

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE



**المدرسة الوطنية المتعددة الفنون
Ecole Nationale Polytechnique**

**Département de génie de l'environnement
Laboratoire des biotechnologies environnementales**

Thème

La production d'hydrogène par les algues

Réalisé par

M^{elle} TABTI Thanina

Soutenue le : 22/06/2008 devant le jury :

Mr N. MAMERI	Professeur à l'ENP	Président
Mr R. BOUARAB	Maitre de conférence à l'ENP	Promoteur
Mr M. AINAS	Chargé de cours à Médéa	Promoteur
M^{me} N. ABDI-HAIDER	Maitre de conférence à l'ENP	Examinatrice
Mr M.S. BENHABILES	Chargé de cours à l'UMMTO	Examineur

DEDICACES

À ma mère, à mon adorable maman, à celle que j'aime par-dessus tout, c'est difficile de transcrire en quelques mots tout l'amour que je lui porte. Merci maman de trimer sans relâche, au bien-être de tes enfants. Merci pour t'être sacrifiée pour que tes enfants grandissent et prospèrent, tu es toujours présente et continue de l'être pour faire mon bonheur. Enfin ! Merci tout simplement d'être... ma mère.

À mon cher et adorable père, Merci d'être toujours à mes côtés, par ton soutien, et ton amour.

À mes chers frères et sœurs : Amel, Nazim, Rosa, Kamila, et le petit rebelle Arilas.

À toute ma famille maternelle : tantes, oncles, cousins, cousines, et surtout à ma grande mère que j'adore.

À tous mes camarades de classe : Hassiba, Hamza, Wassila, Kahina, Sif, Abderahman, Yacine, Mellah, Hocine, Raouf et Lila qui fait partie de l'équipe.

À tous mes amis sans oublier Grégoire

REMERCIEMENTS

C'est grâce au soutien permanent et aux encouragements de plusieurs personnes que ce travail a pu être réalisé. Je tiens à les remercier.

En premier j'adresse mes sincères remerciements à mes promoteurs, Monsieur R. BOUARAB et Monsieur M. AINAS pour leur aide et leur disponibilité. Sans eux le travail accompli et le savoir acquis n'aurait jamais été possibles.

Je voudrais également remercier Mr LOUNICI et Mme ABDI pour leur gentillesse et pour leur aide constante durant notre séjour au laboratoire.

J'exprime ma grande gratitude à Mr N. MAMERI pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de présider le jury de ma soutenance.

Je suis très honorée de compter parmi les membres du jury Mme N. ABDI et Mr M. S. BENHABILES. Je les remercie d'avoir pris le temps et le soin de lire ce rapport.

Un très grand « Merci » à toute l'équipe du laboratoire, pour leur aide et leur soutien.

Liste des figures

Figure I.1 : Principe du vaporeformage.....6

Figure I.2 : Schémas de décomposition de l'eau par électrolyse.....8

Figure I.3 : La production d'hydrogène actuellement dans le monde.....9

Figure I.4 : L'utilisation de l'hydrogène dans le monde.....10

Figure I.5 : Exemple du réseau hydrogène dans le nord de l'Europe.....10

Figure II.1 : filament isolé de spiruline.....12

Figure II.2 : Morphologie de la Spiruline au microscope optique (X.400).....14

Figure II.3 : les différentes formes de spiruline.....15

Figure II.4 : absorption de la lumière par les pigments de la spiruline.....16

Figure II.5 : Diagramme des flux pour la culture et le traitement de la spiruline.....18

Figure II.6 : Cycle de vie de la spiruline.....19

Figure II.7 : la réaction de la photosynthèse.....21

Figure II.8 : Chloroplaste des plantes.....21

Figure II.9 : schéma du cycle de Calvin.....23

Figure III.1 : schémas du mécanisme de bio photolyse.....25

Figure III.2 : système de Biophotolyse indirect.....26

Figure IV.1 : Production d'hydrogène par voie biologique dans le cas de *Chlamydomonas reinhardtii*.....32

Figure VI.2 : la voie fermentative de production d'hydrogène chez la spiruline.....33

Figure V.1 : Schéma de la CPG.....36

Figure V.2 : calcul de l'aire du pic.....40

Figure VI.3 : schéma de la CPG.....48

Figure VII.1 : Courbe étalon mettant en relief la relation entre la DO et le poids sec de la souche.....49

Figure VII.2 : L'effet de la lumière sur une concentration de l'ordre de 0,5 g/l.....50

Figure VII.3 : L'effet de la lumière sur une concentration de l'ordre de 1 g/l.....51

Figure VII.4 : L'effet de la lumière sur une concentration de l'ordre de 2 g/l.....51

Figure VII.5 : courbe de croissance de la souche de spiruline.....52

Figure VII.6 : Courbe mettant en relation le pH avec la vitesse spécifique de croissance.....	54
Figure VII.7 : Chromatogramme obtenu après étalonnage de la CPG.....	55
Figure VII.8 : Chromatogramme obtenu pour une concentration de 1g/l à une intensité lumineuse de 1000 lux.....	56
Figure VII.9 : Chromatogramme obtenu pour une concentration de 1g/l à l'obscurité.....	57
Figure VII.10 : chromatogramme obtenu pour une concentration de 1 g/l avec une intensité lumineuse de 1000 lux.....	58
Figure VII.11 : Chromatogramme obtenu pour une concentration de 0,8 g/l sous une intensité lumineuse de 1000 lux.....	60
Figure VII.12 : Chromatogramme obtenu pour une concentration de 0,8 g/l sous une intensité lumineuse de 2000 lux.....	60
Figure VII.13 : Chromatogramme obtenu pour une concentration de 0,8 g/l sous une intensité lumineuse de 3000 lux.....	61
Figure VII.14 : Etude de l'effet de l'intensité lumineuse sur la production d'hydrogène.....	62
Figure VII.15 : Chromatogramme obtenu pour une concentration de 0,4 g/l sous une intensité lumineuse de 1000 lux.....	63
Figure VII.16 : Chromatogramme obtenu pour une concentration de 1,5 g/l sous une intensité lumineuse de 1000 lux.....	63
Figure VII.17 : Chromatogramme obtenu pour une concentration de 2 g/l sous une intensité lumineuse de 1000 lux.....	64
Figure VII.18 : Etude de l'effet de l'intensité lumineuse sur la production d'hydrogène.....	65

Liste des tableaux

Tableau II.1 : Les pays où l'on trouve de la spiruline.....13

Tableau II.2 : Les éléments nécessaire a la croissance de la spiruline.....17

Tableau III.1 : Comparaison des taux de synthèse de H₂ par des technologies différentes.....28

Tableau III.2 : Avantages et inconvénients des différents processus biologique utilisés pour la production d'hydrogène.....29

Tableau V.1 : Les différents types de détecteurs.....38

Tableau VI.1: Composition chimique du milieu Zarrouk.....41

Tableau VI.2: Composition chimique de la solution A₅.....42

Tableau VI.3 : Composition chimique de la solotionB₆.....42

Tableau VII.1 : Le taux de production d'hydrogène à une intensité lumineuse de 1000 lux.....64

Chapitre I : Généralités sur les modes de production d'hydrogène

I.1	Caractéristiques de l'hydrogène.....	2
I.2	Les domaines d'application de l'hydrogène.....	3
I.2.1	L'industrie chimique et pétrochimique.....	3
I.2.2	L'industrie des corps gras.....	3
I.2.3	L'industrie électronique.....	3
I.2.4	L'hydrogène comme vecteur énergétique.....	4
a)	Dans le secteur des transports.....	4
b)	Production d'électricité.....	4
I.3	Les modes de production d'hydrogène.....	4
I.3.1	Production d'hydrogène à partir d'énergie fossiles.....	4
a)	Le vaporeformage.....	5
b)	L'oxydation partielle.....	6
c)	Le reformage autotherme.....	7
d)	La gazéification du charbon.....	7
I.3.2	La production à partir du nucléaire.....	7
I.3.3	Production d'hydrogène par décomposition de l'eau.....	7
a)	l'électrolyse chimique.....	8
b)	dissociation de la molécule d'eau par cycle thermochimique.....	8
I.3.4	Production à partir de biomasse.....	9
I.3.5	Production biologique.....	9
I.4	Etat actuel de production et d'utilisation de l'hydrogène.....	9
I.5	Le transport et la distribution de l'hydrogène.....	10
I.6	Stockage de l'hydrogène.....	11

Chapitre II : Généralités sur la spiruline

II.1 Qu'est ce que la spiruline ?.....	12
II.2 Où la trouve-t-on ?.....	13
II.3 Caractéristiques biologiques de la spiruline.....	14
II.3.1 Classification.....	14
II.3.2 Morphologie.....	14
II.3.3 Physiologie.....	15
II.3.4 Les pigments.....	15
II.4 La croissance de la spiruline.....	16
II.4.1 Besoins nutritionnels.....	16
II.4.2 Les condition nécessaire à la croissance de la spiruline.....	17
II.4.3 La biologie de la spiruline.....	18
II.4.4 Cycles de vie de la spiruline.....	18
II.5 Composition chimiques et bienfait pour la santé.....	20
II.6 La photosynthèse chez la spiruline.....	20
II.6.1 Définition de la photosynthèse.....	20
II.6.2 Le Mécanisme de la photosynthèse.....	21
II.6.2.1 Localisation de la photosynthèse.....	21
II.6.2.2 Les Etapes de la photosynthèse.....	22
a) La phase lumineuse de la photosynthèse.....	22
b) La phase obscure de la photosynthèse.....	22
➤ Bilan de la photosynthèse.....	24

**Chapitre III : production biologique
d'hydrogène**

III.1 Procédés de production biologiques d'hydrogène.....	25
III.1.1 La bio photolyse directe.....	25
III.1.2 bio photolyse indirecte.....	26
III.1.3 Photo fermentation.....	27
III.1.4 Fermentation.....	27
III.2 Le taux de production d'hydrogène.....	28
III.3 Avantages et inconvénients des voies métaboliques de production d'hydrogène...29	

**Chapitre IV : Production d'hydrogène par
les cyanobactéries**

IV.1 Les voies métaboliques impliquées dans la production d'hydrogène chez les cyanobactéries.....	30
IV.1.1 Systèmes d'enzymes pour la production d'hydrogène.....	31
1/ Hydrogénase membranaire.....	31
2 / Hydrogenase bidirectionnelle ou réversible.....	31
3/ Nitrogénase.....	31
IV.1.2 Système de production d'hydrogène chez les cyanobactéries.....	32
a) La voie de la photoH₂.....	32
b) La voie de la bio photolyse indirecte.....	33
c) La voie du métabolisme fermentatif.....	33
VI.2 L'hydrogène produit chez les cyanobactéries heterocyste et non heterocyste.....	34
VI.3 Paramètres influençant la production d'hydrogène.....	34
VI.4 Optimisation de la production d'hydrogène chez les cyanobactéries.....	35

**Chapitre V : Généralités sur la
chromatographie phase gazeuse**

V.1 Définition de la CPG.....	36
V.2 Description de la CPG.....	36
1- le gaz vecteur.....	37
2- Injecteur.....	37
3- Le four.....	37
4- Colonne.....	38
5- Détecteur.....	39
V.3 Principe de fonctionnement.....	39
V.4 Analyse qualitative et quantitative en chromatographie.....	40

Chapitre VI : Matériels et Méthodes

VI.1. La souche.....	41
VI.2.2. Les Condition de croissance de la souche de spiruline.....	41
VI.2.1. Milieu de culture.....	41
VI.2. Culture de la spiruline et conditions de croissance.....	43
VII. 3. Evaluation de la concentration cellulaire.....	43
• La courbe étalon.....	43
VI.4. Contrôles de la contamination de la souche.....	43
VI.5. L'effet de l'intensité lumineuse sur la culture de la spiruline.....	44
VI. 6. Cinétique de croissance de la spiruline.....	44
VI.7. Etudes de la relation entre la vitesse de croissance et le pH.....	45
VI.8. Production d'hydrogène par la spiruline.....	45
VI.8.1. La Production d'hydrogène en présence de lumière.....	45
VI.8.2. La production d'hydrogène à l'obscurité.....	46
VI.9. Production d'hydrogène avec une carence en soufre.....	46
VI.10. Effet de l'intensité lumineuse sur la production d'hydrogène.....	46
VI.11. Effet de la concentration sur la production d'hydrogène.....	46
VI.12. Mesure de l'hydrogène produit.....	47

Chapitre VII : Résultats et Discussions

VII.1 Etude de la croissance de la spiruline.....	49
• La courbe étalon.....	49
VII.2 Observation au microscope optique.....	50
VII.3 Influence de l'intensité lumineuse sur la culture de la souche.....	50
VII.4 Etude de la cinétique de croissance de la culture de spiruline.....	52
VII.5 L'effet du pH sur la vitesse de croissance.....	53
VII.6 L'étude de la production d'hydrogène par la spiruline.....	55
VII.6.1 Etalonnage de la CPG.....	55
VII.6.2 Production d'hydrogène en présence de lumière.....	56
VII.6.3 Production d'hydrogène à l'obscurité.....	57
VII.7 Production d'hydrogène avec une carence en soufre.....	58
VII.8 Production d'hydrogène avec une carence en soufre à l'obscurité.....	59
VII.9 Effet de l'intensité lumineuse sur la production d'hydrogène.....	59
VII.10 Effet de la concentration cellulaire sur la production d'hydrogène.....	62

INTRODUCTION GENERALE

Introduction :

La situation environnementale de la terre est actuellement en crise à cause des émissions de gaz à effet serre dans l'atmosphère. Au cours de ses dernières années, le monde a connu une multiplication surprenante des phénomènes climatiques inhabituels : canicules, sécheresses persistantes, inondations, élévation du niveau de la mer, ouragans. A cette préoccupation environnementale, il faut ajouter celle posée par la diminution des réserves mondiales des ressources fossiles [1]. Notre génération a ainsi un défi majeur à relever : la production et l'utilisation de nouvelles sources d'énergie ayant des émissions presque nulles en CO₂.

L'hydrogène est alors un très bon candidat pour devenir cette source d'énergie puisqu'il présente une combustion propre, produisant uniquement de l'eau tout en possédant un grand pouvoir calorifique. De plus, il est un vecteur énergétique idéal car toutes les énergies primaires sont transformables en hydrogène [1].

N'étant pas directement disponible dans la nature, l'hydrogène n'est pas lui-même une source d'énergie primaire, il est plutôt produit à partir d'autres sources. Il est d'autant plus intéressant lorsque sa production est de source énergétique propre et renouvelable. Malheureusement, l'hydrogène est actuellement produit à partir du reformage à la vapeur de combustibles fossiles tel que le méthane, engendrant ainsi un niveau élevé de CO₂. Cependant, si dans l'avenir l'hydrogène doit remplacer ces carburants, sa production se fera à partir d'énergie renouvelable et à grande échelle par des processus environnementaux bénins.

Ainsi le monde des microorganismes photosynthétiques représente un formidable réservoir de biodiversité à peine exploré. Certaines micro algues bactéries ou cyanobactéries ont développé des capacités métaboliques originales comme celle de produire de l'hydrogène grâce à des enzymes appelées hydrogénase, en utilisant l'eau et l'énergie solaire comme ressources principales. Ces propriétés permettent d'envisager la mise au point de procédés propres et durables de production d'hydrogène *via* la culture de ces organismes à grande échelle [2].

