, le milieu de préculture sera inoculé, à l'aide d'une seringue stérile par *Rhodobacter sphaeroides* à une densité égale à 1, incubé à 30°C pendant 72h [37] sous une intensité lumineuse de 1500 Lux [60] et une agitation de 60 tours/minutes [87].

V.4.2. Préparation du milieu de production d'hydrogène (le milieu gL)

Le milieu de production d'hydrogène est le milieu glutamate Lactate, désigné par le nom "le milieu gL". Ce milieu contient une source de carbone (lactate de sodium), une source d'azote (glutamate de sodium), les facteurs de croissance et les oligo-éléments (Tableaux V.2 et V.3) nécessaires à cette production.

Le lactate et le glutamate sont les substrats les plus favorables pour la production d'hydrogène par *Rhodobacter sphaeroides* [1, 79]. C'est la raison pour la quelle nous avons choisi le milieu glutamate Lactate pour la production d'hydrogène, dont le rapport C/N=50/10. Le choix de ce rapport C/N repose du fait que la production biologique d'hydrogène nécessite un milieu limité en source d'azote, avec un rapport C/N élevé [35]. Il est important à signaler que dans la

littérature plusieurs milieux sont proposés à titre d'exemple, pour le milieu gL le rapport C/N varie, il est de 32/10 [76] et de 50/10 [34, 60].

Ce milieu est préparé à base d'un litre du milieu basal, (Tableau V.5), auquel on ajoute les composants chimiques donnés dans le Tableau V.7:

Tableau V.7: La composition chimique du milieu gL [34]

Les composants chimiques	g/l
Lactate de sodium ($C_3H_5NaO_3$)	5.603 g
Glutamate de sodium ($C_5H_8NO_4Na$)	1.691 g
Bicarbonate de sodium	1.5 g

Compléter le volume à 1 litre avec de l'eau distillée, ajuster le pH à 6.8 avec du HCl (1N).

V.4.3. Préactivation à la production et optimisation de l'âge de culture

Pour la production de l'hydrogène, les cellules sont préacturées dans un Erlen Meyer de 500 ml contenant 450 ml du milieu gL, barboté à l'argon pendant quelques minutes, stérilisé à l'autoclave à une température de 121°C pendant 20 minutes sous 1 bar.

La suspension bactérienne précultivée dans le milieu asy, suivant la procédure décrite précédemment et dont la DO finale est de 1,724, sera diluée dans le milieu de production gL [37] jusqu'à une DO initial égale à 0,340 et incubée en anaérobiose à une température de 30°C sous une intensité lumineuse de 5000 Lux [49, 60, 87] et une agitation de 60 tours/minute [87].

Le choix du temps d'incubation nécessaire à la préactivation est un paramètre d'optimisation pour la production de l'hydrogène [1, 19].

V.4.4. Production d'hydrogène dans les photobioréacteurs

Nous disposons d'une souche microbienne dont on connaît le comportement cinétique. La productivité du procédé de mise en œuvre est étroitement liée au mode de conduite du bioréacteur utilisé et aux conditions opératoires.

4.4.1. Production de l'hydrogène dans un réacteur cylindrique parfaitement agité

4.4.1.1. Description

Le bioréacteur schématisé dans la Figure V.2, montre une conception générale d'un réacteur classique de 300 ml de volume. C'est une cuve cylindrique (11x6,5cm), scellée à sa partie supérieure par un septum permettant l'inoculation et la prise d'échantillonnage, il est muni d'un agitateur magnétique permettant le bon transfert des deux phases biotique et abiotique. La régulation de la température est faite par un thermorégulateur disposé au sein du bain-marie où baigne le réacteur.

À la partie supérieure, le bioréacteur communique avec trois canalisations verticales ouvertes munies de vannes ; la première permet le passage du gaz inerte à l'intérieur du réacteur (conditions d'anaérobioses), les deux autres permettent la sortie des gaz (air et argon) et (biogaz).

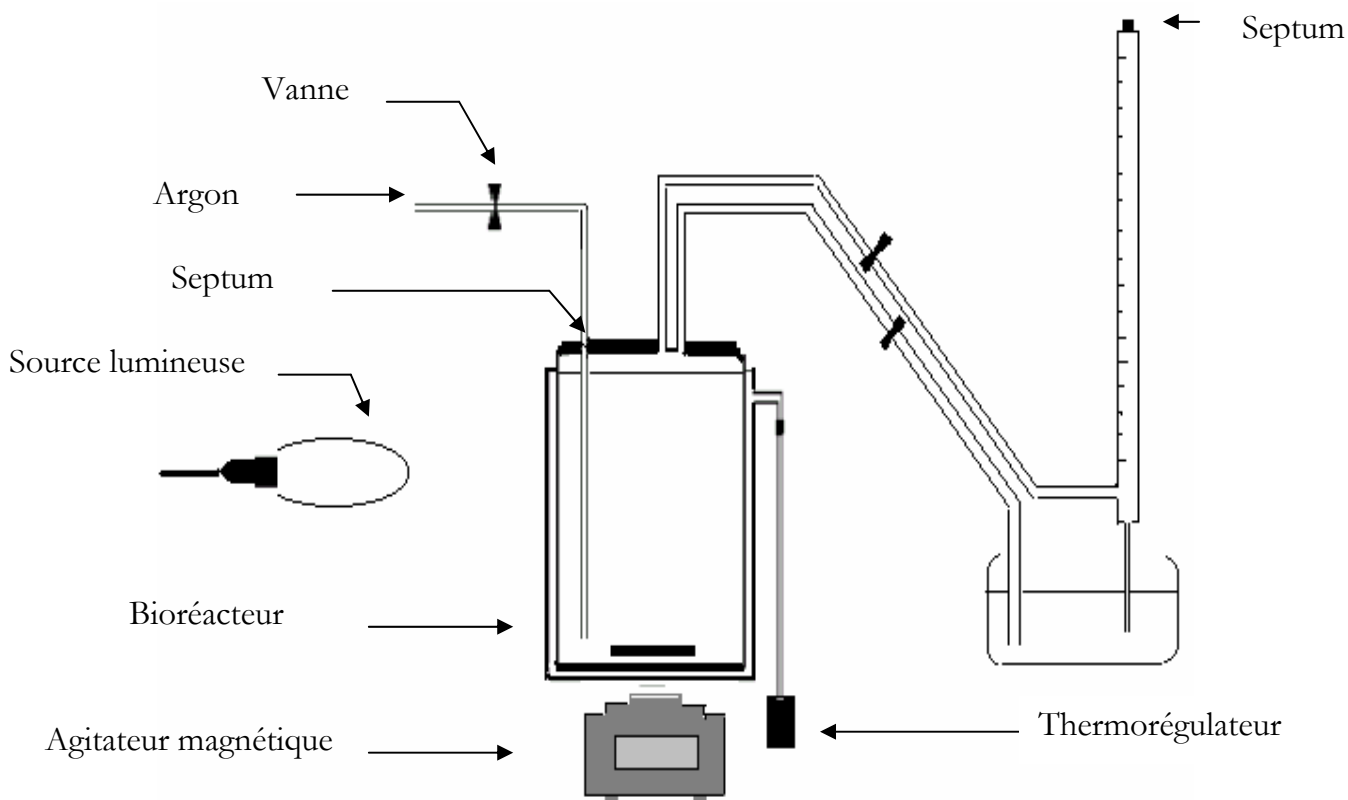


Figure V.2. Réacteur cylindrique parfaitement agité

4.4.1.2. Procédure expérimentale

Une culture bactérienne préactivée dans le milieu gL 1/6(v/v) sera introduite rapidement et stérilement dans le réacteur cylindrique parfaitement agité contenant le milieu gL, autoclavé et barboté à l'argon [37], jusqu'à avoir une DO initiale de 0.43.

4.4.1.3. Conditions de culture

La production d'hydrogène se fait à une température de 30°C, pH 6.8 sous une intensité lumineuse de 2500 Lux à la surface du réacteur. La source lumineuse utilisée est une lampe tungstène (200W, MAG) ; émettrice d'un spectre dont la grande partie est la gamme d'infrarouge. Ce choix repose sur le fait que la suspension bactérienne de *Rhodobacter sphaeroides* absorbe dans la gamme d'infrarouge à une longueur d'onde allant de 800-850nm [60, 63]. Dans la littérature, plusieurs types de lampes sont utilisées : fluorescente [35], halogène [38] et tungstène [5, 34, 40, 60].

4.4.1.4. Optimisation et étude de l'effet des intensités lumineuses sur la cinétique de croissance cellulaire et la production d'hydrogène

Au cours de la photosynthèse, *Rhodobacter sphaeroides* CIP 60.6 utilise, pour sa croissance et pour le mécanisme de production d'hydrogène, la lumière comme source d'énergie [19].

La luminance de la culture bactérienne est un paramètre important à étudier, permettant l'optimisation de la production biologique d'hydrogène. Cette étude se fait en variant les intensités lumineuses, à la surface du réacteur et en face de la source lumineuse, mesurées par un luxmètre numérique (Testo 545).

La production de l'hydrogène se fait à une température de 30°C, sous les intensités suivantes 1000, 2500, 4500 et 8500 Lux.

4.4.1.5 Etude de l'évolution et effet du pH sur la production d'hydrogène

L'évolution du pH est suivie en même temps que la croissance cellulaire par l'utilisation d'un pH mètre (691 pH meter, Ω Metrohom).

Cette étude nous permet de voir l'effet de l'évolution du pH sur la production d'hydrogène, sur l'activité enzymatique de la nitrogénase et l'hydrogénase et de situer la gamme de pH qui favorise la production de l'hydrogène.

4.4.1.6. Effet de l'agitation sur la production d'hydrogène

L'arrêt de l'agitation durant l'incubation, permet d'étudier l'effet du mélange hydrodynamique sur la production d'hydrogène.

4.4.2. Profil de l'intensité lumineuse dans le photobioréacteur en fonction de l'évolution de la concentration cellulaire

Pour pouvoir suivre le profil de l'intensité lumineuse au cours de l'évolution de la concentration cellulaire :

Trois réacteurs contenant des cultures bactériennes, dont les densités en biomasse sont 0.573, 1.400 et 1.980, sont soumis à des mesures permettant d'étudier l'atténuation de l'intensité lumineuse à des profondeurs identiques des trois réacteurs en utilisant un luxmètre. À savoir que la distribution de lumière n'est pas uniforme, cela est lié à la géométrie du réacteur cylindrique.

Cette étude va nous permettre d'estimer le diamètre productif et donc d'évaluer le gain attendu en termes de biomasse et de produit (hydrogène), en concevant un autre réacteur mieux adapté aux besoins spécifiques de la photobioproduction d'hydrogène.

4.4.3. Conception d'un réacteur tubulaire plan avec agitation par pompage (réacteur à jet)

Les photobioréacteurs utilisés généralement sont des réacteurs cylindriques d'où la variation de l'intensité lumineuse incidente au sein du bioréacteur. Pour réduire l'atténuation de l'énergie lumineuse au sein du réacteur et augmenter le taux de production d'hydrogène, on s'est intéressé à concevoir un réacteur tubulaire plan enroulé en spirale d'un faible diamètre.

Description du photobioréacteur

Le photobioréacteur, présenté sur la Figure V.3, est constitué d'une tubulure transparente en verre d'un diamètre de 10 mm et d'un volume de 500 ml, enroulée en spirale sur une surface plane où l'éclairage est maximal. C'est dans cette tubulure où circulent les bactéries. La tubulure plane forme un capteur plan d'environ (29x33x1cm) illuminée par une lampe Tungstène (200W, MAG) placée au dessus du plan. La tubulure est complètement immergée dans un bain marie contenant une eau de refroidissement permettant le maintien de la température constante durant toute la durée de la production.

Les bactéries circulantes passent dans un réservoir cylindrique à travers une tubulure latérale droite horizontale immergée verticalement dans ce réservoir par sa partie supérieure et sortent par une tubulure latérale droite localisée à sa base. Ce passage permet le dégazage de la culture et donc la récupération du biogaz produit. Ce réservoir, rempli d'environ 2/3 (v/v) de suspension bactérienne, est doté à son sommet d'une tubulure en verre trop fine muni d'une vanne manuelle

et scellée à son sommet par un accordeur en silicone permettant de relier deux tubulures fines en verre muni de vanne : l'une permet la libération d'air et d'argon et l'autre le passage direct du biogaz produit vers une boucle permettant l'analyse.

Ce réacteur est également muni à sa surface de deux tubulures droites verticales dotées de vannes manuelles ; l'une, couverte d'un septum permettant l'inoculation et la prise d'échantillonnage et donc de suivre le déroulement de la culture, l'autre d'un coton cardé dont l'utilité est d'empêcher la diffusion de germes présentes dans l'air et maintenir ainsi les conditions d'asepsie lors du barbotage du milieu à l'argon.

La circulation de la suspension bactérienne dans le photobioréacteur est favorisée par la forme spirale, elle est assurée par une pompe type centrifuge. La partie mécanique de cette pompe est séparée de celle où circulent les bactéries afin de maintenir les conditions d'asepsie.

4.4.4. Production de l'hydrogène dans le réacteur tubulaire plan avec agitation par pompage (réacteur à jet)

4.4.4.1. La procédure opératoire pour la photobioproduction d'hydrogène

Le mode opératoire est identique à celui du réacteur cylindrique (voir paragraphe 3-1-2). La production de l'hydrogène se fait sous une température de 30°C, pH 6.8 et une intensité lumineuse de 2000 Lux.

4.4.4.2. Optimisation et étude de l'effet de l'intensité lumineuse sur la cinétique de croissance et de production d'hydrogène

Le réacteur tubulaire plan dont le diamètre intérieur est de 1cm sera exposé aux intensités lumineuses suivantes 2000, 4500 8500 et 8500 Lux. L'effet de la lumière sur la croissance cellulaire, la production d'hydrogène et la productivité sera étudié.

4.4.4.3. Effet de l'intensité lumineuse du jour sur la cinétique de croissance et de production d'hydrogène

A une très forte intensité lumineuse 20000 Lux (Lumière du jour), la croissance cellulaire et la production d'hydrogène seront étudiées.

4.4.4.4. Etude de l'évolution et effet du pH sur la production d'hydrogène

L'évolution du pH est suivie en même temps que la croissance cellulaire par l'utilisation d'un pH mètre (691 pH meter, Ω Metrohom). Ce qui permet d'étudier l'effet du pH sur le mécanisme de production d'hydrogène.

4.4.4.5. Effet de pompage sur la production d'hydrogène

L'arrêt de pompage durant l'incubation, permet d'étudier l'effet d'agitation sur la production d'hydrogène dans le réacteur tubulaire.

Remarque

1. Les deux photobioréacteurs seront couverts d'une enceinte en aluminium ou en carton permettant de sélectionner l'apport de lumière (seule l'intensité lumineuse choisie règne) et de minimiser la diffusion de lumière.
2. Avant et après autoclavage, on augmente l'étanchéité du système en utilisant de la silicone, cela permet d'éviter tous risque de contamination, de dépression et de fuite, à différentes zones de raccordement.

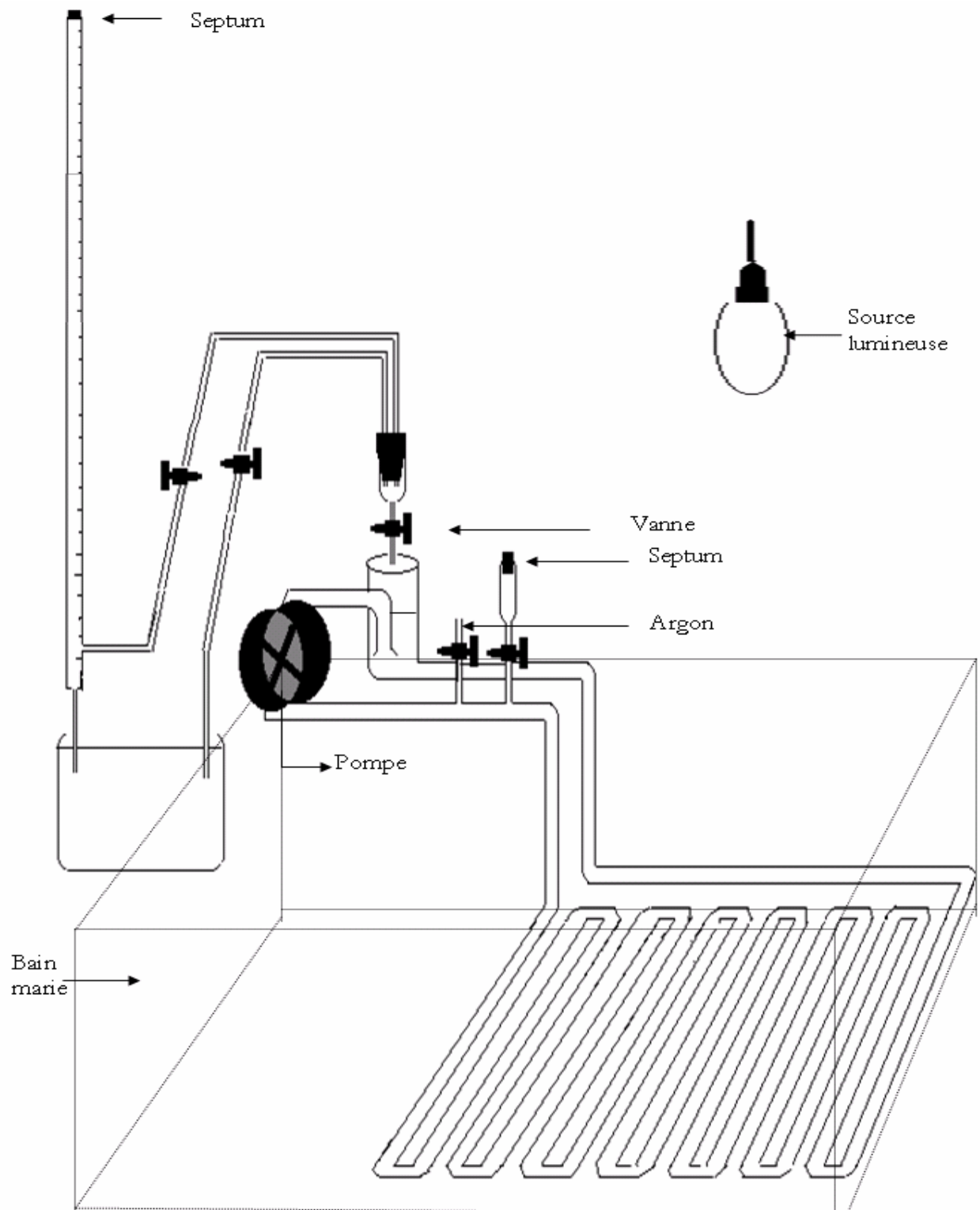


Figure V.3. Réacteur tubulaire plan avec agitation par pompage (réacteur à jet)

V.5. Mesure du taux de la croissance cellulaire

La concentration cellulaire est déterminée par la mesure de la densité cellulaire à une longueur d'onde de 660nm par un spectrophotomètre (Spectrophotomètre UV mini 1240 SHIMADZU) [13], c'est une longueur d'onde où les pigments absorbent peu [60], Figure IV.6. (a). Cette technique de turbidimétrie se prête bien à une détermination en ligne au cours de la croissance cellulaire [88].

Une faible quantité de la suspension bactérienne est prélevée à partir du photobioréacteur à des intervalles de temps, permettant de suivre l'évolution de la cinétique de croissance.

V.6. Mesure du volume d'hydrogène

V.6.1. Description du système

Le biogaz produit est mesuré par la méthode de déplacement d'eau [2,16,35,37,42], il sera récupéré dans un cylindre gradué de 150ml, contenant une solution concentrée en NaOH 20%, scellé à son sommet par un septum permettant l'analyse du gaz.

L'extrémité du tube est mise à barboter dans une solution concentrée en NaCl 20% [37].

V.6.2. Principe

Le volume déplacé dans le tube correspond au volume du biogaz produit. Le CO₂ présent dans le biogaz sera piégé par le passage du mélange gazeux (10%CO₂ et 90% H₂) [2, 16,37] à travers une solution concentrée à 20% de NaOH [37] donc le volume de déplacement de NaOH correspond au volume d'hydrogène produit.

La solution concentrée en NaCl à 20%, présente dans le barboteur, a pour rôle, de maintenir l'anaérobiose [35], d'empêcher l'apport de germes contaminants, de saturer le liquide et donc d'empêcher le passage d'autres gaz autres que le biogaz.

La composition du gaz est confirmée par l'utilisation d'une chromatographie en phase gazeuse (SHIMADZU GC-14B) équipée d'un détecteur de conductivité thermique (TCD). Les températures opérationnelles de l'injecteur, la colonne et le détecteur sont 100°, 200° et 100°C respectivement. L'argon est utilisé comme gaz vecteur avec un débit de 1 l/h.

VI. Résultats et discussions

VI.1. Revivification, caractérisation et étude de la cinétique de croissance de *Rhodobacter sphaeroides* CIP 60.6 en mode photohétérotrophe et chimiohétérotrophe

1.1. Revivification de *Rhodobacter sphaeroides* CIP 60.6

La revivification de *Rhodobacter sphaeroides* CIP 60.6, nécessite un milieu approprié permettant sa réactivation. Selon le mode métabolique utilisé, le temps de début d'apparition des colonies (milieu solide) ou du trouble (milieu liquide) diffère. Les résultats sont illustrés dans le Tableau VI.1.

Tableau VI.1: Temps nécessaire à la revivification de *Rhodobacter sphaeroides*

Mode Temps (h)	Milieu Sistrom A	Revivification	Repiquages	
			Premier	Deuxième
Chimiotrophe (aérobiose)	Solide	72h	48h	24h
Phototrophe (anaérobiose)		120h	72h	48h
	Liquide	96-120h	72h	48h

Ces résultats recommandent la nécessité d'un deuxième repiquage, avant toute utilisation [80]. On constate que la durée d'apparition des colonies diminue considérablement après le deuxième repiquage, suite à une réduction de la phase de latence et une bonne adaptation des bactéries aux constituants du milieu de culture.

1.2. Caractérisation des bactéries

Chaque bactérie présente des formes et des dimensions caractéristiques qui varient selon l'espèce. Ce sont des facteurs primordiaux pour la classification bactérienne.

1.2.1. L'arrangement des bactéries en colonies sur milieu solide

Pour *Rhodobacter sphaeroides*, les colonies formées sur le milieu solide Sistrom A sont approximativement rondes, lisses, avec une odeur caractéristique. L'intensité de la coloration dépend de la présence (ou non) de l'oxygène et de la lumière. Leurs diamètres peuvent atteindre 1mm après 72h d'incubation. En effet, ces résultats sont en accord avec Chris Mackenzie [82].

L'arrangement des bactéries phototrophes présente des colonies ayant une couleur pourpre-brun (Figure VI.1.a) ; les chimiotrophes présentent une couleur rose (Figure VI.1.b).

Cette différence est liée au système pigmentaire des bactéries, régulé par la présence ou non de l'oxygène et selon l'intensité lumineuse.

