

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

ÉCOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE



DEPARTEMENT DE GENIE DE L'ENVIRONNEMENT  
LABORATOIRE BIOTECHNOLOGIE

**Thème :**

**Conception d'un photobioréacteur :  
application à la production de biogaz**

Soutenue le 27.06.2007 devant le jury :

Réalisé par :  
**M<sup>elle</sup> AISSAT Amira**

Mr **R. BOUARABE**  
Mr **H. Lounici**  
M<sup>me</sup> **N. ABDI-HAIDER**  
M<sup>me</sup> **L. Kitous**  
Mr **M. DEROUICHE**

Maître de conférence- ENP  
Maître de conférence- ENP  
Maître de conférence- ENP  
Chargé de cours- ENP  
Maître de conférence- ENP

Président  
Promoteur  
Promotrice  
Examinatrice  
Examineur

Année Universitaire 2006/2007

## DEDICACES :

*À la mémoire de ma tante « AISSAt Houria » j'aurai aimé qu'elle soit parmi nous.*

*À ma tendre et douce mère, pour son soutien et son réconfort.*

*À mon père que j'aime par dessus tout.*

*À mes frères et sœurs : Ryma, Rania, Housseem et Oussama.*

*À mes tantes et oncles, cousins et cousines, mais surtout à ma « MANI »*

*À tous mes amis Amina, Redouene, Zaki, Karim, Dahmen,*

*Une dédicace spéciale à ma meilleure amie « HINDOU »*

## REMERCIEMENTS:

*Je tiens à remercier Mme Abdi, Mr Mameri et Mr Loinici pour m'avoir accueilli dans leur laboratoire des biotechnologie à l'Ecole Nationale Polytechnique. Qu'ils trouvent ici toute ma reconnaissance.*

*J'exprime ma profonde reconnaissance envers mes promoteurs, Madame ABDI et Monsieur LOUNICI Pour leur aide, leur disponibilité. Sans eux le travail accompli et le savoir acquis n'auraient jamais été possibles. Sans oublier M<sup>me</sup> AKROUM et Mr Smail Hocine pour leur précieuse aide.*

*Un merci spéciale et chaleureux pour la dame au grand cœur, je cite Mme ABDI qui m'a été d'un grand soutien.*

*J'adresse mes remerciements à Mr R. BOUARAB pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider le jury de ma soutenance. Je suis très honorée de compter parmi les membre du jury M<sup>me</sup> O. KITOUS et Mr. DROUICHE. Le leur remercie d'avoir pris le temps et le soin de lire ce rapport.*

*Un très grand « Merci » à tous les enseignants et à tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin à ma formation.*

*Je remercie également Assira, Oum –Essaad, Mme Tegar, Lila, Samira, Hassina et Hamida pour leurs aide et leur soutien*

## Liste des figures :

N°	Titre	Page
Figure1	Mécanisme de production d'hydrogène chez les cyanobactéries	09
Figure2	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> (Observation au microscope électronique)	14
Figure3	Spectre d'absorption des pigments de <i>Rhodobacter sphaeroides</i> .	16
Figure4	Schéma du cycle de carbone chez les bactéries pourpres non-sulfureuses	18
Figure5	schéma de production d'hydrogène.	20
Figure6 :	Absorption de la lumière	20
Figure7	transfert cyclique des électrons chez les bactéries pourpres non-sulfureuses	22
Figure8	Photobioréacteur à colonne vertical	25
Figure9	Photobioréacteur à panneaux plats	26
Figure10	Photobioreacteurs tubulaires	27
Figure11	Aspect général d'une courbe de croissance	32
Figure12	Courbe d'absorbance	35
Figure13	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> (croissance en présence de lumière)	39
Figure14	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> (croissance en absence de lumière)	39
Figure15	Courbe de croissance en aérobiose en absence de lumière	43

Figure16	Courbe de croissance en anaérobiose en présence de lumière	44
Figure17	Courbe comparative de croissance	45
Figure18	Aérobiose en absence de lumière (avant)	46
Figure19	Aérobiose en absence de lumière (après)	46
Figure20	Anaérobiose en présence de lumière (avant)	46
Figure21	Anaérobiose en présence de lumière (après)	46
Figure22	Schéma du potobioréacteur(33x29x12)	48
Figure23	Courbe comparative de croissance en sistrom A et ASy	50
Figure24	Courbe de production d'hydrogène par <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	51
Figure25	Relation croissance production	52
Figure26	Evolution du pH au cours de la croissance et la production	53

## Listes des tableaux :

N°	Titre	Page
Tableau III-1	Les différents modes métaboliques de <i>Rhodobacter sphaeroides</i> .	15
Tableau III-2	Caractéristiques de <i>Rhodobacter sphaeroides</i> .	16
Tableau IV-1	Avantages et inconvénients des différents photobioréacteurs	28
Tableau VI-1	Conditions opératoires (milieu solide)	36
Tableau VI-2	Conditions opératoires (milieu liquide)	37
Tableau VI-3	Résultats de la revivification	37
Tableau VI-4	Résultats des repiquages	38

## Sommaire :

Introduction

Chapitre I : Généralité sur les énergies renouvelables.

I-1- Qu'est ce qu'une énergie renouvelable? .....	1
I-2- Hydrogène et énergies fossiles.....	3
I-3- Les modes de production de l'hydrogène.....	4
• Production d'hydrogène à partir des énergies fossiles. ....	4
• Production de l'hydrogène par décomposition de l'eau. ....	4
• Production directe à partir de la biomasse.....	5
• Production d'hydrogène à partir des Systèmes biologiques	5

Chapitre II : Production Photobiologique d'Hydrogène

II-1- Production biologique de l'hydrogène.....	6
II-1-1- Production Photoautotrophique de l'hydrogène.....	6
• Mécanisme de production d'hydrogène par les Cyanobactéries .....	8
II-1-2- Production Photohétérotrophique de l'hydrogène.....	10
• Mécanisme de production d'hydrogène par les bactéries	12

Chapitre III : Généralité sur *Rhodobacter sphaeroides*.

III-1- L'emplacement de <i>Rhodobacter sphaeroides</i> .....	13
III-2- Phylogénie de <i>Rhodobacter sphaeroides</i> .....	14
III-3- Morphologie.....	14
III-4- Métabolismes.....	15
III- 5- Les pigments.....	16
III-6- Aspect de la croissance de <i>Rhodobacter sphaeroides</i> .....	17
III-7- La photosynthèse chez les bactéries pourpre non sulfureuses.....	19
III-7-1- La photoinduction du transfert cyclique d'électron.....	20
Ø Absorption de la lumière.....	20
Ø Description du transfert cyclique d'électron.....	21
III-7-2- La Nitrogénase.....	23

Chapitre IV : Photobioréacteurs

IV-1- Photobioréacteurs pour la production d'hydrogène .....	24
(a) Réacteur à colonne vertical .....	25
(b) Photobioréacteur à panneaux plats .....	26
(c) Photobioréacteurs tubulaires .....	27

Chapitre V : Généralité sur la croissance bactérienne.

V-1- Définition de la croissance microbienne .....	29
1. Besoins élémentaires .....	29
2. Besoins spécifiques .....	30

3. condition physico-chimique .....	30
• Demande d'oxygène .....	30
• Température de croissance .....	31
• pH de croissance .....	31
V-2- Caractéristique d'une courbe de croissance .....	32
La phase de latence .....	32
La phase de croissance .....	33
Phase stationnaire .....	33
Phase de déclin .....	34
V-3- La mesure de la croissance .....	34

## Partie expérimentale

1- Matériel biologique .....	36
2- Milieux de culture .....	36
3- Revivification de la bactérie lyophilisée .....	36
4- Conservation et ensemencement .....	38
5- Caractérisation de la bactérie <i>Rhodobacter sphaeroides</i> . .....	39
5-1- Aspect de la colonie .....	39
5-2- Coloration Gram appliquée à <i>Rhodobacter sphaeroides</i> . .....	40
5-3- Test oxydase appliquée à <i>Rhodobacter sphaeroides</i> . .....	41
6- Cinétique de croissance de <i>Rhodobacter sphaeroides</i> . .....	42
6-1- Etude comparative de croissance. ....	45
7- Etude de la production d'hydrogène .....	47
7-1- Dispositif expérimental .....	47
• Description du photobioréacteur .....	48
• Mode de fonctionnement .....	49
7-2- Cinétique de production d'hydrogène .....	49
• Relation entre croissance et production .....	52
• Effet de la production sur le pH du milieu .....	53

Conclusion

Annexe

Références



*INTRODUCTION  
GENERALE*

## Introduction :

Dominé par les énergies fossiles (pétroles, gaz, charbon), notre système énergétique actuel fait planer une double menace sur notre environnement. Il expose la planète à l'épuisement de ses réserves naturelles et il contribue à l'effet de serre. Actuellement, malgré les objectifs fixés dans le protocole de Kyoto qui stipule l'utilisation rationnelle de l'énergie, l'amélioration de l'efficacité des processus industriels et le passage vers des carburants moins polluants, on se retrouve face à une augmentation de la demande internationale en énergie

Si nous voulons un développement durable pour les générations futures, il devient nécessaire de diversifier nos modes de production d'énergie. Et comme vecteur d'énergie, l'hydrogène représente un enjeu majeur tant scientifique qu'environnemental et économique il devrait donc dans l'avenir jouer un rôle très important [2].

Certes, l'hydrogène n'est pas une source d'énergie car il doit lui-même être produit dans un premier temps. Il a un double avantage, il est à la fois inépuisable et non polluant, il est considéré comme combustible propre et efficace remplaçant les énergies fossiles.

Le seul inconvénient est que l'hydrogène n'est pas directement disponible dans la nature, mais si l'hydrogène doit remplacer les énergies fossiles, il devrait être produit de façon renouvelable, devrait aussi être économiquement et écologiquement viable.

La production d'hydrogène doit répondre à trois critères :

1. la compétitivité : les coûts de production ne doivent pas être trop élevés.
2. le rendement énergétique: la production d'hydrogène ne doit pas nécessiter trop d'énergie.
3. la propreté : le processus de fabrication doit être non polluant sous peine d'annuler l'un des principaux atouts de l'hydrogène

De nos jours, plusieurs méthodes sont opérationnelles, les principalement utilisées sont :

- la production d'hydrogène à partir des énergies fossiles.
- La production d'hydrogène par décomposition de l'eau.
- La production d'hydrogène à partir de végétaux par gazéification.

Parmi ces méthodes, aucune ne répond pour l'instant parfaitement aux critères de bonne production. Ils restent toujours polluants, en plus, les coûts de production restent notamment très élevés, ce qui est un obstacle pour l'utilisations massives.

La recherche de nouvelles technologies permettant la production et l'utilisation de cette énergie propre, a remis récemment sur le devant de la scène la production biologique d'hydrogène, en particulier grâce aux capacités de **bactéries** et des microalgues à en produire sous l'action de la lumière [7].

Dans le cadre de ce travail, intitulé « conception d'un photobioréacteur : application à la production de biogaz, H<sub>2</sub> », nous tenterons la production de ce biogaz. Notre choix s'est porté sur la bioproduction d'hydrogène par la bactérie « *Rhodobacter sphaeroides* ».

Nous consacrons le premier chapitre de notre étude à un rappel sur les énergies renouvelables ou nous verrons en détail le vecteur énergétique « Hydrogène ».

Dans le deuxième chapitre nous présenterons les différents modes de production photobiologique de l'hydrogène.

Nous détaillerons dans les prochains chapitres le mode de production photohétérotrophique par la bactérie *Rhodobacter sphaeroides* ainsi que les différents photobioréacteurs existents pour la photobioproduction d'hydrogène.

Pour la partie expérimentale, nous essaierons de caractériser « *Rhodobacter sphaeroides* » et d'étudier sa croissance selon différents modes métaboliques afin de déterminer les paramètres influençant la conception du photobioréacteur pour en fin passer à la phase de production.

*PARTIE*  
*BIBLIOGRAPHIQUE*

Chapitre I

*GENERALITES  
SUR LES  
ENERGIES  
RENOUVELABLES*

Il n'est pas besoin de rappeler l'incontournable besoin de toutes les formes d'énergie pour la société industrielle d'aujourd'hui. Jadis utilisée pour la survie des populations, l'énergie est de plus en plus un facteur indispensable à leur confort, à leur bien être et à leur développement technologique. Par ailleurs, le modernisme et l'évolution du mode de vie de la société ont accru ses besoins énergétiques dont elle dépend entièrement ; Chose pour laquelle aucun pays n'est aujourd'hui autonome sur le plan énergétique, qu'il s'agisse de la maîtrise des sources d'énergie ou des techniques de production et de transformation [1].

L'opinion publique et les gouvernements nous incitent à mettre en œuvre des solutions énergétiques durables remplaçant les énergies fossiles qui ne cessent de dominer le marché énergétique. Mais quelles que soient les volontés politiques, les évolutions sont difficiles. Car, par exemple, le pétrole fournit actuellement 98 % de l'énergie consommée pour les transports et utiliser une autre source d'énergie pour les voitures n'aurait de résultats significatifs qu'après le renouvellement de la plus grande partie du parc (seize années sont nécessaires au renouvellement de 90 % du parc) [2].

L'optimisation de la consommation est un enjeu essentiel de la politique énergétique nationale et mondiale, sur laquelle des interventions ne sont possibles qu'à l'échelle locale. Face aux problèmes que posent l'utilisation des énergies non renouvelables (raréfaction des ressources, effets néfastes sur l'environnement, risques de tensions internationales), les énergies renouvelables sont découvertes et font l'objet de nombreuses études techniques visant à les domestiquer [2].

### I-1- Qu'est ce qu'une énergie renouvelable ?

Une énergie renouvelable est une source d'énergie qui se renouvelle assez rapidement pour être considérée comme inépuisable à l'échelle de l'homme c'est-à-dire que sur une centaine d'années, on n'en consomme pas plus que la nature n'en produit; donc, le caractère renouvelable ou non d'une source d'énergie dépend de la rapidité avec laquelle elle est utilisée [3,2].

Les énergies renouvelables sont issues de phénomènes naturels réguliers ou constants provoqués par les astres, principalement le Soleil (rayonnement), mais aussi la Lune (marée) et la Terre (énergie géothermique). Aujourd'hui, on assimile souvent les énergies renouvelables aux énergies propres, mais il faut a priori les distinguer bien que certaines énergies soient renouvelables et propres [1].

La plupart des énergies renouvelables proviennent directement ou indirectement du soleil:

- Energie solaire : Elle est utilisée directement par les chauffe-eau solaires (panneaux solaires) et les piles solaires [2, 4].
- Energie hydraulique : Cette énergie provient essentiellement du passage de l'eau à travers les barrages. Elle est issue du cycle de l'eau : le soleil provoque l'évaporation de l'eau qui se condense pour former les nuages. La pluie libérée par ceux-ci contribue à la création des cours d'eau qui à leur tour alimentent les barrages. La puissance des centrales hydroélectriques dépend de la vitesse de l'eau et de son débit. L'énergie des marées est une forme d'énergie hydraulique mise à profit dans les usines marémotrices [2, 4].
- Energie éolienne : Elle utilise la force du vent. Celui-ci est dû à des différences de pressions atmosphériques locales qui résultent de différences d'échauffement de l'air par le soleil [2, 4].
- Energie de la biomasse (arbres, plantes, animaux, micro-organismes) : Elle provient de sa combustion. L'énergie solaire permet la croissance de la biomasse à partir de l'eau, du gaz carbonique ( $\text{CO}_2$ ) et de l'azote de l'air. Lors de la combustion de la biomasse (biocarburants compris) ou des déchets organiques qui en sont issus, l'énergie solaire est restituée sous forme de chaleur et le  $\text{CO}_2$  est libéré dans l'atmosphère [2, 4].
- Biogaz : Le *biogaz* est le gaz produit par la fermentation de matières organiques animales ou végétales à partir du soleil (en l'absence d'oxygène). Cette fermentation appelée aussi méthanisation se produit naturellement (dans les marais) ou spontanément dans les décharges contenant des déchets organiques, mais on peut aussi la provoquer artificiellement dans des digesteurs (pour traiter des boues d'épuration, des déchets organiques industriels ou agricoles, etc.). La forme d'énergie majoritaire du biogaz est le méthane comme pour le gaz naturel : le biogaz est ainsi la forme renouvelable de l'énergie fossile très courante qu'est le gaz naturel. On peut aussi utiliser le terme biométhane [1].

De nos jours, une nouvelle forme de biogaz est susceptible de remplacer les énergies fossiles qui n'est rien d'autre que l'hydrogène, il a fait son apparition plus particulièrement depuis les crises de l'approvisionnement en pétrole de la fin des années 1970 [5].

## I-2- Hydrogène et énergies fossiles :

A la fin du XIXe siècle, l'hydrogène était un combustible incontournable. Il était employé dans les lampes afin de fournir de l'éclairage et également dans le « gaz de ville », où il était mélangé de l'oxyde de carbone. Au cours du XXe siècle, avec l'apparition du gaz naturel et surtout du pétrole, l'hydrogène n'a plus guère été utilisé pour fournir de l'énergie, si ce n'est dans le domaine de la propulsion des fusées [2,5].

En effet, pétrole et gaz naturel peuvent être utilisés directement puisqu'ils se trouvent déjà dans la nature ; leur utilisation est donc plus simple. Mais l'épuisement progressif des réserves est inévitable. D'où un regain d'intérêt pour l'hydrogène car contrairement aux énergies fossiles, sa combustion ne rejette pas de gaz à effet de serre [2].