C'est dans ce cadre que s'inscrit notre sujet d'étude, intitulé «la production de biogaz, H₂ par les algues ». Notre choix s'est porté sur la bioproduction d'hydrogène par une cyanobactérie « la spiruline ». Ce projet de recherche a été réalisé au sein du laboratoire des Biotechnologies environnementales et Génie des procédés à l'Ecole National Polytechnique.

Notre travail se divise en deux parties, la première partie consiste à étudier la croissance de différentes souches de spiruline, et cela afin d'optimiser les paramètres indiquant un bon développement et une bonne croissance.

La deuxième partie est consacrée à la bio production de l'hydrogène, dont laquelle plusieurs paramètres ont été étudiés tel que la concentration, l'intensité lumineuseect

Ce mémoire est organisé en sept chapitres :

- Le premier chapitre concerne l'hydrogène comme futur vecteur énergétiques avec ces différents modes de production.
- Le deuxième chapitre est consacré à la bio production d'hydrogène par les microorganismes.
- Le troisième chapitre décrit la spiruline sa physiologie, son métabolisme photosynthétique.
- Dans le quatrième chapitre nous évoquerons les modes de production d'hydrogène par la cyanobactérie en général.
- Le cinquième chapitre est une description de la chromatographie en phase gazeuse.
- Le sixième chapitre décrit les matériels et méthodes utilisés, nous présenterons également le plan et les conditions opératoires.
- Le septième chapitre présente les résultats obtenus.

Chapitre I :

GENERALITES SUR LES MODES DE PRODUCTION D'HYDROGENE

Actuellement dans un contexte mondial d'explosion démographique et de croissance économique, les besoins énergétiques ne cessent d'augmenter ; il est donc nécessaire de répondre à la demande du présent sans compromettre la capacité des générations futures à satisfaire leurs propres besoins [3].

Il est nécessaire de savoir que 85% de la demande énergétique mondiale est assurée par les énergies fossiles. Ces dernières ont énormément contribué à l'amélioration de la productivité des industries et du confort des populations. Elles sont néanmoins épuisables amenées à disparaître dans un future très proche vue la demande mondial en hausse croissante. Il faut ajouter à cela que les énergies fossiles sont aussi génératrices de graves problèmes environnementaux qui se traduisent par un dégagement dans l'atmosphère de polluants organiques et des gaz à effets de serre qui contribuent au réchauffement climatique.

De ce fait, les organismes mondiaux de protection de l'environnement tirent la sonnette d'alarme. Le protocole de Kyoto a fixé comme objectif de réduire de 5,2% les rejets de gaz à effet de serre [4, 5].

Le développement des énergies renouvelables est aujourd'hui une alternative intéressante pour préserver à la fois le confort des êtres humains et l'environnement. Ces ressources naturelles, sont capables de générer de l'énergie grâce aux technologies développées par les hommes ; leur impact sur l'environnement est faible et elles ne sont pas menacées d'épuisement.

Ainsi l'hydrogène est aujourd'hui proposé comme le vecteur énergétique de demain c'est en effet une solution alternative prometteuse, tant sur le plan environnemental que d'un point de vue économique. Utilisé dans une pile à combustible, l'hydrogène se combine avec l'oxygène de l'air pour produire de l'électricité en ne rejetant que de l'eau.

L'hydrogène peut être extrait d'un grand nombre de matières premières (gaz naturel, charbon, eau, électricité, biomasse....). Bien qu'aujourd'hui 95% de l'hydrogène est produit à partir du gaz naturel, la multiplicité des sources de production garantit une sécurité d'approvisionnement [6].

L'hydrogène représente donc un fabuleux potentiel pour fournir une énergie renouvelable, propre et silencieuse pour alimenter la voiture de demain [6].

I.1 Caractéristiques de l'hydrogène

Il y a plus d'un siècle, Jules Verne écrivait dans *L'Île mystérieuse* qu'un jour l'eau serait employée comme combustible : « L'hydrogène et l'oxygène, qui la constituent, utilisés isolément ou simultanément, fourniront une source de chaleur et de lumière inépuisables. »

L'hydrogène est un gaz connu depuis fort longtemps, c'est Lavoisier qui lui donna son nom en 1783 en constatant que sa combustion avec l'oxygène donnait de l'eau.

La molécule d'hydrogène que l'on utilise est composée de 2 atomes d'hydrogène. C'est un gaz, incolore, inodore, et non corrosif. La molécule d'H₂ étant très petite, elle diffuse rapidement dans l'air et à travers les parois métalliques, c'est le plus léger de tous les corps dans des conditions normales de température et de pression. Il est quatorze fois moins lourd que l'air [9].

Il faut ajouter à cela que L'hydrogène est une molécule particulièrement énergétique, doté d'excellentes propriétés physico chimiques lui conférant la qualité de combustible universel supérieur à celle du pétrole. En réagissant avec l'oxygène pour former de l'eau, il libère une grande quantité de chaleur. 1kg d'hydrogène libère environ 3 fois plus d'énergie qu'1kg d'essence. Pour produire autant d'énergie qu'avec 1 litre d'essence, il faut 4.6 litres d'hydrogène comprimé à 700 bars. En revanche, comme l'hydrogène est très léger, il occupe, à poids égal beaucoup plus de volume qu'un autre gaz, ces volumes importants sont une contrainte pour le transport et le stockage sous forme gazeuse [7,8].

L'hydrogène est extrêmement abondant sur notre planète. Chaque molécule d'eau (H₂O) est le fruit de la combinaison entre un atome d'oxygène et deux atomes d'hydrogène. Or, l'eau couvre 70 % du globe terrestre. On trouve également de l'hydrogène dans les hydrocarbures qui, comme leur nom l'indique, sont issus de la combinaison d'atomes de carbone et d'hydrogène. Enfin, tout organisme vivant, animal ou végétal, est composé d'hydrogène : la biomasse est donc une autre source potentielle d'hydrogène.

Mais bien qu'il soit l'élément le plus abondant de la planète, l'hydrogène n'existe pratiquement pas dans la nature à l'état pur, il pourrait donc être converti en énergie de façon inépuisable à condition de savoir le produire en quantité suffisante [6].

A la fin du XIX^{ème} siècle, l'hydrogène était un combustible incontournable; il était employé dans les lampes et aussi dans le "gaz de ville", où il était mélangé à de l'oxyde de carbone. Puis, sont apparus le gaz naturel et surtout le pétrole et l'hydrogène ne fut plus utilisé sauf dans le domaine de la propulsion des fusées [9].

I.2 Les domaines d'application de l'hydrogène

Il est produit environ 45 millions de tonnes d'hydrogène par an dont 10% en Europe. Un certain nombre de grands producteurs d'hydrogène sont des firmes européennes [6]. L'hydrogène peut être utilisé dans un grand nombre de secteurs industriels: dans l'industrie des corps gras, en électronique, et comme carburant.

I.2.1 L'industrie chimique et pétrochimique

Les utilisations de l'hydrogène sont très variées dans ce domaine :

- synthèse de l'ammoniac par réaction avec l'azote pour fabriquer essentiellement des engrais, mais aussi des explosifs, des matières colorantes ou des résines.
- raffinage: hydrosulfuration des fuels pour éliminer le soufre, hydroraffinage pour améliorer les lubrifiants et pour produire des essences spéciales.
- synthèse du méthanol par réaction du gaz à l'eau pour la fabrication de caoutchoucs, de résines et des produits de base pour la synthèse chimique comme l'acide acétique, le chlorure de méthyle, les esters...
- chimie organique : hydrogénation d'une part d'un certain nombre de matières pour la production de colorants et d'autre part de précurseurs des sulfamides ou des vitamines.
- chimie minérale: production d'eau oxygénée [10].

I.2.2 L'industrie des corps gras

Les corps gras insaturés alimentaires (colza, soja, tournesol,...) doivent être hydrogénés afin de les rendre solides à la température ambiante et augmenter leur aptitude à la conservation. Les corps gras non alimentaires sont également hydrogénés pour fabriquer du savon, des lubrifiants, des peintures et des vernis [10].

I.2.3 L'industrie électronique

L'hydrogène est utilisé pour l'élaboration de cristaux de semi conducteurs de silicium [10].

I.2.4 L'hydrogène comme vecteur énergétique

Gaz essentiellement utilisé dans des applications chimiques, l'hydrogène est aujourd'hui propulsé sur le devant de la scène énergétique. Dans les piles à combustible (PAC), l'hydrogène pourrait remplacer les combustibles fossiles car il a un fort potentiel de réduire à long terme les émissions de gaz à effet de serre et la dépendance énergétique des pays.

Deux secteurs sont envisagés pour l'utilisation de l'hydrogène comme vecteur d'énergie : les transports et la production d'électricité qui, éventuellement, peut s'accompagner d'une production de chaleur [15].

a) Dans le secteur des transports

L'utilisation de l'hydrogène dans les transports peut se faire soit par l'intermédiaire d'une pile à combustible, ou bien avec moteur à combustion interne [11]. Par rapport aux carburants conventionnels, l'hydrogène possède l'avantage de se combiner aisément à l'oxygène de l'air pour donner de l'énergie avec un sous-produit l'eau. Donc ces véhicules électriques fonctionnant à l'hydrogène pourront remplacer avantageusement nos véhicules actuels. [15]

b) Production d'électricité

L'hydrogène peut être transformé en électricité par le biais de la pile à combustible qui convertit l'énergie chimique en énergie électrique. Le combustible considéré est l'hydrogène qui est fourni en continu, ce qui peut permettre d'obtenir du courant électrique. L'hydrogène est également utilisé comme source de chaleur, permettant ainsi d'alimenter les maisons et les immeubles.

I.3 Les modes de production d'hydrogène

La production d'hydrogène, pour être économiquement et écologiquement viable doit répondre à 3 critères: compétitivité, rendement énergétique, propreté.

I.3.1 Production d'hydrogène à partir d'énergie fossiles

La production d'hydrogène à partir de carburants fossiles est actuellement la plus répandue, mais elle ne constitue pas une solution à terme puisque tous ces carburants ont une

durée de vie limitée. En plus cette technique est très polluante car elle génère du CO₂. On distingue quatre procédés de production à partir d'énergie fossiles [12]

a) le vaporeformage

Le vaporeformage consiste à faire réagir un hydrocarbure avec de l'eau sous l'action d'un catalyseur. Il est surtout réalisé avec des hydrocarbures légers; actuellement il est surtout fait avec du gaz naturel.

Le gaz naturel est composé en majeure partie de méthane, mais contient aussi du CO₂ et du soufre. Ce dernier doit être d'abord éliminé par la désulfuration. Le procédé de vaporeformage se scinde alors en deux réactions, la première est la réaction du méthane avec l'eau (réaction (1)) qui produit du CO et de l'hydrogène, la seconde est la réaction de *Water Gas Shift* (réaction (2)) :



La première réaction a lieu vers 800-900°C pour une pression de 25 bars, on obtient alors un gaz riche en CO et en H₂.

La seconde réaction est due à la nécessité d'éliminer le CO, elle est en général réalisée en deux étapes, les réactions *High Temperature Shift* et *Low Temperature Shift* qui ont lieu vers 400 et 200°C respectivement. Ces réactions sont légèrement exothermiques. On obtient alors un gaz contenant essentiellement H₂ et CO₂. Cette étape est suivie d'une ultime purification du gaz. Il y a plusieurs procédés possibles, la plus utilisé est la *Pressure Swing Adsorption (PSA)* qui permet d'obtenir de l'hydrogène pur à 99,9999%. Figure I.1

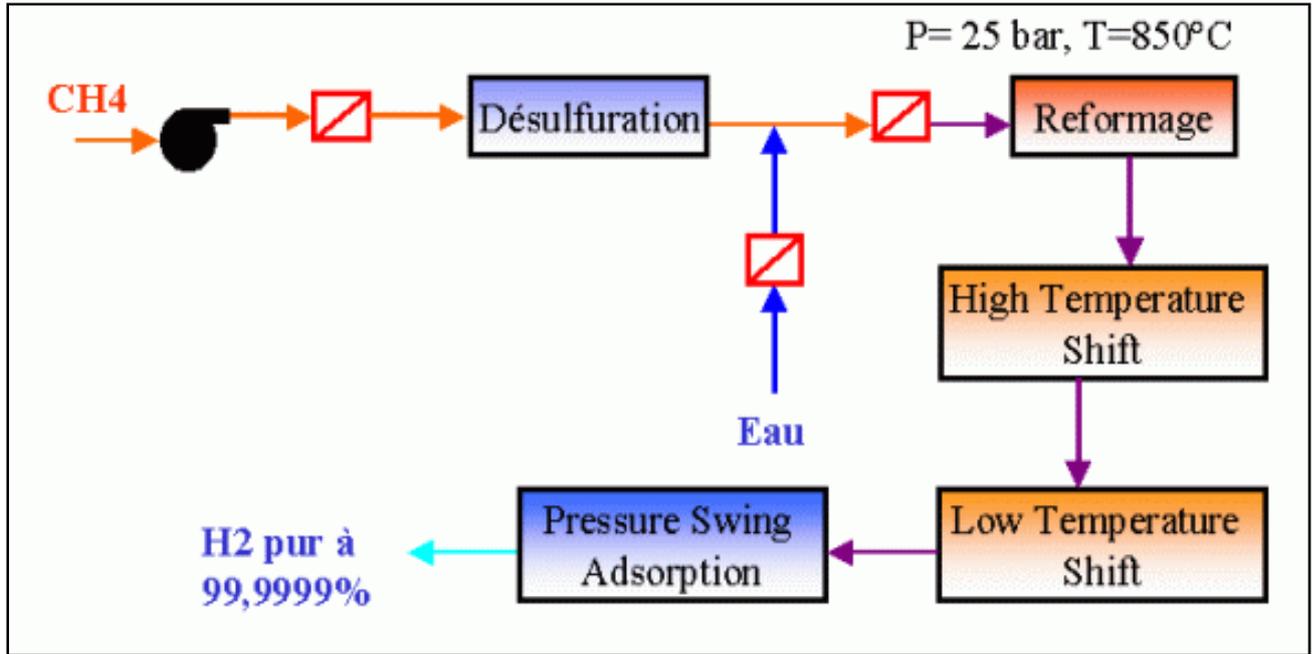


Figure I.1 : Principe du vaporeformage

Ces procédés sont mûrs techniquement, des unités produisant de 20 à 100.000 m³/h existent. Le prix de l'hydrogène produit dépend du prix du gaz naturel et des coûts d'investissement. Pour les petites installations, les coûts les plus importants seront les coûts d'investissement, la part des prix liés au carburant augmente pour les grosses installations. Vu les fluctuations sur le prix du gaz naturel, c'est un facteur à ne pas négliger.

b) l'oxydation partielle

L'oxydation partielle consiste en une réaction entre un carburant (gaz naturel, hydrocarbures légers, voire le charbon) avec l'oxygène. Elle peut être réalisée avec des hydrocarbures plus lourds que pour le vaporeformage; en revanche, comme pour le vaporeformage, le carburant doit aussi être purifié: il doit d'abord être débarrassé du soufre [15 ,18 ,14]. Cette réaction a généralement lieu à plus haute température (1200 à 1500°C) à une pression de 20 à 90 bars. Elle est ensuite suivie des réactions de *Water Gas Shift* et des techniques d'ultime purification.



c) Le reformage autotherme

Le reformage autotherme est une combinaison des deux procédés précédents puisque le carburant est mélangé avec de l'air et de l'eau. L'oxydation partielle est exothermique et la chaleur dégagée permet de fournir de la chaleur au vaporeformage qui est une réaction endothermique. Au total on n'a donc pas besoin d'apport de chaleur. Ce procédé permet d'atteindre une très bonne efficacité et peut être utilisé pour plusieurs carburants: le gaz naturel, le méthanol ou des hydrocarbures [13].

d) La gazéification du charbon

Cette technique fut la source principale de l'hydrogène avant le reformage, mais elle n'est plus utilisée actuellement, sauf en Afrique du Sud ou en Chine. Elle n'est compétitive que là où le pétrole et le gaz sont chers. Néanmoins, cette technique gagne de plus en plus d'importance: elle permet de produire de l'électricité et des sous produits comme l'hydrogène. Le principe est le suivant: on mélange le charbon à de l'eau et de l'air à 1000°C et sous haute pression, et on obtient un gaz contenant en majorité du CO et de l'hydrogène. On peut alors séparer H₂ et CO des autres impuretés. Le CO est éliminé par *Water Gas Shift*, le CO₂ est séparé du reste et pourra être stocké. Le rendement électrique serait de 45 % [17].