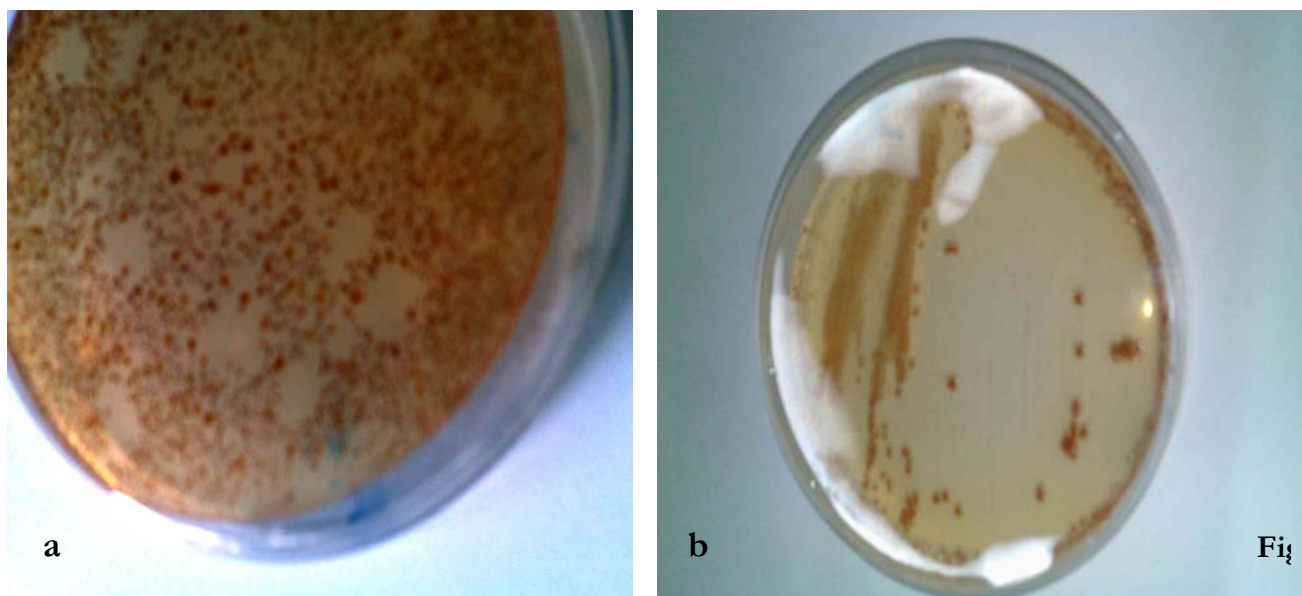


Figure VI.1. (a) Croissance en anaérobiose
(b) Croissance en aérobie

L'anaérobiose induit une différenciation de la membrane cellulaire à travers un processus d'invagination, résultant dans la synthèse d'une membrane intra-cytoplasmique (ICM). L'ICM est structurellement en continue et fonctionnellement en discontinue avec la membrane cytoplasmique (CM), elle contient un complexe protéine-pigment et des composants redox nécessaires à la capture de l'énergie lumineuse et sa conversion en énergie cellulaire [59] (Figure VI.2) [61].

Sous une faible intensité lumineuse (1500 Lux), *Rhodobacter sphaeroides* maximise le niveau de synthèse de l'appareil photosynthétique [90], ce qui se traduit par une couleur foncée en présence de lumière.

En aérobie, la synthèse des pigments est inhibée, les bactéries contiennent peu de pigments par unité de masse [56, 89].

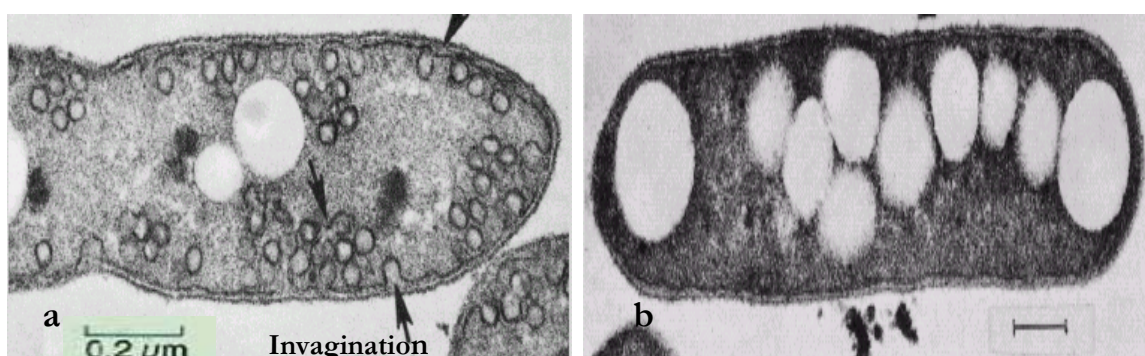


Figure VI.2. Différenciation de la membrane cellulaire en présence [61]
(a) en présence d'oxygène
(b) en absence d'oxygène

1.2.2. La mobilité

Les cellules de *Rhodobacter sphaeroides* apparaissent mobiles à l'état frais, sous microscope photonique.

Elles présentent des mouvements photo-sensoriels dans leur réponse à une stimulation par la lumière [90], elles sont mobiles par leur flagelle unidirectionnel qui produit des rotations dans le sens des aiguilles d'une montre [51], Stephen J Calister et al observent la présence de trois protéines chimiotactiques caractérisant les cultures photosynthétiques [90].

1.2.3. Coloration Gram

Cette coloration des cellules bactériennes permet à la fois de connaître la morphologie des bactéries et de les classer en deux groupes, en fonction de leur capacité ou non de retenir la coloration violette. Cette division découle principalement des différences dans la structure des parois cellulaires des deux groupes [84].

Après coloration et observation au microscope photonique, les bactéries sont colorées en rose "Gram négatif" et elles ont une forme ovoïde [56] (Figure VI.3).

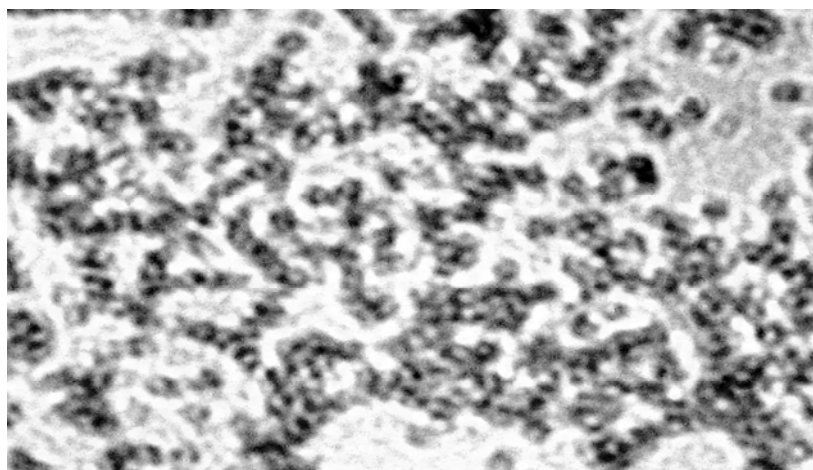


Figure VI.3. Observation au microscope photonique de *Rhodobacter sphaeroides* CIP 60.6 Après coloration Gram.

1.2.4. Observation au microscope électronique à balayage

L'observation au microscope électronique à balayage permet de fournir le détail sur la morphologie bactérienne. (Figure VI.4)

Rhodobacter sphaeroides est une bactérie ovoïde ayant un diamètre allant de 0.5-0.7 μm et une longueur de 2-2.5 μm [40], elle possède un flagelle qui lui permet de se mouvoir librement vers les emplacements les plus favorables à son développement.

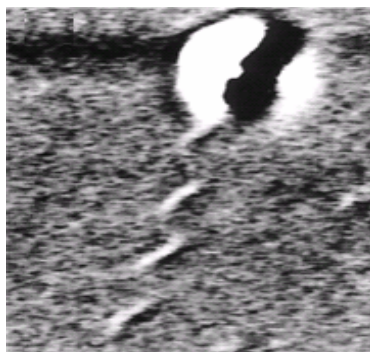


Figure VI.4. Observation au microscope électronique à balayage de *Rhodobacter sphaeroides* CIP 60.6 [91]

1.3. Etude de la croissance bactérienne au cours du métabolisme respiratoire et photosynthétique

L'étude de la croissance d'une culture bactérienne constitue un chemin principal vers des connaissances de base sur la souche.

Les courbes de croissances obtenues en présence et en l'absence de lumière ont une allure d'une courbe de croissance bactérienne classique avec ses différentes phases caractéristiques : la phase de l'attente, la phase d'accélération, la phase de croissance exponentielle, la phase de ralentissement et la phase stationnaire (Figure III.5). Quelque soit le type de microorganisme, la croissance se déroule de façon identique et comporte les mêmes phases.

Rhodobacter sphaeroides est une bactérie pourpre photosynthétique, possédant la capacité de croître en aérobiose en absence de lumière (Chimiotrophe) et en anaérobiose en présence de lumière (Phototrophe). Ces résultats confirment les données de la bibliographie concernant l'adaptation de *Rhodobacter sphaeroides* à plusieurs modes métaboliques [37, 40, 64].

En aérobiose et au bout de 71h la concentration cellulaire a une DO de 2.84, elle atteint son maximum DO 3.6 au bout de 120h d'incubation. En anaérobiose la concentration maximale est atteinte dans un intervalle du temps de [0-70h], correspondant à une DO de 1.88. Les résultats sont présentés sur la Figure VI.5.

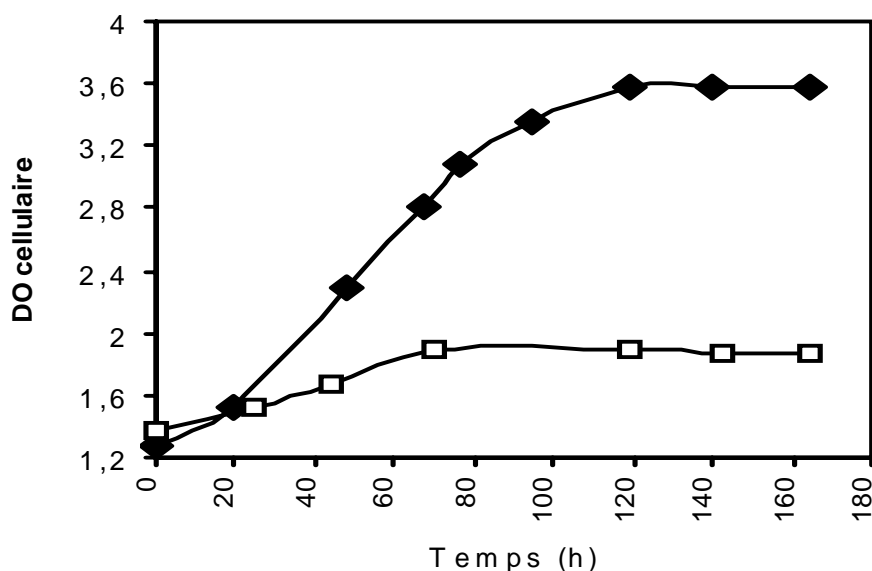


Figure VI.5. La cinétique de croissance en aérobiose (◆) et en anaérobiose (□)

D'après ces résultats, on constate qu'en absence de lumière le taux de croissance est supérieur à celui d'une croissance en présence de lumière. Ces résultats sont similaires à ceux de Chortip Lorrunguang et al, Stephen J Calister et al [90.92].

Au bout du troisième jour d'incubation, les deux milieux prennent la couleur rouge spécifique aux pigments avec une couleur plus foncée en croissance photo-hétérotrophe, (Figure VI.6) (pour plus de détail, voir paragraphe VI.1.2.1).

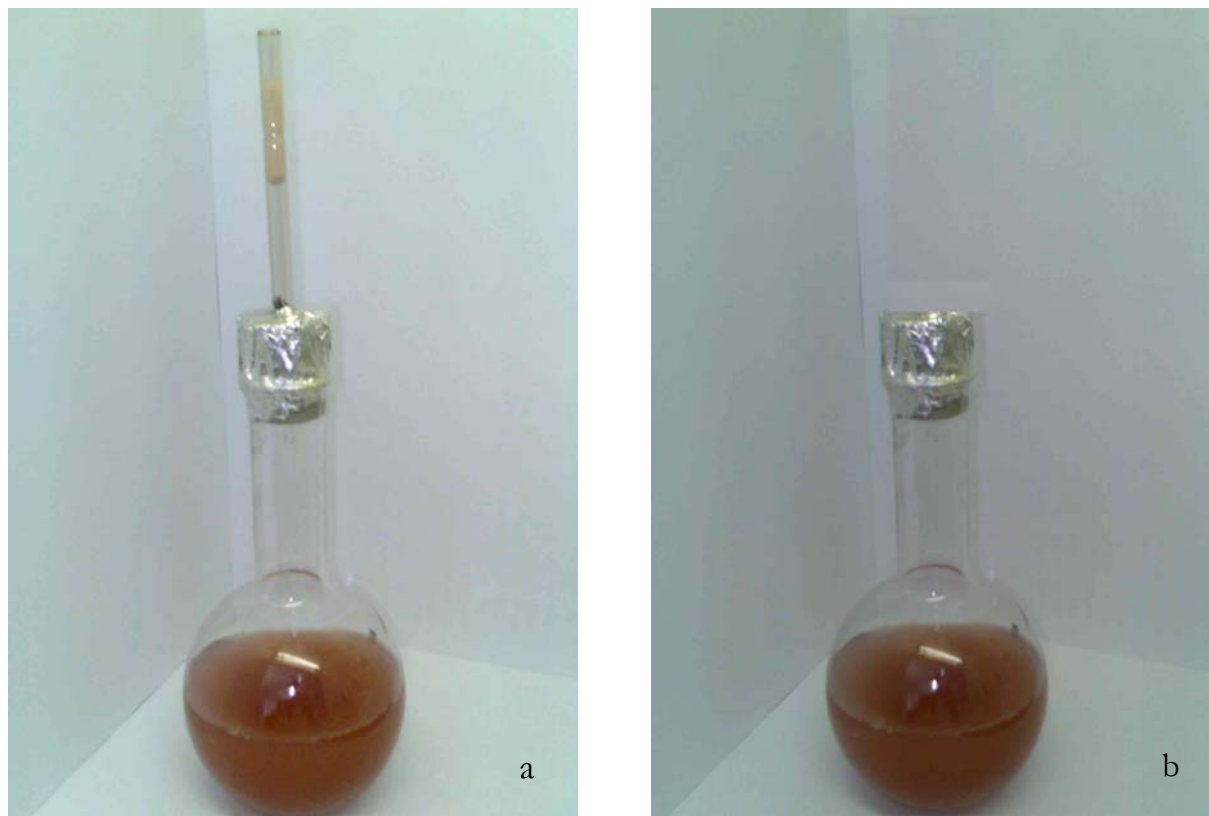


Figure VI.6. Les milieux de croissance en aérobiose
(a) en aérobiose
(b) en anaérobiose

1.4. Etude de la cinétique de croissance dans le milieu Sistrom A et le milieu Asy

Les cinétiques de croissance de *Rhodobacter sphaeroides* sur le milieu Sistrom A ($DO_i=1.37$) et sur le milieu asy ($DO_i=0.98$) sous une intensité de 1500 Lux sont représentées dans la Figure VI.7.

Les courbes de croissance montrent que la bactérie pourpre *Rhodobacter sphaeroides* atteint sa croissance maximale au bout de 70h avec une DO max de 1.88 avec le milieu Sistrom et au bout de 71h avec une DO max de 1.63 avec le milieu asy.

Le calcul de la vitesse (taux) maximale de croissance $r_{X_{max}}$ est régit par la loi suivante [88]:

$$r_{X_{max}} = \frac{dX_{max}}{dt_{max}} \quad (VI.1)$$

Il apparaît que le milieu asy confère aux bactéries une cinétique de croissance avec un taux de croissance ($r_{x_{\max}}=8.9 \cdot 10^{-3} \text{DO/h}$) supérieur à celui obtenu avec le milieu Sistrom A ($r_{x_{\max}}=7.28 \cdot 10^{-3} \text{DO/h}$).

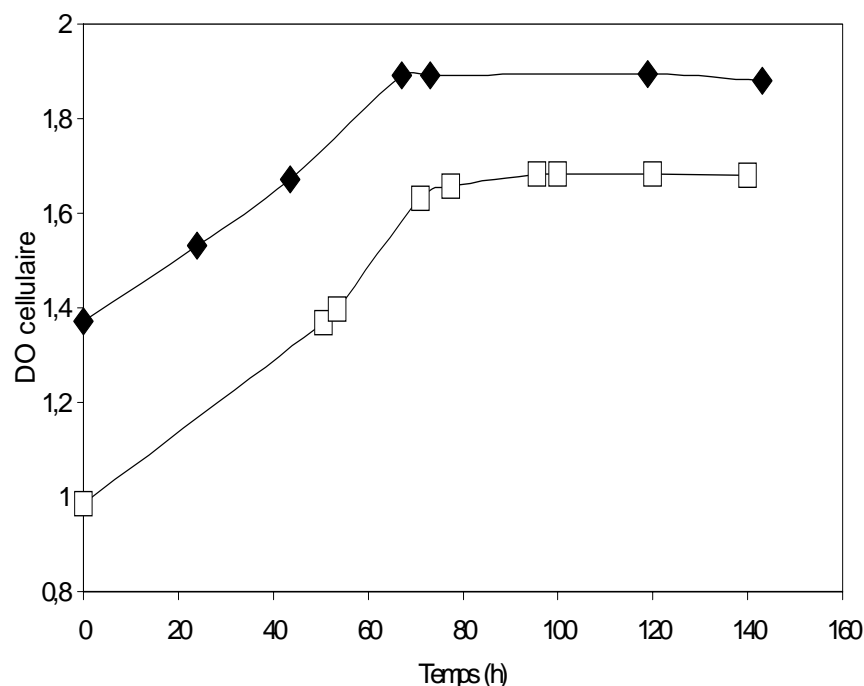


Figure VI.7. Etude de la cinétique de croissance dans le milieu Sistrom A (♦) et le milieu asy (□)

Le milieu Sistrom A contient, en plus d'autres éléments chimiques, des composés chimiques identiques au milieu Asy, à des concentrations presque égales ou supérieures à l'exception de l'acide succinique, utilisé comme source de carbone et force réductrice et du sulfate d'ammonium utilisé comme source d'azote; ces deux composés sont dans le milieu Sistrom à des concentrations 2.5 fois inférieures.

Cette différence affecte la cinétique de croissance de *Rhodobacter sphaeroides*, puisque le sulfate d'ammonium et l'acide succinique sont nécessaires à son métabolisme photo-hétérotrophe [90, 1]. Nous choisissons d'utiliser le milieu asy pour la pré-culture des bactéries destinées à la production de l'hydrogène, afin d'accélérer la croissance bactérienne et afin de réduire le coût du milieu. Ce milieu a d'ailleurs été recommandé par plusieurs chercheurs, comme Toshihiko Kondo et al [37], Eijunakada et al [60], Hегuang Zue et al [34], Jun Miyake et al [83] et Yasuo Asada et al [79].

VI.2. Préactivation à la production d'hydrogène

La préactivation à la production d'hydrogène est une étape importante qui précède la production dans les photobioréacteurs. Cette étape, comme son nom l'indique, induit l'activité de la production de l'hydrogène [76], jusqu'à ce que le taux de production devienne

constant [60]. Le choix du temps nécessaire à l'incubation dépend d'un paramètre important « l'âge de la culture d'inoculation ». Ce paramètre d'optimisation permet d'augmenter l'activité de la production [1,19].

Les résultats obtenus dans la Figure VI.8 montrent que la croissance cellulaire atteint son maximum (DO 1.8) au bout de 65h ce qui correspond au début de la phase de ralentissement.

Le prélèvement de l'inoculum (pour inoculer les photobioréacteurs) s'effectue au bout de 36h à 48h avec une DO de 1.1 à 1.38 respectivement ; ceci correspond à la mi- phase exponentielle. Au cours de cette phase, le taux de croissance bactérienne est maximal, ce qui aura pour rôle, le passage direct vers la phase exponentielle, l'augmentation du taux de production et la réduction du temps de début (temps de retard) de production d'hydrogène.

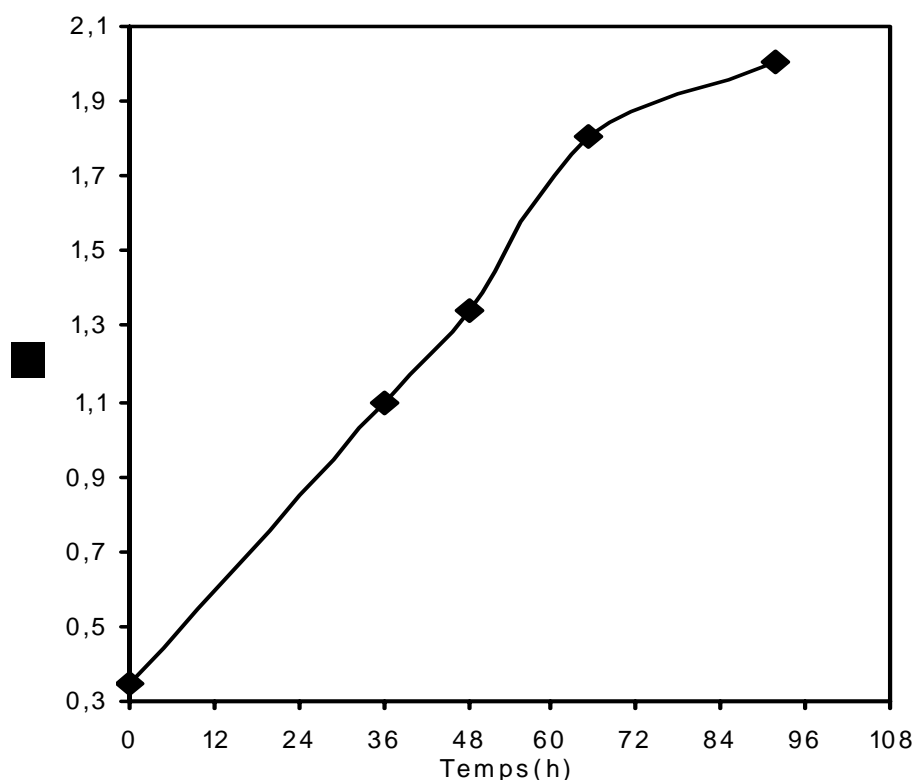


Figure VI.8. Préactivation à la production d'hydrogène

Selon Harun Koku et al [19], le prélèvement de l'inoculum en phase exponentielle et en phase stationnaire de la culture d'inoculation abouti à des résultats remarquablement différents en termes de volume totale de l'hydrogène produit, du taux de production et de l'efficacité de conversion du substrat.

Le choix de la concentration initiale pour l'inoculation des réacteurs n'est pas lié à la densité cellulaire mais à l'âge de cette culture, sachant qu'une très grande concentration diminuerait la production de l'hydrogène [2, 19, 73, 89].

VI.3. Production de l'hydrogène par *Rhodobacter sphaeroides* CIP 60.6 dans un réacteur cylindrique parfaitement agité

3.1. Effet de l'intensité lumineuse sur la croissance bactérienne et la production d'hydrogène

3.1.1. Etude de la relation entre les cinétiques de croissance et de production

Le biogaz produit est mesuré par la méthode de déplacement d'eau. Le volume déplacé dans le tube gradué correspond au volume du biogaz produit. La composition du gaz est confirmée par l'utilisation d'une chromatographie en phase gazeuse (SHIMADZU GC-14B).