Les applications possibles de l'hydrogène :

En industrie : l'hydrogène est une des matières de base de l'industrie chimique et pétrochimique. Il est utilisé notamment pour la production d'ammoniac et de méthanol, pour le raffinage du pétrole en entrant comme gaz de synthèse qui permettrait d'obtenir des carburants plus énergétiques que les carburants actuels; il est également employé dans les secteurs de la métallurgie, de la pharmacologie ainsi que dans le traitement de produits alimentaires [4].

Dans le secteur des transports : des véhicules électriques alimentés par des piles à combustibles fonctionnant à l'hydrogène pourront remplacer avantageusement nos véhicules actuels. A plus petite échelle, la pile à combustible peut s'adapter aux appareils portables (téléphone, ordinateurs...) qui par rapport au système actuel, elle multipliera son autonomie et sera rechargeable en un instant [5].

Les habitations : l'hydrogène sera tout à la fois source de chaleur et d'électricité, il permettra, de plus, d'alimenter en électricité les relais isolés (sites montagneux, mer...) [5].

Les potentialités de l'hydrogène ne se limitent pas à la production d'électricité, l'hydrogène peut donner de l'énergie par combustion. C'est déjà le cas dans le domaine de propulsion des fusées [4].



Pour couvrir ces besoins, plusieurs millions de tonnes d'hydrogène devront être produits pour couvrir la demande mondiale en énergie. Utiliser l'hydrogène comme vecteur énergétique suppose donc d'augmenter radicalement sa production [2].

### I-3- Les modes de production de l'hydrogène :

L'hydrogène n'est pas directement disponible dans la nature, mais, il a cependant l'avantage de pouvoir être produit à partir des trois grandes sources que sont les énergies fossiles, nucléaire et renouvelables [4].

- Production d'hydrogène à partir des énergies fossiles :

Aujourd'hui, la majorité de l'hydrogène est produit à partir des combustibles fossiles qui se fait par fragmentation des molécules d'hydrocarbure sous l'action de la chaleur pour en libérer l'hydrogène. Le vaporeformage du gaz naturel est le procédé le plus courant : le gaz naturel est exposé à de la vapeur d'eau très chaude, et libère ainsi l'hydrogène qu'il contient.

Lors du procédé, trois réactions peuvent se produire :

- ☐ le méthane peut être converti en monoxyde de carbone et hydrogène,
- ☐ le monoxyde de carbone réagit avec la vapeur pour produire du dioxyde de carbone et de l'eau,
- ☐ le méthane peut être directement converti en dioxyde de carbone et hydrogène.

Si par exemple, le combustible utilisé est du gaz naturel, composé essentiellement de méthane (CH<sub>4</sub>), la réaction globale sera : 800 °C



La production d'hydrogène par reformage a l'inconvénient de rejeter du monoxyde de carbone (CO) dans l'atmosphère qui est le principal responsable de l'effet de serre. Comme ce mode de production est polluant et comme les ressources en énergies fossiles sont appelées à décroître, diversifier les modes de production s'avère indispensable [4].

- Production de l'hydrogène par décomposition de l'eau :

Une voie possible consiste à dissocier les atomes d'oxygène et d'hydrogène combinés dans les molécules d'eau (selon la réaction  $\text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{H}_2 + 1/2 \text{O}_2$ ). Cette solution est la plus intéressante en terme d'émission de gaz à effet de serre à condition toutefois d'opérer cette dissociation à partir de sources d'énergie elles-mêmes non émettrices de CO<sub>2</sub>.

Parmi les procédés envisageables, deux sont actuellement à l'étude : l'électrolyse et la dissociation de la molécule d'eau par cycles thermochimiques. L'électrolyse permet de décomposer chimiquement l'eau en oxygène et hydrogène sous l'action d'un courant électrique. La production d'hydrogène par électrolyse peut se faire dans de petites unités réparties sur le territoire national. Pour être rentable, ce procédé exige de pouvoir disposer de courant électrique à très faible coût. Actuellement, la production d'hydrogène par électrolyse coûte 3 à 4 fois plus cher que la production par reformage du gaz naturel. Elle souffre de plus d'un mauvais rendement global. L'électrolyse à haute température, qui est une amélioration de l'électrolyse classique, permettrait d'obtenir de meilleurs rendements. L'autre procédé de décomposition de la molécule d'eau par cycles thermochimiques permet d'opérer la dissociation de la molécule à des températures de l'ordre de 800° à 1 000 °C. De telles températures pourraient être obtenues par le biais de réacteurs nucléaires à haute température de nouvelle génération, actuellement à l'étude, ou de centrales solaires [4].

- Production directe à partir de la biomasse :

La biomasse est une source de production d'hydrogène potentiellement très importante. Elle est constituée de tous les végétaux (bois, paille, etc.) qui se renouvellent à la surface de la Terre. L'hydrogène est produit par gazéification, laquelle permet l'obtention d'un gaz de synthèse ( $\text{CO}_2 + \text{H}_2$ ). Après purification, celui-ci donne de l'hydrogène. Cette solution est attrayante car la quantité de  $\text{CO}_2$  émise au cours de la conversion de la biomasse en hydrogène est à peu près équivalente à celle qu'absorbent les plantes au cours de leur croissance ; l'écobilan est donc nul [4].

- Production d'hydrogène à partir des Systèmes biologiques renouvelables:

Biohydrogène : Une innovation de ces dernières années, qui a mis en exploitation des ressources énergétiques durables pour la production d'hydrogène, c'est la production d'hydrogène à partir du soleil et des organismes photosynthétiques. Cette technique est considérée comme l'un des moyens biologiques les plus prometteurs et durables pour produire ce carburant combustible non polluant [6,7].

Les organismes photosynthétiques, comme certaines algues vertes unicellulaires, cyanobactéries, possèdent l'avantage de produire de l'hydrogène à partir de l'énergie solaire en utilisant l'eau comme donneur d'électrons et de protons sans le dégagement parallèle de gaz à effet de serre ( $\text{CO}_2$ ) inhérent aux autres organismes hétérotrophes. Dans ce cas, un procédé totalement propre basé sur la photosynthèse peut être envisagé, avec comme source d'énergie les deux plus importantes ressources de notre planète, l'eau et le soleil [6,7].

Chapitre II

*Production  
Photobiologique  
d'Hydrogène*

Une des sources d'énergies les moins coûteuses de la planète est la lumière solaire ; De ce fait, la principale source d'énergie de la biosphère et la photosynthèse. Si la production d'hydrogène pouvait être efficacement couplée à un processus photosynthétique, l'hydrogène pourrait être principalement fabriqué avec de la lumière [4].

Ces exactement ce que font certains organismes (algues et certaines bactéries) par une réaction extrêmement simple : deux électrons réducteurs additionnés à deux protons produisent une molécule d'hydrogène [8].

La production photobiologie d'hydrogène peut être un potentiel environnemental acceptable de production d'hydrogène du fait que cette méthode de production de l'hydrogène utilise une énergie renouvelable qui est le soleil sans pour autant libérer le dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ , gaz à effet de serre) [9].

Dans ce qui suit, on va présenter les principaux processus de production photobiologique d'hydrogène ainsi que les enzymes qui y participent.

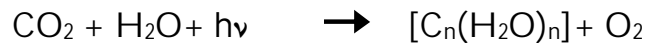
## II-1- Production biologique de l'hydrogène :

La production d'hydrogène par la voie biologique peut se faire selon différents modes trophiques.

### II-1-1- Production photoautotrophique de l'hydrogène :

Les micro-algues et les cyanobactéries sont des organismes photoautotrophes car ils peuvent utiliser la lumière comme source d'énergie et le dioxyde de carbone comme source de carbone [10].

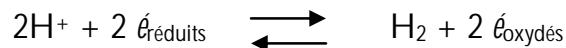
Au cours de la croissance photoautotrophiquement des algues, ils sont capables d'utiliser la lumière du soleil pour métaboliser le dioxyde de carbone et l'eau en composés organiques comme suit :



Alors qu'on anaérobiose, ces algues peuvent produire de l'hydrogène, par la photolyse de l'eau, en utilisant la lumière selon la réaction suivante :



L'enzyme intermédiaire à la production d'hydrogène par les algues vertes et les cyanobactéries est l'hydrogénase [10]. Gaffron et Rubin [12] ont rapporté que l'algue verte *Scenedesmus* produit de l'hydrogène moléculaire en présence de lumière mais aussi en absence de lumière dans des conditions d'anaérobiose ; l'enzyme qui joue le rôle de médiateur dans le processus de production d'hydrogène s'est révélé être l'hydrogénase [12] selon la réaction :



Les algues vertes peuvent être théoriquement considérées comme étant des consommateurs d'eau, cependant, dans beaucoup de cas, l'énergie apportée à l'hydrogénase ne l'est pas toujours par la dissociation de l'eau mais peut être aussi apportée des composés organiques intracellulaires en présence de lumière [12].

Les algues vertes étaient considérées comme étant des organismes dépendant de la lumière servant à catalyser l'eau, mais la production d'hydrogène par ces algues n'est pas faisable car leur enzyme hydrogénase est très sensible à l'oxygène, ce dernier inhibe ou arrête son activité [13]. Un système de dégagement continu de l'oxygène est mis au

point à fin de maintenir une concentration basse d'oxygène. Ce système pourrait être utilisé à l'échelle laboratoire mais pas à grande échelle [13].

Les algues vertes peuvent être utilisées autrement pour la production d'hydrogène : en absence de lumière et en condition d'anaérobiose [15]. C'est un processus anoxygénique de ce fait l'hydrogénase ne sera pas affecter.

Miura et al ont proposé de produire de l'hydrogène dans une alternance de lumière et d'obscurité, selon leur proposition le CO<sub>2</sub> est transformé en amidon par le biais de la photosynthèse durant la phase éclairée, il sera, par la suite, décomposé en hydrogène gazeux, acides organiques et alcools sous les conditions d'anaérobiose durant la phase d'obscurité [15, 16]. Ils ont donc rapporté que les cyanobactéries peuvent utiliser sous des conditions d'anaérobioses pour la production d'hydrogène mais aussi que l'espèce *Spirulina* a obtenu le plus grand taux de production sous ces conditions [17].

Le rôle de l'hydrogénase est inversé chez les cyanobactéries fixatrices d'azote diatomiques, ce dernier oxyde l'hydrogène gazeux en protons H<sup>+</sup> ce qui retentit sur le taux de production [18].

- Mécanisme de production d'hydrogène par les Cyanobactéries :

Les Cyanobactéries, également appelées algues ou bactéries bleu-vert, sont les seules bactéries photosynthétiques qui génèrent de l'oxygène au cours de la photosynthèse. Les cyanobactéries constituent un groupe physiologiquement et morphologiquement diversifié. Elles présentent deux systèmes de réactions lumineuses indépendants : le photosystème I (PS I) et le photosystème II (PS II) qui sont couplées avec des systèmes redox qui vont de H<sub>2</sub>O/ O<sub>2</sub> à NADP<sup>+</sup>/NADPH. Les systèmes photochimiques chez les cyanobactéries sont générateurs d'oxygène ce qui n'est pas le cas pour les réactions photosynthétiques, ces derniers ressemblent à celle des plantes

vertes et les préfigurent. Toute fois, la seule relation entre les cyanobactéries et les eucaryotes est la similitude entre le photosystème des bactéries et celui des chloroplastes des plantes vertes. La culture aisée et rapide de ces microorganismes dans les conditions de laboratoire et leur considérable diversité fonctionnelle en font un modèle d'étude idéal [24].

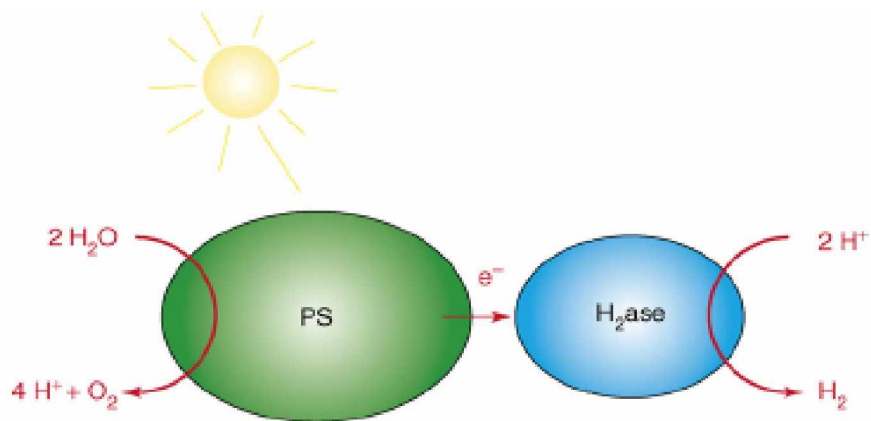


Figure1 : Mécanisme de production d'hydrogène chez les cyanobactéries [24].

Le système responsable de photolyse de l'eau nécessite de l'énergie lumineuse pour générer de l'oxygène et fournir de électrons au PS II. La photolyse à lieu quand 2 molécules d'eaux se fixent à une enzyme photosensible, qui absorbe les quatre charges positives générées lors de l'extraction des 4 électrons de l'eau. Les protons sont libérés dans le milieu, et l'oxygène est produit. Un électron est libéré à chacune des 4 étapes, et l'oxygène est produit seulement après la réalisation des 4 étapes photoniques

Le complexe pigments-protéines impliqués dans la photosynthèse chez les cyanobactéries est présent dans des projections appelées phycobilisomes [24].

Un phycobilisome est un corps subcellulaire qui ressemble à des petites poignées fixées sur la surface externe des membranes photosynthétiques. Peu ou presque pas de transfert de d'énergie se fait entre ces unités photosynthétique, et chacune et comme un générateur cellulaire miniature. L'énergie lumineuse absorbée par les phycobilisomes est transférée préférentiellement à travers la chlorophylle *a* au centre réactionnel du photosystème II, mais une partie de l'énergie d'excitation peut être transférée entre le photosystèmes I et II. Le système permet une cascade descendante d'énergie d'excitation à travers les pigments des phycobilisomes jusqu'à la chlorophylle *a* lorsque la longueur d'onde de la lumière disponible change, la synthèse de pigments capables d'absorber à cette nouvelle longueur d'onde est induite chez les cyanobactéries. Par exemple, la croissance en présence de lumière verte induit la synthèse de phycoérythrine qui absorbe les longueurs d'ondes correspondant au vert, tandis que la lumière rouge augmente la synthèse de la phycocyanine qui est un pigment bleu. Cette capacité de modification des phycobilisomes est appelée adaptation chromatique [24].

### II-1-2- Production Photohétérotrophique de l'hydrogène :

Certaines bactéries sont pour la plus part des photohétérotrophes, en plus de leur capacité à utiliser la lumière comme source d'énergie, elles ont besoin de substrat organique comme source de carbone [10].

Ces bactéries photohétérotrophes ont la capacité de fixer l'azote diatomique qui et par la suite catalysé en ammonium par une enzyme dite nitrogénase (enzyme intermédiaire à la production d'hydrogène par les cyanobactéries) selon la réaction suivante :



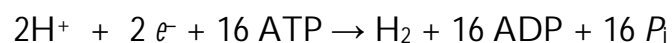


Nous constatons bien que cette enzyme réduit les protons en hydrogène, en consommant de l'énergie sous forme d'ATP (enzyme gourmande en énergie), Ça laisse à croire que la production de H<sub>2</sub> est la fonction première de l'enzyme car, en absence de N<sub>2</sub> ou autre substrat à réduire, la nitrogénase à coutume de produire du H<sub>2</sub>. on peut observer ce phénomène sous une atmosphère de gaz inerte (Argon).

En plus du fait que la nitrogénase ne peut être synthétisée en absence de lumière [20], elle possède une caractéristique importante, c'est qu'elle à horreur de l'oxygène, car il la détruit irréversiblement. L'inhibition de l'activité de la nitrogénase par O<sub>2</sub> fait de la production d'hydrogène un processus essentiellement anaérobie [21].

L'ammonium, souvent utilisé comme source d'azote pour la croissance, est le deuxième inhibiteur de la nitrogénase [22], ce sel est un répresseur de la production de la nitrogénase en plus d'inhiber son activité pour des concentrations supérieures à 20μM. Cette inhibition est réversible c'est-à-dire que la nitrogénase retrouve son activité dès que les sels ammonium seront consommés, l'inhibition de la nitrogénase par NH<sub>4</sub><sup>+</sup> fait que la production d'hydrogène doit se produire en absence de N<sub>2</sub> [23].

En résumé, la production d'hydrogène est principalement associée à l'action de la nitrogénase, cette enzyme catalyse la production d'hydrogène en absence de nitrogène et d'oxygène selon la réaction suivante :



- Mécanisme d'hydrogène par les bactéries photosynthétiques :

Les bactéries photosynthétiques sont anoxygéniques, photohétérotrophiques, ils peuvent croître en anaérobiose pour produire de l'hydrogène en présence de lumière [25, 26]. Ce processus dépend essentiellement de la lumière et de quelques acides organiques [27, 28].

Ces bactéries fixent de l'azote diatomique ; Ce dernier est Utilisé par la nitrogénase et est réduit en ammonium, cependant, l'hydrogène gazeux est produit simultanément. Cette production croit en absence de lumière [29].

Les bactéries anoxygéniques comme *Rhodobacter sphaeroides* utilisent les radiations 600 à 950 nm pour la production d'hydrogène, elle se fait selon un mécanisme présenté dans le chapitre suivant.