I.3.2 La production à partir du nucléaire

Une autre possibilité de production d'hydrogène réside dans le nucléaire. Depuis quelques années, des chercheurs étudient ces réacteurs qui permettent la production d'électricité et d'hydrogène pour une moindre consommation de combustible nucléaire, une production plus faible des déchets mais également un rendement de production de l'ordre de 50 % [16].

I.3.3 Production d'hydrogène par décomposition de l'eau

Cette méthode consiste à dissocier les atomes d'oxygène et d'hydrogène combinés dans les molécules d'eau par la réaction suivante :



Cette solution est la plus intéressante en termes d'émission de gaz à effet de serre si cette dissociation se fait à partir de sources d'énergies elles-mêmes non émettrices de CO₂ [12,17]. Deux procédés sont à l'étude pour cette méthode de production :

a) l'électrolyse chimique

Qui permet de décomposer chimiquement l'eau en oxygène et hydrogène sous l'action d'un courant électrique. Figure I.2

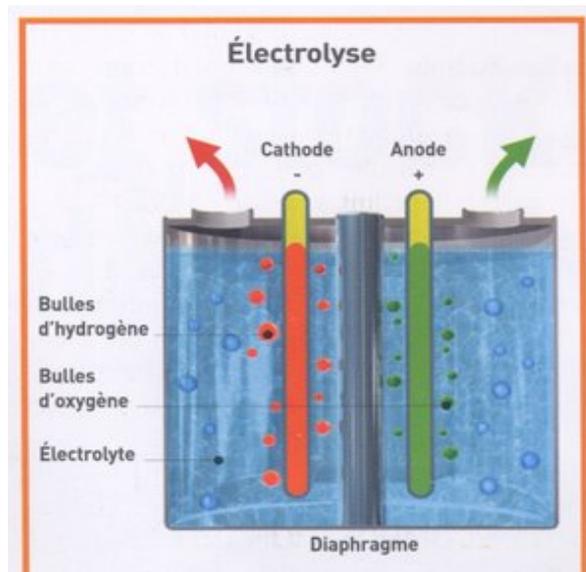


Figure I.2 : Schémas de décomposition de l'eau par électrolyse

Ce procédé nécessite de pouvoir disposer d'un courant électrique à très faible coût. Actuellement, ce procédé coûte 3 à 4 fois plus chères que la production par reformage du gaz naturel.

b) dissociation de la molécule d'eau par cycle thermochimique

La décomposition de la molécule par ce procédé permet d'opérer à des températures de l'ordre de 800° à 1000°C. De telles températures pourraient être obtenues par le biais de réacteurs nucléaires de nouvelle génération ou de centrales solaires [11].

I.3.4 Production à partir de biomasse

La biomasse, elle aussi peut permettre de produire de l'hydrogène, mais aucun procédé n'est encore mûr techniquement. Plusieurs méthodes existent actuellement.

- transformation en alcool (éthanol, méthanol) ou méthane suivi de reformage.
- thermolyse et gazéification de la biomasse suivie de reformage [18].

I.3.5 Production biologique

Une autre possibilité réside dans les algues et les bactéries. En effet, au cours de la photosynthèse, les plantes vertes dissocient l'eau en hydrogène et oxygène. L'hydrogène sera combiné au CO₂ pour construire des tissus végétaux tandis que l'oxygène est libéré dans l'atmosphère [18].

I.4 Etat actuel de production et d'utilisation de l'hydrogène

L'énergie utilisée actuellement dans le monde pour produire l'hydrogène est totalement d'origine fossile (figure I.3). 48% de l'hydrogène est produit par reformage du gaz naturel, 30% par reformage des hydrocarbures et 18% par gazéification du charbon. Les 4% qui restent sont produites par électrolyse de l'eau. Le volume de la production de l'hydrogène a atteint environ 500 Milliards de Nm³ fin 2002. [15]

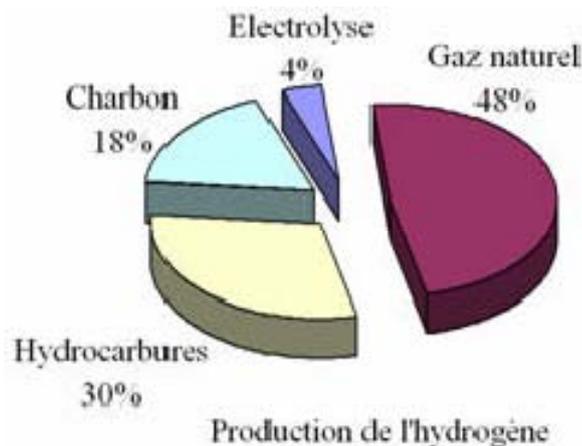


Figure I.3 : La production d'hydrogène actuellement dans le monde

L'hydrogène joue un rôle très important dans l'industrie chimique et pétrochimique (synthèse d'ammoniac, de méthanol, production de colorants, d'eau oxygénée, etc.). Environ 50% de la demande mondiale en hydrogène, est destinée à la production de l'ammoniac, matière première importante dans l'industrie des engrais. 37% de la production d'hydrogène est utilisé dans les raffineries, 8% pour la production des produits chimiques et surtout du méthanol [15].

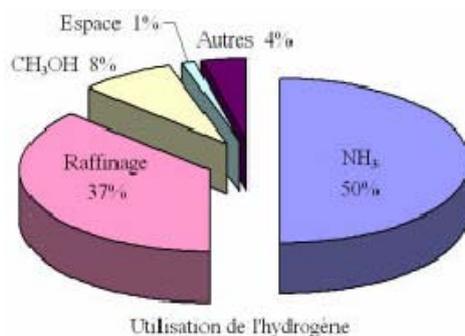


Figure I.4 : L'utilisation de l'hydrogène dans le monde

I.5 Le transport et la distribution de l'hydrogène

L'hydrogène peut être transporté par voie routière sous forme gazeuse dans des conteneurs ou bien sous forme liquide par camions citernes. La principale voie utilisée aujourd'hui est le pipeline, qui représente actuellement un réseau de plus de 2500 km à travers le monde. Ces réseaux sont surtout situés en Europe (1500 km) et aux États-Unis (900 km) [12,13 ,14].



Figure I.5 : Exemple du réseau hydrogène dans le nord de l'Europe

I.6 Stockage de l'hydrogène

Le stockage est une des étapes clé de l'utilisation de l'hydrogène comme vecteur d'énergie. En effet, quelle que soit l'application visée, il est nécessaire d'avoir un système permettant de stocker l'hydrogène afin de conférer une certaine autonomie au système.

Actuellement il existe 3 grandes familles de systèmes de stockage d'hydrogène, chacune ayant des avantages et des inconvénients spécifiques lui permettant d'être intégré, ou non, dans une application particulière:

- Le stockage d'hydrogène comprimé à haute pression :

Le conditionnement de l'hydrogène sous forme gazeuse est une option prometteuse. Les contraintes sont toutefois nombreuses. Léger et volumineux, l'hydrogène doit être comprimé au maximum pour réduire l'encombrement des réservoirs. Des progrès ont été faits: de 200 bar, pression des bouteilles distribuées dans l'industrie, la pression est passée à 350 bar aujourd'hui, et les développements concernent maintenant des réservoirs pouvant résister à des pressions de 700 bar.

- Le stockage cryogénique d'hydrogène liquide (-253°C) :

L'hydrogène est d'ailleurs utilisé dans le domaine spatial sous forme liquide. Mais il est, après l'hélium, le gaz le plus difficile à liquéfier, cette solution entraîne une dépense énergétique importante et des coûts élevés qui rendent son application plus difficile pour le grand public.

- Le stockage solide d'hydrogène.

Aussi, il peut être stocké dans des solides sous forme d'hydrure ou matériaux poreux. Des programmes de recherche sont aussi établis pour développer le stockage dans le charbon actif, nanofibres et nano tubes en carbone; le stockage dans ces cas se fait par adsorption.

Chapitre II :

GENERALITES SUR LA SPIRULINE

Dans les années 1940, un étrange aliment traditionnel était découvert au Tchad par une mission scientifique européenne [34]. Il s'agissait de galettes séchées d'une teinte verte tirant sur le bleu, que l'on trouvait sur les marchés de la région du Kanem sous le nom de " dihé ". L'enquête montra que ce " dihé " provenait de masses d'un micro-organisme unique récolté à la surface de mares fortement alcalines et séché à même le sable des berges. Ce micro-organisme, capable de photosynthèse et se reproduisant rapidement, fut appelé " spiruline " [36]. Voir figure II.1



Figure II.1 : filament isolé de spiruline

II.1 Qu'est ce que la spiruline ?

Cette merveilleuse créature a été décrite pour la première fois par Wittrock et Nordstedt en 1844 [32].

La spiruline est une cyanobactérie, vieille comme le monde dont le nom scientifique est « *Arthrospira Platensis* », qui vit de photosynthèse comme les plantes et prospère naturellement dans les lacs salés et alcalins des régions chaudes du globe.

Nourriture traditionnelle des Aztèques du Mexique et des Kanembous du Tchad, La spiruline possède des propriétés nutritives exceptionnelles. Sa forte teneur en protéines qui est de l'ordre de 60%, sa richesse en acides aminés, en minéraux (Fer, Magnésium) et en vitamines (A, B₁₂) fait d'elle un complément alimentaire de haute qualité, capable de résoudre une grande partie des problèmes de malnutrition et de santé [34].

En plus de ses vertus alimentaires et médicales, elle présente également la capacité de produire de l'hydrogène, d'où l'intérêt qui lui a été portée dans le cadre de ce travail.

II.2 Où la trouve-t-on ?

La spiruline croît naturellement dans les lacs alcalins contenant du carbonate de sodium (Na_2CO_3) ou du bicarbonate de sodium (NaHCO_3), d'autres minéraux et une source d'azote fixé. On trouve de tels lacs alcalins dans tous les continents très souvent près des volcans, et même dans les déserts là où se ramasse l'eau minérale.

Le tableau suivant présente quelques sites où pousse la spiruline [32].

Tableau II.1 : les pays où l'on trouve de la spiruline

Afrique	Asie	Amérique du sud	Amérique du nord et Europe
Algérie	Inde	Pérou	Californie
Tchad	Myanmar	Mexique	Haïti
Soudan	Sri Lanka	Uruguay	Hongrie
Djibouti	Pakistan	Equateur	France
Ethiopie	Thaïlande		
Congo	Azerbaïdjan		
Kenya			
Tanzanie			
Tunisie			
Zambie			
Madagascar			

II.3 Caractéristiques biologiques de la spiruline

II.3.1 Classification

Voici le pedigree de la spiruline selon Ripley D.FOX [32].

Règne.....	Monera
Sous règne.....	Procaryota
Phylum.....	Cyanophyta
Classe.....	Cyanophyceae
Ordre.....	Nostocales
Famille.....	Oscillatoriaceae
Genre.....	Arthrospira
Espèce.....	Platensis

II.3.2 Morphologie

La spiruline est une cyanobactérie multicellulaire filamenteuse. Sous le microscope, elle apparaît en tant que filaments bleu-vert composés de cellules cylindriques disposées sous forme de trichomes non ramifiés enroulés en hélice, ayant un diamètre de l'ordre de 30 à 50 microns, une hauteur de 50 à 60 microns, et dont le nombre varie de 5 à 7.

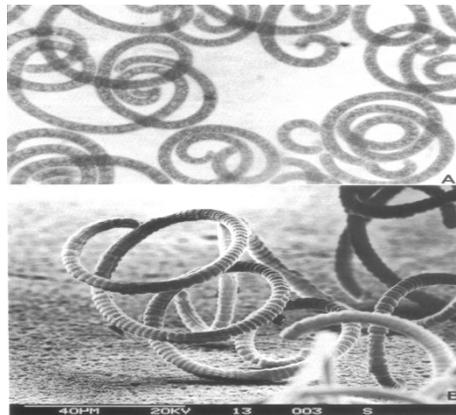


Figure II.2 : Morphologie de la Spiruline au microscope optique (X.400)

Cependant La forme hélicoïdale du trichome est caractéristique du genre. Les paramètres hélicoïdaux (dimensions, longueur et forme des spirales) varient en fonction des conditions environnementales, donc en fonctions des régions [33].

En générale la spiruline peut se présenter sous 3 formes, selon les régions

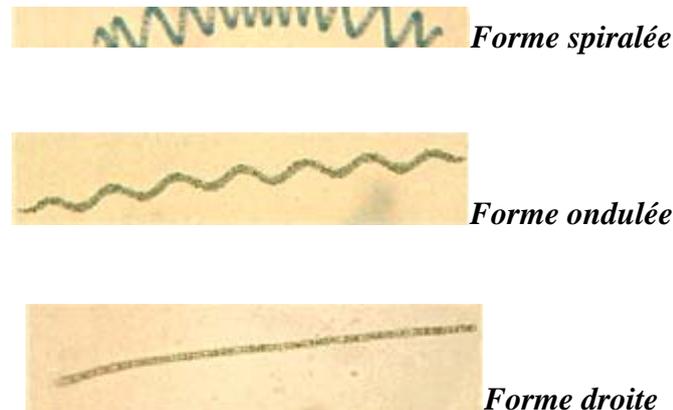


Figure II.3 : les différentes formes de spiruline

II.3.3 Physiologie

La paroi des filaments de la spiruline est de type gram négative, c'est une vrais procaryote c'est-à-dire dépourvue de membrane nucléaire et de paroi cellulosique ce qui la rend totalement digérable par l'homme.

Contrairement à la plus part des cyanobactéries, la spiruline ne possède pas de cellules hétérocystes, c'est-à-dire qu'elle ne fixe pas l'azote atmosphérique.

L'une des principales caractéristiques de la spiruline est sa flottabilité, grâce à des vésicules de gaz se trouvant habituellement près des parois qui peuvent faire monter les filaments dans la colonne d'eau pour atteindre la lumière. Par ailleurs la spiruline se déplace par glissement grâce à des microfibrilles et souvent par des mouvements en vrilles [37].