Les courbes de l'évolution de la concentration cellulaire et du volume d'hydrogène en fonction du temps à différentes intensités lumineuses 1000, 2500, 4500 et 8500 Lux sont illustrées dans les Figures VI.9.10.11 et 12.

- A une faible intensité lumineuse 1000 Lux, (Figure VI.9) la production de l'hydrogène commence après un temps de retard de 24h du début de la phase exponentielle de la croissance bactérienne. L'évolution de la production est concomitante avec la croissance cellulaire. La production et la croissance s'arrêtent au bout de 140h avec un volume final de 0.16 l et à une DO_f égale à 0.769. L'hydrogène est un métabolite primaire associé à la croissance.

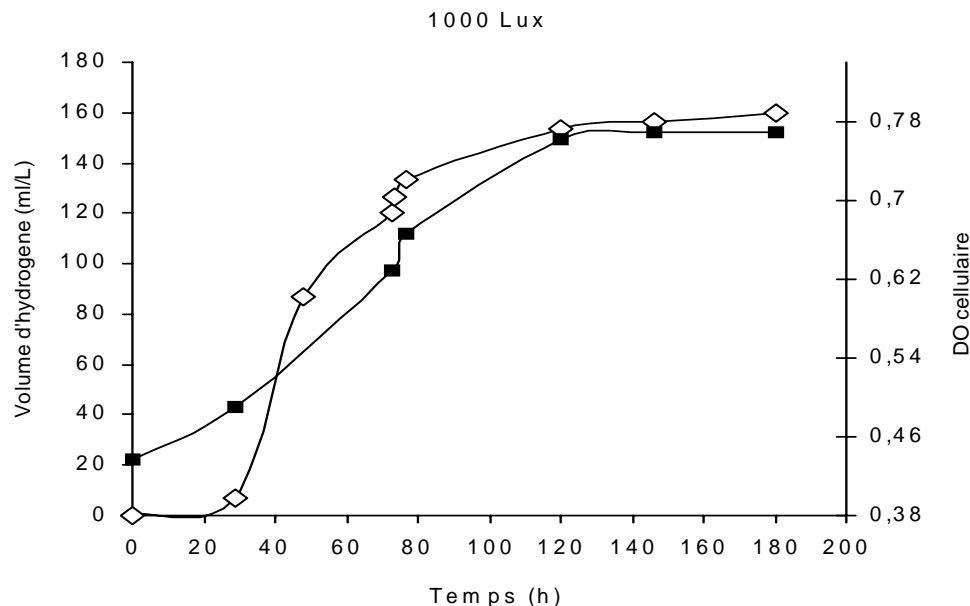


Figure VI.9. Cinétique de croissance bactérienne (■) et de production de l'hydrogène (◇) à une intensité lumineuse de 1000 Lux.

- A une intensité lumineuse de 2500 Lux, l'évolution de la cinétique de croissance présente une phase exponentielle aboutissant à une DO_{max} de 1.9 après un temps d'incubation de 70h. La production d'hydrogène débute après un temps de retard de 10h, elle continue son évolution même durant la phase stationnaire

de la croissance d'une DO_f 2.2 avec une réduction du taux de production maximal de 77%, figure VI.10.

La croissance et la production ne sont que partiellement reliées, on parle d'une association mixte.

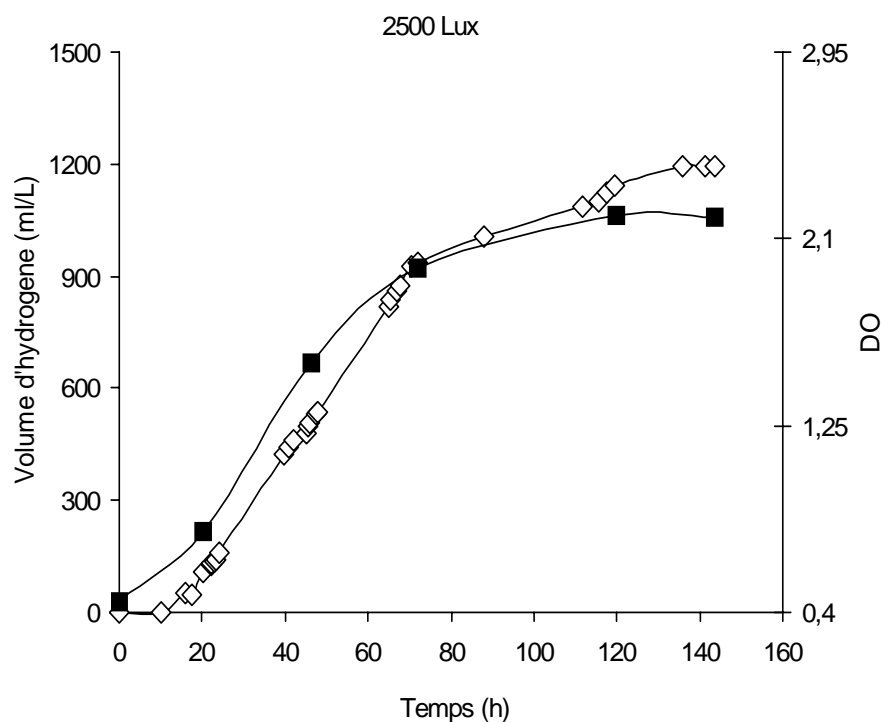


Figure VI.10. Cinétique de croissance bactérienne (■) et de production de l'hydrogène (◇) à une intensité lumineuse de 2500 Lux.

- La courbe de croissance bactérienne et la production d'hydrogène en fonction du temps à une intensité lumineuse de 4500 Lux est illustrée dans la Figure VI.11. La concentration cellulaire maximale, DO_{max} 1.89, est atteinte après 67h d'incubation. Cette concentration atteint un état d'équilibre à une valeur de DO_f égale à 2. La production de l'hydrogène débute après 10h d'incubation, au cours de la phase exponentielle ; le taux de production linéaire est maximal, même durant les premières heures de la phase stationnaire (approximativement 7h) ; ensuite, ce taux diminue avec un pourcentage de 92% jusqu'à la fin de l'expérience.

L'hydrogène produit sous une intensité de 4500 Lux est un métabolite mixte.

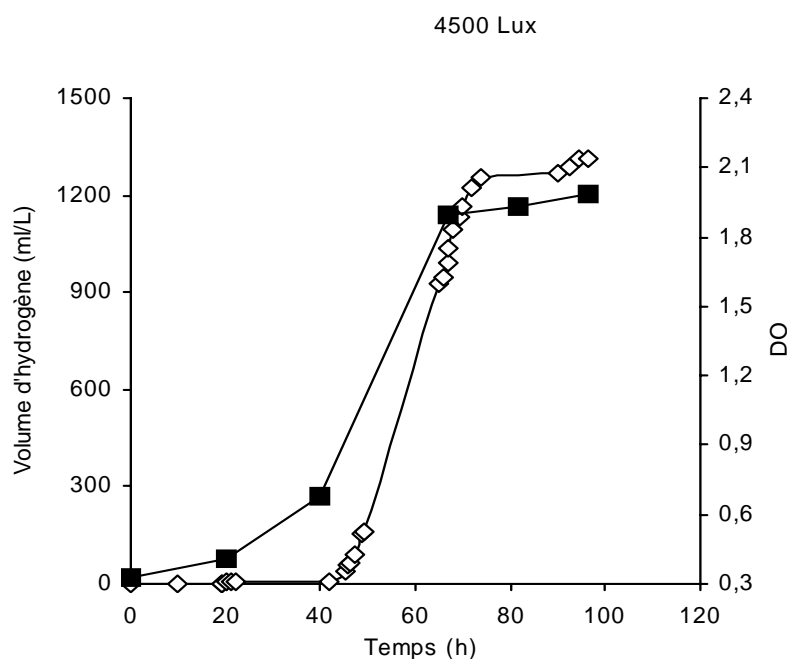


Figure VI.11. Cinétique de croissance bactérienne (■) et de production de l'hydrogène (◇) à une intensité lumineuse de 4500 Lux.

A 8500 Lux, la production de l'hydrogène débute après un temps de retard de 24h. Au bout de 40h d'incubation, la production démarre linéairement et atteint une valeur maximale même durant la phase stationnaire de croissance. Au deux tiers de cette phase maximale de production, la concentration cellulaire est maximale avec une DO_{max} égale à 2.16. Le taux de production diminue de 87% après 89h d'incubation jusqu'à la fin de l'expérience. La DO_F est égale à 2.27 (Figure VI.12).

L'hydrogène produit sous une intensité de 8500 Lux est un métabolite mixte.

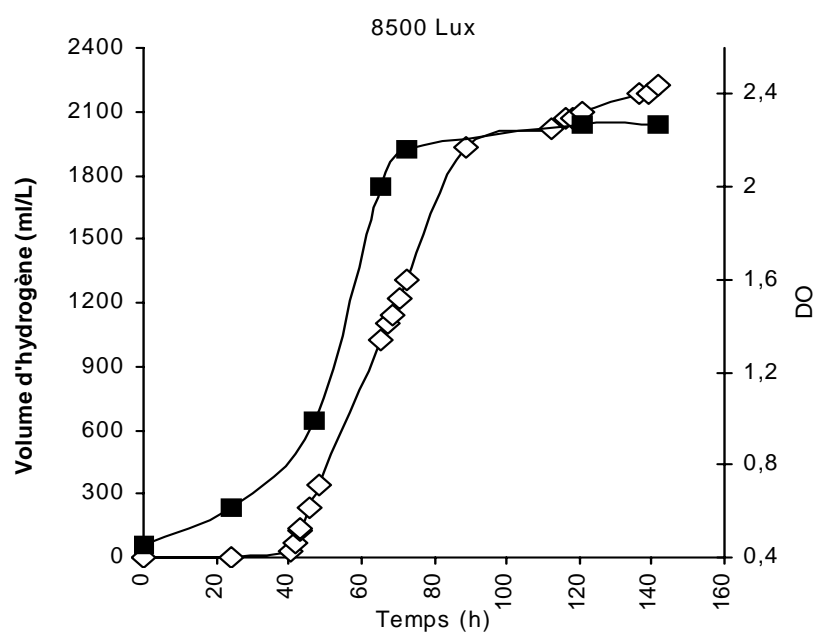


Figure VI.12. Cinétique de croissance (■) et de production (◇) à une intensité lumineuse de 8500 Lux.

D'après ces résultats, l'hydrogène est un métabolite produit au cours des deux phases de la croissance bactérienne : la phase exponentielle et dans certains cas la phase stationnaire avec une réduction du taux de production de $85 \pm 7,5 \%$; cela serait dû à :

- **En termes d'activité métabolique** : la croissance des bactéries s'arrête au cours de la phase stationnaire mais elles conservent cependant une activité métabolique [86].
- **En termes de densité cellulaire** : Au cours de la croissance bactérienne, la concentration cellulaire présente une concentration maximale (DO_{max}) et une concentration finale (DO_f). Dans le cas des métabolismes mixtes, la DO_f est supérieure à la DO_{max} , d'où la continuité de production de l'hydrogène, durant la phase stationnaire, sous les intensités 2500, 4500 et 8500 Lux. Sous une faible intensité lumineuse 1000 Lux, le métabolisme est primaire avec une DO_{max} égale à la DO_f . Ces résultats sont en accord avec ceux de Ela Eroglu et al [39].
- **En termes d'intensité lumineuse** : Au cours de la phase stationnaire et sous des intensités lumineuses supérieures à 2500 Lux, le taux de production de l'hydrogène reste maximal et linéaire, durant un certain intervalle du temps qui devient important avec l'augmentation de l'intensité, ensuite il diminue. Alors que sous une intensité de 2500 Lux, ce taux diminue avec l'arrêt de la croissance et devient nul que pour une très faible luminance de 1000 Lux.

A des intensités de 2500, 4500 et 8500 Lux, on parle de métabolisme mixte et donc du métabolite associé et non associé à la croissance. Le profil de production de l'hydrogène obtenu est régi par la loi de **Leudeking-Pir «LP»** [56, 88] :

$$q_p = \alpha\mu + \beta \quad (VI.2)$$

q_p : est le taux spécifique de production (h^{-1})

μ : est le taux spécifique de croissance (h^{-1}). La production est concomitante avec la croissance.

α et β : sont respectivement les coefficients de croissance associé et non associé (h^{-1}).

$$\alpha = Y' p/X ,$$

$$\beta = \frac{r_p}{X} = q_p' .$$

r_p : est le taux de production ($g/l/h$)

$Y' p/X$: est la quantité de métabolites produite par unité de biomasse cellulaire formée.

A 1000 Lux, le profil d'une production d'hydrogène associée à la croissance est régi par la loi suivante [56, 88] :

$$q_p = Y p/X \mu \quad (VI.3)$$

3.1.2. Effet de l'intensité lumineuse sur la croissance bactérienne

La lumière est une source d'énergie nécessaire au développement des bactéries phototrophes. L'étude de l'évolution de la concentration cellulaire en fonction du temps à différentes intensités lumineuses est illustrée dans la figure VI.13.

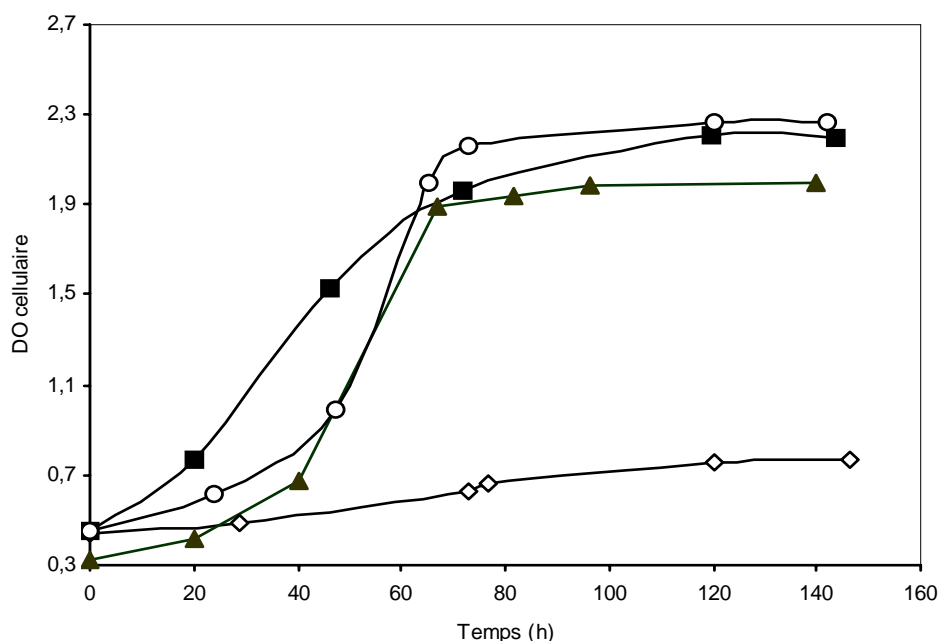


Figure VI.13. Effet de l'intensité lumineuse sur la croissance bactérienne. (◇) 1000 Lux ; (■) 2500 Lux ; (▲) 4500Lux ; (○) 8500 Lux

D'après ces résultats, on constate que le taux de la croissance cellulaire varie en fonction de l'intensité lumineuse ; il atteint les plus grandes valeurs sous les plus grandes intensités [60].

Après 70h d'incubation et à différentes intensités lumineuses, les cultures bactériennes atteignent la concentration maximale ce qui correspond au début de la phase stationnaire de croissance. On constate qu'avec l'augmentation de $r_{x \max}$ et de μ_{\max} , le temps $dt=(t_m-t_0)$ reste constant ; il y a donc réduction du temps de dédoublement bactérien t_d avec :

$$t_d = (1 / \mu_{\max}) \cdot \ln 2 \quad (\text{VI.4})$$

Ce temps de dédoublement bactérien varie d'un microorganisme à un autre et dépend aussi des conditions environnementales, du pH et de la température [88]. Dans notre cas il semblerait qu'il dépende de la valeur de l'intensité lumineuse.

La culture bactérienne change de couleur, elle devient brune-claire, sous une intensité de 8500 Lux. Ce phénomène est lié au nombre de pigments synthétisés. La réduction des bactériochlorophylles pour les différentes souches de *Rhodobacter sphaeroides*, durant la photo-incubation sous des grandes intensités, est rapportée par plusieurs chercheurs [38,54, 64].

3.1.3. Effet de l'intensité lumineuse sur la cinétique de production de l'hydrogène

Comme pour la croissance, la production d'hydrogène augmente avec l'augmentation de l'intensité lumineuse (Figure VI.14).

D'après Barbosa et al [40], la lumière peut devenir un facteur limitant pour la production de l'hydrogène. Il semblerait donc que la lumière serait un paramètre très important pour l'augmentation de cette production [87].

En termes de volume total produit, on remarque que le volume augmente avec l'augmentation de l'intensité lumineuse ; mais si on compare les deux taux d'hydrogène produit aux intensités 2500 Lux et à 4500 Lux, avec le volume total produit on observe une différence. Le taux de production maximal $r_{p \text{ max}}$ à 4500 Lux augmente de 141%, alors que le volume final de l'hydrogène n'augmente que de 9 % correspondant à un volume supérieur ou presque égal à celui d'une production sous une intensité de 2500 Lux ; L'étude comparative repose donc sur l'évaluation des taux maximaux de production et non pas sur les volumes totaux produits.

Bazar Uyar et al [93], déterminent également que le volume total de l'hydrogène produit n'est pas lié à l'intensité lumineuse.

Le temps de retard diminue avec l'augmentation de l'intensité et la croissance cellulaire. A 8500Lux les bactéries deviennent sensibles, ce qui se traduit par une ré-augmentation du temps de début de production d'hydrogène.

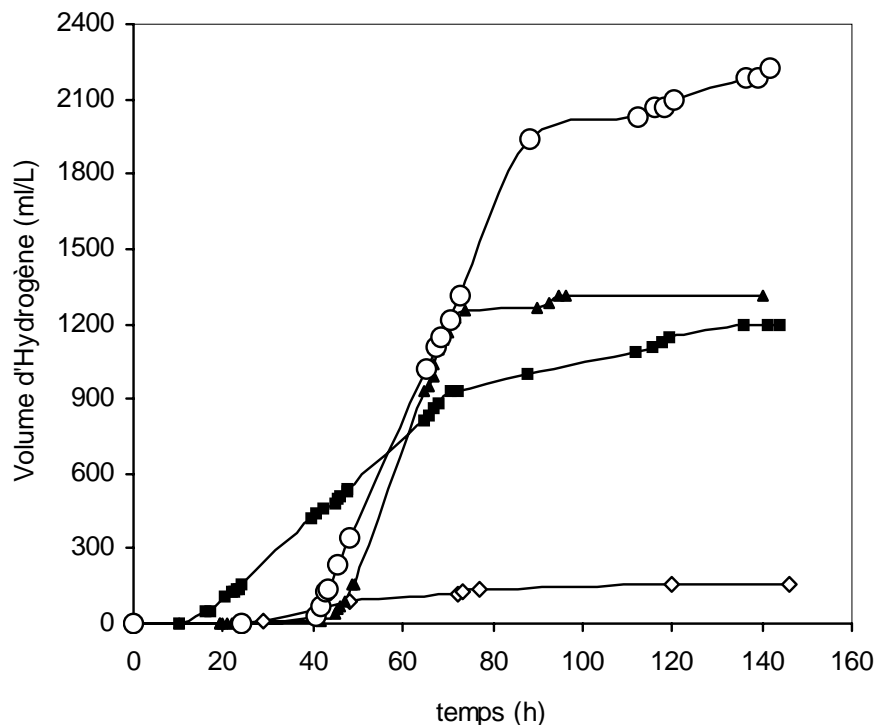


Figure VI.14. Effet de l'intensité lumineuse sur la cinétique de production d'hydrogène.

(◇) 1000 Lux ; (■) 2500 Lux ; (▲) 4500 Lux ; (○) 8500 Lux

3.2. Evolution et effet du pH sur la production d'hydrogène

Le couplage entre l'environnement physique (pH) et le métabolisme du microorganisme permettra, en effet, de renforcer l'étude de la réponse biologique.

D'après les résultats obtenus dans la Figure VI.15, on constate que le pH évolue au cours de la croissance cellulaire à différentes intensités lumineuses. Un pH initial de 7.4 augmente et atteint la valeur de 7.9 ± 0.1 . Une diminution du pH est observée après 70 ± 3 h.

Pour étudier ce paramètre, on se réfère à l'évolution de la croissance bactérienne et à celle de la production d'hydrogène à différentes intensités lumineuses 1000, 2500, 4500 et 8500 Lux (Figures VI.16, 17,18 et 19).

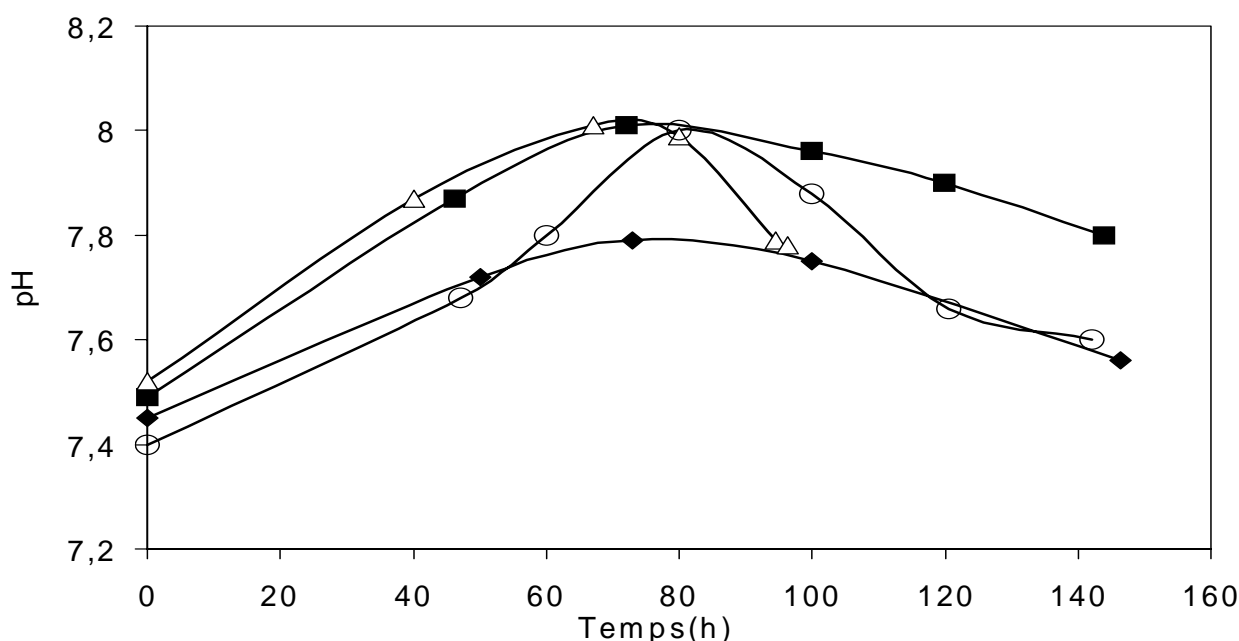


Figure VI.15. Evolution du pH à différentes intensités lumineuses en fonction du temps.