Chapitre III

*GENERALITES  
SUR  
RHODOBACTER  
SPHAEROIDES*

Plusieurs types de bactéries communément appelées hydrogènobacter sont capable de produire de l'hydrogène, on site par exemple les bactéries pourpres sulfureuses et les non-sulfureuses. Notre recherche se basera sur la bactérie pourpre non-sulfureuse « *Rhodobacter sphaeroides* ».

### III-1- L'emplacement de *Rhodobacter sphaeroides* dans la nature :

Un phénomène bien connu des biologistes concerne la stratification des conditions dans les eaux douces, en particulier en été quand le rayonnement du soleil chauffe la surface des plans d'eau. Cette stratification n'est pas permanente. Elle tend à s'effacer en eau agitée ou au cours de la saison froide. Un gradient de conditions différentes s'établit rapidement (oxygène et matière organique), et conduit à une stratification d'organismes. La sélection s'opère évidemment en fonction de la composition de départ et du gradient de matériaux diffusibles qui en découlent. Les anaérobies stricts tendent à se cantonner dans les parties basses (peu ou pas d'oxygène et beaucoup de matière organique), les germes aérotolérants venant migrer plus près des parties hautes [30].

Un milieu chargé en sulfate de calcium favorise le développement des organismes sulfato-réducteurs. Les sulfures inhibent la croissance des bactéries pourpres non sulfureuses, et provoquent la prolifération des formes sulfureuses. Dès que l'oxygène se fait rare, les bactéries vertes ont l'habitude d'envahir le milieu et d'éliminer progressivement les pourpres [30].

La bactérie pourpre non sulfureuse *Rhodobacter sphaeroides* se trouve à la surface des boues, dans l'eau des lacs et des étangs qui sont riches en matières organiques avec un faible taux de sulfures [24].

Les bactéries pourpres non-sulfureuses offrent en compensation des potentialités d'adaptation beaucoup plus grandes, car elles peuvent se développer à l'obscurité en présence d'oxygène à concentration réduite ou assez forte, et oxydent divers composés organiques simples. Ces bactéries ne se développent en culture pure qu'avec un apport de facteurs de croissance [30].

### III-2- Phylogénie de *Rhodobacter sphaeroides* :

*Rhodobacter sphaeroides* appartient la famille des bactéries pourpres non-sulfureuses, c'est une bactérie photosynthétique, appartenant au groupe des Rhodospirillales et membre de la sous classe  $\alpha$ -Proteobactérie [31, 32].

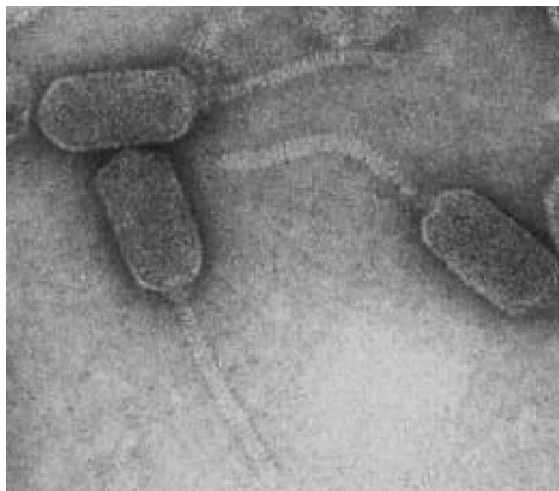
Les Rhodospirillales sont incapables d'utiliser l'eau comme source d'électrons comme le font les plantes vertes et ne produisent pas d'oxygène. Leur photosynthèse est fondamentalement ANAEROBIE, non productrice d'oxygène et dite non oxygénique. Les pigments des Rhodospirillales sont en majorité des bactériochlorophylles et des caroténoïdes dont l'oxygène inhibe leur synthèse, ils possèdent les bactériochlorophylles a et b localisées dans la membrane cytoplasmique.

*Rhodobacter sphaeroides* a la propriété, en plus d'être photosynthétique, de produire de l'hydrogène par photosynthèse [31].

### III-3- Morphologie :

Chaque bactérie présente une forme et des dimensions caractéristiques qui varient selon l'espèce. Ce sont des facteurs primordiaux pour la classification bactérienne dont le facteur le plus important est la forme des bactéries.

Sur la figure N°2 est présentée une observation de *Rhodobacter sphaeroides* au microscope électronique. On peut voir qu'elle est de forme ovoïde [30] et possède des flagelles [33] qui lui permettent de se mouvoir librement vers les emplacements les plus favorables à son développement.



**Figure2 : *Rhodobacter sphaeroides***  
**(Observation au microscope électronique)**

### III-4- Métabolismes :

En général, les bactéries pourpres non sulfureuses peuvent souvent fixer N<sub>2</sub> [20]. Ils réagissent vis-à-vis de la lumière comme suit :

- En photo-organotrophie, elles utilisent des molécules organiques comme source d'électron et de carbone, c'est la photosynthèse [30].
- En absence de lumière, la plupart des bactéries pourpres non sulfureuses peuvent se développer de façon aérobie comme chimo- organotrophe, c'est la respiration [30].

Les bactéries pourpres non sulfureuses sont connues pour leurs facultés d'adaptation à plusieurs modes de nutrition ce qui fait d'elles des organismes de choix pour la recherche. *Rhodospirillum rubrum* et *Rhodobacter sphaeroides* sont parmi les espèces les plus utilisées [24]. Elles peuvent se développer dans cinq conditions différentes, évoquées de manière simplifiée dans le tableau suivant :

Tableau III-1 : Les différents modes métaboliques de *Rhodobacter sphaeroides* [30]

	Lumière	Oxygène	Source de carbone	Source d'électrons	Type trophique	Observation
1	oui		CO <sub>2</sub>	H <sub>2</sub>	Photolitho-autotrophe	PHOTOSYNTHESE
2	oui		Organique	Organique	Photo-hétérotrophe	PHOTOSYNTHESE
3		oui	CO <sub>2</sub>	H <sub>2</sub>	Chimiolitho-autotrophe	Respiration sur H <sub>2</sub>
4			Organique	Organique (réduite)	Hétérotrophe	Fermentation anaérobie
5		oui	Organique	Organique (réduite)	Chimio-hétérotrophe	Respiration sur substrat organique

### III- 5- Les pigments :

Les pigments de *Rhodobacter sphaeroides* sont de couleur pourpre, constitués de bactériochlorophylles a. Ces derniers ne sont pas seuls à donner aux bactéries leur couleur et leur spectre d'absorption, car des pigments accessoires de caroténoïdes y contribuent fortement et participent d'ailleurs à la collecte de l'énergie lumineuse [34].

Nous savons que les radiations retenues en priorité sont précisément celles dont la longueur d'onde correspond à une bande d'absorption du pigment récepteur. Le spectre d'action des différentes radiations lumineuses est donné dans la figure suivante :

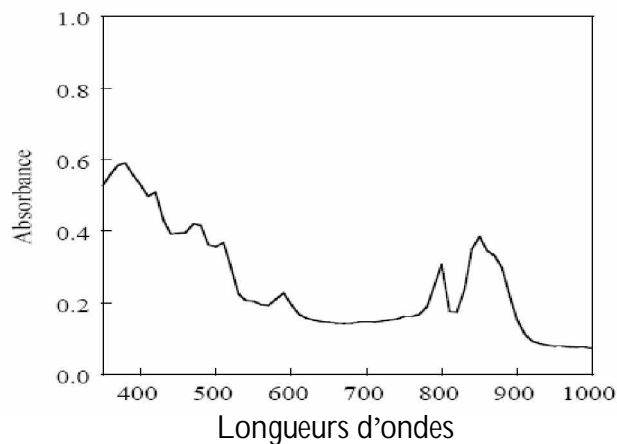


Figure3 : Spectre d'absorption des pigments de *Rhodobacter sphaeroides* [35].

On voit immédiatement que la propriété marquante des bactéries pourpres est d'absorber efficacement les radiations situées dans l'infrarouge très proche (850-1000nm) [30,34].

Dans le tableau suivant, un récapitulatif des caractéristiques de *Rhodobacter sphaeroides* :

Tableau III- 2 : Caractéristiques de *Rhodobacter sphaeroides* [24, 30-34]

Genres et archétypes	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>
type	Bactéries pourpres non sulfureuses
Milieu de croissance	Eaux des lacs, les étangs, la surface des doux
Anaérobiose à la lumière	Oui
Croissance avec O <sub>2</sub> à l'obscurité	Oui
Source de carbone	CO <sub>2</sub> + composés organiques
Sources d'électrons	H <sub>2</sub> et composés organiques
Système membranaire	Membranes cytoplasmiques
Pigments	Bchl a
Facteurs de croissance	PABA, thiamine, biotine,

### III-6- Aspect de la croissance de *Rhodobacter sphaeroides* :

Les bactéries pourpres non-sulfureuses sont capables d'utiliser une grande variété de substrats comme sources de carbone et d'azote. Leur utilisation est étendue et peut différer d'une espèce à une autre. Un schéma simplifié du cycle carbone des bactéries pourpres non-sulfureuses est donné dans figure 1 en mettant l'accent sur les propriétés de *Rhodobacter sphaeroides* [36-38].



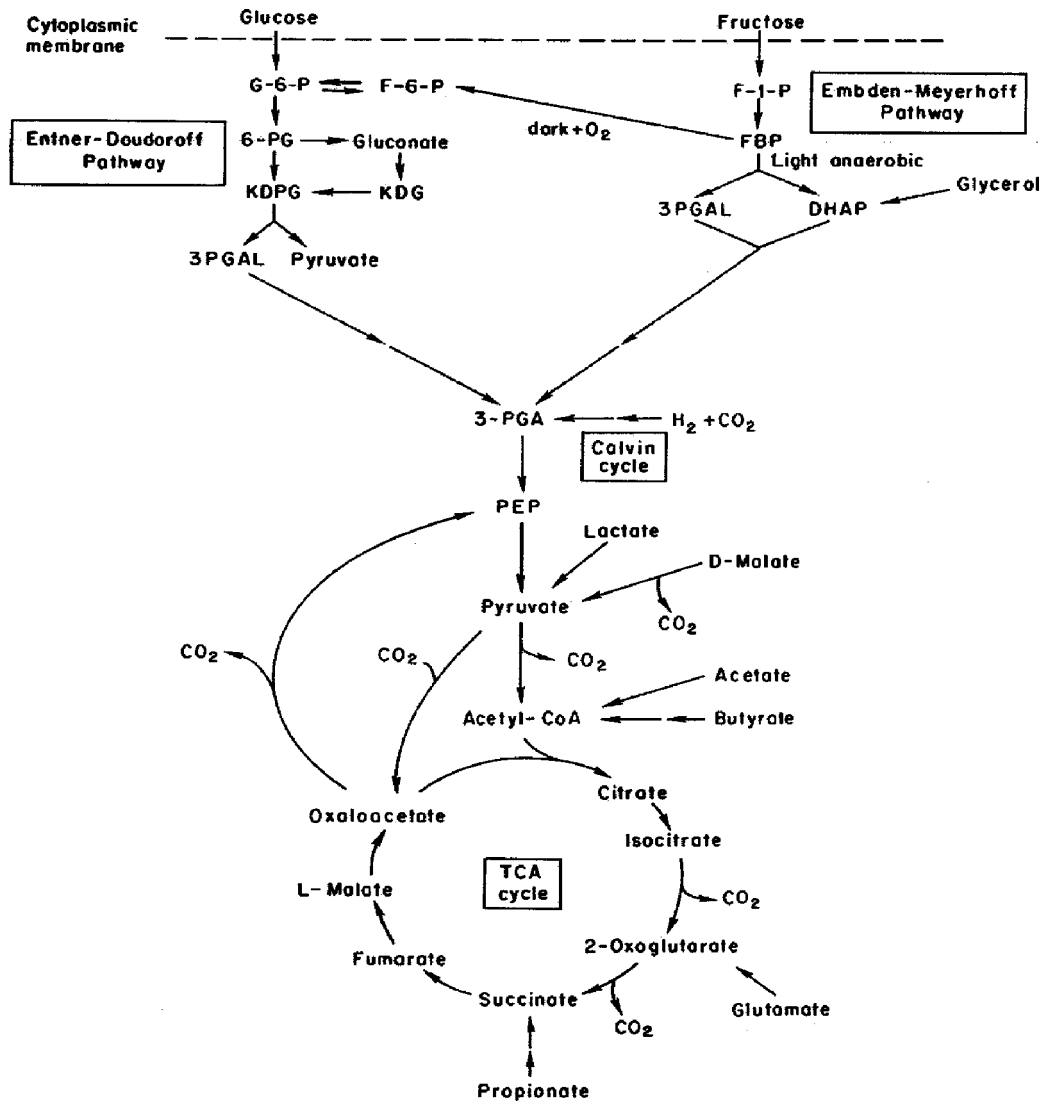


Figure4 : Schéma du cycle de carbone chez les bactéries pourpres non-sulfureuses [22].

De cette figure, on peut observer d'intéressants devenir du carbone utilisé. Par exemple, le D-malate et le L-malate ont suivent des itinéraires différents. Le glutamate, qui est une excellente source d'azote pour la production d'hydrogène, peut également servir comme source de carbone. En effet, une expérience de croissance avec *Rhodobacter sphaeroides* O.U. 001 en utilisant 2 mM de glutamate comme unique source de carbone et d'azote a eu comme conséquence la croissance considérable sous des conditions anoxygéniques phototrophiques [22].

Il est aussi intéressant qu'on puisse observer la croissance même dans un milieu contenant 2 mM de chlorure d'ammonium et aucune source supplémentaire de carbone. Ceci peut être attribué au métabolisme endogénique observé chez *Rhodobacter rubrum* [39] et *Rhodobacter sphaeroides* [40].

Il convient de noter que dans certaines conditions, une importante proportion, non seulement de croissance mais également de production d'hydrogène, peut être attribuée à ce phénomène.

Quand les substrats sont plus réduits que le matériel cellulaire, comme dans le cas de butyrate ou de glycérol, quelques moyens de disposer d'un excès d'électrons sont nécessaires et ceci est accompli par la photoréduction du CO<sub>2</sub>. Nous avons observé pour *Rhodobacter sphaeroides* que le glycérol est consommé à des taux négligeables quand c'est la source unique de carbone, mais les taux élevés de consommation sont observés quand elle est complétée par le malate. Ceci peut être expliqué par le fait que le malate est source latente de le dioxyde de carbone, qui favorise la consommation du glycérol, comme également remarqué par Pike et Sojka [41].

### III-7- La photosynthèse chez *Rhodobacter sphaeroides* :

Dans l'esprit de beaucoup de gens, le terme de photosynthèse est synonyme de d'assimilation de gaz carbonique, cette notion est dictée par l'observation des plantes supérieures et correspond grossièrement à la réalité car une part largement prépondérante du carbone présent dans la biosphère, sous forme organique tire son origine de prêt ou de loin du CO<sub>2</sub> assimilé par les organismes chlorophylliens [34].

On sait qu'en toute rigueur cette définition est inexacte. Des organismes peuvent se développer à l'obscurité sur le gaz carbonique comme seule source carbonée à condition de disposer d'une source d'énergie appropriée. D'autres peuvent au contraire utiliser l'énergie lumineuse pour se développer en modifiant des composés organiques préexistants, sans pour autant utiliser le CO<sub>2</sub>. Cette situation s'observe chez les bactéries pourpres [30].

La photosynthèse est la conversion de l'énergie lumineuse en une énergie électrochimique matérialisée par la construction d'un potentiel membranaire. L'énergie stockée au niveau de la membrane est à son tour convertie en ATP et en composés réducteur (NADH, NADPH). Ces deux catégories d'ingrédients sont nécessaires à l'assimilation de la matière organique par la bactérie. On les retrouve au cours de la réduction du l'azote diatomique N<sub>2</sub> en NH<sub>3</sub>, ainsi que dans la plus part des métabolismes liés à la photosynthèse [10].

La photosynthèse chez la bactérie pourpre non-sulfureuse *Rhodobacter sphaeroides* aboutit à la production du gaz  $H_2$  par ce mécanisme. Le système photosynthétique fait passer un électron du donneur d'électron à la nitrogénase qui l'utilise pour réduire les  $H^+$  en  $H_2$ . Nous verrons en détail chaque partie du processus

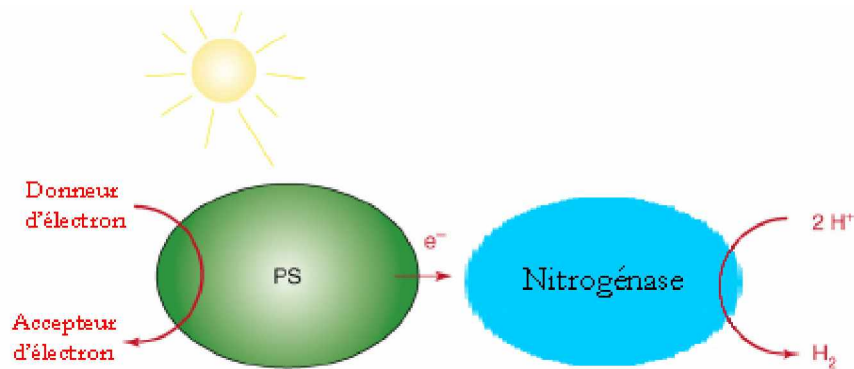


Figure5 : Schéma de production d'hydrogène [10].