II.3.4 Les pigments

La spiruline contient de nombreux pigments photosynthétiques qui sont : la chlorophylles a, β carotène, phycocyanine, phycoérythrine. Ces pigments sont activés par la lumière de longueurs d'ondes différentes et servant ainsi d'antennes pour recueillir l'énergie lumineuse totale et la transmettre aux centres de réaction de la molécule de chlorophylle [32].

On sait que les radiations retenues en priorité sont précisément celle dont la longueur d'onde correspond à une bande d'adsorption du pigment récepteur. Voici le spectre d'adsorption des pigments présents chez la spiruline.

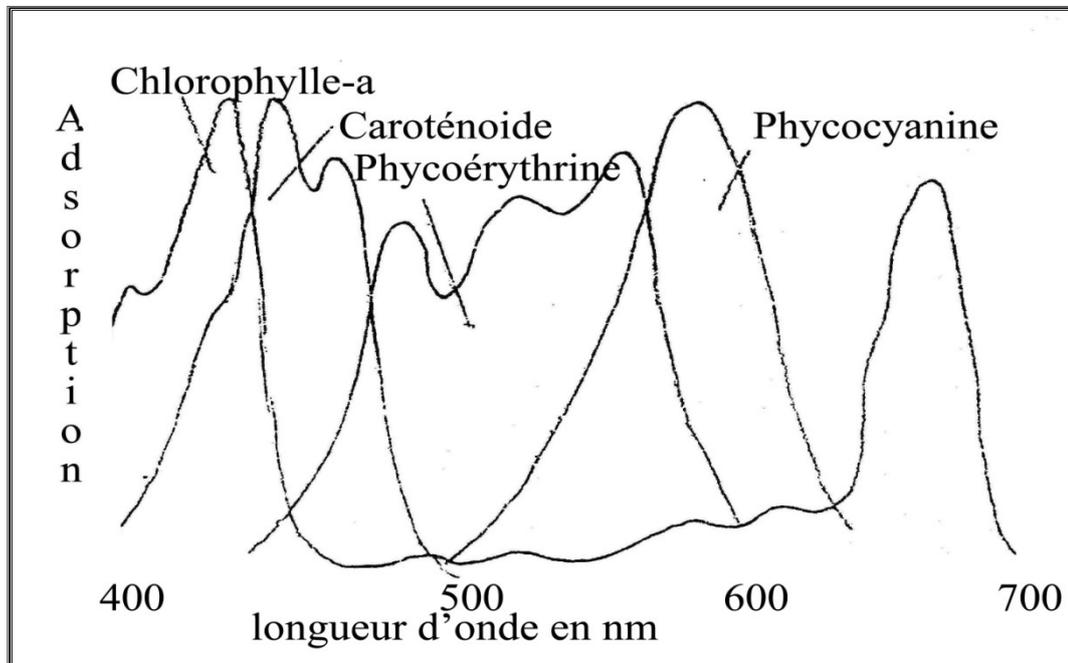


Figure II.4 : absorption de la lumière par les pigments de la spiruline

II.4 La croissance de la spiruline

II.4.1 Besoins nutritionnels

Le milieu de culture doit apporter tous les éléments nécessaires aux synthèses cellulaires et besoins énergétiques du microorganisme. A savoir : un apport important de carbone pour obtenir une croissance rapide, une source d'azote fixé, du fer, du phosphore, du potassium, du soufre, ainsi que d'autres éléments.

Le tableau II.2 présente quelques éléments chimiques nécessaires à la croissance de la spiruline, et le rôle biologique apporté à chaque élément.

Tableau II.2 : les éléments nécessaires à la croissance de la spiruline [32].

Eléments chimiques	Rôle biologique
Carbone (NaHCO ₃)	Source de carbone, source d'énergie
Potassium et sodium	Régulation de la pression osmotique
Phosphore	Composant de la molécule NADP+ Accepteur d'énergie dans la photosynthèse
Magnésium	Se trouvant dans la molécule de chlorophylle
Fer	Se trouve dans la molécule le cytochrome qui transfert les électrons dans la chaîne photosynthétique
Calcium	Intervient dans la synthèse de protéines
Manganèse	Donneur d'électrons à l'échelle d'énergie dans la photosynthèse
Sodium	Activateur d'enzymes
Cuivre, zinc, molybdène Cobalt, les oligo- éléments	Sont inclus dans les vitamines et les enzymes, qui permettent l'édification et l'entretien des molécules essentielles.

Il existe plusieurs milieux de cultures utilisés pour la croissance de la spiruline parmi eux : le milieu Zarrouk, milieu SOT, milieu BG11, l'eau de mer.

II.4.2 Les conditions nécessaires à la croissance de la spiruline

Pour cultiver un végétal, il faut lui fournir tout les éléments nécessaires dans un environnement permettant à la plante de les absorber et de les utiliser.

La spiruline demande un milieu alcalin avec :

- Un pH basique allant de 9 à 11.
- Des éléments nutritifs nécessaires à sa croissance.
- Il lui faut suffisamment de lumière juste au dessous du seuil de photolyse.
- Assez de CO₂ pour saturer le milieu.

- Une agitation de l'eau juste assez forte pour ne pas briser les filaments de spiruline.
- Et une température suffisante allant de 34 à 37 °

Touts les éléments essentiels à la culture de la spiruline sont illustrés dans la figure II.5

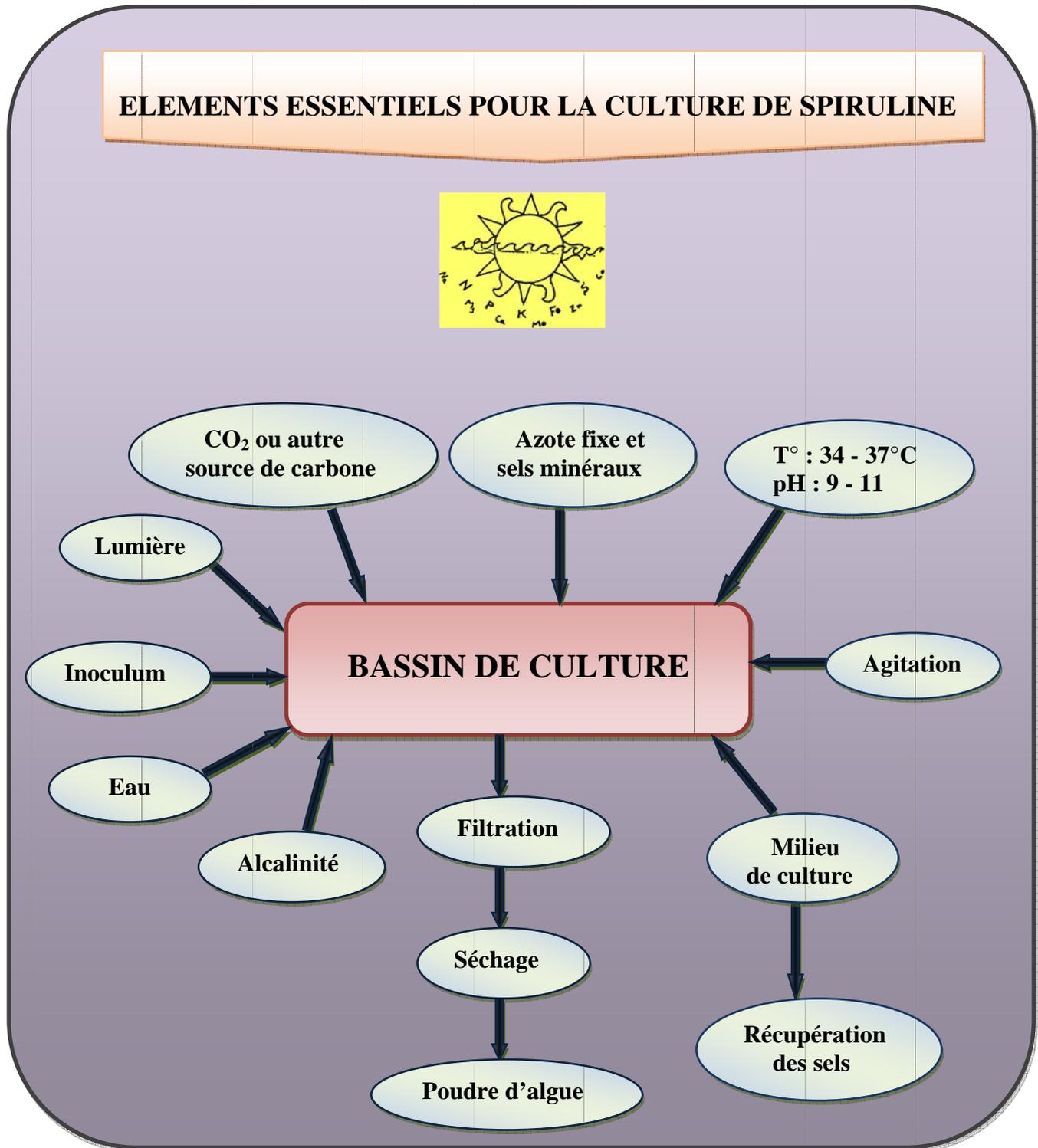


Figure II.5 : Diagramme des flux pour la culture et le traitement de la spiruline

II.4.3 La biologie de la spiruline

Ce qui distingue la spiruline du reste des cyanobactéries, c'est sa niche écologique très particulière. Ce microorganisme prolifère dans des eaux très minéralisées, extrêmement alcalines. Ce sont des conditions qui excluent la majorité des contaminants. Le développement des *Arthrospiras* dans de tels milieux renforce encore cet effet d'exclusion par trois phénomènes [34,37] :

- 1- En consommant les carbonates et bicarbonates de son milieu, la spiruline tend à augmenter encore l'alcalinité du liquide. L'avantage d'un pH élevé est d'inhiber la croissance d'autres algues ou de protozoaire.
- 2- Très pigmentée et souvent flottants, les filaments d'*Arthrospira* forment un écran très efficace privant de lumière solaire les rares algues qui pourraient s'accommoder de leurs milieux de culture (comme la chlorelle, par exemple, une micro algue comestible qui prolifère parfois dans des cultures de spiruline trop peu concentrées)
- 3- Enfin, il a été démontré que la spiruline est capable de sécréter des molécules de défense dans leur milieu de culture. Parmi ces molécules : l'une s'est montrée très active contre une vaste gamme de bactéries. Ce qui pourrait expliquer l'usage traditionnel d'emplâtres de "spiruline" sur des plaies.

II.4.4 Cycles de vie de la spiruline

La reproduction s'effectue par scission simple ou multiple, par bourgeonnement ou encore par fragmentation des trichomes en tronçons cylindriques (cellules spécifique appelées Nécriidia). Chacun d'eux s'allonge par multiplication des cellules par scission binaire toutes les sept heures et donne un nouveau filament [37].

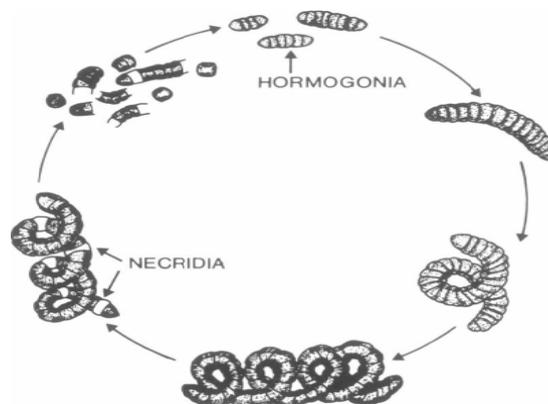


Figure II.6 : Cycle de vie de la spiruline

II.5 Composition chimiques et bienfait pour la santé

De tous les aliments naturels traditionnels connus, la spiruline a la plus haute teneur en protéine (60 à 70%) et sa teneur en acides aminés est équilibrée et essentiel. Elle est riche en vitamine, en lipides et particulièrement en acides gras essentiels. La spiruline produit également des exo polysaccharides, et des antibiotiques actifs contre certaines bactéries [34].

La spiruline présente des effets miraculeux sur la santé humaine et le traitement de certaines maladies. Ainsi de nombreuses études ont été effectuées afin de prouver ses bienfaits. La spiruline est particulièrement recommandé pour :

1. vaincre la malnutrition, elle est utiliser comme complément alimentaire.
2. elle contient toutes catégories de vitamines en particulier la B₁₂ qui prévient l'anémie.
3. elle a la capacité de guérir les oreillons, l'ulcère, le diabète, l'hypertension, la toxicité rénal.
4. renforce les défenses immunitaires, et assure une action anti tumorale.
5. soigner les enfants de Tchernobyl.
6. lutte contre les effets de la maladie du sida [35].

II.6 La photosynthèse chez la spiruline

Comme les plantes et les algues, les cyanobactéries sont photoautotrophe, elles sont capables de synthétiser, leur propre matière organique en utilisant l'énergie lumineuse. Donc on ne peut parler de la spiruline sans évoquer le phénomène de photosynthèse.

II.6.1 Définition de la photosynthèse

La photosynthèse est le processus physico-chimique utilisé par les plantes, les algues et les bactéries photosynthétiques pour l'édification de matériaux organiques, en utilisant l'énergie lumineuse comme outil pour séparer, combiner et réarranger les molécules. L'énergie de la lumière est captée par les pigments des plantes particulièrement les chlorophylles vertes, et dans la spiruline les caroténoïdes, la phycoérythrine et la phycocyanine également. Les pigments agissent comme des antennes recevant l'énergie des photons et la transmettent à des centres de réactions spécifiques, ou elle est converti de façon

à être utilisable pour fabriquer une nouvelle matière végétale à partir de CO_2 et d' H_2O . Ce phénomène se traduit par la réaction suivante :

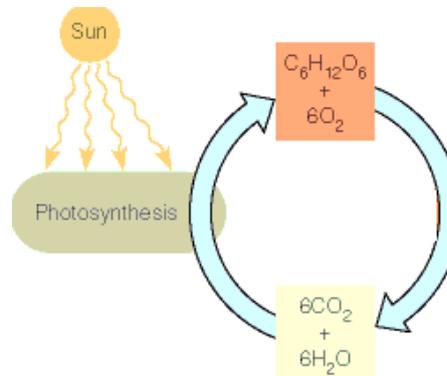


Figure II.7 : la réaction de la photosynthèse

II.6.2 Le Mécanisme de la photosynthèse

Bien que l'équation de la photosynthèse ci-dessus semble fort simple, elle représente un processus très complexe. En effet, la photosynthèse comporte deux phases, elles mêmes divisées en plusieurs étapes. En premier lieu, les réactions photochimiques appelées phase lumineuse se produisent suivi du cycle de Calvin qui représente la phase obscure.

II.6.2.1 Localisation de la photosynthèse

La photosynthèse est réalisée au niveau des chloroplastes, c'est un organe présent dans les cellules de plantes, entouré d'une double membrane et dont le stroma contient entre autre des thylakoïdes qui renferment des chlorophylles [38]. Figure II.8

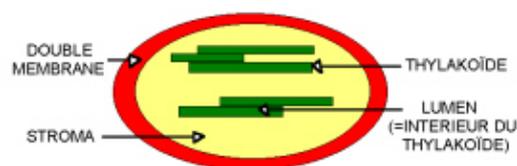


Figure II.8 : Chloroplaste des plantes

II.6.2.2 Les Etapes de la photosynthèse

a) La phase lumineuse de la photosynthèse

Cette phase est réalisée au niveau de la membrane des thylacoïdes. Les photons excitent les antennes des pigments et l'énergie migre de pigment en pigment vers les centres réactionnels photochimique, photosystème I (P700) et photosystème II (P680).