(◆) 1000 Lux ; (■) 2500 Lux ; (Δ) 4500 Lux ; (○) 8500 Lux

Sur la courbe de croissance, l'évolution du pH suit l'évolution de la concentration cellulaire en fonction du temps. L'arrêt de la croissance bactérienne correspond à l'arrêt de l'augmentation du pH. L'augmentation du pH durant une étape précoce de la croissance serait due à la richesse du milieu en source d'azote, le glutamate de sodium [2].

Sur la courbe de production de l'hydrogène, l'augmentation du pH débute avant la production de l'hydrogène et s'arrête au cours de cette production. D'après ces résultats, l'évolution du pH est liée à la croissance cellulaire et non pas à la transformation des protons en molécules d'hydrogènes. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Mi-Sun Kim et al [38], Bazar Zabut et al [2] et Gokhan Kars et al [94].

La production d'hydrogène est favorable à un pH compris entre 7.5 ± 0.1 . A pH alcalin 7.9 ± 0.1 , la production diminue voir même s'arrête.

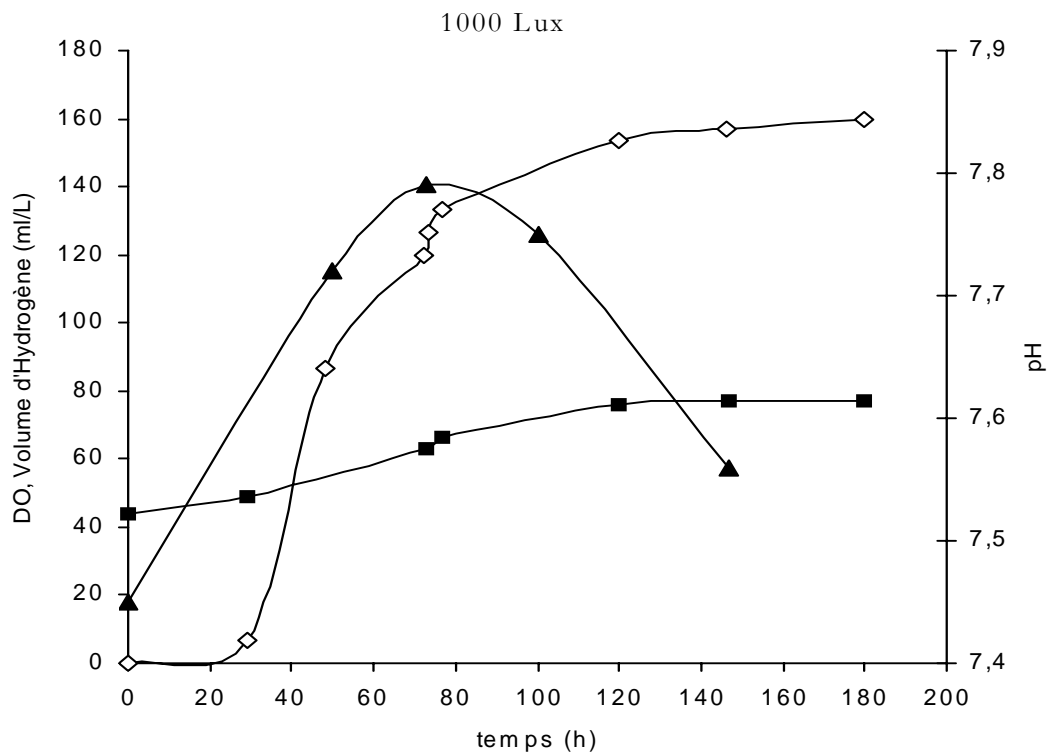


Figure VI.16. Evolution du pH en fonction du temps sous une intensité de 1000Lux. (◇) Hydrogène ; (■) densité cellulaire ; (▲) pH.

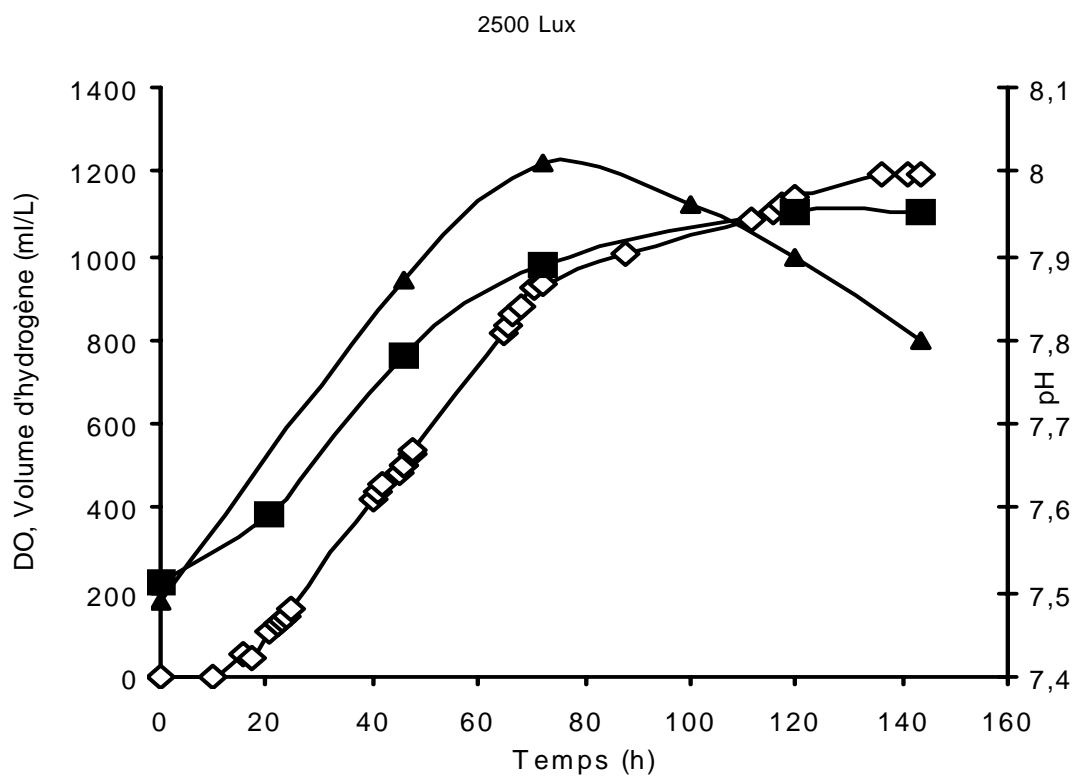


Figure VI.17. Evolution du pH en fonction du temps sous une intensité de 2500Lux. (◇) Hydrogène ; (■) densité cellulaire ; (▲) pH.

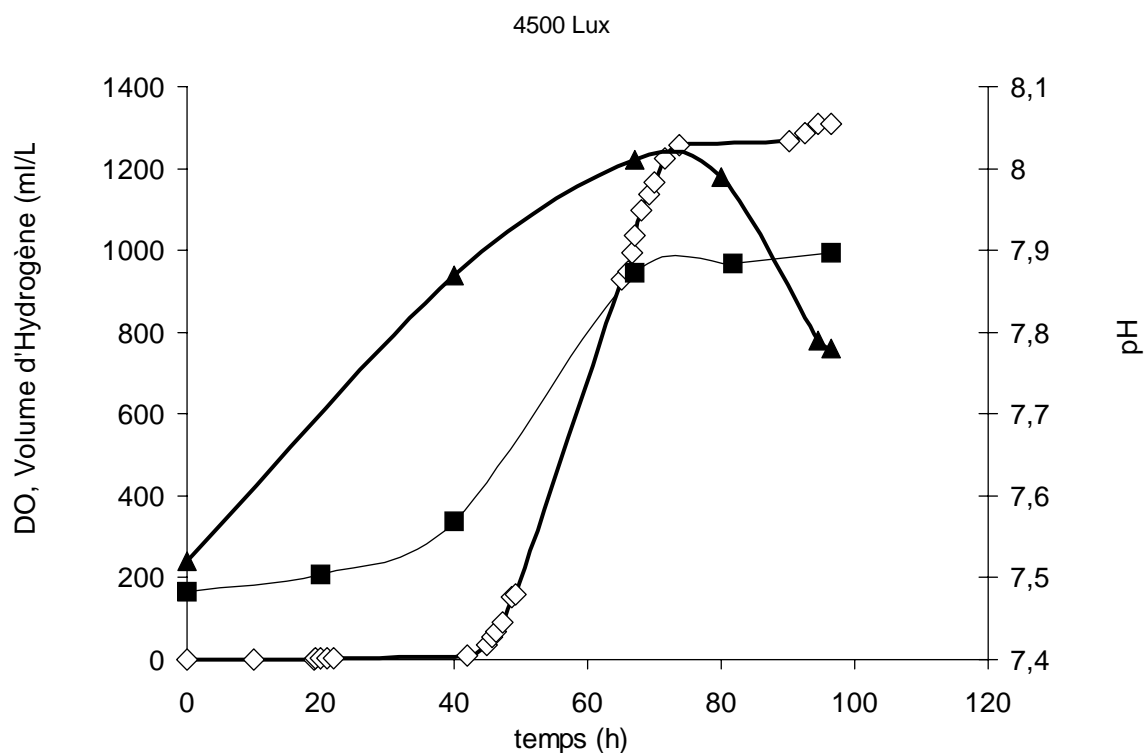


Figure VI.18. Evolution du pH en fonction du temps sous une intensité de 4500Lux. (◇) Hydrogène ; (■) densité cellulaire ; (▲) pH.

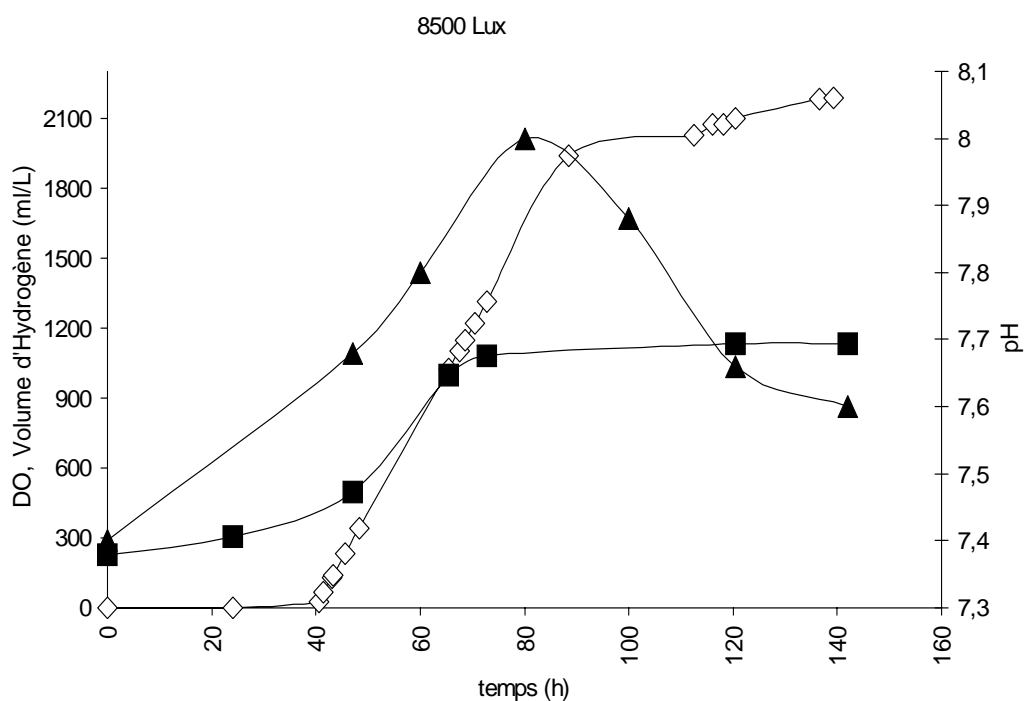


Figure VI.19. Evolution du pH en fonction du temps sous une intensité de 8500Lux. (◇) Hydrogène ; (■) densité cellulaire ; (▲) pH.

L'évolution du pH à un effet sur la production de l'hydrogène. Le pH alcalin est défavorable à l'activité de la nitrogénase, enzyme productrice de l'hydrogène, alors qu'il est favorable à l'activité de l'hydrogénase [2], enzyme consommatrice de l'hydrogène et productrice de protons, ce qui se traduit par une diminution du pH. Dans ces conditions, la production d'hydrogène baisse.

3.3. Cinétique de croissance et de production de *Rhodobacter sphaeroides* CIP 60.6 dans le réacteur cylindrique parfaitement agité

La cinétique de croissance et de production sont déterminées par le calcul des taux maximaux et des productivités totales. C'est une mesure de la performance globale d'une opération microbiologique, comme une production d'hydrogène.

- Le taux maximal de la croissance bactérienne et de la production d'hydrogène est régit par les deux lois [54] suivantes respectivement :

$$rx_{\max} = \frac{dx_{\max}}{dt_{\max}} \quad (\text{VI.1})$$

$$rp_{\max} = \frac{rp_{\max}}{dt_{\max}} \quad (\text{VI.5})$$

Les valeurs de X_1 et X_2 , P_1 et P_2 , sont des concentrations distinctes de la phase exponentielle de croissance et de production, respectivement [36].

- La productivité "Pr" exprimant la quantité de biomasse " $Pr x_t$ " ou de métabolite " $Pr p_t$ " synthétisé par unité de temps et par unité de volume de bioréacteur est régit par les deux lois suivantes [88.19] :

$$rx_t = \frac{dx_t}{dt_t} = Pr x_t \quad (\text{VI.6})$$

$$rp_t = \frac{dp_t}{dt_t} = Pr p_t \quad (\text{VI.7})$$

Les taux maximaux et les productivités totales de croissance et de production sont représentés dans le tableau VI.2 :

Tableau VI.2. Taux maximaux et Productivités totales de croissance et de production du réacteur cylindrique parfaitement agité

Intensités lumineuses (Lux)	Les taux maximaux (r max.)		Les productivités (Pr)	
	r x max (DO/h)	rp max (l/l/h)	Pr x _t (DO/h)	Pr p _t (l/l/h)
8500	0.0550	39.74 10 ⁻³	0.027	15.67 10 ⁻³
4500	0.0450	39.01 10 ⁻³	0.021	13.59 10 ⁻³
2500	0.0160	16.17 10 ⁻³	0.018	08.70 10 ⁻³
1000	0.0031	04.21 10 ⁻³	0.005	01.06 10 ⁻³

D'après les résultats obtenus, le taux maximal et la productivité totale de croissance augmentent proportionnellement à l'intensité lumineuse. La production de l'hydrogène augmente de manière significative jusqu'à saturation, à une intensité de 4500 Lux, sans photo-inhibition.

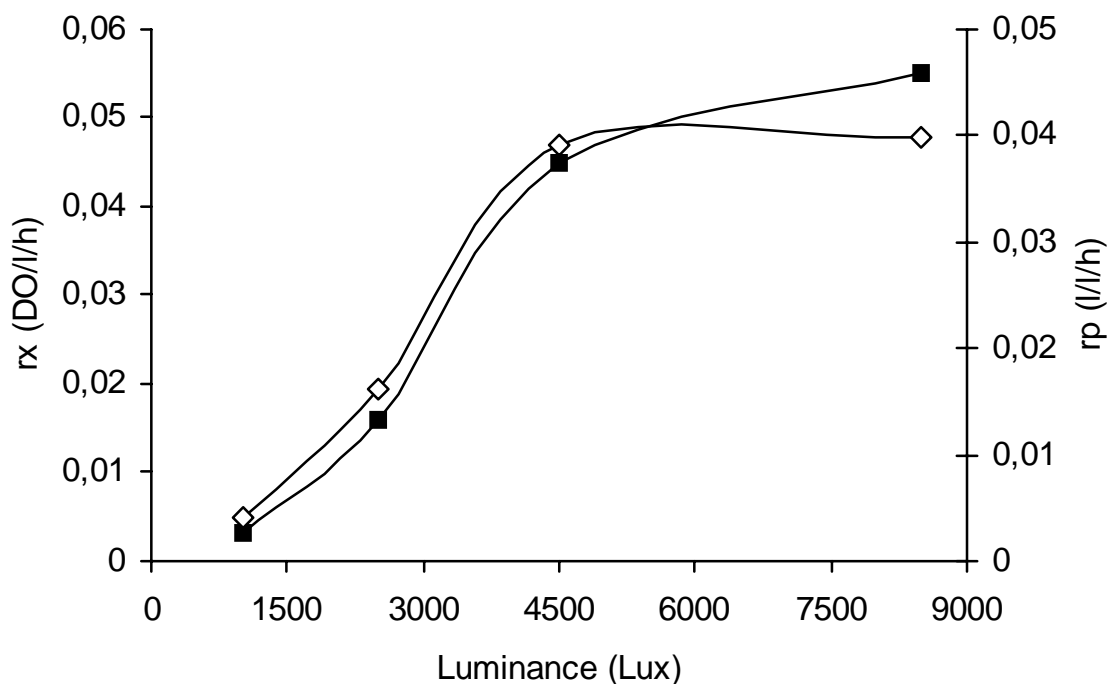


Figure VI.20. Evolution du taux maximal de la croissance bactérienne (■) et de la production (◇)

D'après les résultats illustrés dans la Figure VI.20, l'augmentation de l'intensité lumineuse n'a pas d'effet photo-inhibiteur [93] mais un effet de saturation observé à des intensités excessives [45] du à l'effet d'ombre dit «shading effect» qui se produit lorsque la pénétration de la lumière est limitée par les pigments du système photosynthétique présentent en excès du fait de l'augmentation de la concentration cellulaire [37, 72].

Ce phénomène de saturation est observé chez *Rhodobacter sphaeroides* OU.001 à une intensité de 4000 Lux [93] et chez *Rhodobacter sphaeroides* RV à une intensité de 8500 Lux [34] dans un réacteur cylindrique parfaitement agité.

A 8500 Lux, le taux de la croissance bactérien augmente de 22% par rapport à celui obtenu sous une intensité de 4500 Lux. Cette augmentation au cours de la saturation de production où la lumière est limitée dans une zone profonde du réacteur, est liée à la physiologie de la bactérie. Dans de telles conditions et sous une faible intensité au sein du bioréacteur, les bactéries développent leur système photosynthétique pour une collecte suffisante de lumière [37] nécessaire à leur croissance.

Dans le cas d'un éclairage en continu dans le but de réduire l'apport d'énergie durant la nuit, l'utilisation d'une intensité de 4500 Lux est suffisante pour la production de l'hydrogène dans un réacteur cylindrique parfaitement agité ayant un diamètre de 6.5cm, puisque l'augmentation de l'intensité conduit à une saturation de production, suite à une réduction de la pénétration de la lumière.

3.4. Etude comparative entre les taux de production d'hydrogène de différentes souches de *Rhodobacter sphaeroides*

Les taux de production maximaux et les productivités totales chez les différentes souches de *Rhodobacter sphaeroides* y compris la CIP 60.6, utilisée dans nos travaux de recherche, sont représentés dans le Tableau VI.3.

Tableau VI.3. Production de l'hydrogène par différentes souches de *Rhodobacter sphaeroides* (*R. sp.*).

Souche	C/N (mM/mM)	Intensité et source lumineuse	T°C	Taux maximal $r_{p_{max}}$ (l/l/h)	Taux total Pr_{p_t} (l/l/h)	Réf
R sp RV	Lactate 50- 100/4.7 (a)	10000 Lux Tungstène	30°C	0.0366	/	[1]
R sp KD131	Malate 30/8	32 w/ m ² Halogène	30°C	/	0.026+ 0.0047	[38]
R sp (Berkeley collection)	Glucose 20/13 (b)	8000 Lux Incand	27°C	0.01260	/	[1]
R sp OU.001	Malate	4000 Lux	30°C	0.03500	0.01300	[93]
R sp OU.001	Malate, Lactate 30/10	2400 Lux	30°C	0.01680	/	[1]
R sp CIP 60.6	Lactate 50/10	4500 Lux Tungstène	30°C	0.03900	0.01359	*
R sp CIP 60.6	Lactate 50/10	2500 Lux Tungstène	30°C	0.01617	0.00871	*
R capsulatus jp 91	Lactate 30/5	Tungstène	30°C	0.03847	0.02146	[36]

(a): Source d'azote utilisé est l'extrait de levure, (b) : 0.2% (p/v) qui correspond à 13mM d'extrait de levure sont ajoutés au glutamate, (*) : nos résultats

La productivité et l'activité métabolique de la souche *Rhodobacter sphaeroides* CIP 60.6 est pratiquement similaire à celle de *Rhodobacter sphaeroides* OU.001.

3.5. Effet de l'agitation sur la production d'hydrogène

Afin de vérifier le rôle de l'agitation sur la production de l'hydrogène au cours de la phase exponentielle de production nous avons opté pour un arrêt du système durant 6h ce qui correspond au quart du jour. Cet arrêt conduit à un ralentissement considérable de l'évolution du volume de l'hydrogène produit (Tableau VI.4), Le taux de production total diminue de 13 % et le taux maximal diminue de 60%. Après redémarrage de l'agitation il atteint de nouveau sa valeur initiale.

Tableau VI.4. Taux de production en présence et en l'absence d'agitation.

Taux de production d'hydrogène (l/l/h)	Agitation durant la production 97h		
	Sans arrêt d'agitation	Avec arrêt d'agitation (6h)	Durant l'arrêt d'agitation (6h)
Maximal	39.01 10 ⁻³	38.06 10 ⁻³	15.70 10 ⁻³
Total	13.59 10 ⁻³	11.92 10 ⁻³	/

Ces résultats expliquent le rôle important de l'agitation qui augmente le débit d'évacuation du biogaz produit et favorise le contact entre les deux phases biotique et abiotique (lumière et substrat). (Figure VI.21).

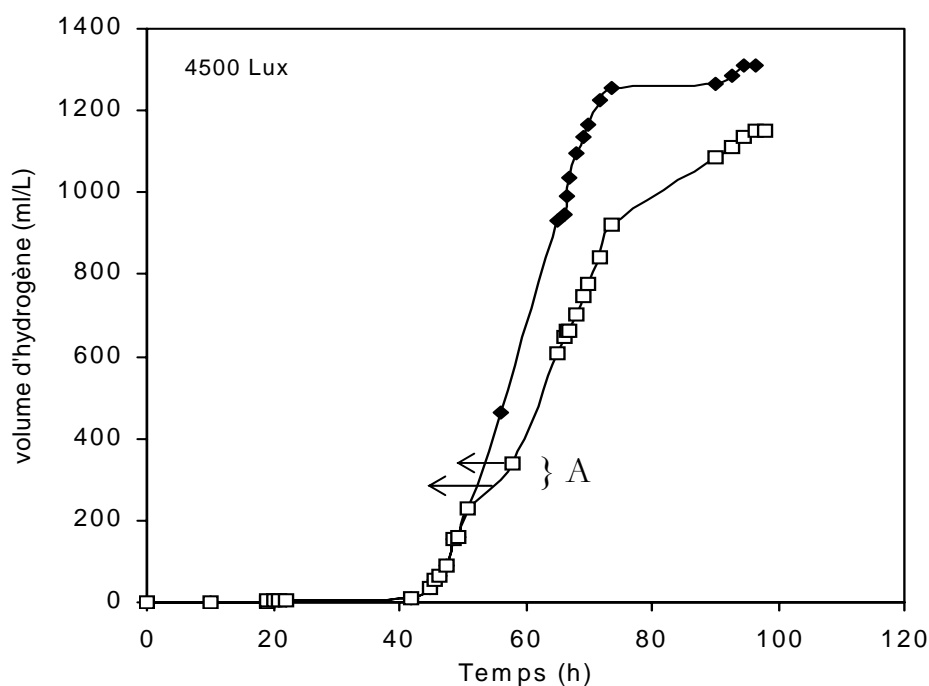


Figure VI.21. Effet de l'agitation sur la production d'hydrogène. (◆) Sans arrêt d'agitation ; (□) avec arrêt d'agitation ; (A) durant l'arrêt d'agitation

Une discontinuité de l'agitation conduit à une production instable de l'hydrogène. L'agitation augmente la performance du bioréacteur en permettant un bon dégazage et augmente l'efficacité de conversion de l'énergie lumineuse et du lactate en hydrogène. Ces résultats rejoignent ceux de Baker Zabut (2006) [2].