### III-7-1- La photoinduction du transfert cyclique d'électron :

#### ∅ Absorption de la lumière :

La photosynthèse est la conversion de l'énergie lumineuse parvenant aux pigments récepteurs en d'énergie photochimique qui est transmissible de molécule en molécule à travers une nappe de complexes protéiques contenant les bactériochlorophylles entourant le centre réactionnel appelé LH1, LH2. Le LH1 entoure directement le centre réactionnel alors que le LH2 joue le rôle d'antenne qui absorbe la lumière et engendre une excitation qui se transmissible à travers un cycle [42,44].

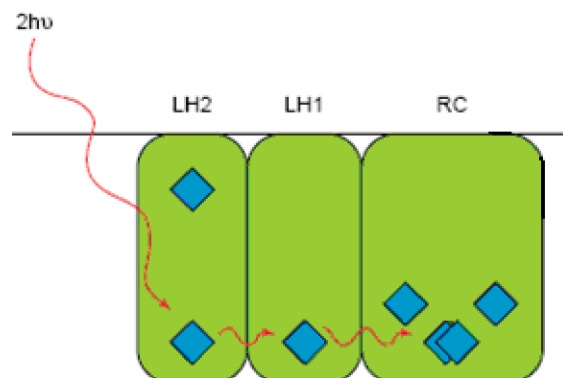


Figure6 : Absorption de la lumière

### Ø Description du transfert cyclique d'électron:

Le centre réactionnel photosynthétique n'est rien d'autre qu'une protéine membranaire et qui est défini comme étant la plus petite entité protéique capable d'effectuer une séparation de charge sous l'action d'un éclairage lumineux de longueur d'onde convenable, il se compose pour *Rhodobacter sphaeroides* de [43,44]:

- § Quatre molécules de bactériochlorophylle et deux molécules de bactériophéophytine (molécule de bactériochlorophylle a ne contenant pas de magnésium).
- § Une molécule de ménaquinone.
- § Une molécule d'ubiquinone.
- § Un atome de fer non-hémique qui est présent sur le coté cytoplasmique de la membrane.

Ces composants sont liés de manière covalente aux deux sous unités (L et M) de la protéine du centre réactionnel [43]. Une autre sous unité protéique transmembranaire est attachée au complexe L-M. Deux des molécules de bactériochlorophylle sont appariées et partagent la fonction de donneur photochimique d'électron.

Une des molécules de bactériophéophytine intervient comme transporteur intermédiaire d'électron entre la bactériochlorophylle et le ménaquinone. Les rôles des deux autres molécules de bactériochlorophylle ne sont pas encore connus. Les électrons de la bactériochlorophylle vont à l'ubiquinone et puis au complexe cytochrome b-c<sub>1</sub> où leur passage aboutit à l'extrusion de protons [45].

Dans les centres réactionnels obtenus à partir d'une souche de *Rhodobacter sphaeroides* une molécule de caroténoïde est liée à chaque particule du centre réactionnel. Le centre réactionnel caroténoïde n'est probablement pas impliqué dans la capture de la lumière ou le transport d'électrons, mais transfère plus tôt l'énergie issue du centre. Les transports cyclique et non cyclique d'électrons dans les bactéries photosynthétiques non-sulfureuses sont illustrés dans la figure suivante :

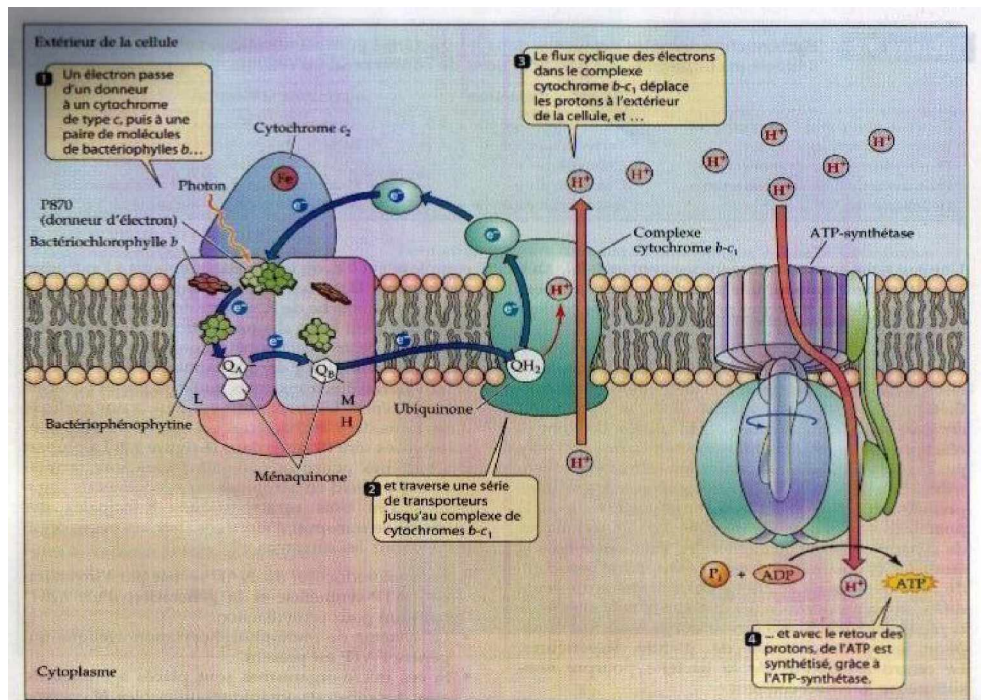


Figure7 : transfert cyclique des électrons chez les bactéries pourpres non-sulfureuses [24,33].

La plus part des bactéries pourpre non-sulfureuses sont facultatives et poussent en aérobiose sur des substrats organiques. Les trois caractéristiques principales des systèmes de transport d'électrons chez ces micro-organismes sont les suivantes :

- La photoréduction du NAD se fait par l'inversion de l'ATP-synthétase et la génération d'un  $\Delta\mu H^+$  suffisant pour cette réaction.
- Le système de photophosphorylation cyclique qui génère l'ATP est présent.
- Si ces micro-organismes sont placés à l'obscurité avec des substrats organiques utilisables, c'est le système énergétique lié à la croissance aérobie hétérotrophe [24,34]

Ces trois systèmes partagent certains composants qui peuvent fonctionner aussi bien en croissance aérobie que photosynthétique. La synthèse du système oxydase terminal est primordiale pour la croissance en aérobiose (hétérotrophe). La photophosphorylation chez les bactéries pourpres se fait par translocation dépendante de la lumière, d'un proton à travers la membrane transductrice d'énergie. L'organisation d'un transfert (dépend de la lumière) des électrons aboutit à la formation d'un  $\Delta H^+$ . Le cytochrome  $c_2$  donne un électron à la bactériochlorophylle oxydée (Bchl 870). Deux cytochromes c ou plus, sont associés à la surface périplasmique de la membrane cytoplasmique à proximité d'un centre réactionnel [24].

Au cours de la croissance anaérobie photoautotrophe, beaucoup de substrats réduits tels que le succinat et le malate peuvent donner des électrons. Des études récentes confirment que le fer ferreux ( $\text{Fe}^{++}$ ) peut aussi servir de donneur d'électrons chez les bactéries pourpres [46].

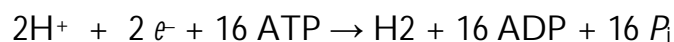
Certains des produits oxydés obtenus peuvent encore être métabolisés, tandis que d'autres ne le sont pas. La réaction globale pour la croissance anaérobie photoautotrophe de *Rhodobacter sphaeroides* peut être décrit comme suite :



Une augmentation de l'intensité lumineuse pendant la croissance fait baisser la synthèse des pigments photosynthétiques de *Rhodobacter sphaeroides* (Bchl a), mais le taux de croissance n'est pas altéré [24]. La synthèse de bactériochlorophylle est suspendu temporairement et est reprise à un taux plus faible avec le rétablissement d'une croissance équilibré. La présence de l'oxygène arrête également la synthèse de pigments photosynthétique. Les cultures qui poussent hétérotrophiquement dans l'obscurité (chimiohétérotrophes facultatifs) contiennent peu de pigments par unité de masse cellulaire. Une baisse dans l'apport d'oxygène induit la synthèse des pigments [47]. La photophosphorylation est le mécanisme principal de récupération énergétique en anaérobiose et une baisse d'oxygène est le signal de la synthèse des pigments capteurs de lumière [24,47].

### III-7-2- La Nitrogénase :

Les protons sont acheminés vers la nitrogénase, cette enzyme catalyse la production d'hydrogène en absence de nitrogène et d'oxygène selon la réaction suivante :



*Chapitre IV*

*PHOTOBIOREACTEURS*

Exposé à la lumière du jour, certains organismes photosynthétiques produisent de l'hydrogène à partir d'eau et de matières organiques. Dans ce qui suit va être présenté les approches techniques pour l'utilisation de tel procédés de production d'hydrogène .

#### IV-1- Photobioréacteurs pour la production d'hydrogène:

Les bioréacteurs sont essentiels pour la production à grande échelle de hydrogène. Puisque la lumière est un paramètre essentiel pour la croissance des organismes producteurs d'hydrogènes, les bioréacteurs doivent être transparents et par conséquent s'appeler les photobioréacteurs [6, 48]. Tous les photobioréacteurs exigent une entrée proportionnée de lumière, qui est habituellement la lumière du soleil, mais dans quelques photobioréacteurs d'autres sources de lumière artificielles est également employées pour fournir la lumière recommandée. À l'intérieur de photobioréacteur il devrait y avoir une répartition en zones, l'une près de la surface lumineuse et l'autre foncée, plus loin de cette surface. La zone foncée est due à l'absorption de la lumière par les cellules ainsi que sa refraction par le trouble. La productivité d'hydrogène d'un photobioréacteur est limitée et tend à diminuer à des intensités plus élevées du au trouble existent (la photosynthèse détourne la voie de production d'hydrogène). En raison du mélange, les cellules circuleront entre la zone éclairée et foncée du réacteur à une certaine fréquence et à des intervalles réguliers, qui dépend de la conception de réacteur. La position de la source lumineuse aussi bien que l'hydrodynamique gazeuse liquide affecte également la croissance des organismes producteurs d'hydrogènes aussi bien que la production d'hydrogène [49].

Un réacteur pour la production photobiologique d'hydrogène doit rassembler plusieurs conditions :

- 1) Photobioréacteur devrait être un système fermé de sorte que l'hydrogène produit ne puisse s'échapper.
- 2) La conception de réacteur doit permettre la stérilisation avec la convenance et la facilité.
- 3) Pour maximiser le secteur de la lumière d'incident (de ce fait augmenter le taux de croissance et de production d'hydrogène) la conception devrait fournir un rapport surface/ volume élevée.



Plusieurs types de bioréacteurs ont été employés pour la production d'hydrogène. Ceux-ci peuvent être principalement divisés en trois types de photobioréacteurs (PBRs) : réacteur à colonne verticale, photobioréacteur à panneau plat et réacteur de type tubulaire.

(a) Réacteur à colonne verticale :

Un tel PBRs se compose d'une colonne transparente habituellement composé de verre et entouré par une chambre à eau permettant de fixer la température par la circulation de l'eau. Le dessus de réacteur prévoit des entrées et sorties pour les gaz tels que l'argon et l'hydrogène. Le milieu frais est ajouté d'un réservoir de au-dessus du PBR [50, 51]. Des micro-organismes sont inoculés par un septum ce dernier aide l'entretien de la stérilité et empêche la contamination. La partie inférieure de la colonne de PBR maintient des sorties pour la culture et une entrée/sortie pour l'argon. Dans ce type de PBR on utilise la lumière du soleil en tant que source lumineuse. La productivité la biomasse change sensiblement pendant l'année, elle est maximale pendant l'été et elle peut être beaucoup plus grande qu'en hiver. Un exemple de ce type de PBR est celui utilisé pour la production d'hydrogène en utilisant des espèces de Rhodobacter. [6, 50, 51]. Cette colonne de réacteur s'est composée d'un verre cylindre avec un volume intérieur de 400ml entourés par une chambre à eau. Les dimensions optimales de la colonne verticale étaient environ 0.2 m de diamètre et de 4 m de hauteur de colonne. La taille optimale de colonne dépend des facteurs comme vitesse d'agitation et force des matériaux optiquement transparents par exemple, du verre ou du thermoplastique.

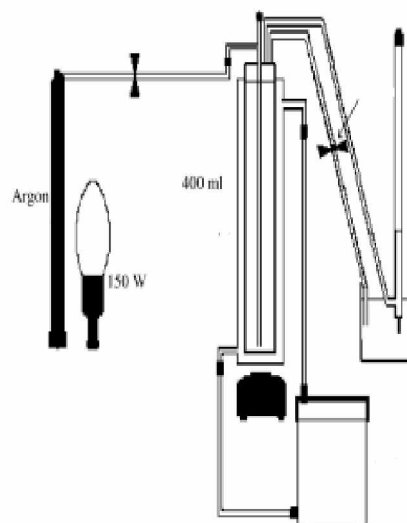


Figure8 : Photobioréacteur à colonne verticale [6]

(b) Photobioréacteur à panneaux plats :

Un PBR à panneau plat typique se compose d'une armature en acier inoxydable et de trois panneaux de polycarbonate [53]. Le réacteur se compose de deux compartiments placés côte à côte. Le compartiment avant contient culture bactérienne (3 cm de profondeur et de volume 2,4 l). Dans l'autre compartiment circule de l'eau par l'intermédiaire d'un bain Marie à température contrôlée par un système de régulation pour maintenir la température désirée de la culture. Cette conception de PBR utilise habituellement la lumière artificielle, les lampes d'halogène de tungstène (habituellement 500 W) sont placées sur un côté du réacteur en tant que source lumineuse [53]. L'intensité de la lumière moyenne fournie sur la surface de réacteur est 175 W/m<sup>2</sup>. Une membrane à gaz recircule le gaz par les spargers (aiguilles hypodermiques) au pied du réacteur [53]. Le gaz produit est rassemblé dans un gasbag. Dans ce système de réacteur, les vannes à pression empêchent des fluctuations de pression dans le système de recyclage de gaz et une soupape de refoulement maintient une pression constante d'entrée au contrôleur d'écoulement de masse. Un condensateur empêche la vapeur d'eau d'entrer dans le système de recyclage de gaz. Le réacteur est stérilisé à l'autoclave avant la production d'hydrogène par la culture. Le milieu de culture est stérilisé à l'autoclave séparément et alimenté au réacteur. Le prélèvement est fait par le port témoin, fixé au tube de sortie. La croissance bactérienne est surveillée en ligne.

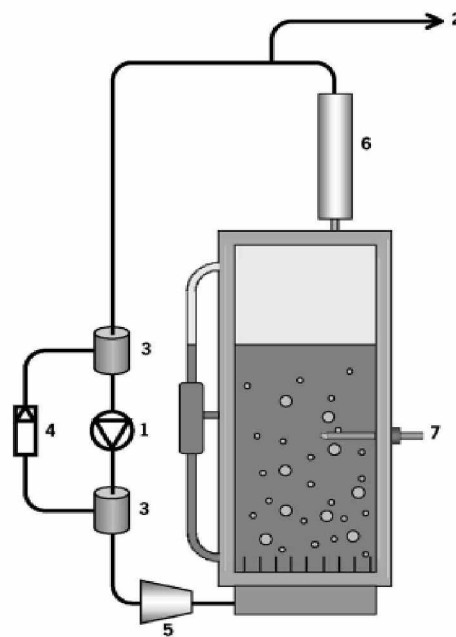


Figure9 : Photobioréacteur à panneaux plats [54].  
 (1) pompe à membrane à gaz; (2) gasbag pour la collecte des gaz produits;  
 (3) spargers; (4) vanne à pression; (5);  
 (6) condensateur; (7) électrode pH=redox

(c) Photobioréacteurs tubulaires :

PBRs tubulaire se compose de tubes transparents avec des diamètres s'étendant de 3 à 6 centimètres, et à longueurs s'étendant de 10 à 100 m [55]

Le liquide de culture est pompé par ces tubes au moyen de pompes mécaniques. Les tubes peuvent être placés de différentes manières : dans un plan horizontal avec un petit ou grand nombre de coudes en U ; verticale, enroulé comme cylindre ou cône ; dans un plan vertical, placé dans une barrière comme la structure à l'aide des coudes en U ou relié par des tubulures ; tubes horizontaux ou inclinés, parallèles relié par des tubulures. La spécificité de la conception agit sur le régime sur la densité du flux de photon incident sur la surface de réacteur [56]. Dans ce PBR, le refroidissement est réalisé par le jet d'eau. Les caractéristiques de transfert de masse du photobioréacteur tubulaire changent avec forme du réacteur [57].

Un résumé des types de bioréacteur et de leurs propriétés est fourni dans le tableau suivant.

Tableau IV-1 : Avantages et inconvénients des différents photobioréacteurs [50, 51, 53,55, 56].