En premier lieu le photosystème II absorbe l'énergie lumineuse qui fera monter les électrons dans l'échelle des potentiels ou ils passeront par une série de molécules porteuses dans le photosystème I. Ces électrons sont issus de la photolyse de l'eau d'après la réaction suivante :



Le photosystème I prend maintenant le relais. Son centre de réaction P700 a reçu de l'énergie par l'antenne chlorophyllienne et un électron lui a été envoyé par le photosystème II, cet électron étant excité passe par une série d'accepteurs, jusqu'à se qu'il arrive au dernier accepteur qui est le NADP^+ lui même réduit en NADPH.

En parallèle avec le transfert d'électrons du PSII vers PSI du triphosphate d'adénosine (ATP) est formé à partir du diphosphate d'adénosine (ADP) et cela en captant 2 électrons et 2 protons, ces protons vont activer la pompe à H^+ qui libère de l'ATP [32,38].

b) La phase obscure de la photosynthèse

Le cycle de Calvin se fait dans le stroma des chloroplastes chez les eucaryotes. c'est la dernière étape de la Photosynthèse où l'ATP et le NADPH, produits pendant les réactions photochimiques, sont utilisés. Ce cycle est une succession de réactions biochimiques, régulées par différents enzymes pour permettre la réduction et l'incorporation du CO_2 atmosphérique dans des molécules organiques. L'enzyme clé de ce cycle est la *Rubisco* car elle permet la fixation du CO_2 au RuBP: cette *Rubisco* ou *ribulose-1-5-biphosphate carboxylase* représente jusqu'à 16 % des protéines

totales du chloroplaste; c'est une des protéines les plus importantes et abondantes sur terre.

Ce cycle se répète 6 fois (donc 6 incorporation de CO_2) pour former une molécule de glucose par exemple. Ce glucose pourra ensuite servir dans la synthèse de polysaccharides, d'acides gras, d'acides aminés, nucléotides et toutes les autres molécules nécessaires à la vie de la plante [38].

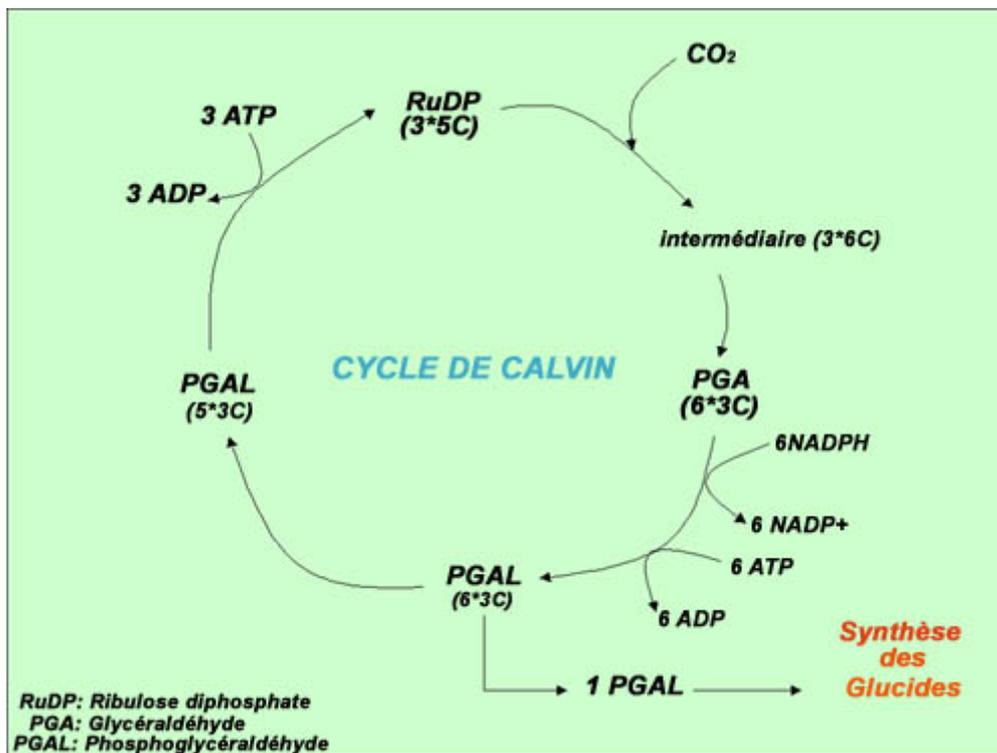


Figure II.9 : schéma du cycle de Calvin

➤ Bilan de la photosynthèse :

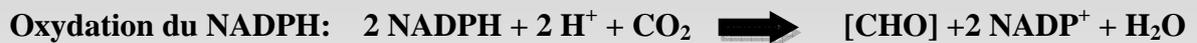
Phase lumineuse

MEMBRANE THYLACOIDE



Phase obscure

STROMA



Chapitre III :

PRODUCTION BIOLOGIQUE D'HYDROGENE

En raison de sa haute efficacité de conversion et son recyclage naturellement non polluant, l'hydrogène est aujourd'hui considéré comme le carburant du futur. Les procédés de production biologique d'hydrogène s'avèrent moins consommateurs d'énergie et plus favorables à l'environnement par rapport aux processus thermochimiques et électrochimiques. Les procédés biologiques reposent essentiellement sur les organismes photosynthétiques ou fermentatifs comme les cyanobactéries les bactéries pourpres, et les algues.

III.1 Procédés de production biologiques d'hydrogène

La production biologique de l'hydrogène est définie comme le résultat du métabolisme d'un organisme vivant qui libère, dans des conditions données, de l'hydrogène gazeux comme métabolite secondaire [19].

III.1.1 La bio photolyse directe

La production de l'hydrogène par ce procédé repose sur le principe de la photosynthèse. Cette dernière implique l'absorption de la lumière par deux photosystèmes (photosystème I et photosystème II) : opérant en série pour la dissociation de deux molécules d'eau et libérant de l'oxygène. Ainsi des électrons sont libérés et seront utilisés soit pour réduire le CO₂ (Cycle de Calvin) soit sont eux même réduits en hydrogène gazeux par une enzyme appelée hydrogénase. Cette dernière absente chez les plantes supérieures et spécifique aux micro algues, peut réduire les protons en hydrogène gazeux sous certaines conditions. Ce phénomène a été rapporté pour la première fois par Gaffron et Rubin, puis repris par plusieurs chercheurs [19, 24]. Ces derniers expliquent que la bio décomposition directe de la molécule d'eau par l'énergie des PSI et PSII libère des électrons qui sont transportés via des porteurs (Ferredoxine : Fd) jusqu'à une hydrogénase qui va les réduire en gaz selon le schéma simplifié suivante :

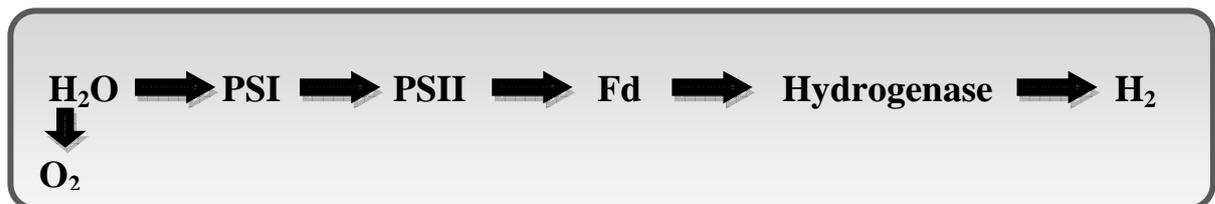


Figure III.1 : schéma du mécanisme de bio photolyse

Cependant, le rendement de cette production est tributaire du taux d'oxygène dans le milieu. Des niveaux d'oxygène $\geq 2\%$ inhibe l'activité de l'hydrogénase ce qui diminue la production de l'hydrogène [10]. Des conditions d'anaérobiose suivies d'un éclaircissement suffisant, sont déterminantes pour une production soutenues.

III.1.2 bio photolyse indirecte

Les systèmes de production d'hydrogène actuellement les plus efficaces utilisant les cyanobactéries repose sur ce procédé de bio photolyse indirecte, c'est-à-dire d'une séparation temporelle comme suit :

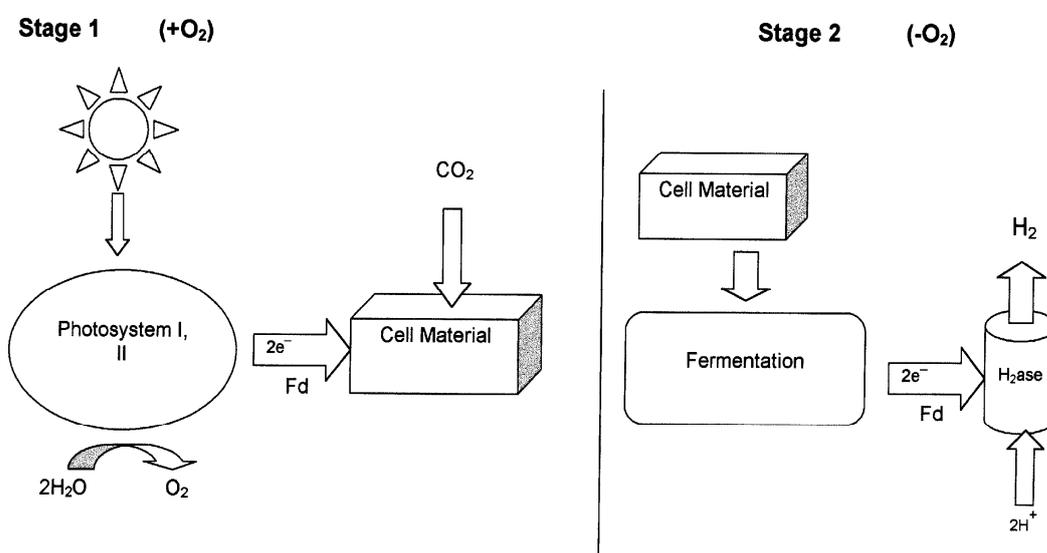


Figure III.2 : système de Biophotolyse indirect

Dans une première phase, les conditions sont favorables à la photosynthèse, permettant la croissance et l'accumulation des réserves. Dans une deuxième phase, il se produit une étape de fermentation pour le déplacement de l'oxygène produit et enfin dans une dernière étape il y'a production d'hydrogène en présence de lumière.

Les équations des réactions alors mise en jeu sont les suivantes :



Le $C_6H_{12}O_6$ joue le rôle de transporteur d'électrons intermédiaires entre la photosynthèse et la réaction de production d'hydrogène séparées temporairement. Ces équations représentent un maximum théorique de conversion des substrats en hydrogène. [20, 21, 22] 23, 24]

III.1.3 Photo fermentation

Certaines bactéries photosynthétiques comme les bactéries pourpres non sulfureuses produisent de l'hydrogène par photo fermentation, processus selon lequel plusieurs substrats peuvent être utilisés tels que les acides organiques et qui seront convertis en H_2 et CO_2 .

Cette production d'hydrogène est associée à l'action de la nitrogénase, qui en absence d'azote, en condition d'anaérobie, et en présence de lumière, catalyse la réduction des protons en hydrogène [27].

La dégradation des composés organiques par les bactéries photosynthétiques libère des électrons, qui sont ensuite pris en charge par les transporteurs de la chaîne photosynthétique et dirigés vers la nitrogénase grâce à l'énergie lumineuse. Ces électrons sont alors utilisés pour la production de l'hydrogène. L'ATP nécessaire au fonctionnement de l'enzyme, est généré par le transfert cyclique des électrons au niveau de cette chaîne [19, 28].

L'équation de conversion d'un substrat organique en hydrogène est la suivante :



III.1.4 Fermentation

Cette méthode de production d'hydrogène se fait par des bactéries fermentatives qui dégradent à l'obscurité, les composés organiques issus de l'hydrolyse des déchets de la biomasse riche en glucose. La fermentation est un processus indépendant de la lumière et qui se déroule dans des conditions d'anaérobie stricte.

Cette méthode est utilisée par les bactéries hétérotrophes mésophiles anaérobies strictes tel que *Clostridium Acetobutliu*, qui dégrade à l'obscurité les substrats organiques en hydrogène, dioxyde de carbone, et acides organiques ou alcools, selon la réaction suivante :



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

Théoriquement, le rendement de production d'hydrogène est de 4H₂ par mole de glucose consommé, dans le cas où celui-ci est complètement métabolisé. Il faut savoir également que l'accumulation des composés organiques issus de la fermentation inhibe la croissance et la production d'hydrogène. Cependant il est difficile d'atteindre une complète dégradation du glucose en CO₂ et en H₂ à travers une fermentation anaérobie [30].

III.2 Le taux de production d'hydrogène

Les rendements de production biologique d'hydrogène, varient en fonction des microorganismes et des voies métaboliques utilisées pour cette production. [29]

Théoriquement, l'efficacité de conversion de l'énergie lumineuse est plus importante chez les bactéries photo fermentaires comparée aux algues [19]. Une comparaison du taux de production d'hydrogène par les différentes voies métaboliques est représentée dans le tableau suivant :

Tableau III.1 : Comparaison des taux de synthèse de H₂ par des technologies différentes [19].

Système de production d'hydrogène	Taux d'hydrogène produit	Microorganisme
Bio photolyse directe	0.070 (mmol H ₂ / (1 x h))	C.reinhardtii
Bio photolyse indirecte	0.355 (mmol H ₂ / (1 x h))	A.variabilis Pt 84
Photo fermentation	96 (mmol H ₂ / (1 x h))	R.gelatinosus
Fermentation	21 (mmol H ₂ / (1 x h))	Clostridium

III.3 Avantages et inconvénients des voies métaboliques de production d'hydrogène

L'utilisation de chacun de ces procédés de production de bio hydrogène présente des avantages et des inconvénients.

Tableau III.2 : Avantages et inconvénients des différents processus biologique utilisés pour la production d'hydrogène [31].

Processus	Avantages	Inconvénients
Biophotolyse directe	- Production d'hydrogène à partir de l'eau	- Présence de lumière - Production d'inhibiteur de production (O ₂)
Biophotolyse indirecte	- Production d'hydrogène à partir de l'eau - La nitrogénase a la capacité de produire de l'hydrogène et la fixation d'azote moléculaire	- Présence de lumière - Présence d'une hydrogénase membranaire consommatrice d'hydrogène - Production d'inhibiteur de production - faible production
photo fermentation	- Production d'hydrogène en présence de plusieurs substrats carbonés - Pas de production d'oxygène	- Présence de lumière
fermentation	- Une production sans lumière - Peuvent produire de l'hydrogène en présence de plusieurs substrats carbonés - Pas de production d'oxygène	- Les produits de fermentation doivent subir un traitement pour éviter les risques de pollution d'eau

Chapitre IV :

PRODUCTION D'HYDROGENE PAR LES CYANOBACTERIES

Certains organismes photosynthétiques, comme les algues vertes unicellulaires ou cyanobactéries, possèdent l'avantage de produire de l'hydrogène. Dans le cas de la spiruline et certaines cyanobactéries, qui sont des microorganismes à photosynthèse oxygénique, la production d'hydrogène n'est qu'une voie biologique de « secours » permettant de maintenir transitoirement l'activité de la photosynthèse en condition d'anoxie après un séjour prolongé à l'obscurité [44,42]. La photosynthèse s'accompagnant d'un dégagement d'O₂, l'anoxie est alors rompue et la cellule peut rapidement retrouver un fonctionnement métabolique classique. Donc la voie métabolique de production d'hydrogène chez la spiruline n'est pas optimisée, contrairement à la photosynthèse qui est un système efficace de conversion de l'énergie solaire en biomasse. Pour pouvoir exploiter cette voie de production, il est donc nécessaire de trouver les protocoles de mise en culture favorisant un dégagement d'hydrogène. Pour cela, il est important de connaître les mécanismes et les enzymes responsables de la production d'hydrogène chez les cyanobactéries [28].