VI.4. Le profil de l'intensité lumineuse au sein du réacteur

Les suspensions bactériennes opaques, quand elles sont nombreuses et quand elles présentent un niveau élevé en pigments, diminuent la pénétration de la lumière

Pour pouvoir évaluer l'atténuation de l'intensité lumineuse, dont le but est d'augmenter la production de l'hydrogène et de minimiser les pertes d'énergie au sein du réacteur, nous avons étudié le profil de l'intensité lumineuse à différents points de profondeur du réacteur cylindrique, (Figure VI.22).

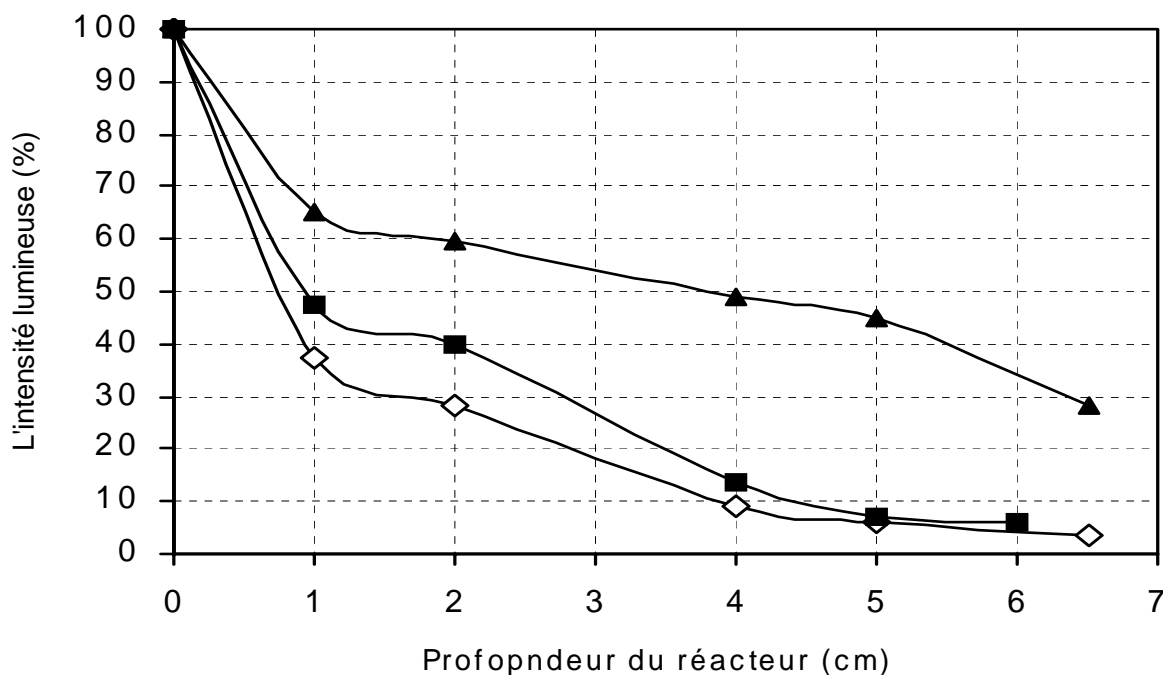


Figure. VI.22. Profil de l'intensité lumineuse au sein du réacteur.
(◇) 1.98 ; (■) 1.4 ; (▲) 0.573

Il apparaît que l'atténuation de la lumière est importante dans les premiers millimètres de profondeur ; elle est de l'ordre de 35 à 65% en fonction de la densité cellulaire. Si nous considérons que I_0 est de 8500 Lux, le profil de l'intensité lumineuse montre qu'au-delà d'un centimètre de profondeur le taux de production diminue en dessous du taux optimal qui correspond à 4500Lux. Notre réacteur doit avoir au maximum un diamètre d'un centimètre, dans le but de maintenir une intensité lumineuse uniforme et productive (Figure V.3).

Pour la réduction de la zone non productrice du réacteur, nous avons conçu et développé un photobioréacteur ayant un faible diamètre, en augmentant le rapport surface/volume.

Un faible diamètre nous a posé les problèmes techniques suivants :

- Fragilité (manipulation délicate des vannes) ;
- Agitation magnétique impossible ;
- Dégazage difficile.

Ces problèmes ont été surmontés par l'utilisation d'une géométrie tubulaire plane enroulée en spirale et qui apporte trois avantages essentiels, à savoir :

- Des conditions de lumière contrôlées et mieux exploitées (Faible diamètre et système plan)
- Une efficacité hydrodynamique (les zones mortes rencontrés dans les réacteurs cylindriques sont évités dans ce réacteur par sa conduite tubulaire coudée et enroulée en spirale) ;
- La récupération du biogaz se fait par un barbotage liquide- liquide suite au jet du milieu dans un réservoir de dégazage, par la pompe dont sa partie mécanique est séparée de celle où circulent les bactéries (un meilleur dégazage).

Pour des commodités pratiques nous avons choisi un diamètre de 1cm.

La performance et la productivité du réacteur dépendent de plusieurs paramètres tels que la profondeur, la nature de la matière du réacteur, la distribution et la densité des bactéries. Nous nous proposons d'étudier dans ce qui suit l'effet de la profondeur, de l'intensité lumineuse et de la densité cellulaire.

VI.5. Production de l'hydrogène par *Rhodobacter sphaeroides* CIP 60.6 dans un réacteur tubulaire plan à jet (agitation par pompage)

L'optimisation d'un procédé microbiologique, telle que la production d'hydrogène, repose sur la :

- Maximisation des concentrations des produits de croissance, (biomasse microbienne et hydrogène);
- Maximisation de la productivité.

Ces critères impliquent la définition des conditions conduisant aux meilleurs profils en ce qui concerne les courbes de croissance et de production [88].

Pour définir ces conditions, nous avons étudié l'effet de l'intensité lumineuse sur la croissance cellulaire et sur la production, l'évolution et l'effet du pH, l'effet de l'agitation, les productivités totales, les taux maximaux et le gain apporté par le réacteur tubulaire plan comparé au réacteur cylindrique.

5.1. Effet de l'intensité lumineuse sur la production d'hydrogène et la croissance bactérienne

5.1.1. Etude de la relation entre la cinétique de croissance et de production

Les courbes de croissance cellulaire et de volume de l'hydrogène produit en fonction du temps à différentes intensités lumineuses 2000 Lux, 4500 Lux, 8500 Lux et 20000 Lux sont illustrées dans les Figures VI.23, 24, 25 et 26.

- A une intensité de 2000 Lux (Figure VI.23), la production de l'hydrogène débute après un temps de retard de 10h. La production est concomitante avec la croissance, l'arrêt de la croissance (DO 0.78) correspond à l'arrêt de la production de l'hydrogène avec un volume final de 0.838 l.

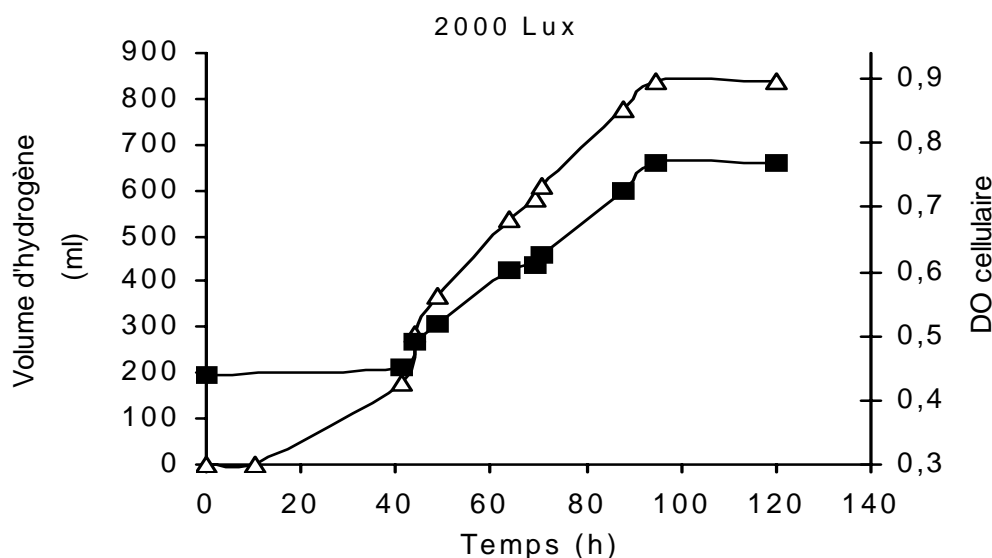


Figure VI.23. Cinétique de croissance et de production à une intensité lumineuse de 2000 Lux. (Δ) H₂; (■) DO.

Sous une intensité de 2000 Lux, l'hydrogène est un métabolite primaire associé à la croissance.

- A une intensité lumineuse de 4500 Lux, la production de l'hydrogène débute après 10h d'incubation, le taux de production de l'hydrogène reste linéaire et maximal durant les premiers 17h de la phase stationnaire ce qui correspond à 42h d'incubation. Ce taux de production diminue de 88% jusqu'à la fin de l'expérience avec un volume final de 1.241 l (Figure VI.24).

Après 25h d'incubation, la concentration cellulaire est maximale, elle est d'une densité de 1.9, elle atteint un état d'équilibre avec une DO_f de 2.12, après 61h d'incubation. Sous une intensité lumineuse de 4500 Lux, l'hydrogène est un métabolite mixte.

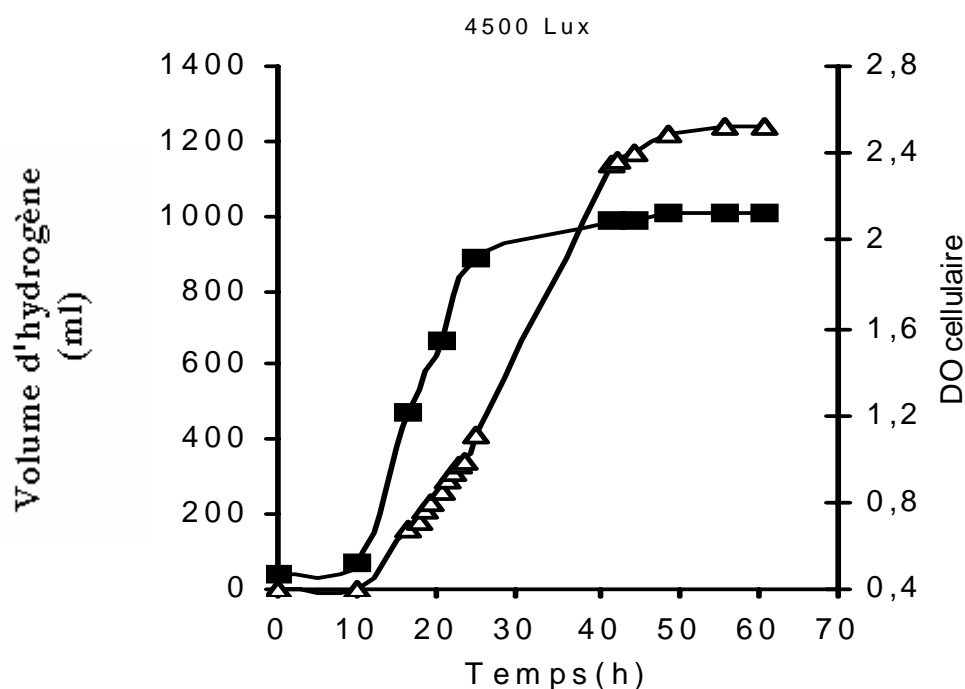


Figure VI.24. Cinétique de croissance et de production à une intensité lumineuse de 4500 Lux. (Δ) H_2 ; (■) DO.

- Les courbes de croissance et de production en fonction du temps à une intensité lumineuse de 8500 Lux sont illustrée dans la figure VI.25.

Une concentration cellulaire maximale de 1.8 est atteinte au bout de 72h correspondant au début de la phase stationnaire avec une DO_f de 2.09, après 5 à 6 jours d'incubation.

La production de l'hydrogène débute après 24h d'incubation, à la mi-phase exponentielle de croissance et qui correspond à 72h d'incubation. Le taux de production devient maximal durant la phase stationnaire de croissance ; Ce taux diminue de 91 % jusqu'à un volume final de 2.055 l. L'hydrogène est un métabolite mixte.

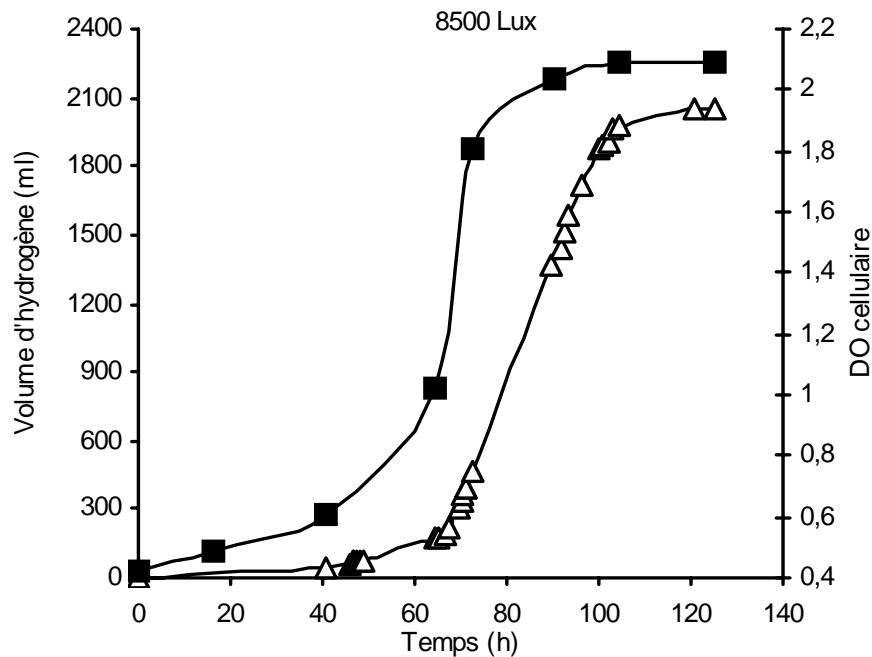


Figure VI.25. Cinétique de croissance et de production à une intensité lumineuse de 8500 Lux. (Δ) H₂ ; (■) DO

- Pour une forte intensité lumineuse 20000 Lux correspondant à la lumière du jour, l'hydrogène est produit après un temps de retard de 24h. La production maximale est concomitante avec la phase exponentielle de croissance aboutissant, au bout de 90h, à un volume de 1.97 l d'hydrogène et une DO_{max} de 2.16. La croissance bactérienne s'arrête avec une DO_f de 2.18, alors que le taux de production diminue de 85%, durant cette phase, jusqu'à un volume final de 2.156 l (Figure VI.26). L'hydrogène est un métabolite mixte.

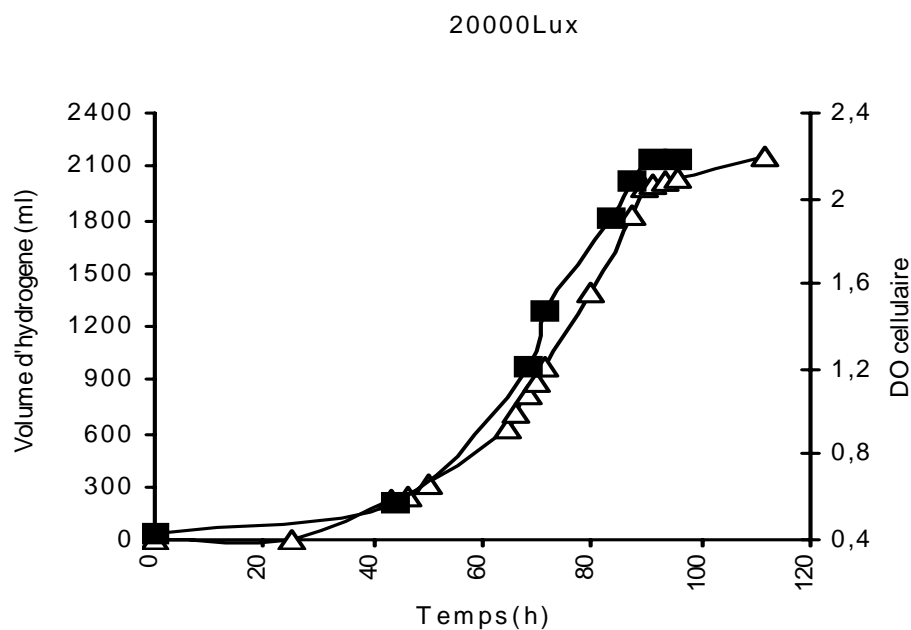


Figure VI.26. Cinétique de croissance et de production à une intensité lumineuse de 20000 Lux. (Δ) H₂ ; (■) DO

Comme pour le réacteur cylindrique, l'hydrogène est produit durant la phase exponentielle et stationnaire de la croissance, sous des intensités lumineuses allant de 4500, 8500 et 20000 Lux.

Le taux de production est maximal durant l'arrêt de la croissance sous des intensités de 4500 et 8500 Lux, alors qu'à 20000 Lux l'arrêt de la croissance correspond à une diminution du taux de production, cela peut être dû à une réduction de l'activité métabolique au cours de la phase stationnaire comparé à 4500 et 8500 Lux.

Une réduction du taux de production de l'ordre de $89.5 \pm 1.5\%$ sous des intensités de 4500, 8500 et 20000 Lux est observé, alors que pour une faible intensité, l'hydrogène est un métabolite primaire.

Au cours de la croissance cellulaire, si la concentration finale est supérieure à la concentration maximale, le métabolisme est mixte [39].

Le profil de la production de l'hydrogène au cours du métabolisme mixte et primaire est régit par les deux lois (VI.2) et (VI.3), respectivement.

5.1.2. Effet de l'intensité lumineuse sur la croissance bactérienne

D'après les résultats obtenus dans la Figure VI.27, l'augmentation de l'intensité lumineuse conduit à une augmentation de la concentration cellulaire en fonction du temps.

On observe que pour une intensité de 20000 Lux le taux de croissance est légèrement inférieur par rapport à celui obtenu sous une intensité de 8500 Lux.

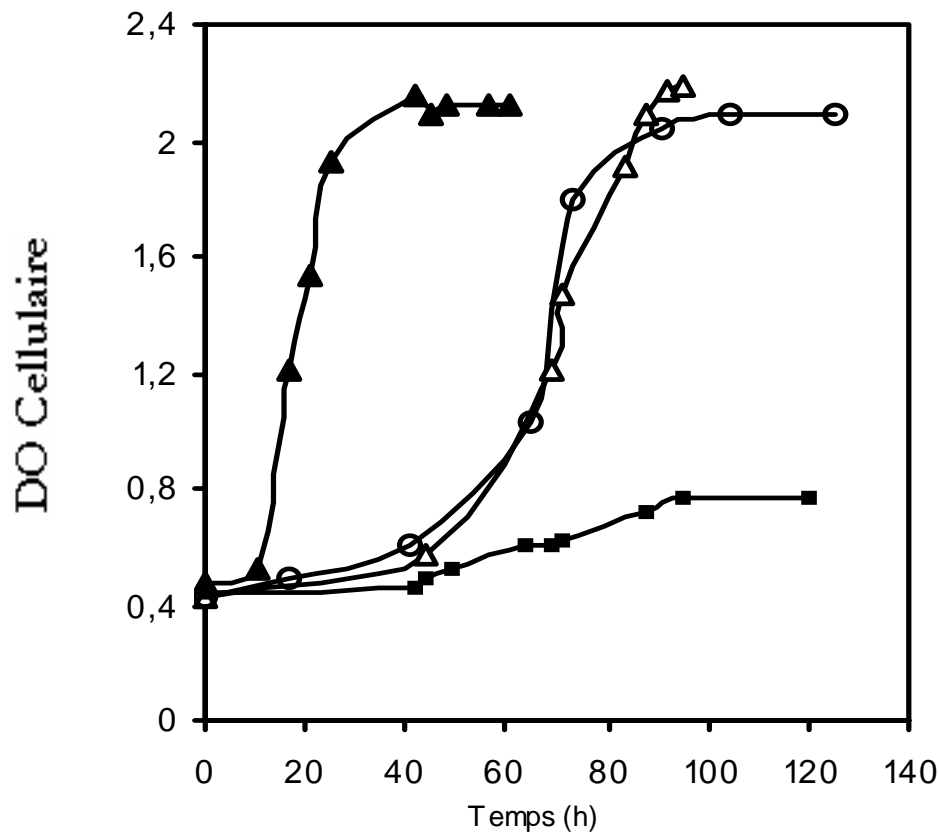


Figure VI.27. Effet de l'intensité lumineuse sur la cinétique de la croissance bactérienne.

(■) 2000Lux ; (▲) 4500Lux ; (○) 8500Lux ; (△) 20000 Lux

A 4500 Lux, la phase de latence est réduite par rapport aux autres intensités. A des intensités lumineuses très fortes, les bactéries deviennent sensibles à la lumière [37,95], ce qui se traduit par une prolongation de la phase de latence et une adaptation à ces conditions.

La couleur des pigments change à différentes intensités en fonction du temps. Sous des intensités lumineuses inférieures à 8500 Lux, la suspension bactérienne est rouge-brune, alors qu'aux intensités excessives, la couleur des pigments vire vers une couleur rose, au cours des premières 48h d'incubation. Les pigments perdent progressivement leur couleur ; ils passent d'une couleur brune claire sous une intensité de 8500 Lux à beige sous une intensité de 20000 Lux, durant toute la durée d'incubation (Figure VI.28).



Figure VI.28. Effet des intensités lumineuses sur la couleur des suspensions bactériennes (a)20000Lux ; (b) 8500Lux ; (c) 4500Lux

Cela est dû à une réduction du nombre des bactériochlorophylles par cellule bactérienne suite à une inhibition de la synthèse de nouveaux pigments sous des grandes intensités lumineuses [53]. Cette perte de couleur pourpre des pigments chez *Rhodobacter sphaeroides* est rapportée par plusieurs auteurs [38,54, 64].

5.1.3. Effet des intensités lumineuses sur la cinétique de production d'hydrogène

La cinétique de production de l'hydrogène en fonction du temps par *Rhodobacter sphaeroides* CIP 60.6 (DSM 158) à différentes intensités est représentée dans la Figure VI.29.

Le taux de production de l'hydrogène croît avec l'augmentation de l'énergie lumineuse. Il devient maximal après 44h d'incubation à 2000Lux et après 17h d'incubation à 4500 Lux, suite à une élévation de l'intensité lumineuse. Sous une intensité de 8500 Lux et 20000 Lux ce temps est de 66h, un temps nécessaire pour une réadaptations des bactéries à ces intensités excessives.