Type du photobioréacteur	Avantage	inconvénient	référence
A colonne vertical	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Simple et conception peut coûteuse.</li> <li>2. Bon transfert de matière</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Manque de control de l'intensité lumineuse.</li> <li>2. Fluctuation de productivité du au cycle diurne et aux saisons</li> </ol>	50- 51
A panneaux plats	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Meilleur control de l'intensité lumineuse.</li> <li>2. Système efficace de control des gaz</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Coûts de production élevés.</li> <li>2. conception compliquée (nécessité de maintenance)</li> </ol>	53- 56
Tubulaire	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Ratio S/V élevé ce qui offre une meilleure exposition à la lumière.</li> <li>2. Offre un taux plus élevé de biomasse</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Création de zone morte.</li> </ol>	55- 56

Chapitre V

*GENERALITES SUR  
LA CROISSANCE  
BACTERIENNE*

## V-1- Définition de la croissance microbienne :

La croissance microbienne est définie comme une augmentation des constituants cellulaires, et peut se traduire par une augmentation de taille ou du nombre des microorganismes. Cette croissance est conditionnée par des exigences nutritionnelles qui correspondent à leurs besoins qui peuvent se traduire en :

- besoins élémentaires.
- Besoins spécifiques.
- Conditions physico-chimiques.

### 1. Besoins élémentaires :

La croissance de tous types de bactérie nécessite une source d'énergie, une source de carbone, une source d'azote et différents cations et anions (éléments minéraux).

○ source d'énergie :

Selon le type d'énergie utilisé on peut distinguer deux catégories de bactérie ou de type trophique :

- les phototrophes ou photolithotrophes qui tirent leurs énergies du rayonnement solaire
- les chimiotrophes ou chimiosynthétiques qui tirent leur énergie à partir des réactions chimiques.

#### a) Les phototrophes :

La photosynthèse est le mode de vie caractéristique des végétaux, des algues et de quelques espèces bactériennes, dans chaque cas grâce à l'énergie lumineuse, le processus conduit à la synthèse d'ATP, les mécanismes sont pourtant très distincts, selon qu'il s'agit de bactéries ou de végétaux.

D'une part, les appareils photosynthétiques sont très différents, ainsi que les pigments photosynthétiques

D'autre part, les donneurs d'électron sont aussi différents : Pour les plantes c'est  $H_2O$ , pour les bactéries, il s'agit d'un composé chimique autre que  $H_2O$  ou un composé organique.

La phototrophie bactérienne peut faire appel à des composés minéraux ou organiques comme source d'électron, on aura donc :

- Bactérie photolithotrophe : lorsque le donneur d'électron est un composé minéral.
- Bactérie photo-organotrophe : lorsque le donneur d'électron est un composé organique.

## b) les chimiolithrophes :

La majorité des bactéries sont des organismes chimiolithrophe est selon le donneur d'électron nous aurons :

- bactérie chimiolithotrophe : lorsque le donneur d'électron est un composé minéral.
- Bactérie chimio-organotrophe : lorsque le donneur d'électron est un composé organique, la majorité des bactéries sont dans ce cas.

## ○ une source de carbone :

C'est la plus souvent l'élément énergétique lui-même, il est sous forme minérale ou organique selon le type trophique. C'est l'élément constitutif essentiel de la cellule.

## ○ source d'azote :

L'azote est apporté sous forme de  $\text{NO}_2$  ou de  $\text{NH}_4$ , la forme organique est incorporé après désamination (il sert à la synthèse des protéines) quelques bactéries seulement sont capable de fixer l'azote sous forme moléculaire.

## ○ éléments minéraux :

Ces éléments de base sont apportés sous formes d'ions phosphate, chlorure, sulfate de calcium, potassium, sodium. Ces éléments sont utilisés à une grande concentration, ce sont des macroéléments. Par contre, le fer et le magnésium sont apportés à une faible concentration, ce sont des oligo-éléments.

2) Besoins spécifiques :

Certaines bactéries ont besoin, en plus des éléments de base, pour pousser la présence de substance organique qu'elles sont incapables de synthétiser et qu'on appelle facteur de croissance ; ces bactéries sont appelées auxotrophes.

3) condition physico-chimique :• Demande d'oxygène :

Il existe plusieurs types de bactéries en fonction de leurs rapports avec l'oxygène.

- Les bactéries aérobies strictes : ne se développent qu'en présence d'air, leur principale source d'énergie est la respiration, l'oxygène moléculaire, l'ultime accepteur d'électron, est réduit en eau.
- Les bactérie aéro-anaérobie facultatives : se développent avec ou sans air. l'énergie provient de l'oxydation des substrats et de la voie fermentaire.
- Les bactéries anaérobies strictes : ne se développent qu'en absence totale ou presque d'oxygène qui est le plus souvent toxique, ces bactéries doivent se

cultiver sous atmosphère réductrice. La totalité de l'énergie est produite par fermentation

- Température de croissance :

Les bactéries peuvent être classées selon leur température optimale de croissance

- Bactéries mésophiles : la température de croissance proche de celle du corps humain (37°C).
- Bactéries thermophiles : la température de croissance est comprise entre 45 et 70°C.
- Bactéries hyper-thermophiles : la température de croissance est supérieure à 80°C.
- Bactéries psychrophiles : la température de croissance est proche de 0°C.

- pH de croissance :

Le pH (concentration en ion H<sup>+</sup>) de l'environnement varie de 0.5 et 10.5, on distingue donc :

- Les bactéries neutrophiles : qui se développent pour des pH compris entre 5.5 et 8.5 avec un optimum voisin de 7. La plus part des bactéries médicalement importantes sont ainsi.
- Les bactéries alcalophiles : qui préfèrent les pH alcalins.
- Les bactéries acidophiles : qui se multiplient mieux dans des milieu acides.

Lorsque les nutriments et les conditions physiques requises par un micro-organisme sont réunis, les micro-organismes peuvent se multiplier, car ils croissent et se divisent aussi rapidement que l'environnement le leur permet.

## V-2- Caractéristique d'une courbe de croissance :

L'introduction d'une petite population de bactérie (inoculum) dans un volume adapté de milieu de culture conduit à une augmentation prévisible du nombre de cellule.

Si l'on reporte sur une feuille de papier millimétrique le nombre d'organisme, relevé à différents intervalles de temps au cours de la croissance, on obtient une courbe de croissance pour le micro-organisme. Une courbe de croissance caractéristique est représentée sur la figure suivante :

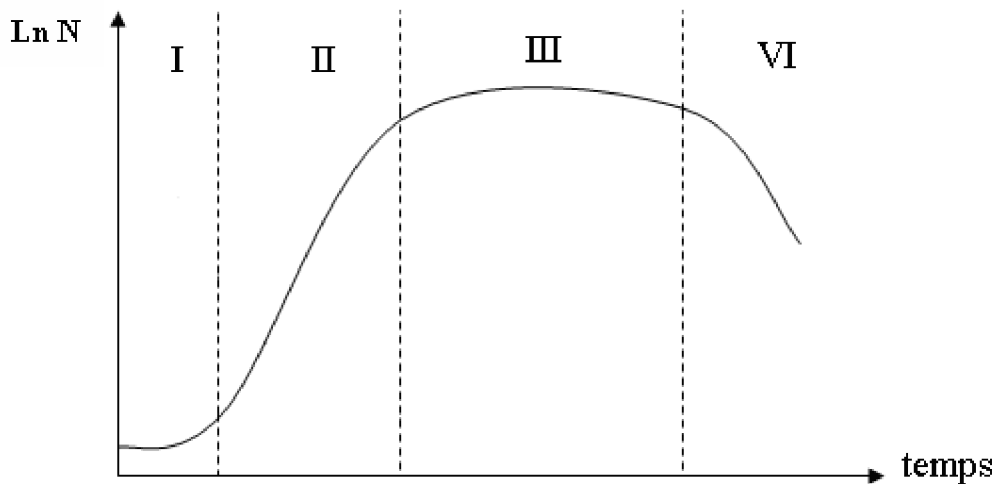


Figure11 : Aspect général d'une courbe de croissance

L'aspect général de la courbe de croissance reste identique et ne change pas avec l'espèce.

La courbe se divise en quatre phases distinctes qui sont :

- La phase de latence.
- La phase de croissance exponentielle.
- La phase de stationnaire.
- La phase de déclin.

### La phase de latence (I) :

Le repiquage d'une culture dans un milieu « frais » entraîne une phase d'adaptation. Au cours de cette phase initiale de latence le nombre de cellule n'augmente pas dans la plupart des cas. Cependant, la taille des cellules peut augmenter surtout si l'inoculum provient d'une culture qui n'est pas en croissance active. Cette phase est une période où les différents composants de chaque cellule sont synthétisés pour fournir les enzymes nécessaires à la dégradation de substrat essentiels à la croissance et à la division.



Plusieurs facteurs peuvent influencer cette phase, sa durée est extrêmement variable elle varie selon la nature des micro-organismes (facteur d'ordre génétique) et la nature du milieu. Elle peut être longue lorsque l'inoculum provient d'une culture âgée (en phase stationnaire avancée) ou d'une culture refroidie. Elle peut être longue aussi dans le cas de du transfert d'un inoculum d'un milieu complexe à un milieu composé de sel et de glucose dans ce cas les micro-organismes doivent synthétiser la plupart des protéines impliquées dans la synthèse des monomères qui lui étaient fournis par le milieu complexe. Mais elle peut aussi être négligeable ou courte pour un jeune inoculum prélevé en phase exponentielle de croissance est transféré dans un milieu frais de même composition.

### La phase de croissance exponentielle (II) :

Pendant la phase exponentielle ou logarithmique les micro-organismes se développent et se divisent activement. Le taux de croissance étant maximale, sa valeur sera sous la dépendance de la nature du milieu, les conditions de culture et le potentiel génétique des micro-organismes. Cette phase dépend en majeure partie de la composition du milieu ; la croissance la plus rapide étant obtenue avec un milieu riche dans lequel les micro-organismes ne dépensent pas d'énergie pour la synthèse de monomère.

La vitesse de croissance est constante pendant la phase exponentielle, les micro-organismes se divisent en doublant leur nombre à intervalles de temps réguliers (temps de génération). La population est presque uniforme en terme de propriétés chimiques et physiologique durant cette phase.

La croissance exponentielle est une croissance à l'équilibre ou tous les constituants cellulaires sont synthétisés à des vitesses constantes les une par rapport aux autres. Un changement des concentrations en nutriments ou des conditions de culture provoque une croissance en équilibre instable car les vitesses de synthèse des composants cellulaire varient les une par rapport aux autres jusqu'à ce qu'un nouvel état d'équilibre soit atteint.

### Phase stationnaire (III) :

Pendant la phase exponentielle les microorganismes consomment le substrat S jusqu'à épuisement, le milieu devient alors de moins en moins favorable à la croissance. La disparition du substrat S induit donc un ralentissement de la croissance qui tend vers une limite, les microorganismes ne se multiplient plus.

### Phase de déclin (IV) :

C'est une phase de respiration endogène ou d'autolyse au cours de laquelle le nombre de bactéries décroît.

### V-3- La mesure de la croissance :

Une estimation assez précise de la masse cellulaire totale est essentielle pour mener des études qui font appel à la croissance des micro-organismes. La mesure de la biomasse totale au cours du temps permet de déterminer précisément le taux de croissance, l'assimilation d'un substrat, l'effet d'inhibiteurs ou de divers autres paramètres. Les différentes méthodes de mesure de la biomasse cellulaire et du nombre de cellule peuvent être directes ou indirectes.

La méthode la plus simple, la plus rapide et donc généralement la plus utilisée au laboratoire pour la détermination de la masse cellulaire est la mesure indirecte « la turbidimétrie ». Cette méthode nécessite l'emploi d'un *spectrophotomètre*. Dans un spectrophotomètre, un rayon de lumière traverse une suspension de bactérie qui disperse la lumière proportionnellement au nombre de cellules présentes. Une suspension de bactérie apparaît trouble car elle disperse la lumière. Plus il y a de cellules, plus la turbidité est grande et plus la lumière est dispersée. La longueur d'onde du faisceau qui traverse la suspension peut varier dans une large gamme mais, pour l'analyse de suspensions bactériennes, des longueurs d'onde comprises entre 400 et 600nm sont principalement utilisées.

L'absorbance ne donne qu'une valeur approchée car la taille et la forme des cellules ont une influence sur la dispersion de la lumière. Pour évaluer précisément la biomasse cellulaire d'une espèce particulière de micro-organisme, la valeur de l'absorbance est rapportée au poids de matière sèche ou au nombre de cellules donnant cette absorbance.

Cette relation est schématisée sur la figure suivante :

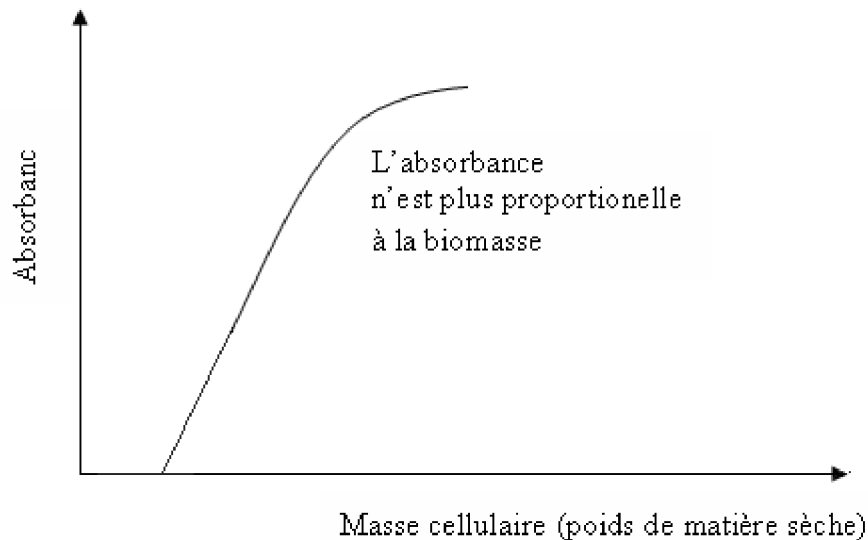


Figure12 : courbe d'absorbance

Pour des densités élevées, les valeurs d'absorbance s'écartent de la linéarité. Il est donc nécessaire de diluer les suspensions denses à fin que leur absorbance se situ dans la partie linéaire de la courbe. Le facteur de dilution sera alors pris en compte pour le calcul précis du nombre de cellule de l'échantillon initial.

Le succès de la turbidimétrie par rapport aux autres méthodes, est du à ça rapidité ça reproductibilité et au fait qu'elle n'a pas d'effet négatif sur les cellules. Les mesures de turbidité ne sont pas applicables aux cellules qui se développent en amas ou aux suspensions qui contient moins de  $10^7$  cellules/ml (limite inférieure de turbidité visible).

*PARTIE*  
*EXPERIMENTALE*

Notre travail sera axé sur l'étude de certaines propriétés liées à *Rhodobacter sphaeroides* (caractéristiques, croissance), la conception d'un photobioréacteur dans lequel nous avons suivi la production de l'hydrogène.

### 1- Matériel biologique :

La bactérie utilisée pour cette étude est *Rhodobacter sphaeroides* (CIP60.6) (souche pure), elle a été obtenue auprès du centre de ressources biologiques de l'institut Pasteur de France [59]. C'est une bactérie photosynthétique à pigment pourpre, non sulfureuse et productrice d'hydrogène [24].

### 2- Milieux :

Dans le cadre de cette étude, différents milieux sont utilisés tant pour la croissance que pour la production. Nous avons choisi deux milieux de croissance pour *Rhodobacter sphaeroides* l'un est le milieu sistrom A [60], l'autre est le milieu Asy dont la composition est légèrement modifiée par rapport au milieu sistrom A [21]. L'utilité de chaque milieu sera expliquée au fur et à mesure de l'avancer des travaux. Un milieu spécifique à la production nommé milieu GL est également utilisé [21].

### 3- Revivification de la bactérie lyophilisée :

Le milieu de croissance sistrom A est utilisé également comme milieu de réactivation de la bactérie lyophilisée, cette dernière est mise en contact avec le milieu de croissance préalablement autoclavé.

Après avoir bien désinfecter la surface de l'ampoule qui contient la bactérie lyophilisée, à l'alcool, nous introduisons 0.2 ml de milieu de réactivation afin de réhydrater le lyophilisat.

Nous procéderons ensuite à des ensemencements en milieu liquide (sistrom A) et en milieu solide dans les conditions présentées dans les tableaux N°1 et 2.

Tableau.1 : Conditions opératoires (milieu solide)

	Boîtes de Pétris	
Aérobiose	+	/
Anaérobiose	/	+
lumière	-	+

(+) présence (-) absence

Tableau .2 : Condition opératoires (milieu liquide)

Aérobiose	-
lumière	+

(+) présence (-) absence

a) Ensemencement à partir du milieu liquide sur des boites pétris :

En aérobiose :

Nous prélevons à l'aide d'une pipette Pasteur stérile une quantité de culture bactérienne hydratée en milieu liquide (sistrom A). Nous la déposons sur la surface du milieu solide et à l'aide d'un étaloir, Nous étalons la quantité ensemencée. Les boites seront incubées en position inversée dans un incubateur de marque EN 500 nue à la température optimale 30°C.

En anaérobiose :

Nous prélevons à l'aide d'une pipette pasteur stérile une quantité de culture bactérienne que nous déposons dans des boites Pétris vides. Nous coulons dessus le milieu de culture préalablement fondu, et ensuite, Nous homogénéisons en faisant un mouvement circulaire vers la gauche puis vers la droite. Nous laissons refroidir et solidifier. Les boites seront incubées en position inversée dans un incubateur, à la température optimale 30°C.