IV.1 Les voies métaboliques impliquées dans la production d'hydrogène chez les cyanobactéries

La production d'hydrogène chez les cyanobactéries est un phénomène complexe impliquant l'interaction de plusieurs voies métaboliques. Il existe plusieurs métabolismes de production d'hydrogène chez les cyanobactéries. Cela dépend du procédé utilisé pour la production, des enzymes responsables de la synthèse de l'hydrogène et du type de cyanobactéries (fixatrices d'azote ou non fixatrices d'azote).

Le problème majeur expliquant le faible développement industriel de ce type de production vient de la nature transitoire du phénomène en conditions naturelles. Sachant que pour la spiruline la phase obscure qui déclenche l'hydrogenase produit 25% d'hydrogène, et la phase lumineuse produit le reste c'est à dire 75% de l'hydrogène total. L'arrêt rapide du processus de dégagement de l'hydrogène est lié au fait que l'enzyme responsable de la production d'hydrogène est fortement sensible à l'oxygène dégagé en parallèle par la photosynthèse au cours de la phase lumineuse. Ce qui explique la faible production d'hydrogène chez ce type de microorganismes [25, 40, 43].

IV.1.1 Systèmes d'enzymes pour la production d'hydrogène

Chez les cyanobactéries, on trouve trois types d'enzymes susceptibles de produire de l'hydrogène

1/ Hydrogénase membranaire

Cette hydrogénase est trouvée dans les thylakoides des cyanobactéries, effectuant une prise de H_2 couplée à la réduction des quinones. C'est-à-dire que cette hydrogénase est capable de capturer l'hydrogène à de basses pressions partielles, réduisant un électron accepteur de haut potentiel (au niveau des couples de NAD/NADH, ou même à FAD/FADH). Cette enzyme produit peu d'hydrogène. Elle est ainsi dite contre productive quand le but est de produire l'hydrogène à l'échelle commerciale [27,44].

La réaction catalysée par l'hydrogénase prend la forme suivante :



2 / Hydrogénase bidirectionnelle ou réversible

L'hydrogénase réversible est associée à la membrane cytoplasmique. Possédant un site actif à NiFe. Elle est capable d'oxyder l'hydrogène ou de réduire les protons en utilisant le $NAD^+/NADH$ ou $NADP^+/NADPH$ comme partenaire redox. Ce type d'enzyme accepte les électrons directement de la ferrédoxine pour produire de l'hydrogène. A la différence de l'hydrogénase membranaire, les hydrogénases réversibles produisent plus d'hydrogène [43].

3/ Nitrogénase

Les nitrogénases sont les principales enzymes productrices d'hydrogène. On les trouve dans les cyanobactéries hétérocystes. Les nitrogénases fixent l'azote atmosphérique le réduisent en ammoniac et génèrent ainsi de l'hydrogène. La réduction de l'azote en ammoniac exige de l'énergie métabolique sous forme d'ATP d'après la réaction suivante [26, 41, 44] :



IV.1.2 Système de production d'hydrogène chez les cyanobactéries

Comme nous l'avons évoqué précédemment les cyanobactéries sont capables de produire de l'hydrogène sous certaines conditions et par un certains nombres de processus. En résumé, l'hydrogène peut être produit chez les cyanobactéries par l'une des trois voies suivantes :

a) La biophotolyse

Sous des conditions spécifiques, le métabolisme de certaines cyanobactéries est réorienté vers la production d'hydrogène au lieu de la formation de biomasse. Comme pour *Chlamydomonas reinhardtii* qui possède une hydrogénase à fer à forte activité couplée à la chaîne photosynthétique. Lorsqu'elle est placée à la lumière en conditions anaérobies, cette cyanobactérie produit transitoirement de l'hydrogène, en utilisant l'eau comme donneur d'électrons et le rayonnement solaire comme source d'énergie [19].

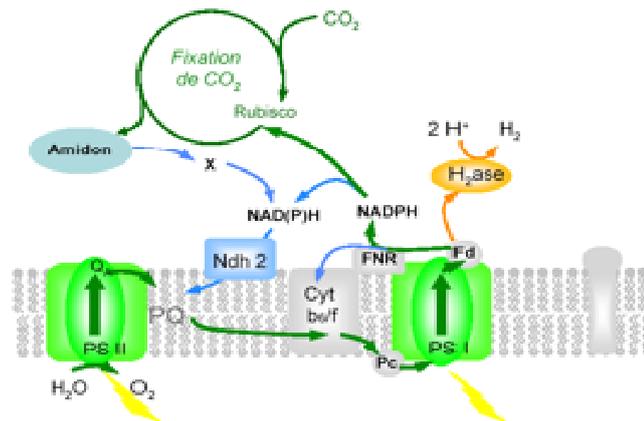


Figure IV.1 : Production d'hydrogène par voie biologique dans le cas de *Chlamydomonas reinhardtii* [38].

D'après la figure IV.1 les deux photosystèmes PSI et PSII opèrent en série pour la dissociation de deux molécules d'eau en libérant de l'oxygène. Ainsi des électrons libérés sont réduits en hydrogène gazeux par l'hydrogénase.

b) la voie de la bio photolyse indirecte

Les Cyanobactéries peuvent également synthétiser et produire de l'hydrogène par la photosynthèse. La plus part des cyanobactéries utilisant ce processus de bio photolyse indirect sont les cyanobactéries fixatrices d'azote qui produisent de l'hydrogène à l'aide de la nitrogénase en absence d'azote. Ainsi, l'oxygène sera consommé par la respiration lors du passage en anoxie et l'hydrogène est alors produit [24].

c) la voie du métabolisme fermentatif

Quelques cyanobactéries non fixatrices d'azote comme la spiruline ont la capacité de produire de l'hydrogène à travers leur métabolisme fermentatif, qui est un processus indépendant de la lumière qui se déroule dans des conditions d'anaérobies strictes. Le métabolisme de production d'hydrogène par voie fermentative chez la spiruline est résumé d'après le schéma suivant :

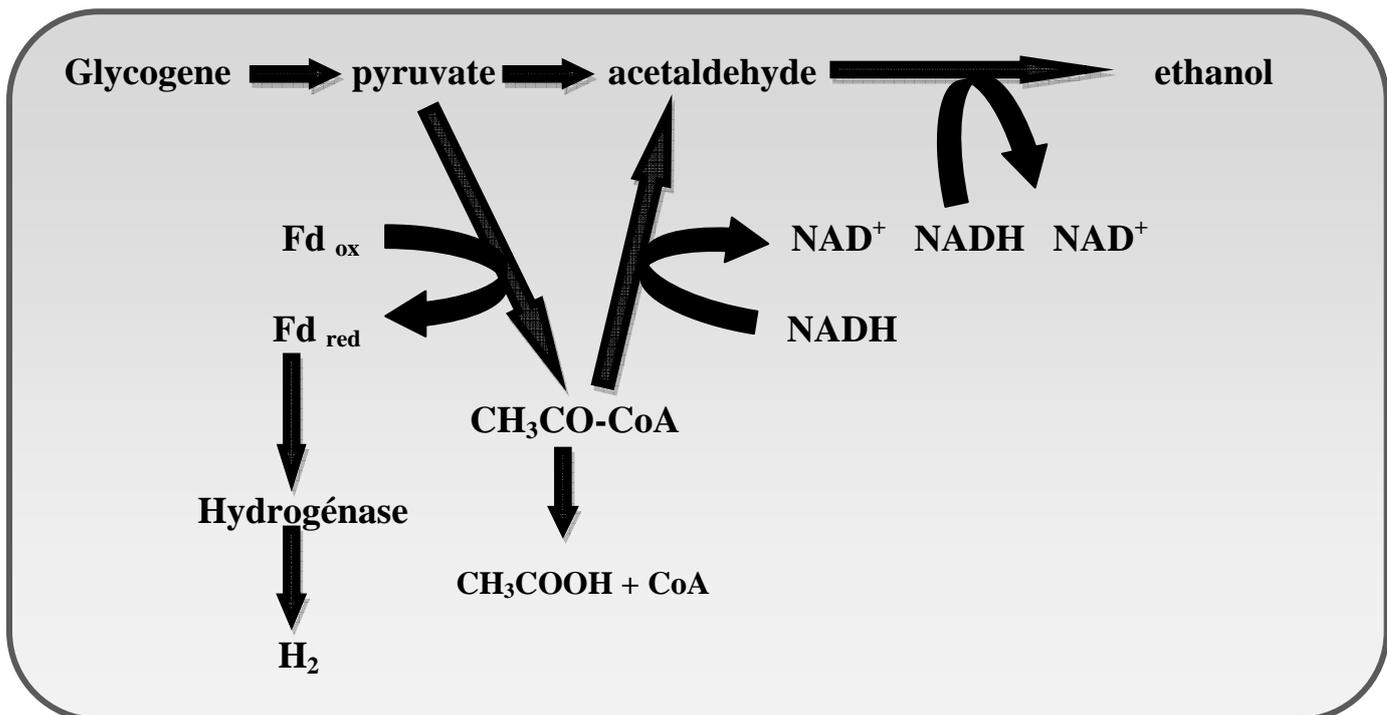


Figure VI.2 : la voie fermentative de production d'hydrogène chez la spiruline

D'après la figure VI.2 le pyruvate pourrait être dégradé en acétyl CoA à l'aide de la réduction de la ferrédoxine. Cet acétyl-CoA peut être encore métabolisé de deux manières : soit à l'acétate par des réactions hydrolytiques ou bien à l'acétaldéhyde par la déshydrogénase d'acétaldéhyde [29,44].

VI.2 Production d'hydrogène chez les cyanobactéries heterocyste et non heterocyste

Chez les cyanobactéries productrices d'hydrogène on rencontre deux types de cellules :

1. Les heterocystes (fixatrices d'azote) : ce sont des cellules végétatives à l'intérieur desquelles se déroulent la photosynthèse et ou fonctionne la nitrogénase alors protégée de l'oxygène par une paroi cellulaire épaisse.
2. les non heterocystes (non fixatrices d'azote) : ce sont des cellules qui ne possèdent pas la capacité de fixer l'azote atmosphérique et qui ne possèdent pas également de paroi cellulaire séparant l'oxygène de l'enzyme responsable de la production d'hydrogène.

Du fait de la différence de physiologie de ces deux cellules, le taux de production d'hydrogène diffère également entre ces deux cellules, le taux d'hydrogène produit chez les hétérocyste est plus élevé que celui des non hétérocyste. Cela est dû à l'oxygène qui inhibe la production d'hydrogène. Les non hétérocystes qui ne possèdent pas de paroi cellulaire séparant ainsi l'oxygène de l'hydrogénase, contrairement aux cyanobactéries hétérocystes.

VI.3 Paramètres influençant la production d'hydrogène

Les paramètres qui influencent la production d'hydrogène chez les cyanobactéries sont :

1- lumière : l'hydrogène produit chez les cyanobactéries est fortement influencé par l'intensité lumineuse. Ainsi il est important de trouver la bonne intensité donnant une production optimale.

2- température : La température optimale pour la production d'hydrogène chez la plupart des cyanobactéries se situe entre 30-40°C.

3- Effet de l'oxygène : En raison de la sensibilité extrême des hydrogénases à l'oxygène, l'hydrogène produit dépend du taux d'oxygène présent.

4- le type d'enzyme responsable de la production d'hydrogène : Le taux d'hydrogène produit est également influencé par l'enzyme, l'hydrogénase membranaire produit moins d'hydrogène que l'hydrogénase réversible qui elle-même produit moins que la nitrogénase.

5- PH : le pH également joue un rôle important dans la production d'hydrogène [10].

VI.4 Optimisation de la production d'hydrogène chez les cyanobactéries

Les principaux obstacles rencontrés dans le développement des technologies de production d'hydrogène utilisant les cyanobactéries sont :

- 1- inhibition des enzymes impliquées dans la production d'hydrogène par l'oxygène,
- 2- une consommation de l'H₂ par une hydrogénase réversible,
- 3- une productivité globale assez faible [29].

A fin d'optimiser la production d'hydrogène, l'objectif à terme est d'éviter l'inhibition de l'hydrogénase par l'oxygène et d'augmenter le taux de production d'hydrogène. A cet effet, plusieurs stratégies ont été proposées afin de contourner ces difficultés. La méthode proposée consiste à découpler les phases de production d'oxygène de celle de production d'hydrogène. Pour cela les cyanobactéries sont, tout d'abord, placées dans des conditions favorables à l'accumulation d'hydrate de carbone. Dans un deuxième temps, l'activité du PSII est inhibée et la production d'hydrogène s'effectue en remobilisant ces réserves. Sachant également que le dégagement d'oxygène est dû à l'activité du PSII, celui-ci peut être éliminé par l'inhibition du PSII [42].

Chapitre V :

GENERALITES SUR LA CHROMATOGRAPHIE PHASE GAZEUSE

Dans le cadre de ce travail qui consiste en la production de biohydrogene. La composition du biogaz produit sera confirmé et identifier par l'utilisation de la chromatographie phase gazeuse. Ayant été amené à manipuler cet appareil, il est donc nécessaire de faire un point sur son principe de fonctionnement.

V.1 Définition de la CPG

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une méthode séparative parmi les plus employées car elle allie rapidité et efficacité de séparation. Elle permet d'analyser qualitativement et quantitativement des mélanges complexes de gaz ou de composés qui peuvent être volatilisés sans être décomposés.

Etant de plus en plus utilisées dans les domaines de la chimie cette technique d'analyse offre plusieurs avantages, elle permet :

- L'automatisation assurant l'utilisation de très nombreux échantillons
- la microanalyse qui est une méthode de détection très sensible (du μg au mg)
- la séparation de mélanges complexes
- une analyse qualitative et quantitative aisée
- des analyses dans de nombreux domaines d'applications [45,47].