L'efficacité de conversion de l'énergie lumineuse en hydrogène est le facteur clef pour la réalisation de cette production [60]. Elle peut devenir un facteur limitant pour cette production [40].

Comme il a été préalablement mis en évidence le volume total produit n'est pas lié à l'intensité lumineuse.

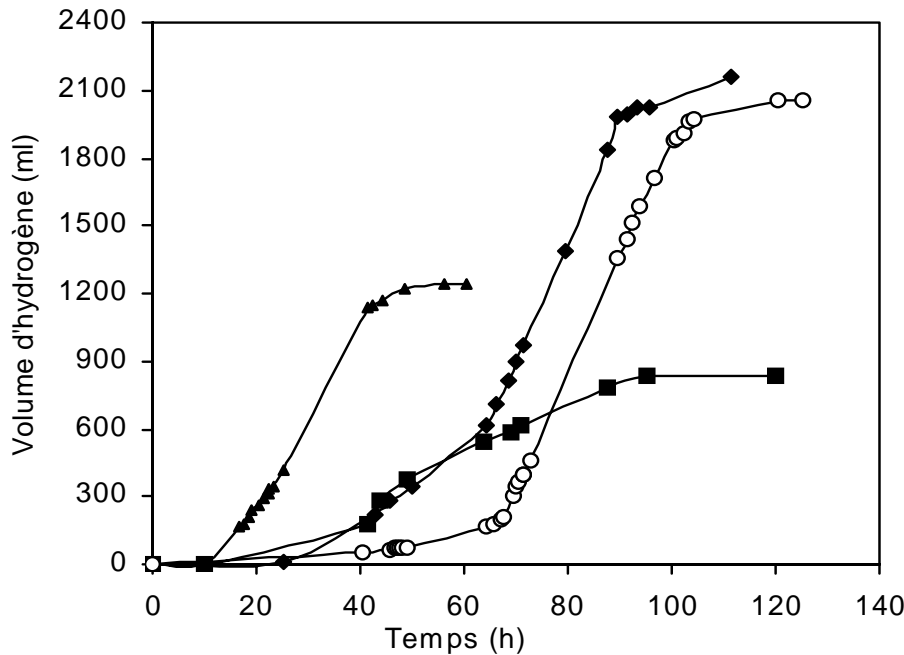


Figure VI.29. Effet de l'intensité lumineuse sur la cinétique de production d'hydrogène.
 (■) 2000Lux ; (▲) 4500Lux ; (○) 8500Lux ; (◆) 20000 Lux

5.2. Evolution et effet du pH sur la production d'hydrogène

L'étude de l'évolution du pH est en effet essentielle pour relier la réponse d'une culture à la modification volontaire des conditions environnementales menant à la production d'hydrogène.

D'après les résultats illustrés dans la Figure VI.30, on constate que le pH augmente au cours de la croissance cellulaire aux différentes intensités lumineuses ; il passe de la valeur de 7.3 ± 0.1 à 8.5 ± 0.6 .

Cette augmentation peut être expliquée par la transformation des protons du milieu en molécules d'hydrogène. Il est par ailleurs légitime de s'interroger : L'évolution du pH suit-elle la cinétique de croissance bactérienne et ou la production ? Pour répondre à cette question, on présente les courbes VI.31, 32, 33 et 34, correspondants aux intensités lumineuses suivantes 2000, 4500, 8500 et 20000 Lux, respectivement.

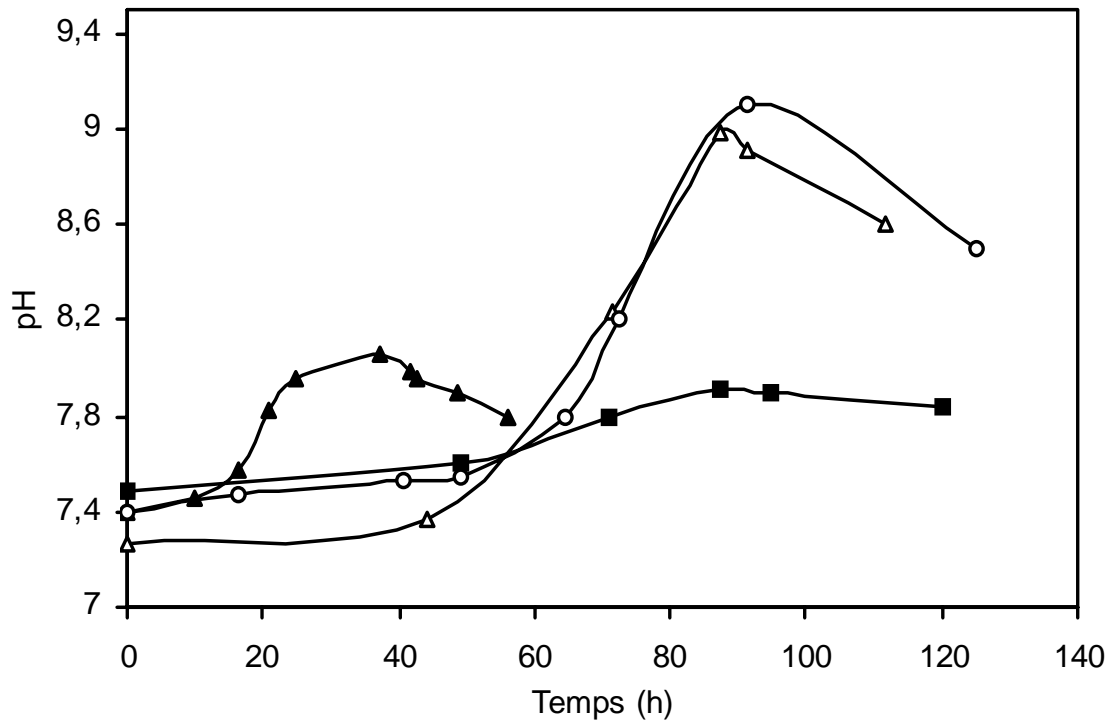


Figure VI.30. Evolution du pH à différentes intensités lumineuses en fonction du temps. (■) 2000Lux ; (▲) 4500Lux ; (○) 8500Lux ; (△) 20000 Lux

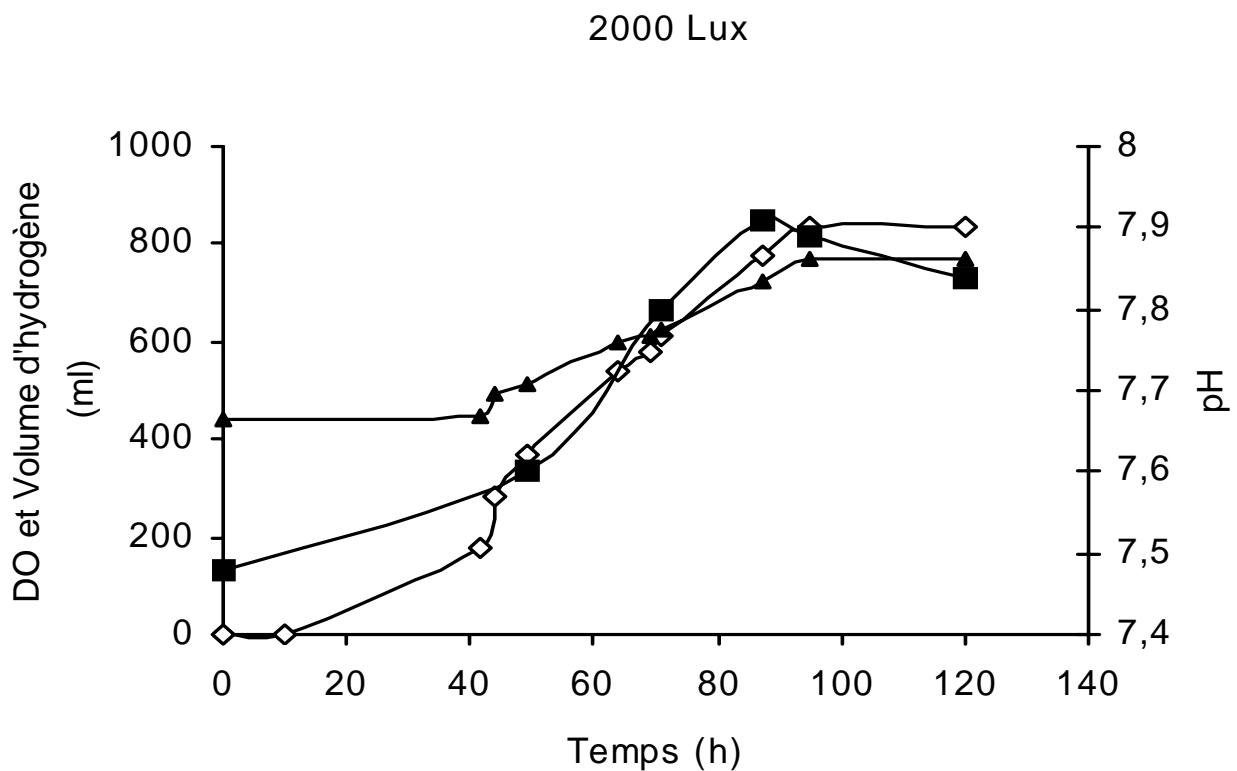


Figure VI.31. Evolution du pH en fonction du temps sous une intensité de 2000Lux. (◇) Hydrogène ; (▲) densité cellulaire ; (■) pH.

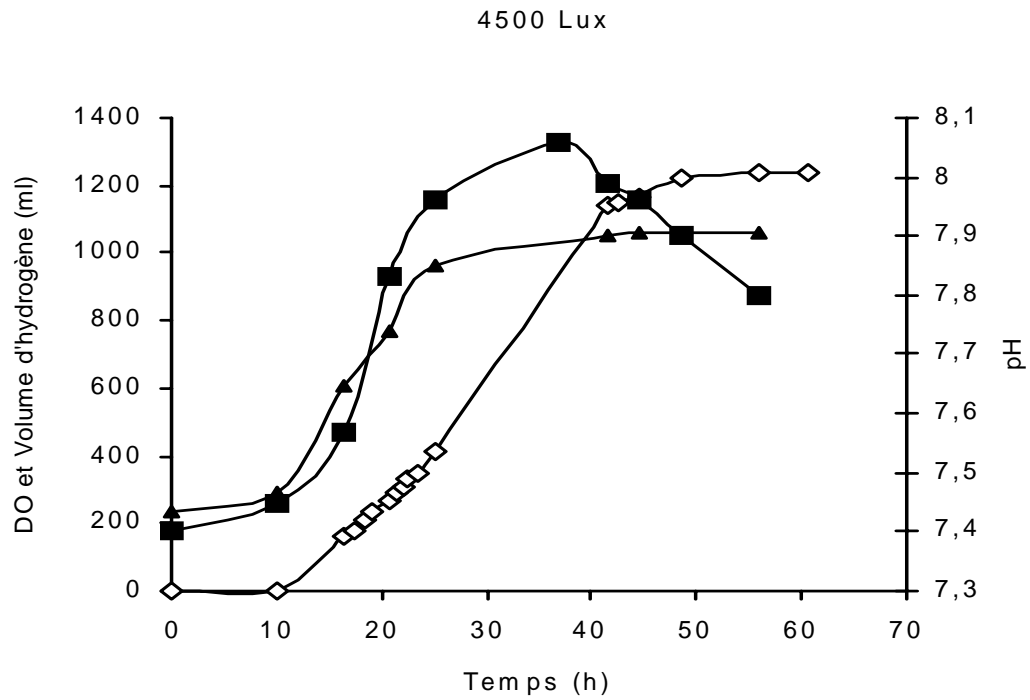


Figure VI.32. Evolution du pH en fonction du temps sous une intensité de 4500Lux.
 (◇) Hydrogène ; (▲) densité cellulaire ; (■) pH.

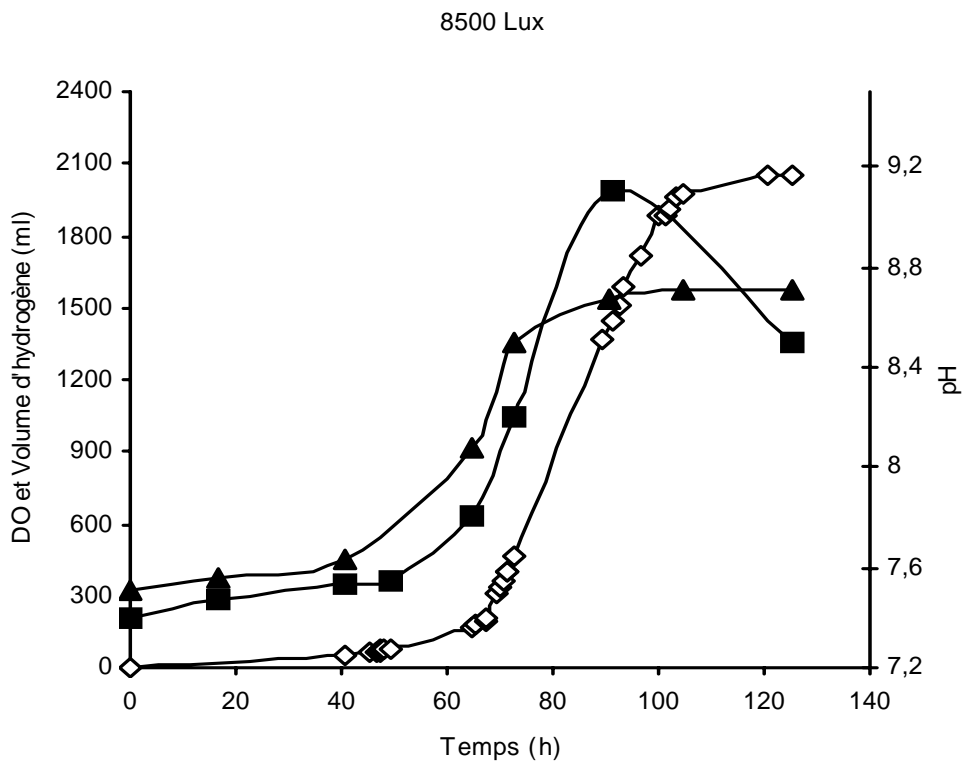


Figure VI.33. Evolution du pH en fonction du temps sous une intensité de 8500Lux.
 (◇) Hydrogène ; (▲) densité cellulaire ; (■) pH.

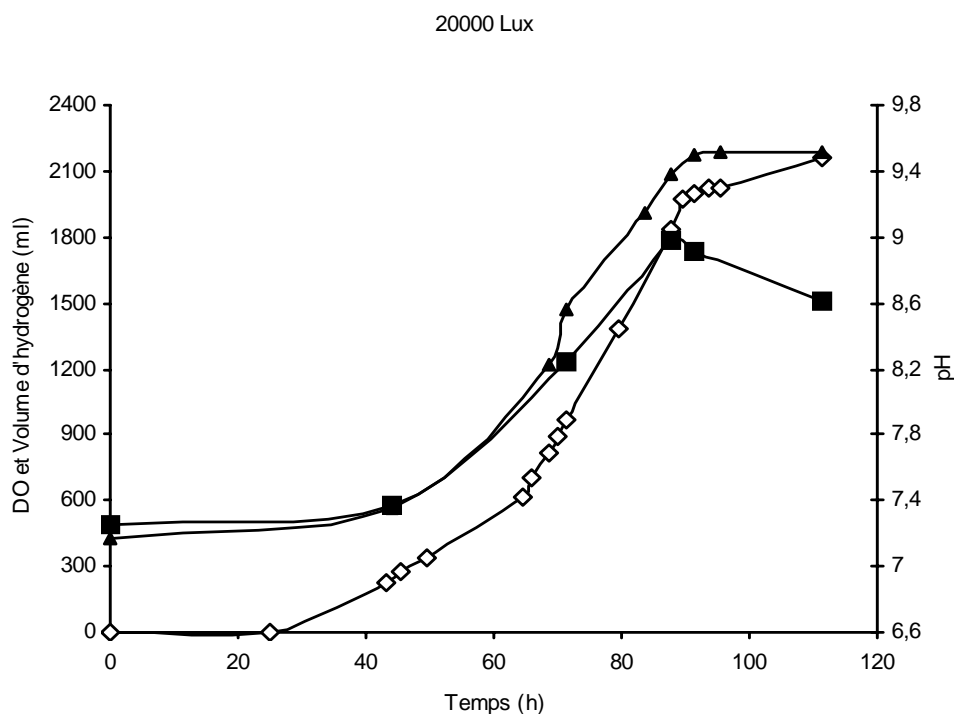


Figure VI.34. Evolution du pH en fonction du temps sous une intensité de 20000Lux.
 (◇) Hydrogène ; (▲) densité cellulaire ; (■) pH.

En comparant l'évolution du pH à celle de la croissance bactérienne et de la production d'hydrogène, on constate que le pH évolue lentement puis rapidement suivant l'évolution de la croissance et de la production. L'arrêt de l'accroissement du pH correspondant à l'arrêt de la croissance cellulaire, alors que la production de l'hydrogène continue à progresser (Figures VI.32, 33,34) (métabolite mixte). L'évolution du pH suit la croissance cellulaire. Ces résultats sont similaires à ceux produits par Bazar Zabut et al [2], Mi Sun Kim et al [38] et Gokhan Kars et al [94].

L'évolution de la production de l'hydrogène dépend du pH du milieu qui devient alcalin lors de la croissance cellulaire. Le pH favorable en début de production est de l'ordre de 7.45 ± 0.05 , le pH 8.5 ± 0.6 semble être défavorable à cette production. Dans ces conditions, l'apparition de l'activité de l'hydrogénase «enzyme membranaire consommatrice d'hydrogène» avec l'activité du complexe nitrogénase «enzyme productrice de l'hydrogène» se traduit par un lien moléculaire co-régulé mutuellement [38]. Ce pH alcalin conduit à un ralentissement de la production de l'hydrogène suite à une réduction de l'activité de la nitrogénase ; alors qu'il est favorable à l'activité de l'hydrogénase [2]. Cependant, l'hydrogène ainsi produit sera dissocié en protons et contribue à une réduction du pH du milieu (Figures ci-dessus). Par ailleurs, la disparition de la source d'électron conduit à l'arrêt de la production de l'hydrogène.

5.3. Cinétique de croissance et de production dans le réacteur tubulaire plan à jet

La performance d'un procédé microbiologique exprimant la biomasse et le produit, est régit en déterminant sa productivité totale et le taux maximal de la cinétique de croissance et de production.

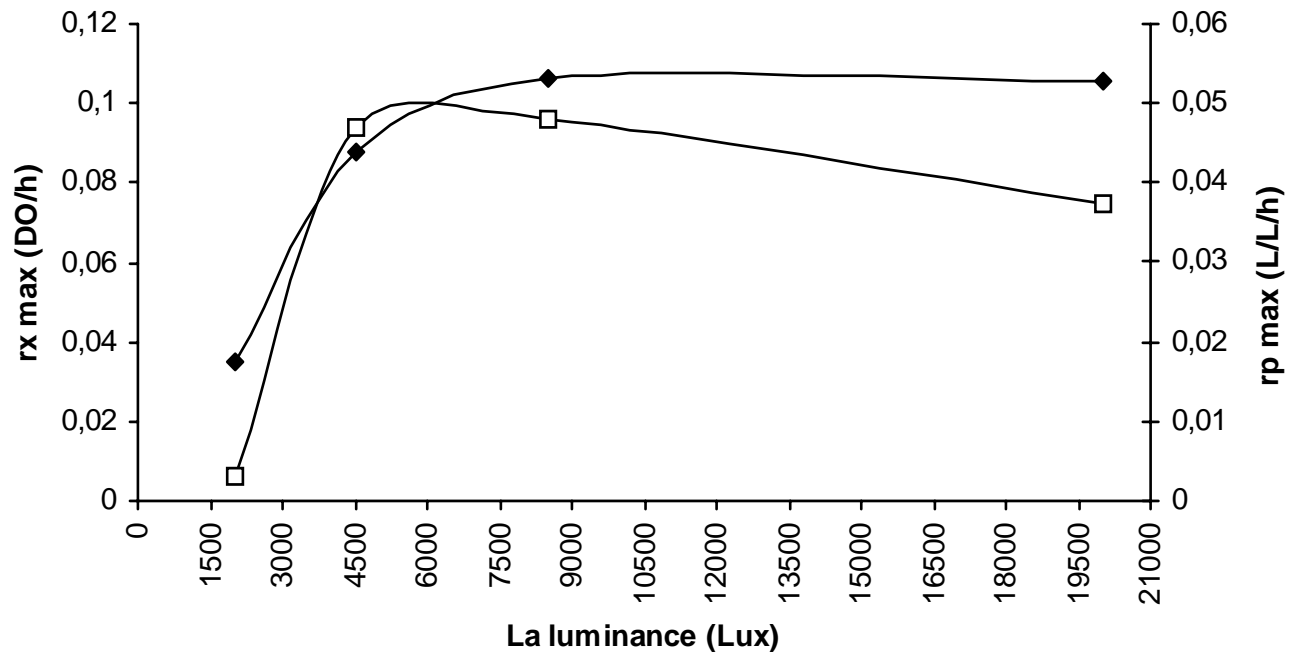


Figure VI.35. Evolution du taux maximal de la croissance bactérienne (\square) et de la production d'hydrogène (\blacklozenge)

D'après la Figure VI.35, le taux maximal de la croissance cellulaire augmente avec l'augmentation de l'énergie lumineuse, jusqu'à saturation sous une intensité de 4500 Lux, correspondant à son taux maximal de croissance. Sous une très forte intensité, 20000 Lux, une faible inhibition prend place, accompagné d'une modification de la couleur des pigments due à une réduction des bactériochlorophylles. Les bactéries deviennent très sensibles à la lumière, ce qui provoque une réduction de la concentration cellulaire. La réduction du taux de croissance sous de très fortes intensités lumineuses, suite à une réduction des pigments a été rapportée par plusieurs chercheurs, [37, 38, 95].

Le taux maximal de production de l'hydrogène croît avec l'augmentation de l'énergie lumineuse, jusqu'à un taux de saturation à 8500 Lux.

En comparant les deux taux maximaux $r_{x \max}$ et $r_{p \max}$, calculés à partir des lois (VI.1) et (VI.5) on remarque que :

- **4500-8500Lux :** A 8500 Lux le taux de croissance bactérien est similaire à celui obtenu sous une intensité de 4500 Lux ; alors que le taux de production de l'hydrogène augmente. La pénétration de la lumière est limitée par les pigments présents en excès dans le système photosynthétique ; à 8500 Lux le taux de pigment diminue par rapport à 4500 Lux, ce qui se traduit par une augmentation de la production de l'hydrogène.

- **8500-20000 Lux :** À 20000 Lux le taux de croissance cellulaire et le nombre de pigments sont inférieurs comparés à 8500 Lux; alors qu'une saturation de production est établie. La diminution en biomasse n'a pas réduit la production de l'hydrogène, mais elle a permis un bon transfert de lumière nécessaire au mécanisme biologique de production.