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 3 : Résultats de la revivification

Milieu Sistrom A	Conditions	Observations
Solide	Aérobiose	Présence de colonies rondes pourpres lisses après 72h (3 jours) d'incubation dans les boites Pétris
	Anaérobiose	Présence de colonies rondes lisses brunes après 120h (5 jours) d'incubation sur milieu solide en boite Pétris
liquide	Anaérobiose	Présence de troubles après 96h d'incubation

Ces résultats indiquent la différence de métabolisme chez cette bactérie selon la présence ou non d'oxygène et de lumière [30].

4- Conservation et ensemencement: (à partir du milieu solide)

Afin de bien conserver la souche et de l'utiliser dans de bonnes conditions, deux repiquages sont nécessaires avant toute utilisation de la souche [48]

Nous réalisons les repiquages en stries à partir des boîtes de pétris ensemencées en surface après 96h d'incubation, sur milieu solide (boîtes et tubes) incubés dans les conditions adéquates de température (30°C).

Ensemencement à partir du milieu solide sur tubes inclinés :

Nous prélevons à l'aide d'une pipette pasteur une quantité de culture bactérienne dans des conditions d'asepsies et nous ensemençons en stries. Nous incubons les tubes à température optimale de 30°C.

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 14.

Tableau -4 : Résultats des repiquages

Milieu de repiquage	repiquage	Mode métabolique	Temps (h)
Sistrom A solide	1 <sup>er</sup>	Lithotrophe (aérobiose)	Observation de colonie pourpre au bout 48h
Sistrom A solide	2 <sup>ème</sup>	Lithotrophe (aérobiose)	Observation de colonie pourpre au bout 24h

Nous constatons bien que la durée d'apparition des colonies diminue considérablement après le deuxième repiquage ce qui revient à une diminution de la phase de latence et donc une meilleure adaptation de la bactérie [61].

5- Caractérisation de la bactérie Rhodobacter sphaeroides :

Chaque bactérie présente une forme et des dimensions caractéristiques qui varient selon l'espèce, ce sont des facteurs primordiaux pour la classification bactérienne.

5-1- Aspect de la colonie:

Les colonies sont pour la plupart regroupés en amas ronds et lisses, approximativement de 1mm de diamètre. L'intensité de la coloration varie selon la présence ou non de lumière.

Les boîtesensemencées en surface et en présence de lumière présentent une coloration rose. Cellesensemencées en profondeur et en présence de lumière donnent une coloration brune. Ces résultats sont illustrés sur les figures 13 et 14.



Figure13 : Rhodobacter sphaeroides  
(croissance en présence de lumière)



figure14 : Rhodobacter sphaeroides  
(croissance en absence de lumière)

Cette différence de couleur est non seulement influencée par l'intensité lumineuse, cette dernière fait baisser la synthèse des pigments photosynthétiques (bactériochlorophylles a) au cours de la croissance [24] mais aussi, l'apport faible d'oxygène induit la synthèse des pigments [47].



5-2- Coloration Gram appliquée à Rhodobacter sphaeroides :

La paroi est l'enveloppe externe de la bactérie, sa composition est déterminée par la méthode de la coloration. Nous avons choisi la méthode de coloration Gram [61].

Cette technique de coloration permet de tester la perméabilité pariétale ; elle a pour principe de colorer le cytoplasme pour un temps déterminé. Cette technique n'est valable que si le temps de coloration est respecté et la paroi est intacte [61].

Les réactifs utilisés sont :

- Le colorant primaire : Il s'agit du violet de gentiane phénirique.
- Le mordant : c'est le lugol. Il permet la fixation du colorant.
- L'agent de décoloration : On utilise l'alcool éthylique (ou éthanol) 96°.
- Le colorant de contraste : Il remplace dans les cellules décolorées le colorant primaire. On utilise la fushine phéniquée de Ziehl diluée.

Technique de coloration de Gram :

On réalise les étapes suivantes :

1. Nous étalons le frottis (le prélèvement de bactéries en aérobiose).
2. Nous fixons la préparation.
3. Nous recouvrons la lame de violet de gentiane phéniquée, nous laissons agir deux minutes puis jetons l'excès de colorant.
4. Nous versons sur la lame quelques gouttes de la solution de lugol (le mordant), nous laissons agir une minute puis nous égouttons.
5. nous inclinons la lame, nous laissons tomber, goutte à goutte, l'agent de décoloration jusqu'à ce qu'il s'écoule incolore de l'extrémité inférieure de la lame.
6. Nous lavons abondamment à l'eau distillée.
7. Nous recolorons à l'aide du colorant de contraste, nous le laissons agir deux minutes.
8. Nous lavons abondamment à l'eau distillée.
9. Nous séchons à nouveau la lame au dessus de la flamme du bec bunsen.
10. Nous faisons une observation au microscope [61].

Par la coloration Gram :

- Les germes qui ont gardé la première coloration sont bruns-violet, ils sont Gram-positif [24].
- Les germes décolorés par l'éthanol et colorés par le colorant de contraste sont roses-rouges, ils sont Gram-négatifs [24].

Observation microscopique :

Nous avons utilisé le microscope photonique (Motic microscopes). L'observation s'effectue directement sans lamelle à sec après la mise au point de l'objectif. Nous déposons une goutte d'huile à immersion sur la lame avant de passer à l'objectif 1000 [24,61].

Nous observons une coloration rose, ce qui nous permet de conclure que *Rhodobacter sphaeroides* est Gram-négative (Gram -).

### 5-3- Test oxydase appliquée à *Rhodobacter sphaeroides*

La recherche de l'oxydase est un des critères les plus discriminatifs et les plus employés pour l'identification des bactéries, surtout celle des Gram négatif. Cette recherche consiste à mettre en évidence la capacité de la bactérie testée à oxyder la forme réduite incolore de dérivés méthylés du paraphénylène diamine, en leur forme oxydée semi-quinonique rose violacé.

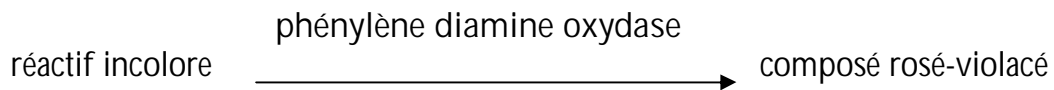
Ce test permet de détecter l'enzyme cytochrome oxydase des bactéries à partir de leur culture en milieu gélosé. Les cytochromes sont des protéines qui appartiennent à la chaîne respiratoire, composée d'une succession de transporteurs d'électrons. Le terme d'oxydase est, d'autre part, réservé aux enzymes utilisant l'oxygène comme substrat. . . En bactériologie, il faut donc comprendre le terme d'oxydase comme la présence d'une enzyme réagissant avec un dérivé méthylé du paraphénylène diamine.

#### Principe

LE test de l'oxydase est basé sur la production bactérienne d'une enzyme oxydase intracellulaire.

En présence d'oxygène atmosphérique et de cytochrome C, cette enzyme oxyde le réactif phénylène diamine pour former un composé coloré en violet, l'indophénol.

Ce réactif est incolore, et en présence de l'enzyme, il libère un composé rose-violacé, noircissant à l'air.



### Technique

Nous prenons une colonie que nous déposons sur une lame, nous posons précisément une goutte du réactif phénylène diamine sur la colonie.

L'apparition après 10 à 30 secondes d'une coloration violet indique un test positif (oxydase +), par contre l'absence de coloration indique un test négatif (oxydase-).

### Lecture et interprétation :

Après avoir effectué le test oxydase à *Rhodobacter sphaeroides*, nous observons une coloration rose violet ce qui prouve qu'elle est oxydase +.

### 6- Cinétique de croissance de *Rhodobacter sphaeroides* :

L'étude de la croissance d'une culture bactérienne constitue le 1<sup>er</sup> chemin vers des connaissances de base sur la souche.

Afin de bien comprendre le métabolisme de la bactérie, nous avons suivi la croissance de *Rhodobacter sphaeroides* dans les conditions suivantes :

- Aérobiose en absence de lumière.
- Anaérobiose en présence de lumière d'intensité 1500 Lux [62] produite par une lampe en tungstène (200W) et mesurée par un luxmètre numérique (Testo 545)

Le suivi de la croissance de *Rhodobacter sphaeroides* est réalisé dans deux réacteurs contenant 200 ml de la solution sistrom A.

La mesure de la croissance est réalisée en utilisant la méthode directe par la mesure de la turbidité, nous avons utilisé le spectrophotomètre UV mini 1240, SHIMADZU à une longueur d'onde de 660nm qui correspond à un minimum d'absorbance pour les pigments de *Rhodobacter sphaeroides* (voir figure 3).

La densité optique initiale des deux solutions est proche de 1.2. Les milieux sont incubés pendant 6 jours à une température de 30°C et un pH de 6.8

Les résultats obtenus sont résumés dans les figures 15 et 16.

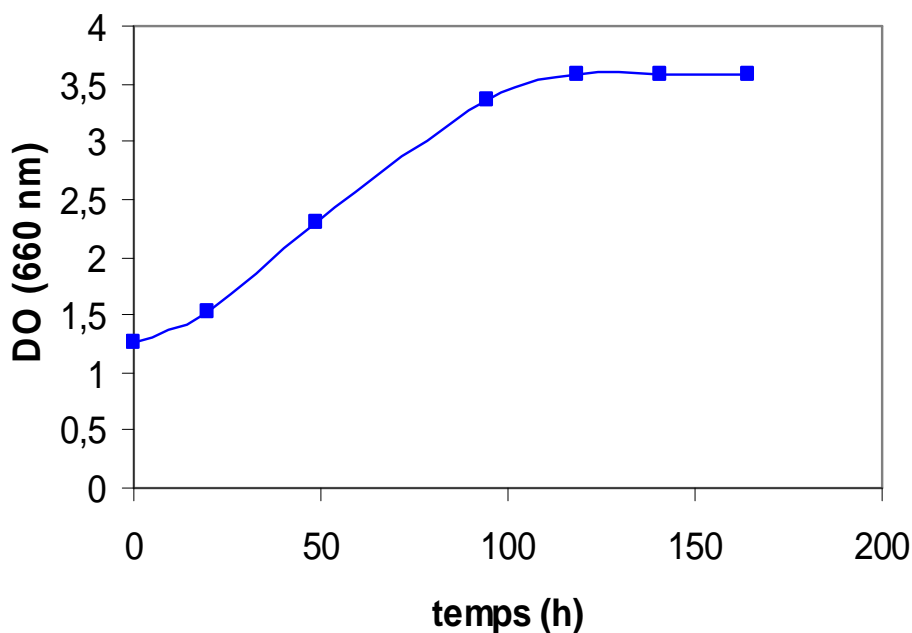


Figure15 : Courbe de croissance en aérobiose en absence de lumière

Nous remarquons que l'allure de la courbe correspond parfaitement à la courbe de croissance bactérienne, nous observons trois phases :

- Une première phase dans l'intervalle de temps [0h, 20h]. La légère remontée de la courbe correspond à la phase d'accélération.
- Une deuxième phase dans l'intervalle de temps [20h, 110h]. L'accroissement remarquable de la courbe correspond à la phase exponentielle avec un taux de croissance de l'ordre de 0.3359 g/L.h, un taux très inférieur à ce qui est trouvé dans la littérature [10].

Cet accroissement de la concentration bactérienne s'explique par une utilisation du substrat abondant dans le milieu par les microorganismes pour se multiplier de façon exponentielle.

- Une troisième phase dans le domaine de temps [110h, 140h]. Un palier est atteint ; Il correspond à la phase stationnaire avec un taux de croissance quasi nul.

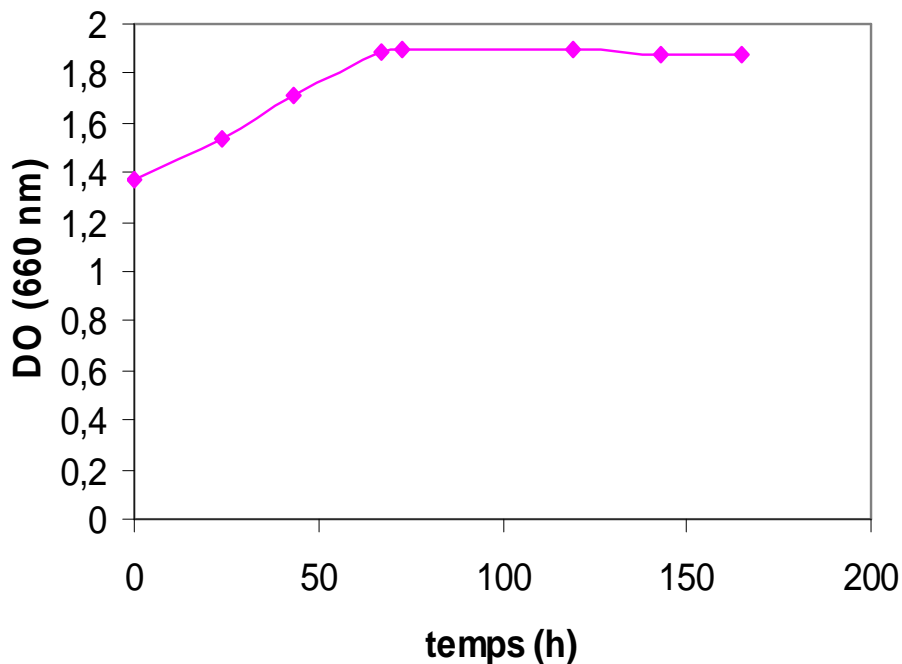


Figure16 : Courbe de croissance en anaérobiose en présence de lumière

Nous observons deux phase bien distinctes :

- Une première phase dans l'intervalle de temps [0h, 70h]. Il se produit une remontée de la courbe qui ne peut que correspond à la phase exponentielle de croissance, le taux de croissance est de l'ordre de 0.1357 g/L.h.
- Une deuxième phase dans l'intervalle de temps [70h, 170h] où la courbe se stabilise. C'est la phase stationnaire de croissance.

### 6-1- Etude comparative de croissance :

Les deux précédentes études confirment bien les données de la bibliographie concernant l'adaptation de *Rhodobacter sphaeroides* à plusieurs modes de nutrition [1] plus particulièrement, son adaptation aux deux conditions étudiées.

L'étude comparative de la croissance aux deux conditions préalablement étudiées est illustrée sur la figure 17.

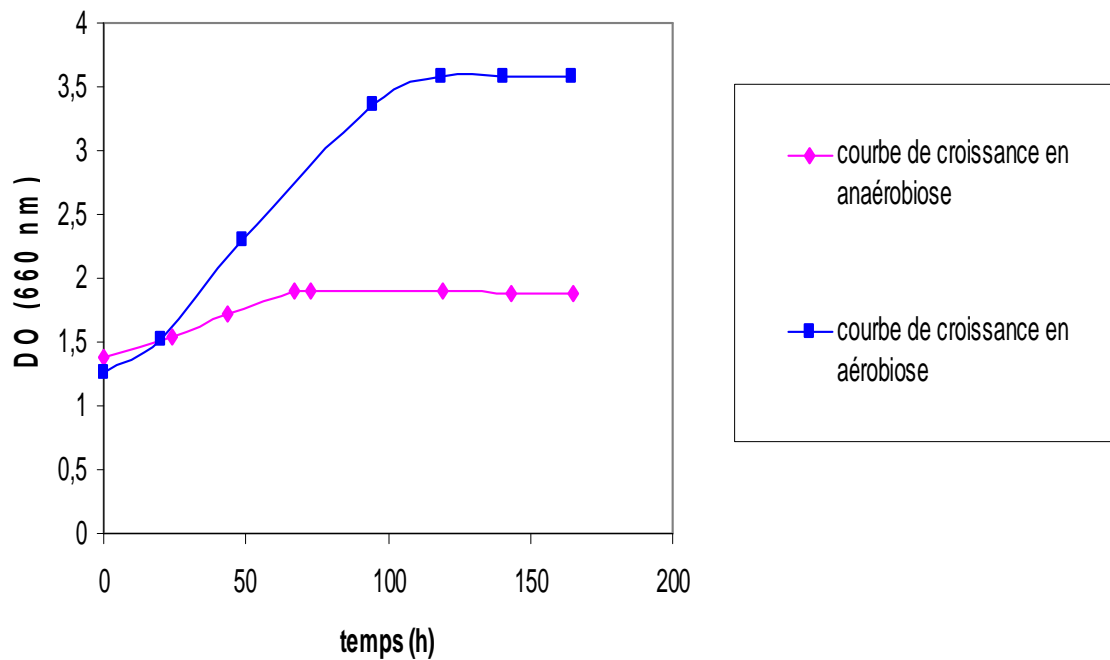


Figure17 : Courbe comparative de croissance

La croissance en aérobie est plus importante que celle en anaérobie [61].

Dans les deux conditions, le milieu se colore en pourpre, couleur caractéristique de *Rhodobacter sphaeroides*. Ces résultats sont illustrés sur les figures 18, 19, 20 et 21.

Avant	Après
	
<p>Figure18 : Aérobiose en absence de lumière</p>	<p>Figure19 : Aérobiose en absence de lumière</p>
	
<p>Figure20 : Anaérobiose en présence de lumière</p>	<p>Figure21: Anaérobiose en présence de lumière</p>

En condition d'aérobiose, l'oxygène favorise la prolifération d'invagination de la membrane cytoplasmique [47], alors qu'en condition d'anaérobiose en présence de source lumineuse, c'est l'intensité assez faible de cette dernière qui favorise la synthèse des bactériochlorophylles [24]. Ce qui abouti à une intensification de la couleur.