V.2 Description de la CPG

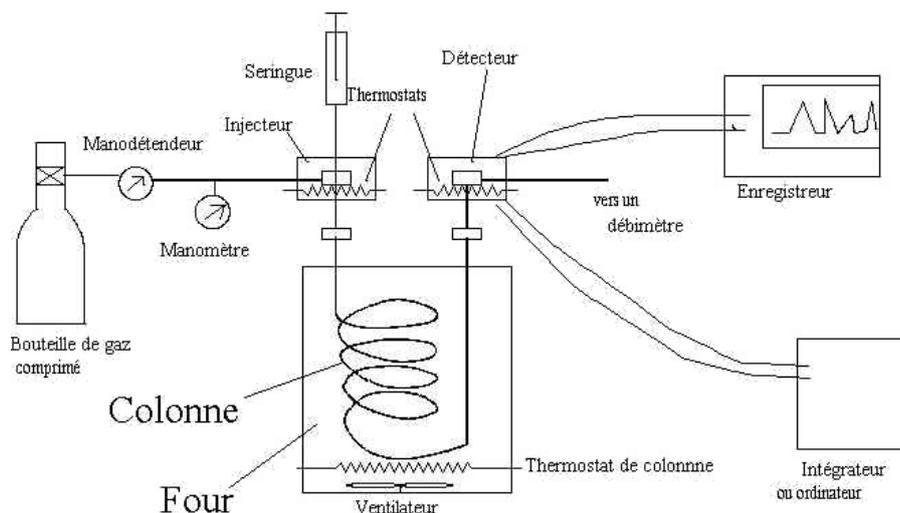


Figure V.1 : Schéma de la CPG

Cet appareil comprend schématiquement cinq parties : une source de gaz, une chambre d'injection, un four, dans lequel se trouve placé une colonne et un détecteur couplé à un enregistreur [45].

1- le gaz vecteur

La source de gaz (gaz porteur ou vecteur) constitue la phase mobile. Conservé sous pression dans des « bonbonnes » métalliques, le gaz passe dans des détendeurs permettant d'obtenir des pressions allant de 0.2 à 4 bars

Les principaux gaz utilisés sont : N₂, Ar, He, H₂. Ils doivent répondre à un certain nombre de critères : très grande pureté, inertie vis-à-vis des substances à chromatographier, très faible viscosité, compatibles avec le système de détection [45].

2- Injecteur

Il permet l'introduction de l'échantillon qui doit être vaporisé instantanément avant d'être transféré dans la colonne. Sa température doit être supérieure d'environ 20°C à la température du produit le moins volatil. A l'aide d'une seringue hypodermique de petite capacité, on pique au travers du septum, afin que l'extrémité de l'aiguille arrive au-dessous du niveau de l'arrivée du gaz porteur, puis on pousse le piston pour réaliser l'injection. Il faut que la chambre d'injection ait un volume aussi petit que possible, pour limiter les volumes morts du chromatographe [47].

3- Le four

Le four possède un volume important et son atmosphère est brassée par un système de ventilation. Très fréquemment on lui adjoint un dispositif de programmation qui, pendant une chromatographie, permet d'augmenter progressivement la température en fonction du temps, améliorant parfois très efficacement les séparations [47].

4- Colonne

C'est l'organe principal, elle est constituée d'un tube généralement métallique de diamètre intérieur de l'ordre du millimètre. Ce tube contient la phase stationnaire constituée par un liquide adsorbant fixé sur un solide inerte (ex : brique pilée, alumine etc... soigneusement calibrée). On distingue les colonnes à remplissage proprement dit, constituées d'une tubulure en verre, acier ou autre métal (les plus fréquentes sont en acier inoxydables), dont les dimensions varient de 2 à 6 mm pour le diamètre intérieur et de 1 à 10 m pour la longueur. Le support remplissant la colonne est constitué de grains dont les dimensions varient de 60 à 70 μm ; ils sont à base soit de matériau réfractaire soit de silice. [46,47]

5- Détecteur:

Il permet de mettre en évidence le passage des différents gaz séparés par la colonne. La détection peut être basée sur des techniques de mesures différentes. Le détecteur le plus utilisé en CPG est celui à conductibilité thermique appelé catharomètre. Sa température est généralement la même que celle de l'injecteur [46]. Il existe différents types de détecteurs voir tableau V.1

Tableau V.1 : les différents types de détecteurs

DETECTEUR	Gaz vecteur	Applications
Catharomètre	H ₂ /He	Tous composés
FID	He/N ₂	Composés organiques
Capture d'e ⁻	N ₂	Composés halogénés
Thermoionique	N ₂	Composés avec N ou P
Photométrie de flamme	N ₂ /H ₂	Composés avec S ou P

V.3 Principe de fonctionnement

L'échantillon est d'abord introduit en tête de colonne par l'intermédiaire d'une micro seringue qui va traverser une pastille en caoutchouc, appelée *septum*, pour se retrouver dans une petite chambre en amont de la colonne appelée *injecteur*. L'injecteur est traversé par le *gaz porteur* et porté à une température appropriée à la volatilité de l'échantillon. Les quantités injectées peuvent varier de 0.2 à 5.0 μl . Ensuite les différents composés de l'échantillon vont être emportés par le

gaz porteur (ou gaz vecteur) à travers la colonne et se séparer les uns des autres en fonction de leur affinité avec la phase stationnaire. La phase stationnaire va provoquer un phénomène de rétention chromatographique avec les différents composés (appelés solutés). Plus le composé a de l'affinité avec la phase stationnaire, plus il mettra du temps à sortir de la colonne. La grandeur expérimentale brute est appelée temps de rétention. C'est le temps qui s'écoule entre l'injection de l'échantillon et l'apparition du signal maximum du soluté au détecteur. Pour favoriser le transport de tous les composés à travers la colonne (élution), il faut déterminer la bonne température du four. En général, la température doit être supérieure à la température d'ébullition des composés. On peut travailler en isotherme, c'est-à-dire avec une température fixe durant toute l'analyse ou avec un programme de température qui varie.

A la sortie de la colonne, les composés rencontrent un élément essentiel qui est appelé détecteur. Cet élément évalue en continu la quantité de chacun des constituants séparés au sein du gaz porteur grâce à la mesure de différentes propriétés physiques du mélange gazeux. Le détecteur envoie un signal électronique vers un enregistreur (sorte d'imprimante) qui dessinera les courbes de chaque pic en fonction de leur intensité (courbe de type Gaussienne). L'ensemble des pics est appelé chromatogramme [45, 46, 47].

V.4 Analyse qualitative et quantitative en chromatographie

1. Analyse qualitative :

Elle sert essentiellement à l'identification des composants d'un mélange, et cela à l'aide du temps de rétention, c'est le temps que met le soluté à sortir de la colonne c'est à dire le temps écoulé entre l'injection et le maximum du pic du composé élué. Chaque composé a un temps de rétention bien spécifique à lui. Donc Pour identifier un composé inconnu on rapporte son temps de rétention, à celui d'un produit connu appelé témoin, injecté sur la même colonne, dans les mêmes conditions. On obtient ainsi une valeur où les valeurs de rétention indiquées correspondent à l'étalon, et à partir de la on peut identifier nos échantillons d'après le temps de rétention [46].

2. Analyse quantitative :

Une fois identifiés le ou les solutés intéressants, celui-ci permet l'analyse quantitative grâce à la relation: $m_i = K_i A_i$, qui relie la masse m du soluté i injecté à l'aire du pic A_i représentant ce soluté. Il est donc nécessaire de mesurer, le coefficient de proportionnalité K_i pour chaque pic obtenu.

La plupart des chromatogrammes donne l'aire des pics mais si celle-ci n'est pas donnée par le chromatogramme, on peut l'obtenir par la méthode suivante :

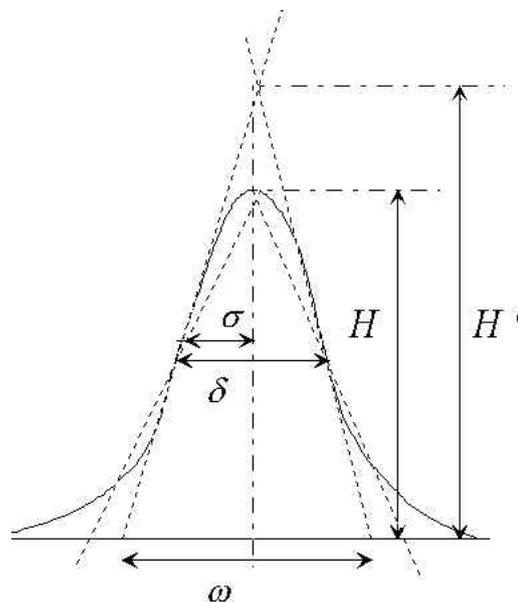


Figure V.2 : calcul de l'aire du pic

On assimile le pic à un triangle soit en traçant les tangentes aux points d'inflexion de la courbe et en calculant l'aire:

$A_i = \frac{1}{2} H' \omega$ soit en mesurant la largeur à mi-hauteur et en calculant l'aire par: $A_i = H \delta$, ou encore en mesurant les largeurs au quart (β) et aux trois quarts (γ) de la hauteur, grâce à la relation suivante [46] :

$$A_i = \frac{1}{2} H(\beta + \gamma)$$

Chapitre VI :

MATERIELS ET METHODES

La première étape de ce travail consiste à étudier, caractériser et optimiser les paramètres de croissance de la spiruline.

VI.1. La souche

Au cours de ce travail nous avons utilisé une souche de spiruline à partir d'un échantillon d'eau provenant du sud Algérien plus exactement de Tamanrasset. La souche a été obtenue sous forme de pommade, et mise à notre disposition dans son milieu de culture.

VI.2. Culture de la spiruline et conditions de croissance

Le milieu de culture doit être complet, procurant ainsi à la souche les éléments nécessaires à sa croissance. Il faut également fournir à la souche les conditions les plus favorables lui permettant ainsi un bon développement.

VI.2.1. Milieu de culture

Le milieu de culture utilisé pour la croissance de la spiruline est le milieu Zarrouk, son pH est de 9, il doit être conservé à l'abri de la lumière. La composition de ce milieu est donnée dans le tableau suivant :

Tableau VI.1: Composition chimique du milieu Zarrouk

Composés	teneur (g /l)
NaHCO ₃	16.8 g
K ₂ HPO ₄	0.50 g
NaNO ₃	2.50 g
K ₂ SO ₄	1.00 g
NaCl	1.00 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.20 g
CaCL ₂	0.04 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.01 g
EDTA	0.08 g

Pour 1 litre de la composition ci-dessus, ajouter 1 ml de chacune des solutions d'oligo-éléments A₅ et B₆.

Tableau VI.2: Composition chimique de la solution A₅

Oligo-éléments	teneur (g/l)
H ₃ BO ₄	2.86 g
MnCl ₂ . 4H ₂ O	1.81 g
ZnSO ₄	0.22 g
CuSO ₄	0.08 g
MoO ₃	0.01 g

Tableau VI.3 : Composition chimique de la solution B₆

Oligo-éléments	teneur (g/l)
NH ₄ VO ₃	229 x 10 ⁻⁴ g
K ₂ Cr (SO ₄) .24 H ₂ O	960 x 10 ⁻⁴ g
NiSO ₄ . 7H ₂ O	478 x 10 ⁻⁴ g
Na ₂ WO ₄	179 x 10 ⁻⁴ g
Ti ₂ (SO ₄) ₃	400 x 10 ⁻⁴ g
Co (NO ₃) ₂ . 6H ₂ O	44 x 10 ⁻⁴ g

Le milieu ainsi préparé est stérilisé à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes

VI.2.2. Les Conditions de croissance de la souche de spiruline

La culture de la souche de spiruline est menée à 34°C, dans des Erlenmeyers de 500 ml, sous une lampe fluorescente de différentes intensités 1000, 1500, 2000 lux, mesurés à l'aide d'un luxmètre. La spiruline est exposée à 12 h de lumière et 12 h d'obscurité.

L'agitation ainsi que l'aération sont assurées toutes les heures durant 1 minute à l'aide d'une pompe. La concentration de la biomasse et le PH sont mesurés chaque jour, afin de suivre le développement et la croissance de la spiruline. L'aspect de cette dernière, sa couleur ainsi que des observations microscopiques sont également suivis tous les jours.

VI.3. Evaluation de la concentration cellulaire

La concentration cellulaire est estimée par spectrométrie à 618 nm (Spectromètre mini 1240 SHIMADZU). La suspension cellulaire est diluée de façon à obtenir une densité optique comprise entre 0.05 et 0.2 unités d'absorbance, afin de rester dans la zone de linéarité de la gamme étalon de la densité optique en fonction du poids sec.

• La courbe étalon

Nous avons établi le lien entre la densité optique et le poids sec de l'algue qui représente la concentration cellulaire. L'estimation de la biomasse sèche exprimée en g/l est mesurée comme suit :

Un volume connu de culture est filtré, le filtre est mis dans une étuve à 90°C pendant 5 heures. Ayant déjà pesé le papier filtre vide, après 5 heures de temps à la sortie de l'étuve les papiers filtres sont de nouveau pesés. La différence de masse permet de déterminer la masse sèche.

VI.4. Contrôles de la contamination de la souche

Il est vrai que la spiruline ne se contamine pas facilement par les microorganismes, du fait de son pH élevé qui inhibe la croissance de la plus part des contaminants. Néanmoins il est important de prendre des précautions lors des manipulations, car il peut exister des microorganismes qui peuvent tolérer un pH élevé comme les *streptocoques*, les *chlorelles* (algues vertes monocellulaires comestibles), ou bien des cyanobactéries toxiques tel que

Oscillatoria. C'est pourquoi on faisait un examen journalier d'un échantillon de spiruline grâce à une observation au microscope optique.

VI.5. L'effet de l'intensité lumineuse sur la culture de la spiruline

La spiruline se multiplie par la photosynthèse en utilisant la lumière comme source d'énergie. Donc l'intensité lumineuse à une forte influence sur la croissance et le bon développement de la souche.

Plus la spiruline reçoit de la lumière plus sa croissance est rapide, il faut savoir également qu'une forte intensité conduit à une photolyse, qui se manifeste par un éclatement des cellules.

La couleur de la culture de spiruline donne une indication sur l'état des cellules. Dans les meilleures conditions de croissance, la couleur de la spiruline est bleu vert foncé, une couleur jaunâtre de la culture indique une photolyse.

La spiruline flotte généralement à la surface pour chercher de la lumière lorsque celle-ci est faible, c'est l'une de ses principales caractéristiques qui la différencie des autres cyanobactéries, cela est signe d'un bon développement. Mais une forte intensité lumineuse fait tomber les filaments d'algues au fond. Donc lorsqu'elle décante ça signifie qu'elle est stressée et il faut vite agir afin d'éviter la mort des cellules.

Tous ces paramètres nous donnent ainsi une indication sur l'intensité lumineuse qu'il faut choisir pour une concentration connue de la culture. Donc afin de trouver le bon équilibre entre la concentration cellulaire et l'intensité lumineuse, nous avons pris 3 échantillons de spiruline de différentes concentrations 0.5 g/l , 1g/l , 2g/l ,et chacun de ces échantillons a été exposé à différentes intensités lumineuses 800 , 1000 , 2000 , 3600 , 5000 lux .

VI.6. Cinétique de croissance de la spiruline

L'étude de la croissance d'une culture constitue le premier chemin vers des connaissances de base sur la souche. Il est important de suivre l'évolution de la cinétique de croissance de la spiruline, afin de déterminer le taux maximal de croissance.

Ayant déjà optimisé les paramètres de croissance, nous avons suivi au cours du temps le développement de la spiruline dans les conditions les plus favorables à sa croissance.

Cette étude a donc été faite sur une culture de spiruline avec une concentration de 0.9 g/l sous une intensité lumineuse de 1000 lux.

VI.7. Etudes de la relation entre la vitesse de croissance et le pH

L'étude de l'évolution de la vitesse de croissance en fonction du pH est en effet essentielle afin d'obtenir une relation qui existe entre ces deux paramètres. Nous pouvons ainsi déterminer le pH le plus favorable à une croissance maximale.