Pour comprendre l'effet de l'intensité lumineuse sur la réduction de la croissance cellulaire et des pigments, récepteurs de photons et nécessaires au mécanisme de production de l'hydrogène, sans affecter le taux de production, on se réfère aux travaux suivants :

- Toshihiko Kondo et al (2002) déterminent que sous une très forte intensité lumineuse, une faible densité de pigments réduit le taux de la croissance bactérienne mais elle n'a pas un très grand effet sur la nitrogénase, enzyme productrice d'hydrogène [37].
- Patricia J et Samuel Kaplan (1988), démontrent que le complexe B875 semble être un intermédiaire obligatoire dans le transfert de l'énergie d'excitation du complexe B800-850 au complexe RC. Sous une forte intensité lumineuse, les quantités de polypeptides RC et B875 ne varient pas, comparés à des quantités initiales égales des chromatophores isolés de *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 [64].
- Selon Eui-Jin Kim et al (2006), le complexe B875 doit être présent pour la croissance et la production de l'hydrogène chez *Rhodobacter sphaeroides*. Sa réduction conduit à une diminution de la production de l'hydrogène, alors qu'une réduction du complexe B800-850, suite à une mutation, augmente la production [72].

En comparant ces résultats [64, 37, 72] avec ceux des Figures VI.28 et VI.35, on détermine que sous des intensités de 8500 et 20000 Lux, les quantités en B875 et RC restent constantes, alors que les quantités en bactériochlorophylles et B800-850 diminuent, ce qui explique l'augmentation de la production de l'hydrogène à 8500 Lux et une saturation du taux de croissance suite à une sensibilité des cellules. Cette sensibilité augmente sous une intensité de 20000 Lux et se traduit par une faible photo-inhibition de la croissance cellulaire tout en maintenant un taux de production presque égal à celui obtenu sous une intensité de 8500 lux et donc une saturation du taux de production de l'hydrogène, étant donné que l'activité de la nitrogénase n'est pas affectée et les complexes B875 et RC restent constant.

Suite à une réduction du taux de la croissance à 20000Lux, comparé à 4500Lux et 8500Lux, la pénétration de la lumière est plus importante. Ces bactéries vont produire de l'hydrogène avec un taux similaire à 8500 Lux ; c'est l'état d'équilibre entre l'intensité et la concentration cellulaire dans le réacteur tubulaire plan à jet, de un centimètre de diamètre.

Tableau VI.5 : Les taux maximaux et les productivités totales de croissance et de production du réacteur tubulaire à jet.

Intensités lumineuses (Lux)	Les taux maximaux (r max.)		Les productivités (Pr)	
	$r_{x_{max}}$ (DO/h)	$r_{p_{max}}$ (l/l/h)	Pr_{x_t} (DO/h)	Pr_{p_t} (l/l/h)
20000	0.07466	$52.869 \cdot 10^{-3}$	0.027	$19.330 \cdot 10^{-3}$
8500	0.09566	$53.227 \cdot 10^{-3}$	0.025	$17.042 \cdot 10^{-3}$
4500	0.09380	$44.000 \cdot 10^{-3}$	0.040	$22.170 \cdot 10^{-3}$
2000	0.00600	$17.600 \cdot 10^{-3}$	0.010	$08.830 \cdot 10^{-3}$

Lorsqu'on compare les deux taux maximaux à 8500 Lux et 20000 Lux (Tableau VI.5), on remarque que le taux diminue de 1% par rapport à 8500 Lux. Une lumière trop importante devient trop forte pour la production de l'hydrogène, conduisant à une réduction significative du taux de production et du taux de la croissance cellulaire. Cette diminution peut être attribuée à une photo-inhibition. Ces observations sont en accord avec ceux de [38, 45,83].

On suppose qu'une intensité lumineuse de 20000 Lux correspond à un point séparant deux phases de production : La saturation et la photo-inhibition.

L'utilisation d'une intensité lumineuse de 8500Lux est recommandée durant la nuit aboutissant à une même productivité sous la lumière du jour équivalente à 20000Lux.

VI.6. Etude comparative entre le réacteur cylindrique parfaitement agité et le réacteur tubulaire plan à jet

6.1. Le volume totale d'hydrogène produit et le temps de retard

6.1.1. Le volume total d'hydrogène produit

D'après la Figure VI.36. (a), l'augmentation de l'intensité lumineuse correspond à une augmentation du volume total produit. Pour pouvoir évaluer la réponse d'un système biologique, on évalue le taux maximal de production et la productivité totale. Comme précédemment, les volumes produits à une intensité de 2500Lux et 4500Lux pour le réacteur cylindrique sont presque similaires alors que leurs taux de production diffèrent. Inversement, dans le réacteur tubulaire pour une intensité de 8500Lux, le volume augmente de 65% alors que le taux de production n'augmente que de 20% comparé à ceux sous une intensité de 4500Lux ; au sein du même réacteur, ce volume diminue de 03% alors que la productivité augmente de 34% comparé au réacteur cylindrique dans les mêmes conditions opératoires.

Ces résultats sont en accord avec les travaux de Bazar uyar et al [93], qui mettent en évidence que le volume total produit n'est pas lié à l'intensité lumineuse contrairement au taux de production.

6.1.2. Le temps de retard

Le temps de retard est le temps du début de production de l'hydrogène. A des faibles intensités lumineuses (1000Lux), le début d'apparition de l'hydrogène est suffisamment long. Ce temps diminue avec l'augmentation de l'intensité lumineuse jusqu'à une gamme d'intensité correspondant à 8500 et 20000Lux, où les bactéries deviennent sensibles à la lumière ; dans ces conditions les bactéries nécessitent un temps de réadaptation ce qui se traduit par une augmentation du temps de retard (Figure VI.36.(b)). Dans la littérature ce temps varie de 20 ± 7 h [19].

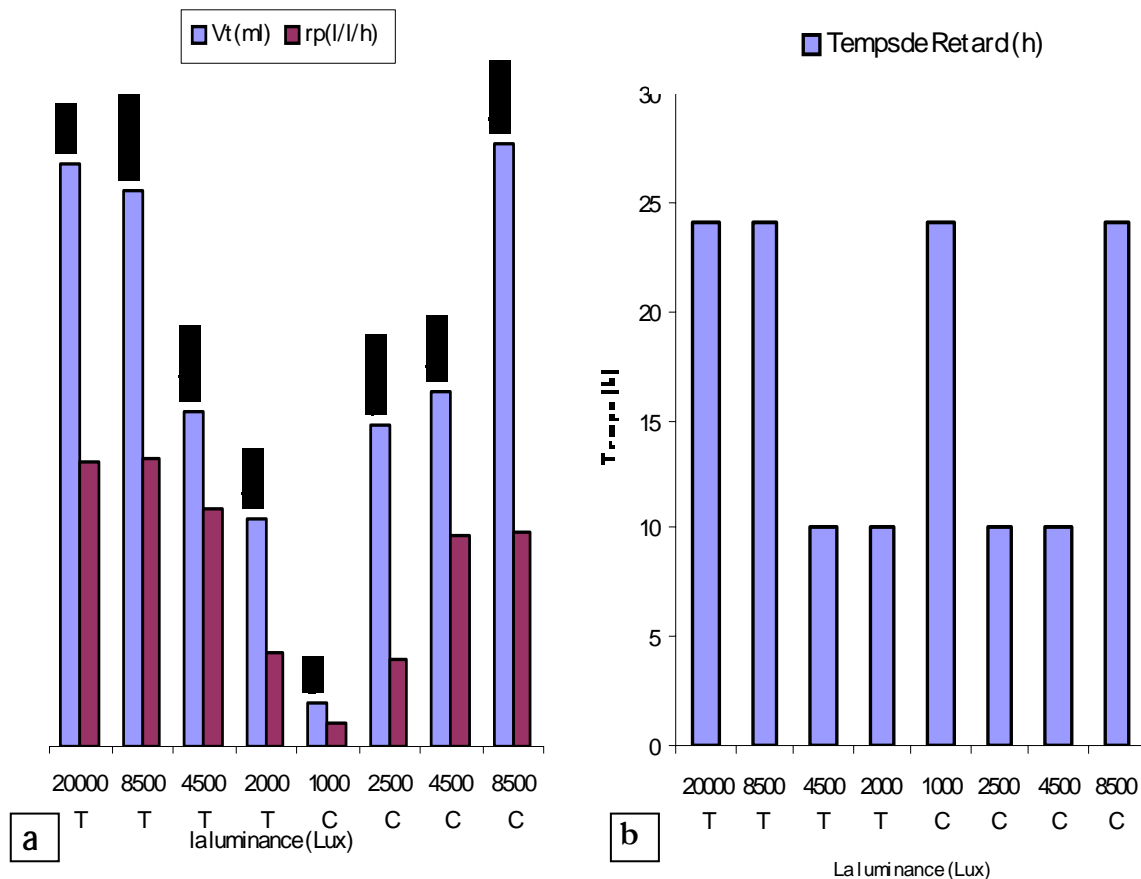


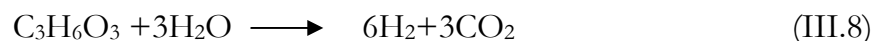
Figure VI.36. (a) Volume total produit ; (b) Temps de retards dans le réacteur tubulaire et le réacteur cylindrique à différentes intensités lumineuses

6.2. L'efficacité de conversion de substrat par *Rhodobacter sphaeroides* CIP 60.6

Le cycle d'acide citrique (TCA) (Figure IV. 2), la membrane photosynthétique (Figure IV.3 et IV.4) et les enzymes (voir paragraphe IV.4) jouent un rôle important dans le mécanisme de production de l'hydrogène [1].

Un autre paramètre qui caractérise la production biologique de l'hydrogène : c'est l'efficacité de conversion du substrat par la souche *Rhodobacter sphaeroides* CIP60.6, défini comme le rapport entre la quantité de l'hydrogène produit et la quantité attendue à travers la stœchiométrie de conversion du substrat [36].

Pour une mole de lactate, correspondant au substrat utilisé 6 moles d'hydrogène sont attendues dans cette bioconversion :



Par ailleurs, l'efficacité de conversion du substrat (η) peut être calculé par cette équation [19] :

$$\eta = \frac{P}{6VM_0} \cdot 100\% \quad (\text{VI.6})$$

Avec : P : Nombre de moles actuelle d'hydrogène produite ;
 V : Le volume du milieu de production en litre ;
 M_0 : La concentration initiale (molaire).

L'efficacité de conversion du substrat par *Rhodobacter sphaeroides* CIP60.6 est de l'ordre de 33%. Dans la littérature, une efficacité de conversion du substrat de l'ordre de 35% est observée chez *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 [19].

6.3. Effet des paramètres physico-chimiques sur la cinétique de production

La réponse biologique dépend des paramètres physico-chimiques tels que le pH et l'agitation. L'activité enzymatique de la nitrogénase et l'hydrogénase est co-réglée mutuellement, chacune constitue un antagonisme métabolique de l'autre (Tableau VI.6).

L'agitation, elle aussi affecte l'efficacité de conversion du substrat et du dégazage, et par voie de conséquence la cinétique de production de l'hydrogène par *Rhodobacter sphaeroides* CIP 60.6. Avec l'arrêt de l'agitation, cette cinétique est presque négligeable dans le réacteur tubulaire à jet comparé au réacteur cylindrique ; cela est dû à la géométrie du système tubulaire où les bulles du biogaz sont piégées dans la canalisation. Dans ce système, le jet de la pompe est suivi d'un barbotage liquide-liquide au sein d'un réservoir cylindrique qui permet le dégazage de la culture et donc la récupération du biogaz produit (Figure V.3).

Tableau VI.6. : Gamme de pH affectant l'activité enzymatique de la nitrogénase et de l'hydrogénase

pH	Réacteur cylindrique	Réacteur tubulaire
Début de production	7.5 ± 0.1	7.45 ± 0.05
Défavorable à la production	7.9 ± 0.1	8.5 ± 0.6

6.4. Etude comparative entre les cinétiques de croissance et de production dans le réacteur cylindrique parfaitement agité et le réacteur tubulaire plan à jet

Le bioréacteur est conçu en fonction du type de processus qui doit s'y dérouler. Quel que soit le type de micro-organismes, le bioréacteur doit permettre un contact aussi bon que possible entre les deux phases biotique (*R. sp* CIP 60.6) et abiotique (le milieu de production «gL» et la lumière) du système.

Selon l'allure des cinétiques optimales, la productivité d'un procédé est liée aux phénomènes de transfert entre les bactéries, le milieu et l'énergie lumineuse. C'est un paramètre important qui caractérise la production biologique de l'hydrogène (Figure VI.37).

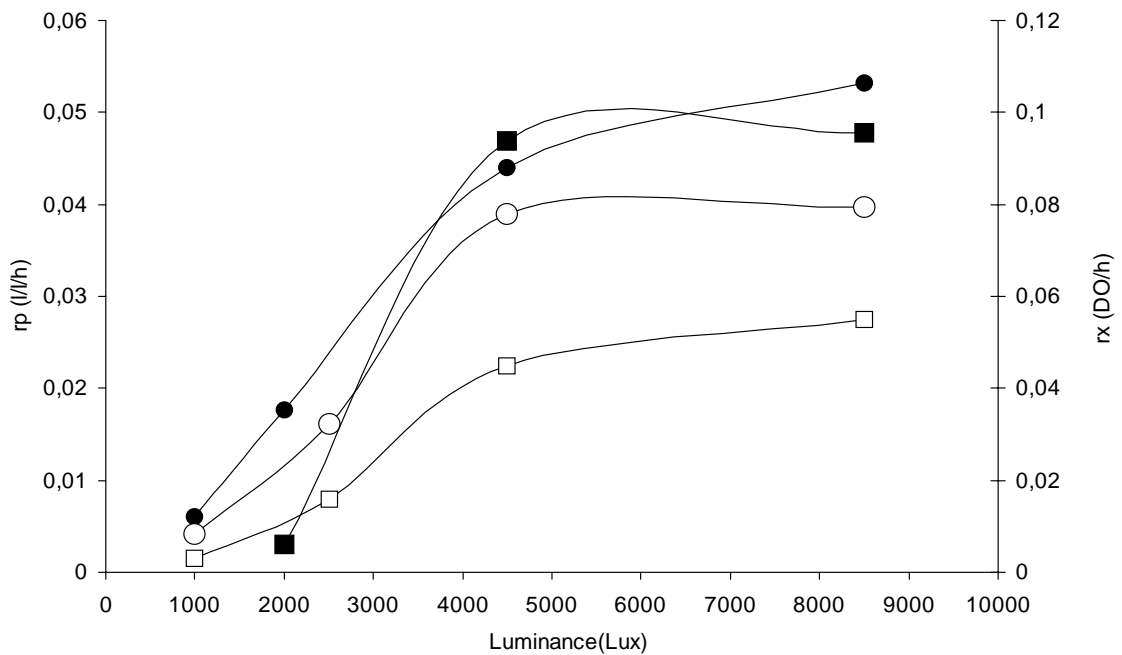


Figure VI.37. Étude comparative entre les cinétiques de croissance (□, ■) et de production (○, ●) dans le réacteur cylindrique parfaitement agité (symbole vide) et le réacteur tubulaire plan à jet (symbole plein)

A des faibles intensités lumineuses, inférieures ou égales à 2000Lux, les taux de croissance cellulaire sont presque identiques pour les deux réacteurs. Dans les conditions où les taux maximaux de croissance sont nettement inférieurs comparés à ceux obtenus sous de grandes intensités (Figure VI.37), un bon transfert de lumière dans les deux réacteurs est établi.

Dans le réacteur cylindrique ayant 6.5cm de diamètre, les bactéries les plus profondes développent leur système photosynthétique par une collecte suffisante de lumière [37], permettant ainsi une croissance presque identique que celle dans le réacteur tubulaire, mais cette énergie lumineuse reste insuffisante pour la production de l'hydrogène comparé au réacteur tubulaire (1cm de diamètre) où le gain est de l'ordre de 50% (Figure VI.38). Le même gain est observé par T. Kondo et al [37], lors de l'utilisation d'une souche mutée *Rhodobacter sphaeroides MTP4*.

Sous des intensités de 2500 Lux et 4500 Lux et du fait que les bactéries présentes dans le réacteur tubulaire reçoivent plus d'énergies que celles dans le réacteur cylindrique, le gain en terme de biomasse devient plus important au-delà de 2000Lux, il augmente de 62.5% et de 100%, alors que le gain en terme de produit augmente de 43.75% et de 12.8%, respectivement.

L'augmentation en biomasse et en pigment en fonction du temps dans le réacteur tubulaire aura pour effet une limitation de transfert de lumière et donc une réduction de l'énergie lumineuse nécessaire à la production ; ainsi, les pigments sont synthétisés en excès, ils alimentent en quantités importantes la nitrogénase en ATPs et Fd_{red} comparé à sa capacité enzymatique [37]. C'est la raison pour laquelle le taux de production de l'hydrogène n'augmente que de 12.8% à 4500Lux, par rapport au réacteur cylindrique dans les mêmes conditions opératoires.

Dans le réacteur tubulaire et à une intensité de 8500Lux, le taux de production augmente de 34%, suite à une réduction du gain en biomasse qui est de l'ordre de 73%.

Dans ces mêmes conditions (8500 Lux, 30°C) la réduction du nombre des pigments (couleur de la suspension bactérienne) est plus importante dans le réacteur tubulaire que dans le réacteur cylindrique. Le nombre de pigments par cellule diminue avec l'augmentation du rapport surface / volume. Cette corrélation est rapportée également par Nakada et al [53].

Les très faibles intensités lumineuses sont plus productives, en terme de produit « Hydrogène », dans le réacteur tubulaire, y compris pour les très grandes intensités.

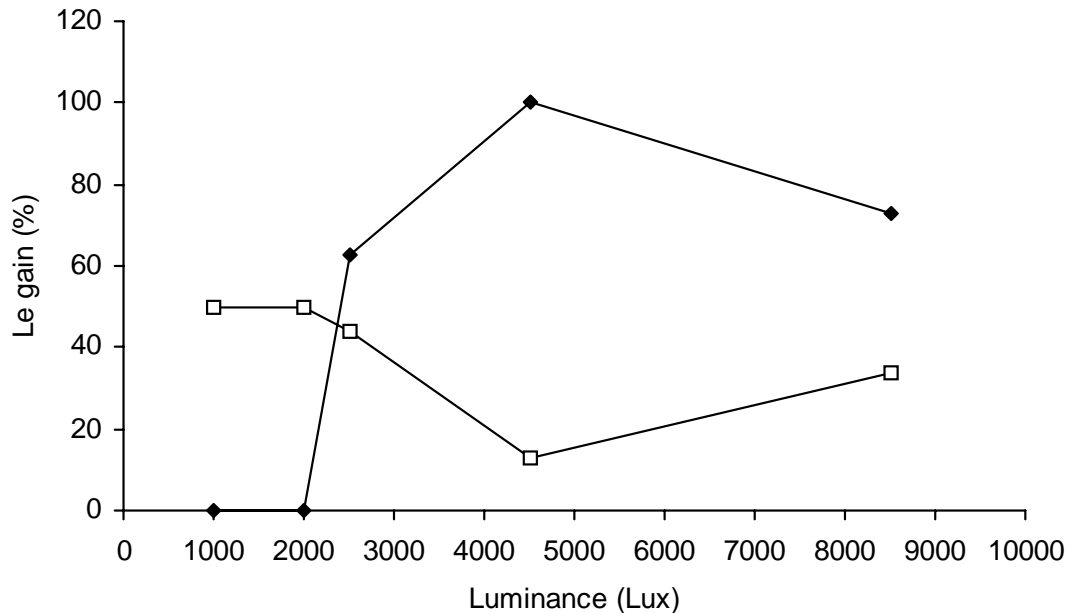


Figure VI.37. Gain en termes de biomasse (◆) et produit (□) dans le réacteur tubulaire comparé au réacteur cylindrique à différentes intensités lumineuses

6.5. Effet de la concentration en biomasse et en pigments sur le taux de production de l'hydrogène à différentes intensités lumineuses

Dans le réacteur tubulaire et sous les mêmes conditions opératoires, l'augmentation du gain en biomasse au-delà de 50%, comparé au réacteur cylindrique, réduit le gain en termes de production d'hydrogène (Figure VI.38). Cela est dû à une forte atténuation de la lumière dans des suspensions bactériennes ayant de grandes concentrations cellulaires et des densités élevées en pigments (Figure VI.22). La réduction de l'énergie lumineuse en fonction de la profondeur du réacteur aura pour effet une réduction du taux maximal de production de l'hydrogène (Figure VI.37).

D'après ces résultats, le réacteur tubulaire plan enroulé en spirale augmente la productivité du système et l'activité métabolique de *Rhodobacter sphaeroides* CIP 60.6, par l'augmentation de l'efficacité de conversion de l'énergie lumineuse, nécessaire au mécanisme de production de l'hydrogène pour la production de l'ATP, des électrons, protons et des transporteurs redox nécessaires dans le cycle d'acide citrique. La réduction du diamètre, la surface plane et la forme spirale permettent une réduction des pertes d'énergie atténuée en profondeur et l'uniformité de distribution de l'énergie lumineuse, tout en assurant un bon transfert entre la phase biotique et abiotique du système.

Conclusion

Notre travail avait pour but la photobioproduction de l'hydrogène en présence d'une bactérie photofermentaire pourpre non sulfureuse, *Rhodobacter sphaeroides* CIP60.6 (DSM158). Deux photobioréacteurs qui diffèrent par leur géométrie et leur système d'agitation ont été utilisés. L'un cylindrique parfaitement agité et l'autre tubulaire plan enroulé en spirale à jet, que nous avons conçu et développé au sein de notre laboratoire.

Les connaissances acquises sur le mécanisme de la bioproduction de l'hydrogène nous ont permis de choisir le lactate comme substrat, une source de lumière naturelle fournie par une lampe tungstène, un âge de la culture, une température de 30°C et un pH 6,8.

Nous avons revivifié la bactérie lyophilisée *Rhodobacter sphaeroides* CIP60.6 et mise dans le milieu de production de l'hydrogène glutamate-lactate (gl) après optimisation de l'âge de la culture dans le milieu de préactivation.

Au cours de nos travaux, nous avons montré que la production de l'hydrogène dépend de plusieurs paramètres tels que l'âge de la culture bactérienne, l'intensité lumineuse, le pH et l'agitation.

Une variation de l'intensité lumineuse affecte le taux de production de l'hydrogène, le taux de la croissance bactérienne, l'intensité des pigments et l'évolution du pH.

* Pour le réacteur cylindrique parfaitement agité, l'augmentation de l'intensité conduit à une augmentation de la production de l'hydrogène jusqu'à une saturation observée à 4500 Lux, avec un taux de production de $39 \cdot 10^{-3}$ l/l/h. L'intensité des pigments est inversement dépendante de l'intensité lumineuse.

Le temps de retard « lag time » diminue avec l'augmentation du taux cellulaire qui croît avec l'intensité lumineuse. Une augmentation du temps de début de production est observée à des intensités excessives (≥ 8500 Lux), valeur pour laquelle les bactéries deviennent sensibles.

La production peut se dérouler durant les deux phases de la croissance, la phase exponentielle et la phase stationnaire à des intensités lumineuses supérieures à 2000 Lux à condition que la concentration bactérienne soit supérieure à la concentration maximale.

A des intensités lumineuses excessives, l'augmentation du taux de production de l'hydrogène est meilleure en phase stationnaire.