## 7- Etude de la production d'hydrogène :

### 7-1- Dispositif expérimental :

Afin de mener à bien le procédé de production de biohydrogène mettant en oeuvre les capacités naturelles de *Rhodobacter sphaeroides* à en produire, la démarche scientifique doit être de concevoir un réacteur adéquat fournissant à la culture de ces micro-organismes les conditions optimales pour qu'un tel procédé puisse s'avérer comme potentiellement intéressant pour la production

Pour *Rhodobacter sphaeroides*, bactérie photosynthétique, non-sulfureuse, productrice d'hydrogène, ces conditions sont : du lactate comme source de carbone, des conditions d'anaérobiose en présence d'Argon afin de chasser l'oxygène présent, une température optimale de 30°C et un pH de milieu proche de la neutralité [21].

La première idée de la conception était d'utiliser un réacteur cylindrique conventionnel et de l'adapter aux conditions de la culture [67]; mais l'inconvénient est qu'il ne permet pas une diffusion uniforme de la lumière. Cette dernière est absorbée au fur et à mesure qu'elle traverse le réacteur par les microorganismes qui y vivent, ou plus encore, elle est stoppée par le trouble du milieu réactionnel [64].

Pour ces différentes raisons un réacteur biologique avec agitation par pompage portant le nom de « fermenteur à jet » [65] a été réalisé au sein de notre laboratoire. Il permet à *Rhodobacter sphaeroides* de produire de l'hydrogène dans les conditions suivantes :

- Une bonne diffusion de la lumière
- Un bon transfert de chaleur pour pouvoir régler la température à 30°C qui est la température optimale de croissance pour *Rhodobacter sphaeroides*.
- Une bonne agitation.
- Des conditions d'étanchéités parfaites.



- Description du photobioréacteur :

Ce réacteur de 500ml se compose de :

Un corps principal : ce sont des tubes en verres en forme de serpentin (7 tubes) de 1 cm de diamètre transparents vis-à-vis du rayonnement solaire. Une entrée constituée d'une petite cloche permet le dégagement gazeux, raccordé à la colonne de récupération de l'hydrogène. Une sortie comportant deux vannes, l'une prévue pour le barbotage à l'argon, l'autre pour l'introduction du milieu inoculé.

Le réacteur est directement relié à une colonne de récupération des gaz produit (c'est-à-dire  $H_2$  et  $CO_2$ ). La colonne graduée contient du NaOH 20% et plongé dans un récipient contenant une solution saturée de NaCl 20%. Cette dernière permet de maintenir les conditions d'anaérobiose alors que le NaOH permet la dissolution de  $CO_2$  [65].

L'agitation est réalisée à l'aide d'une pompe à jet. Ce jet liquide est généralement utilisé pour l'agitation des réacteurs anaérobies.

Nous constatons bien que ce photobioréacteur est le résultat de jumelage entre le réacteur tubulaire et le système de récupération des gaz du réacteur à colonne verticale en plus de quelque spécificité pour une meilleure adaptation du réacteur au conditions nécessaire à la production comme la cloche qui permet un échappement des gaz et le diamètre petit qui permet une bonne diffusion de la lumière

- Mode de fonctionnement :

Le milieu inoculé est introduit au réacteur par l'entrée N°1 (voir figure N°22) jusqu'à remplir tout le volume de ce dernier. La production se produit dans des conditions d'anaérobiose et pour ce l'entrée N°2 (voir figure N°22) est prévue pour le barbotage à l'argon, les gaz chassés du milieu sortent par la voie N°3 (voir figure N°22). Sortie d'Ar

La circulation des gaz est schématisée sur la figure 22 (flèches bleu) ; La cloche permet aux gaz produits de s'échapper vers la colonne de récupération de gaz remplie de NaOH où le  $CO_2$  est dissous, alors que le  $H_2$ , vu de sa faible densité, continue à monter et déplace ainsi le volume de NaOH dans la colonne ; La lecture du volume de NaOH déplacé indique ainsi le volume d'hydrogène produit.

7-2- Cinétique de production d'hydrogène :

L'étude a été réalisée en inoculant un Erlenmeyer de 250 ml remplis avec du milieu Asy, sous des conditions d'anaérobiose et en présence de la seule source de lumière (lampe en tungstène (200 W)) d'intensité 1500 Lux.

La bactérie doit croître dans un milieu anaérobie, et ce en barbotant le milieu avec un gaz rare (Ar) afin de chasser l'oxygène qui est inhibiteur de croissance en présence de lumière et l'azote pour éviter la production de  $\text{NH}_4^+$  qui est inhibiteur de production de  $\text{H}_2$ .

L'agitation permet un développement favorable à la croissance de la bactérie, car elle permet une homogénéisation du milieu et de la température.

La mesure de la croissance étant toujours faite par la méthode spectroscopique (UV mini 1240, SHIMADZU) à une longueur d'onde de 660nm. La densité optique initiale des deux solutions est proche de 1, l'étude a été suivie pendant 6 jours d'incubation à une température de 30°C et un pH de 6.8

Nous avons choisi le milieu Asy après une étude comparative de la croissance de *Rhodobacter sphaeroides* sur milieu sistrom A et Asy dont les résultats sont représentés sur la figure ci-dessous :

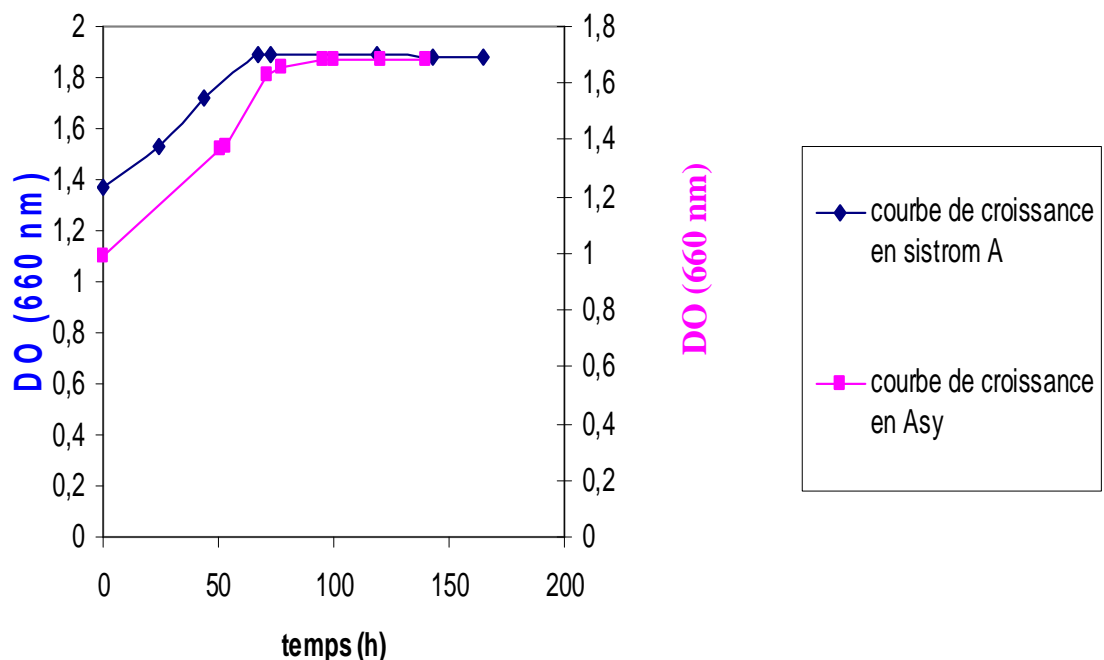


Figure23 : Courbe comparative de croissance en sistrom A et ASy

Il apparaît que la croissance sur milieu Asy est plus importante. Ce milieu contient les mêmes réactifs que le milieu sistrom A à des concentrations plus ou moins égales sauf pour l'acide succinique et sulfate d'ammonium, donneur de carbone et d'azote respectivement. Ces derniers apportés à des concentrations supérieures améliorent la croissance sur milieu Asy.

Le milieu Asy sera donc retenu comme milieu de préculture avant le passage à la production afin d'accélérer la croissance. Il a d'ailleurs été adopté par plusieurs auteurs comme "Heguang Zhu" pour la préculture de *Rhodobacter sphaeroides*.

72h est le temps choisi pour le prélèvement d'inoculum du milieu Asy vers le milieu GI. Cette durée correspond à la phase exponentielle de croissance, donc le repiquage de Asy vers GL réduit considérablement la phase de latence.

Nous avons suivi pendant 3 jours la cinétique de croissance de *Rhodobacter sphaeroides*, sa production d'hydrogène ainsi que l'évolution du pH du milieu. Les conditions opérationnelles étant l'anaérobiose en présence de lumière d'intensité 4500lux. [62] Les résultats sont illustrés sur les figures 24, 25 et 26.

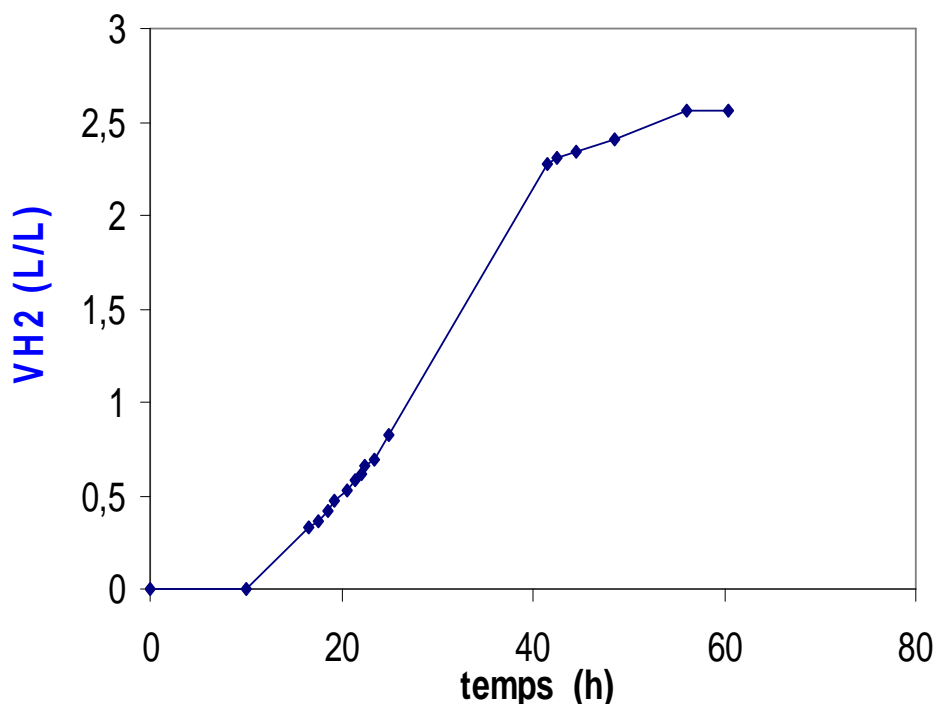


Figure24 : Courbe de production d'hydrogène par *Rhodobacter sphaeroides*.

Nous constatons que la courbe se comporte de trois phases :

- Une première phase dans l'intervalle de temps [0h, 10h] où on ne remarque aucune variation de la courbe ce qui peut être expliqué par le fait que la production n'a pas encore démarré
- Une deuxième phase dans l'intervalle de temps [10h, 60h] où on observe un accroissement remarquable de la courbe qui correspond à la phase de production avec un taux de productivité maximale égale à 44 ml/L<sub>cult</sub>.
- Une troisième dans le domaine de temps [60h, 70h] où la courbe commence à atteindre un palier qui correspond à la phase d'arrêt de production.

Le volume final obtenu est de 1241.6 ml au bout de 56h. Le taux de productivité maximal pour ce réacteur qui est de 0.044 L/L<sub>cult</sub>/h est largement supérieur à celui trouvé dans la littérature (0.014 L/L<sub>cult</sub>/h) [23]

- Relation entre croissance et production :

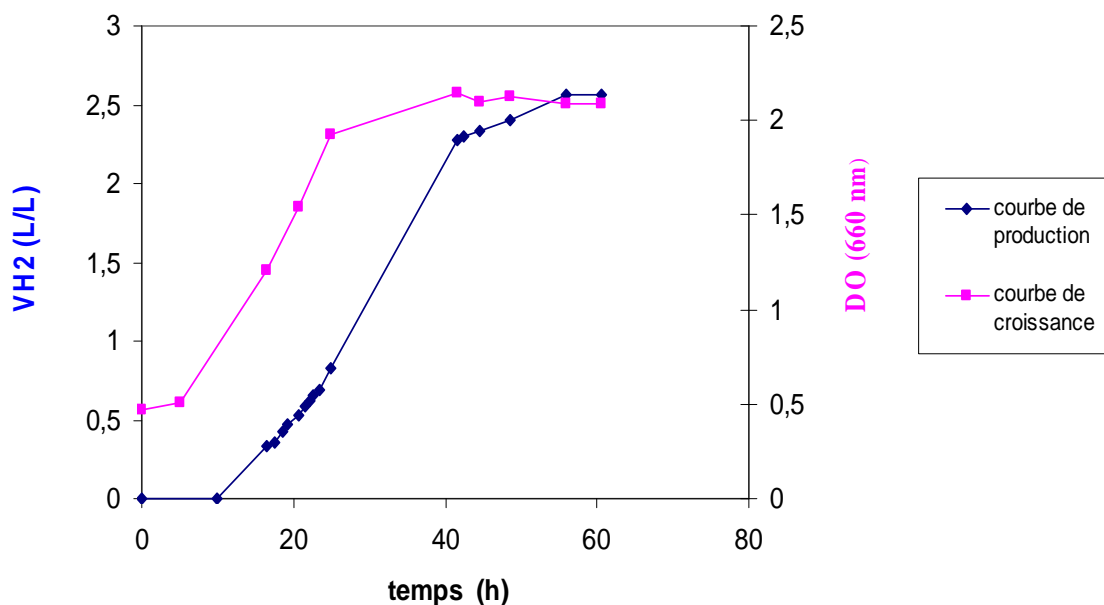


Figure25 : Relation croissance production

On observe que le début de la production à lieu après 10h, où la bactérie est en phase exponentielle de croissance. La production continue tout au long de cette phase de croissance, mais au bout de 35h, on observe un arrêt de la croissance alors que la production continue avec le même taux de productivité jusqu'à 42h ou on remarque une baisse de la productivité. On peut conclure que H<sub>2</sub> est un métabolite mixte [66].

L'analyse chromatographique a été réalisé par chromatographie en phase gazeuse (CPG 14B SHIMADZU) et a confirmé que le gaz capturé dans la colonne de récupération est bien de l'hydrogène.

- Effet de la production sur le pH du milieu :

Nous avons suivi l'évolution du pH tout au long de la production. Les résultats obtenus sont illustrés sur la figure21 :

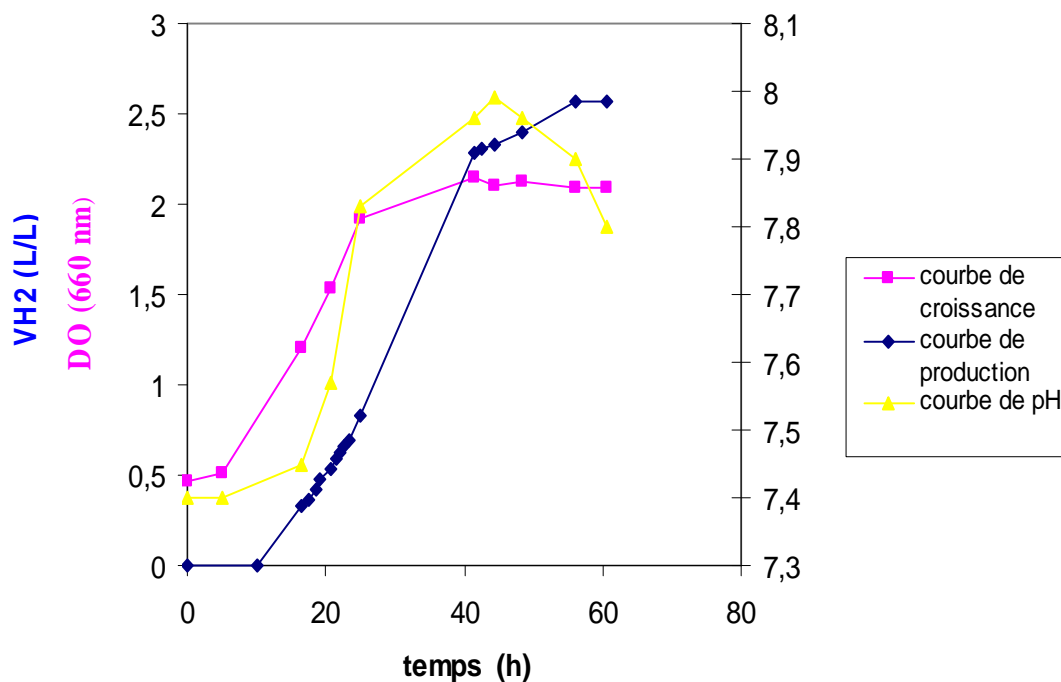


Fig26 : Evolution du pH au cours de la croissance et la production

On remarque que l'augmentation du pH suit l'évolution de la croissance *Rhodobacter sphaeroides* dans les conditions de photosynthèse et la production jusqu'à atteindre un pH de 8 après 44h. Le pH chute avec l'arrêt de la croissance.

L'augmentation du pH pourrait s'expliquer par la transformation des protons présents dans le milieu en  $H_2$  jusqu'à atteindre le pH 8. Cette valeur de pH réduit l'activité de la nitrogénase. Ce qui se traduit par une baisse du taux d'hydrogène produit.

La diminution du pH serait dû à l'activité de l'hydrogénase consommatrice d'hydrogène pour produire des proton  $H^+$ . Par ailleurs, avec la disparition de la source d'électron lors de la photosynthèse la bactérie s'oriente vers l'utilisation de l'hydrogène produit comme source d'électron ; ce qui se traduit par un arrêt de la production [67].

*CONCLUSION  
GENERALE*

## Conclusion :

L'objectif de ce travail est la conception d'un photobioréacteur adéquat à la production d'hydrogène par la bactérie photosynthétique *Rhodobacter sphaeroides*.

Au cours de la première partie de notre travail, nous avons revivifié la souche pure lyophilisée de « *Rhodobacter sphaeroides* ». De même, nous avons caractérisé et étudié deux modes métaboliques de croissance.

En seconde partie, et à base du travail précédemment fait, nous avons conçu un photobioréacteur regroupant tous les paramètres menant à une bonne production. Le paramètre le plus déterminant pour la conception est l'intensité lumineuse. Et on a l'hypothèse de réduction du diamètre interne du réacteur afin de permettre une bonne diffusion de la lumière.

En dernière partie, nous avons déterminé les performances de ce photobioréacteur en étudiant la production d'hydrogène par « *Rhodobacter sphaeroides* » et en le comparant à d'autres réacteurs précédemment utilisés.

Les résultats obtenus en comparant le réacteur tubulaire utilisé pour cette étude et le réacteur cylindrique utilisé par d'autres auteurs dans les mêmes conditions opératoires [23], on trouve que les taux de productivité obtenus sont largement supérieurs en tubulaire qu'en cylindrique.

En perspective, et pour une optimisation de la productivité, on devrait en premier lieu utiliser des substrats favorables à la production comme le Lactate ou bien optimiser l'intensité lumineuse. On peut avoir recours aussi à la manipulation génétique pour diminuer ou éliminer l'activité de l'hydrogénase ou en modifiant la structure de la nitrogénase afin d'augmenter son activité.



*Références  
bibliographiques*

- [1] Energie. Science et vie édition Excelsior Publication (2002).
- [2] C. E. Chitour. 5<sup>ième</sup> journée de l'énergie, perspective énergétiques à l'horizon 2020 dans un contexte de globalisation planétaire. Enag (2002).21-63.
- [3] R.B. Stanley, L.L. Beller. Renewable Energy : Ready to meet its promise. The Washington Quarterly. Hiver (2000).229-244.
- [4] <http://www.cea.fr>. la collection « hydrogène » et « la filière hydrogène »
- [5] [www.enpc.fr](http://www.enpc.fr). la collection « Quelle place pour l'hydrogène dans les systèmes énergétiques de demain? ».
- [6] Y. Asada, J. Miyake. Photobiological hydrogen production. Journal of Bioscience and Bioengineering (1999), Japan : 1, 1-6.
- [7] A. Melis, M.R. Melnicki. Integrated biological hydrogen production. International Journal of Hydrogen Energy (2006). USA, 31 : 1563-1573.
- [8] J. Benemann. Hydrogen biotechnology : Processus and prospects. National Biotechnology(1996).14 :1101-1103
- [9] R. Wüschiers, P. Lindblad. Hydrogen in education- a biological approach. International Journal of Hydrogen Energy (2002). 27 : 1113-1140.
- [10] I. Akkerman, M. Janssen, J. Roch, R.H. Wijffels. Photobiological hydrogen production: photochemical efficiency and bioreactor design. International Journal of Hydrogen Energy (2002). 27 :1195-1208.
- [11] H. Gaffron, J. Rubin. Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae. J. Gen. Physiol., 26, 219-240 (1942). 20.
- [12] R. Schulz. Hydrogenases and hydrogen production in eukaryotic organisms and cyanobacteria. J. Marine Biotech., 4, 16-22 (1996).
- [13] E. Greenbaum. Energetic efficiency of hydrogen photoevolution by algal water splitting. Biophysical. J., 54, 365-368.(1988).
- [14] M. Seibert, T. Flynn, D.Benson, E. Tracy, , M. Ghirardi. Development of selected and screening procedures for rapid identification of H<sub>2</sub>-producing algal mutants with increased O<sub>2</sub> tolerance, p. 227-234. In Zaborsky, O. R. (ed.), Biohydrogen, Plenum Press, London (1998).

- [15] Y. Miura, S. Ohta, M. Mano, K. Miyamoto. Isolation and characterization of unicellular marine green alga exhibiting high activity in the dark hydrogen production. *Agr. Biol. Chem.*, 50, 2837-2844 (1986).
- [13] Hydrogen production by a combination of a marine green alga and a photosynthetic bacterium, p. 42. In *Proc. RITE Int. Workshop on Biological Hydrogen production (24-25 Nov., Tokyo, Japan) (1994)*.
- [17] Y. Asada, M. Miyake, Y. Koike, I. Uemura, J. Miyake. Hydrogenase-mediated hydrogen metabolism in *J.*: Hydrogenase-mediated hydrogen metabolism in a non nitrogen-fixing cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*, p. 173-180. In Zaborsky, O. R. (ed.), *BioHydrogen*. Plenum Press, London (1998).
- [18] A. Hancel, P. Lindblad. Towards optimization of cyanobacteria as biotechnologically relevant producers of molecular hydrogen a clean and renewable energy source. *Appl. Microbial. Biotechnol* (1998). 50, 153-160.
- [19] J.R. Benemann, N. M. Weare. Hydrogen evolution by nitrogen-fixing *Anabaena cylindrica* culture. *Science* (1974), 184, 174-175.
- [20] J. Meyeur, B.C. Kelley, P.M. Vignais. Aerobic nitrogen fixation by *Rhodospseudomonas Capsulata*. North Holland Biomedical Press (1978) ; 224-228.
- [21] C. P. Wolk, A. Ernst, J. Elhai. Heterocyst metabolism and development, p. 769-823. In Bryant, D.A. (ed.), *The molecular biology of cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (1994).
- [22] H. Zhu, T. Wakayama, T. Suzuki, Y. Asada, J. Miyake. Entrapment of *Rhodobacter sphaeroides* RV in cationic polymer Agar gels for hydrogen production in the presence of  $\text{NH}_4^+$ . *Journal Of Bioscience and Bioengineering* (1999); 88(5) 507 -512.
- [23] H. Koku, I. Eroglu, U. Gunduz, M. Yucel, L. Turker. Aspects of the metabolism of hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides*. *International Journal of Hydrogen Energy* 27 (2002) 1315 – 1329.
- [24] J. J.Perry. *Microbiologie ; cours et question de révision*. Dunod (2004). Paris ; 192-201.
- [25] H. Gest, M.D. Kamen. Photoproduction of molecular hydrogen by *Rhodospirillum rubrum*. *Science*(1949);109:558–9.

- [26] J. Miyake, S. Kawamura. Photoproduction of hydrogen from glucose by a co-culture of a photosynthetic bacterium and *Clostridium butyricum*. J Ferment Technol (1984);62:531–5.
- [27] R. Warthmann, N. Pfennig, H. Cypionka. The quantum requirement for H<sub>2</sub> production by anoxygenic phototrophic bacteria. Appl Microbiol Biotechnol (1993);39:358–62.
- [28] JS. Rocha, MJ. Barbosa, RH. Wijffels. Hydrogen production by photosynthetic bacteria: culture media, yields and efficiencies, in: Miyaki J, Matsunaga T, San Pietro A, editors. BioHydrogen II. An approach to environmentally acceptable technology. New York: Pergamon, An imprint of Elsevier Science; (2001). p. 3–32.
- [29] DO. Hall, SA. Markov, Y. Watanabe, KK. Rao. The potential applications of cyanobacterial photosynthesis for clean technologies. Photosynth Res (1995); 46:159–67.
- [30] J. Pelmont. Bactéries et environnement, Adaptations physiologiques. Office des publications universitaires (1995), Alger ; 413-439.
- [31] J.P. Larpent. Introduction à la nouvelle classification bactérienne. Technique et Documentation (2000). Paris ; 44-49.
- [32] C.R. Woese, W.G. Weisburg, B.J. Paster, C.M. Hahn, R.S. Tanner, N.R. Krieg, H.P. Kooops, H. Harms, E. Stackebrandt. The phylogeny of purple bacteria: the beta-subdivision. Syst. Appl. Microbiol. (1984). 327–336.
- [33] H.L. Packer, H.Lawther , J.P. Armitage. The *Rhodobacter sphaeroides* flagellar motor is a variable-speed rotor. Microbiology Unit, Departement of Biochemistry, University of Oxford. Oxford. (1997). 37-40.
- [34] C. Gavach. La bioconversion de l'énergie solaire. Masson 1981.Paris ;
- [35] E. Nakada, Y. Asada, T. Arai, J. Miyake. Light Penetration into cell suspension of photosynthetic bacteria and relation to hydrogen production. Journal of fermentation and bioengineering (1995), 80(1); 53-57.
- [36] FR. Tabita. The biochemistry and metabolic regulation of carbon metabolism and CO<sub>2</sub> fixation in purple bacteria. Blankenship RE, Madigan MT, Bauer CE, editors.

Anoxygenic photosynthetic bacteria. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers (1995). p. 885–914.

- [37] R. Conrad, H.G. Schlegel. Influence of aerobic and phototrophic growth conditions on the distribution of glucose and fructose carbon into the Entner-Doudoroff and Embden-Meyerhof pathways in *Rhodopseudomonas sphaeroides*. J Gen Microbiol (1977);101:277–90.
- [38] Willison JC. Pyruvate and acetate metabolism in the photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. J Gen Microbiol (1988); 134:2429–39.
- [39] Gest H, Ormerod JG, Ormerod KS. Photometabolism of *Rhodospirillum rubrum*: light-dependent dissimilation of organic compounds to carbon dioxide and molecular hydrogen by an anaerobic citric acid cycle. Arch Biochem Biophys (1962); 97:21–33.
- [40] T. Wakayama, J. Miyake. Light shade bands for the improvement of solar hydrogen production efficiency by *Rhodobacter sphaeroides* RV. International Journal of Hydrogen Energy (2002). 27:1495 – 1500.
- [41] L. Pike, G.A. Sojka. Glycerol dissimilation in *Rhodopseudomonas sphaeroides*. J Bacteriol (1975); 124(3): 1101–5.
- [42] J. Richard. Codgell, J. Southall, T. Alastair. Gardiner, Christopher J. Law, Andrew Gall, Aleksander W. Rosza, Neil W. Issacs. How purple photosynthetic bacteria harvest solar energy. C.R. Chimie (2006). 9:201-206.
- [43] U. Eremler, G. Fritzsche, S. K. Buchanan, H. Michel. Structure of photosynthetic reaction center from *Rhodobacter sphaeroides* at 2.65 Å resolution: cofactors and protein-cofactor interactions. Structure (1994) .2: 925-936.
- [44] A. Verméglio, P. Joliot. The photosynthetic apparatus of *Rhodobacter sphaeroides*. Trend in Microbiology (1999). 7:435-440.
- [45] S. Scheuring, D. Lévy, J.L. Rigaud. Watching the component of photosynthetic bacterial membranes and their in situ organisation by atomic force microscopy. Biochimica and Biophysica acta (2005). 1712: 109-127.
- [46] W.H. Chen, S.Y. Chen, S. K. Khanal, S. Sung. Kinetic study of biological hydrogen production by anaerobic fermentation. International Journal of Hydrogen Energy (2006). 31:2170-2178.

- [47] K. Izu, F. Nakajima, K. Yamamoto, F. Kurisu. Aeration condition affecting Growth of purple nonsulfur Bacteria in an organic wastewater treatment process. *Systematic and applied Microbiology* (2001). 24:294-302.
- [48] I. Akkerman, M. Janssen, J. Rocha, R.H. Wijffels: Photobiological hydrogen production: photochemical efficiency and bioreactor design. *International Journal of Hydrogen Energy* (2002), 27:1195-1208.
- [49] S. Suh, S.B. Lee: A light distribution model for an internally radiating photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering* 2003, 82:180-189.
- [50] T. Arik, U. Gunduz, M. Yucel, L. Turker, V. Sedirolu, I. Eroglu: Photoproduction of hydrogen by *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001. *Proceedings of the 11th World Hydrogen Energy Conference, Stuttgart, Germany* (1996), 3:2417-2424.
- [51] Miro'n AS, Go'mez AC, Camacho FG, Grima EM, Chisti Y: Comparative evaluation of compact photobioreactors for large-scale monoculture of microalgae. *Journal of Biotechnology* (1999), 70:249-270.
- [52] B. Zabut, K. El-Kahlout, M. Yucel, U. Gunduz, L. Turker, I. Eroglu. Hydrogen 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.
- [53] S. Hoekema, M. Bijmans, M. Janssen, J. Tramper, R.H. Wijffels: A pneumatically agitated flat-panel photobioreactor with gas re-circulation: anaerobic photoheterotrophic cultivation of a purple non-sulfur bacterium. *International Journal of Hydrogen Energy* (2002), 27:1331-1338.
- [54] S. Hoekema, M. Bijmans, M. Janssen, J. Tramper, H. Rene. A. Wijjeels pneumatically agitated &at-panel photobioreactor with gas re-circulation: anaerobic photoheterotrophic cultivation of a purple non-sulfur bacterium. *International Journal of Hydrogen Energy* 27 (2002) 1331 – 1338.
- [55] E. Molina, J. Fernández, FG. Ación, Y. Chisti: Tubular photobioreactor design for algal cultures. *Journal of Biotechnology* (2001), 92:113-131.
- [56] MR. Tredici, GC. Zittelli: Efficiency of sunlight utilization: tubular versus flat photobioreactors. *Biotechnol Bioeng* (1998), 57:187-197.
- [57] CU. Ugwu, JC. Ogbonna, H. Tanaka: Improvement of mass transfer characteristics and productivities of inclined tubular photobioreactors by installation of internal static mixers. *Appl Microbiol Biotechnol* (2002), 58:600-607.

- [58] E. Molina, J. Fernandez, F.G. Acien, Y. Chisti. Tubular Photobioreactor design for algal cultures. *Journal of Biotechnology* (2001). 92:113-131.
- [59] Centre de Ressource Biologique de l'Institut Pasteur, Paris. 2007
- [60] Siström, W. R. The kinetics of the synthesis of photopigments in *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *J. Gen. Microbiol* (1962). 28:607-616.
- [61] M. Prescott. *Microbiologie*. De Boeck (2003). Paris ;95-201.
- [62] Ko. In-Beom, T. Noike. Use of blue optical filters for suspension of growth of algae in hydrogen producing non-axenic cultures of *Rhodobacter sphaeroides* RV. *International journal of hydrogen* (2002). 27:1297-1302.
- [63] C. Lorrunguang, J. Mrththong, K. Sasaki, N. Noparatnaraporn. Selection of Photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* 14F for Polyhydroxyalkanoate production with two stage Aerobic Dark cultivation. *Journal of Biochemistry and Bioengineering* (2006).102:128-131.
- [64] R. Scriban. *Biothechnologie. Technique et Documentation* 1999. Paris; 285-286.
- [65] M. D. Redwood, L. E. Macaskie. A two-stage, two-organism process for biohydrogen from glucose. . *International Journal of hydrogen Energy* (2006). 31:1514-1521.
- [66] E. Eroglu, M. Yucel, L. Turker. The relationship between Growth kinetics and hydrogen production By *Rhodobacter sphaeroides*.
- [67] H.P. Fang, H. Liu. Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture. *Bioresource Technology* (2002). 82:87-93.

Résume :

L'hydrogène est une source d'énergie propre du future, elle peut être produite par différentes voies y compris celle microbiologique. Dans ce présent travail, on a eu recours à l'utilisation de la bactérie *Rhodobacter sphaeroides* qui est une bactérie photosynthétique productrice d'hydrogène. Pour ce, on a conçu un photobioacteur qui diffère des réacteurs cylindriques par leur diamètre inférieure à fin de diminuer les pertes de diffusion lumineuse et d'augmenter ainsi la productivité.

Mots clefs : *Rhodobacter sphaeroides*, photoproduction d'hydrogène, photobioacteur.

Abstract:

Hydrogen is a clean source of energy of future, it can be produced by various ways including microbiological saddle. In this present work, one had recourse to the use of the bacterium *Rhodobacter sphaeroides* which is a producing photosynthetic hydrogen bacterium. For this, one designed a photobioreactor who differs from the cylindrical engines by their diameter lower than end to decrease the losses of light diffusion and to increase the productivity thus.

Key words : *Rhodobacter sphaeroides*, photoproduction of hydrogen, photobioreactor.

ملخص:

الهيدروجين مصدر طاقة نظيف للمستقبل، يمكن إنتاجه بطرق شتى حتى باستعمال المكرر بيولوجيا . في إطار هذا العمل، تم استعمال البكتيريا (*Rhodobacter sphaeroides*) و هي بكتيريا تعمل بالتركيب الضوئي لإنتاج الهيدروجين و لهذا تم إنجاز "فوتو بيورياكتور" الذي يختلف عن غيره بقطر أصغر و ذلك للتقليل من ضياع إنتشار الضوء و زيادة المنتوجية.

كلمات المفتاح: *Rhodobacter sphaeroides*، إنتاج الهيدروجين بالضوء، فوتوبيورياكتور.