L'étude de l'évolution du pH à différentes intensités lumineuses nous a permis de déterminer que l'accroissement du pH suit la cinétique de croissance cellulaire et affecte la cinétique de production de l'hydrogène. Les résultats obtenus montrent que les pH alcalins : $\text{pH} \geq 7,9 \pm 0,1$ sont défavorables à la production de l'hydrogène.

L'agitation et l'homogénéisation du système augmentent la performance du photobioréacteur en augmentant le contact entre les deux phases biotique et abiotique. Il en découle une augmentation de l'efficacité de conversion du substrat et de l'énergie lumineuse dans la production de l'hydrogène. L'agitation permet un meilleur dégazage du gaz produit.

* Dans le réacteur plan tubulaire à jet, du fait de l'uniformité de la distribution de la lumière, du faible diamètre et de la bonne agitation évitant les zones mortes existant dans

le réacteur cylindrique, nous observons des améliorations dans la production. Le taux de production de l'hydrogène augmente avec l'élévation de l'intensité lumineuse jusqu'à un état d'équilibre à 8500 Lux ; le taux de production obtenu est estimé de l'ordre de $53,23 \cdot 10^{-3}$ l/l/h.

Sous des intensités lumineuses excessives et avec l'augmentation du rapport surface/volume, la synthèse des pigments diminue, favorisant l'amélioration de la production de l'hydrogène. Dans ce réacteur, les intensités lumineuses supérieures à 4500 Lux sont productives en terme d'hydrogène, contrairement au réacteur cylindrique (saturation).

L'utilisation de ce photobioréacteur a permis d'obtenir des résultats très prometteurs pour l'utilisation de la photobioproduction de l'hydrogène par la bactérie photofermentaire, *Rhodobacter sphaeroides*, l'une des meilleures candidates pour remplacer les matières énergétiques premières non renouvelables et polluantes. En effet, les très faibles intensités deviennent très productives pour la production de l'hydrogène et le taux de production augmente de 50%.

Le gain en biomasse et en hydrogène dépend de l'intensité lumineuse. L'augmentation du gain en biomasse au delà de 50% conduit à une réduction du gain en hydrogène. Aux grandes intensités, les bactéries sont sensibles, le gain en hydrogène augmente de 34% par rapport à celui du réacteur cylindrique, suite à une réduction du gain en biomasse qui induit une diminution de l'atténuation de la lumière incidente

Le développement d'un tel photobioréacteur qui réduit les phénomènes de photolimitation améliore considérablement la productivité du système. Par ailleurs, l'utilisation d'un tel procédé dans la photobioproduction de l'hydrogène à grande échelle semble plus avantageuse sur le plan environnementale et économique.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] **Koku. H, Eroglu. I, Gunduz. U, Yucel. M, Turker. L.** Aspects of the metabolism of hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2002; 27: 1315 – 1329.
- [2] **Zabut. B, El-Kahlout. K, Yücel. M, Gündüz. U, Türker. L, Eroglu. I.** Hydrogen gas production by combined systems of *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 and *Halobacterium salinarum* in a photobioreactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2006; 31: 1553 – 1562.
- [3] **Laniecki. M.** Generation of hydrogen with photobacteria. *Solar & Alternative Energy*. 2006 SPIE-The International Society for Optical Engineering. Mickiewicz University in Poznan, Poland.
- [4] **Pelmont. J.** Adaptations physiologiques. Bactérie et environnement. Presse universitaire de gronoble, 1994; 2.
- [5] **Eroglu. E, Gunduz. U, Yucel. M, Turker. L, Eroglu. I.** Photobiological hydrogen production by using olive mill wastewater as a sole substrate source. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2004; 29: 163 – 171.
- [6] **Chitour C. E.** Les perspectives énergétiques à l'horizon 2020 dans un contexte de globalisation planétaire, cinquième journée de l'énergie. Ecole Nationale Polytechnique d'El Harrach, Alger, Avril 2001.
- [7] **Multon. B, Seigneurbieux. J, Ruellan. M, Ben Ahmed. H.** Energie et développement durable. Document rédigé pour le bulletin des anciens élèves. L'ENSET/ENS de Cachan, février 2006, n°228.
- [8] **Multon. B.** Ressources et consommation d'énergie. Production d'électricité à partir des renouvelables, Module C16/Ecole Normale Supérieure de Cachan 2007.
- [9] Energies renouvelables, missions et programmes, ADEME / rapport d'activité, 2001.
- [10] **Swanny. F, Pruvost. J, Legrand. J.** Étude des voies métaboliques de production d'hydrogène chez la microalgue et transposition en photobioréacteur. École Polytechnique de l'Université de Nantes, 2006 ; N° ED 0367-224.
- [11] **Lambert. J.** Définitions et abréviations L'huile végétale pure Végétole ®. Institut Français des huiles végétales pures, 2005.
- [12] Le futur du pétrole. Cahier technologique N°1. La recherche, N°407, Avril 2007.
- [13] **Luzzi .A et William. A.** Produire de l'hydrogène par photolyse de l'eau, La filière hydrogène. Direction des sciences du vivant, Hivers 2004-2005, CLEFS-CEA-N° 50/51.
- [14] **Radgen. P, Cremer. C, Warkentin. S, Dr. Gerling. P, Dr. May. F, Knopf. S.** Summary of the Study Assessment of technologies for CO₂ capture and storage, Climate Change. Fraunhofer ISI and Karlsruhe, BGR Hannover, 31 March 2005.
- [15] Cap sur l'hydrogène d'origine renouvelable. Bulletin des énergies renouvelables 2006/ 2007; N°9, Edition: Centre du développement des énergies renouvelables CDER, Alger.
- [16] **Das. D, Veziroglu. T. N.** Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2001; 26: 13-28.
- [17] **Hollmuller. P, Lachal. B, Romerio. F, Weber. W, Zraggen. J. M.** L'hydrogène futur vecteur énergétique. Actes de la 15ème Journée du Cuepe Colloque du cycle de formation du Cuepe, Mai 2005.p :3, 20-22, Genève.
- [18] L'hydrogène vecteur énergétique. Bulletin des énergies renouvelables ; Edition : Centre du développement des énergies renouvelables CDER, Alger 2005 ; N°8.
- [19] **Koku. H, Eroglu. I, Gunduz. U, Yucel. M, Turker. L.** Kinetics of biological hydrogen production by the photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* O.U. 001. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2003; 28: 381 – 388.
- [20] **Dr Badwal. S.P.S., Ms Mishael. J.** Australian hydrogen activity, Energy in transition. Commonwealth of Australia, 2004 ; 177.
- [21] **Spinner. B, Fabre. E.** Une politique de recherche et développement pour des énergies durables. Action Concertée ENERGIE du CNRS et du Ministère de la Recherche et des Nouvelles Technologies, Décembre 2003.p22.
- [22] International Energy Agency, Agreement on the Production and Utilization of Hydrogen. End-of-Term Report: 1999-2004 And Plans: 2004-2009.

- [23] **Yokahama.** Photo courtesy of S.P.S.Badwal Japan, June 2004.
- [24] Hydrogene et biomasse, les pile a combustible. CLEFS CEA-N°44-Hivers 2000-2001.
- [25] **Vermaas. W.** An Introduction to Photosynthesis and Its Applications. The World & I, March 1998, p 158-165.
- [26] **Whitmarsh. J and Govindjee.** The photosynthetic process. In: "Concepts in Photobiology: Photosynthesis and Photomorphogenesis». Published by PurLife Health & Research Company, 2004; 11-51.
- [27] **Hallenbeck. P. C., Benemann. J. R.** Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. International Journal of Hydrogen Energy, 2002; 27: 1185 – 1193.
- [28] **HAHN. J. J, Prs; Jacoby. W. A, Bajpai. R. K, Doslkocil. E. J, Yu. Q.** Hydrogen production from biomass. The Faculty of the Graduate School at the University of Missouri-Columbia, In Partial Fulfilment of the Requirements for the Degree Doctor, DECEMBER 2006.
- [29] **Legrand. J.** Production d'hydrogène par des énergies renouvelables. Rapport final du programme de recherche intégrée 4.1. Programme énergie, université de Nantes, 2004-2005.
- [30] **Dutta. D, De. D, Chaudhuri. S and Bhattacharya. S. K.** Hydrogen production by Cyanobacteria, Microbial Cell Factories, Review. Licensee BioMed Central, 2005; 4:36.
- [31] **Reith. J.H, Wijffels. R.H and Barten. H.** Status and perspectives of biological methane and hydrogen production, Bio-methane & Bio-hydrogen. Dutch Biological Hydrogen Foundation, 2003.
- [32] **Melis. T.** Integrated Biological Hydrogen Production, International Hydrogen Energy Congress and Exhibition IHEC, 2005, Istanbul, Turkey.
- [33] **Esper. B, Badura. A and Rogner. M.** Photosynthesis as a power supply for (bio-) hydrogen production, TRENDS in Plant Science Review. Elsevier Ltd, 2006; 11 (11).
- [34] **Zhu. H, Wakayama. T, Suzuki. T, Asada. Y and Miyake. J.** Enhancement of Rhodobacter sphaeroides RV in cationic polymer/agar gels of hydrogen production in the presence of NH₄⁺. Journal of biosciences and bioengineering, 1999; 88 (5): 507-512, Japan.
- [35] **Redwood. M. D, Macaskie. L. E.** A two-stage, two-organism process for biohydrogen from glucose. International Journal of Hydrogen Energy, 2006; 31: 1514 – 1521.
- [36] **He. D, Bultel. Y, Magnin. J-P, Willison. J. C.** Kinetic analysis of photosynthetic growth and photohydrogen production of two strains of Rhodobacter Capsulatus. Enzyme and Microbial Technology, 2006; 8: 253–259.
- [37] **Kondo. T, Arakawa. M, Hirai. T, Wakayama. T, Haka. M and Miyake. J.** Enhancement of hydrogen production by a photosynthtic bacteria mutant with reduced pigment. Journal of bioscience and bioengineering, 2002; 93 (2): 145-150, Japan.
- [38] **Kim. M-S, Baek. J-S, Lee. J. K.** Comparison of H₂ accumulation by Rhodobacter sphaeroides KD131 and its uptake hydrogenase and PHB synthase deficient mutant. International Journal of Hydrogen Energy, 2006; 31: 121 – 127.
- [39] **Erolu. E, Tabanolu. A, Gündüz. U, Yücel. M, Türker. L and Erolu. I.** The relationship between growth kinetics and hydrogen production by Rhodobacter sphaeroides. Press of Middle East Technical University, Ankara, Turkey, 2005.
- [40] **Nath. K. Kumar. A. Das. D.** Hydrogen production by Rhodobacter sphaeroides strain O.U.001 using spent media of Enterobacter cloacae strain DM11. Appl Microbiol Biotechnol, Springer-Verlag, 2005; 68: 533–541.
- [41] **Hoekema. S, Bijmans. M, Janssen. M, Tramper. J, Wijffels. R. H.** A pneumatically agitated &at-panel photobioreactor with gas re-circulation: anaerobic photoheterotrophic cultivation of a purple non-sulfur bacterium. International Journal of Hydrogen Energy, 2002; 27: 1331 – 1338.
- [42] **Asada. Y and Miyake. J.** Review, Photobiological Hydrogen Production. Journal of bioscience and bioengineering, 1999; 88 (1): 1-6.
- [43] Interstate Technology & Regulatory Council, Characterization, Design, Construction, and Monitoring of Bioreactor Landfills, February 2006.
- [44] **Wolfrum. E. J and Watt. A.** Bioreactor Design Studies for a Hydrogen-Producing Bacterium. Applied Biochemistry and Biotechnology, Humana, 2002; 98–100.
- [45] **Wakayama. T, Nakada. J. E, Asada. Y and Miyake. J.** Effect of light/ dark cycle on bacterial hydrogen production by Rhodobacter sphaeroides RV. Applied Biochemistry and Biotechnology. Humana Press, 2000; 48-86.

- [46] **Prof. Pilon. L.** Photobiological Hydrogen Production. University of California Los Angeles, Mechanical and Aerospace Engineering Department, UCLA. www.seas.ucla.edu
- [47] **Taob. Y, Chen. Y, Wu. Y, He. Y, Zhou. Z.** High hydrogen yield from a two-step process of dark- and photo-fermentation of sucrose. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2007; 32: 200-206.
- [48] **Buckley. M and Wall. J.** Microbial energy conversion. American Academy of Microbiology, San Francisco, 2006. California.
- [49] **Makenzi. C, Choudhary. M, Larimer. F. W, Predki. P. F.** The home stretch, a first analysis of the nearly completed genome of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *Photosynthetic Research*, Kluwer Academic Publishers, 2001; 70: 19-41. Netherlands.
- [50] **Madera. M, Vogel. C, Kummerfeld. S.K, Chothia. C and Gough. J.** The Superfamily database in: additions and improvements. *Nucl. Acids Res*, 2004; 32: D235-D239.
- [51] **Packer. H. L and Armitage. J.** Behavioural Responses of *Rhodobacter sphaeroides* to Linear Gradients of the Nutrients Succinate and Acetate. *Applied and environmental microbiology*, Dec. 2000; 66 (12): 5186–5191.
- [52] **Paustian. T. D and Kurtz. R. S.** Transposon Mutagenesis of *Rhodobacter sphaeroides*. *Proceedings of the 15th Workshop/Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE)*, University of Wisconsin–Madison, 1994; 15 (608): 263-4921.
- [53] **Darcy. D, LeClair. B.S.** Optimisation and characterization of the growth of the photosynthetic bacterium *Blastochloris viridis* and a brief survey of its potential as a premeditative tool, Indiana April 2006.
- [54] **Timmy. Li.** What Is The Most Successful Method To Culture *Rhodobacter Sphaeroides* To Yield The Greatest Amount Of Polyhistidine-Tagged Proteins? 10th Grade Science Exhibition. Rubric: Science Experiment, Round 2, Final Draft, May 20th, 2005.
- [55] **Leveau. J. Y et Bouix. M.** Microbiologie industrielle. Les microorganismes d'intérêt industriel. Collection science et techniques agroalimentaires. Lavoisier, Tec et Doc apria, 1993.
- [56] **Larpen. J. P et Gourdaud. M. L.** Memento technique de microbiologie. Lavoisier, Tec et Doc, troisième édition, 1997.
- [57] **Hilton. J. C, Temple C. A and Rajagopalan K. V.** Re-design of *Rhodobacter sphaeroides* Dimethyl Sulfoxide Reductase. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.*, 1999; 274 (13): 8428–8436.
- [58] **Hickman. J. W, Mackenzie. C, Choudhary. M, Donohue. T, Kaplan. S and Zhou. D. S, Kvikstad. E, Kile. A, Severin. J, Forrest. D, Runnheim. R, Churas. C, Schwartz. C.** Whole-Genome Shotgun Optical Mapping of *Rhodobacter* Sequence Assembly *sphaeroides* strain 2.4.1 and Its Use for Whole-Genome Shotgun. *Genome Research*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003; 13: 2142-2151.
- [59] **Brandner. J. P, McEwan A. G, Kaplan. S and Donohue T. J.** Expression of the *Rhodobacter sphaeroides* Cytochrome c2 Structural Gene. *Journal of Bacteriology*, American Society for Microbiology, 1989, 171 (1): 360-368.
- [60] **Nakada. E, Asada. Y, Arai. T and Miyake. J.** Light penetration into cell suspension of photosynthetic bacteria ant relation to hydrogen production. *Journal of fermentation and bioengineering*. 1995; 80 (1): 53-57.Japan.
- [61] **Bahatyroya. S.** The native architecture of a photosynthetic membrane. *Nature*, 2004 ; 430: 1058-1062.
- [62] **Scheuring. S. A.** Habilitation à Diriger des Recherches, Université Pierre & Marie Curie, Août 2005.
- [63] **Hu. X and Schulten. K.** Model for the Light-Harvesting Complex I (B875) of *Rhodobacter sphaeroides* *Biophysical Journal*, August 1998; 75: 683–694.
- [64] **Kiley. P. J and Kaplan. S.** Molecular genetics of photosynthetic membrane biosynthesis in *Rhodobacter sphaeroides*. *Microbiological reviews*, 1988; 50-69.
- [65] **Christopher. J, Law. A, Aleksander. W, Roszak. A, June Southall A, Alastair. T, Gardiner. A, Neil. W, Isaacs. A, Richard. J, Cogdell. A.** The structure and function of bacterial light-harvesting complexes (Review). *Molecular Membrane Biology Issue*, May-June 2004; 21 (3): 183 – 191.
- [66] **Sheuring. S, Levy. D, Rigaud. J. L.** Watching the components of photosynthetic bacteria Membranes and there is situ organisation by atomic force microscopy. *Biochemical and biophysical act*, Review Elsevier, 2005; (1712): 109-127.

- [67] **Das. D. R, Kiley. P. J, Segal. M, Norville. J, Yu. A. A, Wang. L, Trammell. S. A, Reddick. L. E, Kumar. R, Stellacci. F, Lebedev. N, Schnur. J, Bruce. B. D, Zhang. S and Baldo. M.** Integration of Photosynthetic Protein Molecular Complexes in Solid-State Electronic. American Chemical Society, 2004; 4 (6): 1079-1083.
- [68] **Nicholls. D. G and Ferguson S. J.** Bioenergetics (Third Edition). Elsevier, 2002.
- [69] **Luzzi. A et William. A.** Produire de l'hydrogène par photolyse de l'eau, La filière hydrogène. Direction des sciences du vivant, Hivers 2004-2005, CLEFS-CEA-N° 50/51.
- [70] **Donahue.** Function and control of the Rhodobacter sphaeroides photosynthetic apparatus. BACTER Workshop, 2006.
- [71] **Nomataa. J, Kitashimab. M, Inoueb. K and Fujitaa. Y.** Nitrogenase Fe protein-like Fe-S cluster is conserved in L-protein (BchL) of dark-operative protochlorophyllide reductase from Rhodobacter capsulatus. Federation of European Biochemical Societies FEBS Letters, 2006; 580: 6151-6154.
- [72] **Kim. E-J, Kim. J-S, Kim. M-S, Lee. J. K.** Effect of changes in the level of light harvesting complexes of Rhodobacter sphaeroides on the photoheterotrophic production of hydrogen. International Journal of Hydrogen Energy, 2006; 31: 531 – 538.
- [73] **Yetis. M, Gunduz. U, Eroglu. I, Yucel. M and Turker. L.** Photoproduction of hydrogen from sugar refinery wastewater by Rhodobacter sphaeroides OU.001. . International Journal of Hydrogen Energy, 2000; 25: 1035-1041.
- [74] **Zhu. H, Suzuki. T, Tsygankov. A. A, Miyakez. A.** Hydrogen production from tofu wastewater by Rhodobacter sphaeroides immobilized in agar gel. International Journal of Hydrogen Energy, 1999; 24: 305-310.
- [75] **Eroglu. E, Eroglu. I, Gunduz. U, Turker. L and Yucel. M.** Biological hydrogen production from olive mill wastewater with tow-stage process. International Journal of Hydrogen Energy, 2006; 31: 1527 – 1535.
- [76] **Fang. H.P, Zhu. H, Zhang. T.** Phototrophic hydrogen production from glucose by pure and co-cultures of Clostridium butyricum and Rhodobacter sphaeroides. International Journal of Hydrogen Energy, 2006; 31, 2223 – 2230.
- [77] **Taob. Y, Chen. Y, Wu. Y, He. Y, Zhou. Z.** High hydrogen yield from a two-step process of dark- and photo-fermentation of sucrose. International Journal of Hydrogen Energy, 2007; 32: 200-206.
- [78] **Yokoi. H, Saitsu. A, Uchaida. H, Hirose. J, Hayashi. S and Takasaki. Y.** Microbial Hydrogen Production from Sweet Potato Starch Residue. Journal of bioscience and bioengineering, 2001; 91 (1): 58-63.
- [79] **Asada. Y, Tokumoto. M, Aihara. Y, Oku. M, Ishimi. K, Wakayama. T, Miyake. J, Tomiyama. M, Kohno. H.** Hydrogen production by co-cultures of Lactobacillus and a photosynthetic bacterium, Rhodobacter sphaeroides RV. International Journal of Hydrogen Energy, 2006; 31: 1509 – 1513.
- [80] Informations sur les souches bactériennes du Centre de ressources biologiques de l'institut Pasteur, CRBIP. Pasteur.2004.
- [81] **Sistrom, W. R.** The kinetics of the synthesis of photopigments in Rhodospseudomonas sphaeroides. J. Gen. Microbiol. 1962; 28: 607-616.
- [82] **Makenzi. C.** Rhodobacter sphaeroides. October 2005.
- [83] **Miyake. J, Wakayama. T, Schnackenberg. J, Arai. T and Asada. Y.** Simulation of the daily sunlight illumination pattern for bacterial photo- hydrogen production. Journal of bioscience and bioengineering, 1999; 88 (6): 659-663, Japan.
- [84] **Prescott. M.** Microbiologie. De Buech, Paris, 2003.
- [85] **Perry. J.** Microbiologie. Dunod, Paris, 2004.
- [86] **Lecler. H, Gaillard. J. L et Simonet.** Microbiologie générale. La bactérie et le monde bactérien. 1994.
- [87] **In-BeomKo, Noike. T.** Use of blue optical filters for suppression of growth of algae in hydrogen producing non-axenic cultures of Rhodobacter sphaeroides RV. International Journal of Hydrogen Energy, 2002; 27: 1297 – 1302.
- [88] **Scriban. R, Pompidou. A.** Biotechnologie. Lavoisier Tec et Doc, cinquième édition, 1999.
- [89] **Delachapelle. S, Renaud. M et Vignais. P.** Etude de la production d'hydrogène en bioréacteur par une bactérie photosynthétique Rhodobacter capsulatus. Revue des sciences de l'eau, 1991 ; 4 : 38-39.

- [90] **Callister. S. J, Nicolra. C. D, Zeng. X, Roh. J. H, Dominguez M. A, Tavano C. L, Monroe. M. E, Kaplan. S, Donohue T. J, Smith R. D, Lipton. M.** Comparison of aerobic and photosynthetic *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. proteomes. *Journal of Microbiologie Methods*, 2006; 67: 424-436.
- [91] **Lobaton. E, Bayen. A.** Modeling and Optimization Analysis of Single Flagellum Bacterial Motion, UC Berkeley Systems Engineering, Civil and Environmental Engineering, Pisa, April 6th, 2007
- [92] **Lorrunguang. C, Martthong. J, Kensasaki and Noparatnaraporn. N.** Selection of photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* 14F for polyhydroxyalkanoate production with tow stage aerobic dark cultivation. . *Journal of bioscience and bioengineering*, 2006; 102, (128-131). Japan.
- [93] **Uyar. B, Eroglu. I, Yücel. M, Gündüz. U, Türker. L.** Effet of light intensity and illumination pattern on biological hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* OU.001. *Proceedings International Hydrogen energy Congress and exhibition IHEC*, 2005. Middle East Technical University, Ankara, Turkey.
- [94] **Kars. G, Gündüz. U, Yücel. M, Türker. L, Eroglu. I.** Hydrogen production and transcriptional analysis of *nifD*, *nifK* and *hupS* genes in *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 grown in media with different concentrations of molybdenum and iron. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2006; 31: 1536 – 1544.
- [95] **Roh. J. H, Smith. W. E, and Kaplan. S.** Effects of Oxygen and Light Intensity on Transcriptome Expression in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *The journal of biological chemistry*, 2004; 279 (10): 9146–9155.