Sachant que pour une culture de spiruline, le pH augmente en fonction du temps, arrivé à une certaine valeur, le milieu s'épuise il est donc nécessaire de le renouveler.

Après avoir étudié la croissance de la spiruline nous nous intéresserons dans cette deuxième partie, à la production d'hydrogène

VI.8. Production d'hydrogène par la spiruline

Comme nous l'avons évoqué précédemment la plupart des cyanobactéries produisent de l'hydrogène. Donc le but de notre travail est de prouver que même la spiruline qui est elle-même une cyanobactérie, possède la capacité de produire de l'hydrogène.

Il a ainsi fallu dans un premier temps, trouver le bon protocole menant la spiruline à produire de l'hydrogène.

VI.8.1. La Production d'hydrogène en présence de lumière

Le milieu utilisé pour la production est le milieu de croissance Zarrouk appauvrie en azote avec 5 mg /l de NaNO₃. Dans un flacon de 500ml nous avons introduit 250 ml de biomasse avec une concentration de 1g/l, sous des conditions d'anaérobiose. Les flacons ont été bien fermés et bouchés à l'aide du Teflon pour empêcher une contamination par l'air.

Afin d'éliminer l'oxygène dissous dans le milieu nous avons ajouté 2 g de di thionate de sodium (Na₂S₂O₄) avec 5 minutes d'agitation. Le milieu est également barboté à l'azote pendant une heure et cela pour chasser l'oxygène qui inhibe la production d'hydrogène. Nous procéderons ensuite à un sous vide pour éliminer toutes traces d'oxygène et créer un environnement favorable à la production d'hydrogène. Le flacon est alors incubé à une température de 32°C, durant 26 h avec 12 h d'obscurité et 14h en présence de lumière sous une

intensité lumineuse de 1000 lux, et sous agitation. Après 26 h de temps le gaz obtenue est analysé par chromatographie phase gazeuse [50].

VI.8.2. La production d'hydrogène à l'obscurité

La production d'hydrogène par ce protocole, constitue les mêmes étapes évoquées précédemment lors de la production en présence de lumière. L'incubation se fait toujours à 30°C et sous agitation, la seule différence réside dans le fait que les flacons sont incubés pendant 24 h à l'obscurité [49]. La quantité de biomasse utilisée est de 250 ml, avec une concentration de 1g/l.

VI.9. Production d'hydrogène avec une carence en soufre

Le milieu de production utilisé est le milieu Zarrouk appauvri en azote et en soufre, le soufre est introduit à l'état de traces [25 ,49]. Dans ce cas les deux protocoles sont utilisés : la production à l'obscurité et la production en présence de lumière. La concentration de la culture est de 1 g/l.

VI.10. Effet de l'intensité lumineuse sur la production d'hydrogène

L'étude de l'effet de l'intensité lumineuse sur la production d'hydrogène est un paramètre très important, afin d'optimiser la production et de déterminer la meilleur intensité qu'il faudrait utiliser.

Le milieu de production est le milieu Zarrouk appauvrie en soufre. L'étude a été faite sur 3 flacons différents avec la même concentration égale à 0.8 g/l et les flacons ont été exposés a différentes intensités lumineuses 1000 lux, 2000 lux et 3000 lux.

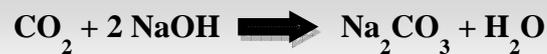
VI.11. Effet de la concentration sur la production d'hydrogène

La concentration de la culture est également un paramètre important dans la production d'hydrogène. Afin de déterminer la concentration de la culture qui donne la meilleure production d'hydrogène, nous avons utilisés trois flacons avec différentes concentrations : 0.4 g/l, 1.5 g/l, 2 g/l les flacons sont exposés à la même intensité lumineuse qui est égale à 1000 lux.

VI.12. Mesure de l'hydrogène produit

Le flacon utilisé pour la production d'hydrogène est directement relié à une colonne de récupération du biogaz produit. La colonne est remplie avec du NaOH 20%, et plongé dans un récipient contenant une solution saturé de NaCl 20%, cette dernière permet de maintenir l'anaérobiose afin d'empêcher le passage d'autres gaz autre que le biogaz.

Le volume déplacé dans la colonne correspond au volume des gaz contenus dans le flacon. Le CO₂ sera piégé par le NaOH d'après la réaction suivante :



Donc les gaz récupérés dans la colonne correspondront au biogaz produit (H₂), ainsi que le gaz barboté (N₂).

L'analyse du biogaz produit a été effectuée par chromatographie en phase gazeuse. Le chromatographe utilisé était un GC-14A de Shimadzu (Japon) (figure VI.1) équipé d'un intégrateur CR8A. L'échantillon gazeux est entraîné par l'argon (phase mobile) qui balayait de manière continue la colonne (CTR I, Alltech).

La colonne, l'injecteur et le détecteur sont maintenus à des températures de 100 °C, 120°C, 120°C respectivement.



Figure VI.3 : schéma de la CPG

Chapitre VII :

RESULTATS ET DISCUSSIONS

VII.1 Etude de la croissance de la spiruline

• La courbe étalon

La courbe étalon a été réalisée afin de calculer la concentration de la culture de spiruline avec une simple lecture de la densité optique.

Différentes DO ($\lambda = 618 \text{ nm}$) en fonction de la concentration de la biomasse sont données dans la figure VII.1

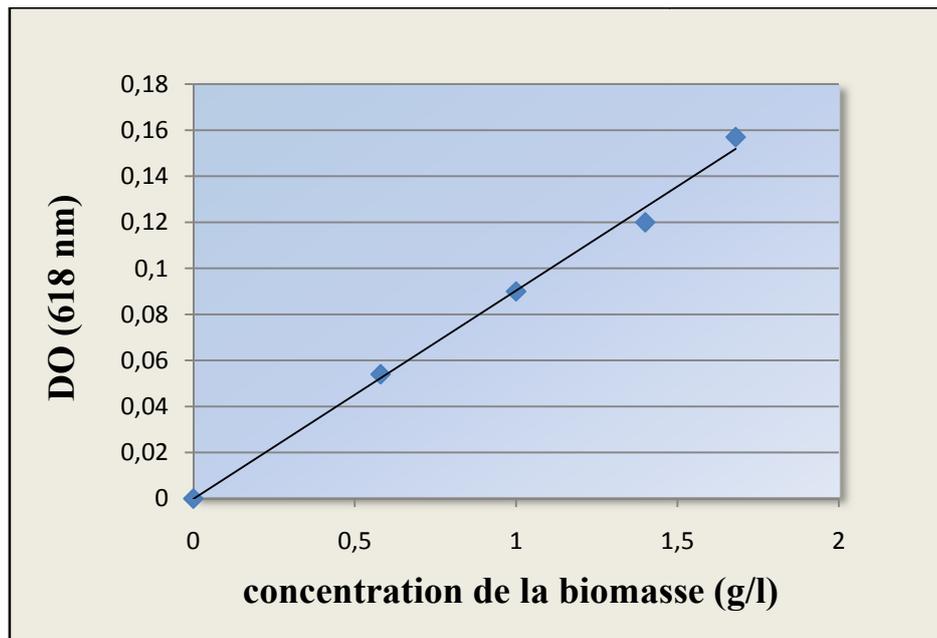


Figure VII.1 : Courbe étalon mettant en relief la relation entre la DO et le poids sec de la souche

D'après la loi de Beer Lambert la relation qui relie la DO et le poids sec est la suivante :

$$DO = \varepsilon P_s \quad P_s = \frac{DO}{0.92}$$

VII.2 Observation au microscope optique

L'observation au microscope optique avec un agrandissement X 40, permet de fournir des détails sur la pureté de la souche. Lors de l'observation on ne remarque aucune cellules étrangères autre que celles de la spiruline qui dans notre cas à la forme de filaments avec quelques spirales. Notre souche n'est donc pas contaminée, néanmoins il est nécessaire de la surveiller tout les jours.

VII.3 Influence de l'intensité lumineuse sur la culture de la souche

Afin de mieux comprendre la relation qui existe entre la concentration cellulaire et l'intensité lumineuse, différentes concentrations de la souche ont été exposées à différentes intensités lumineuse. Les résultats sont illustrés dans les figures suivantes :

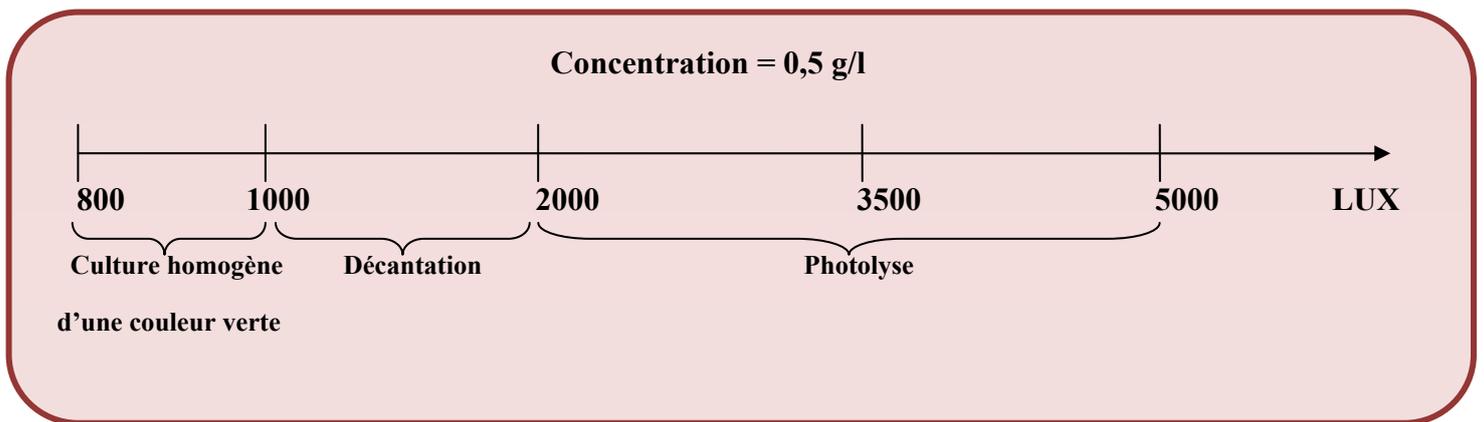


Figure VII.2 : Effet de la lumière sur une concentration de l'ordre de 0,5 g/l

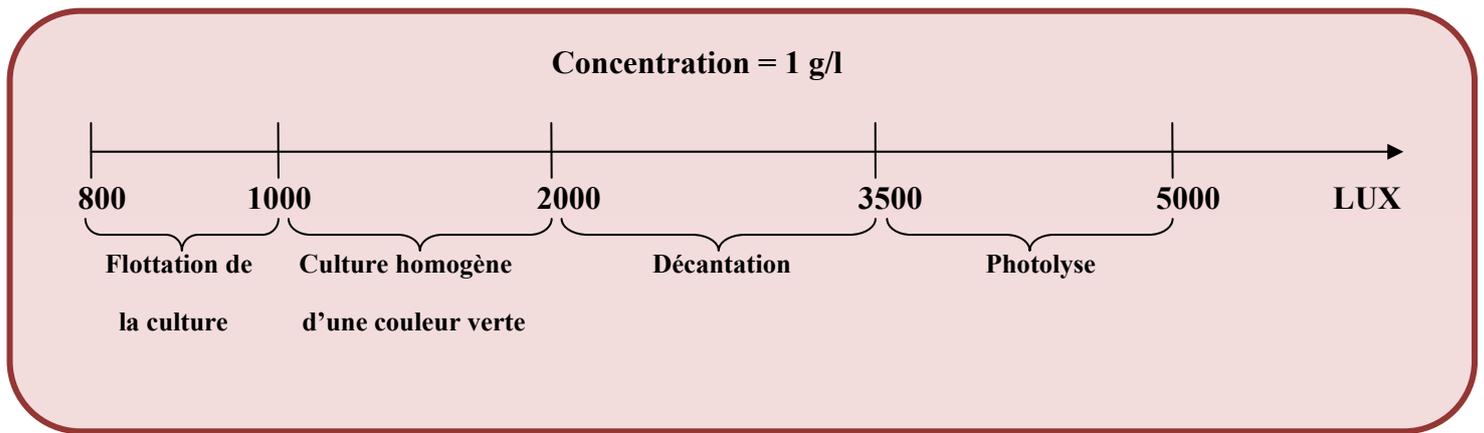


Figure VII.3 : Effet de la lumière sur une concentration de l'ordre de 1 g/l

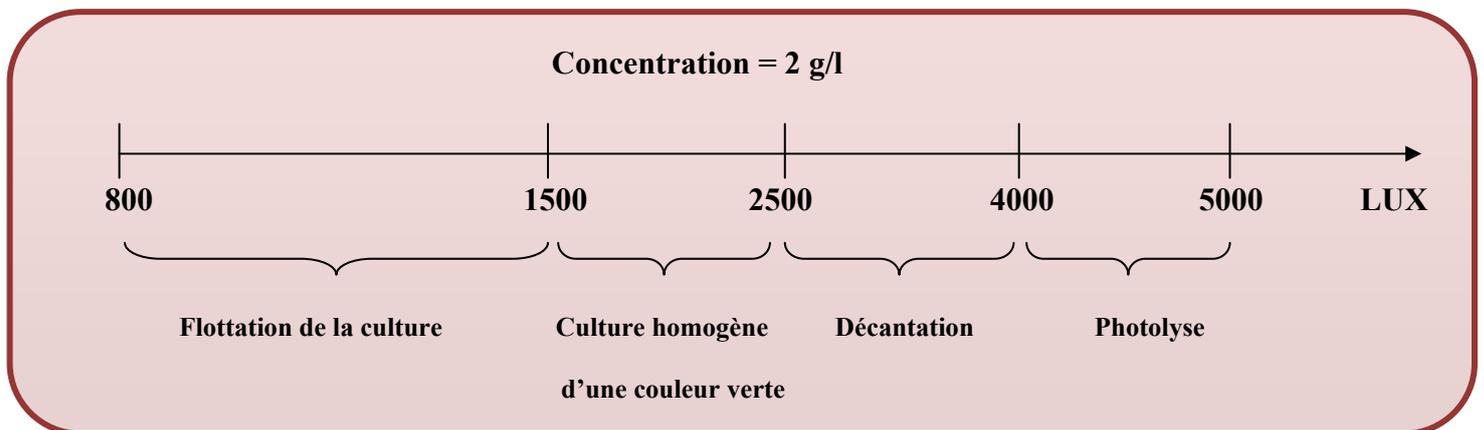


Figure VII.4 : Effet de la lumière sur une concentration de l'ordre de 2 g/l

- D'après ces résultats, on constate que pour une culture de concentration 0.5 g/l l'intensité lumineuse approprié est de 1000 lux.
- Une culture de concentration de 1 g/l doit être exposée à une intensité allant de 1000 à 2000 lux.
- Et enfin pour une culture de 2 g/l l'intensité lumineuse doit varier entre 1500 et 2500 lux.

En conclusion, cette étude nous a permis de trouver la bonne intensité lumineuse permettant un bon développement de la culture en évitant bien sur la photolyse.

VII.4 Etude de la cinétique de croissance de la culture de spiruline

Au cours de la cinétique de croissance de la spiruline nous avons suivi l'évolution de la concentration cellulaire de la culture en fonction du temps. Les résultats obtenus sont résumés dans la figure VII.5

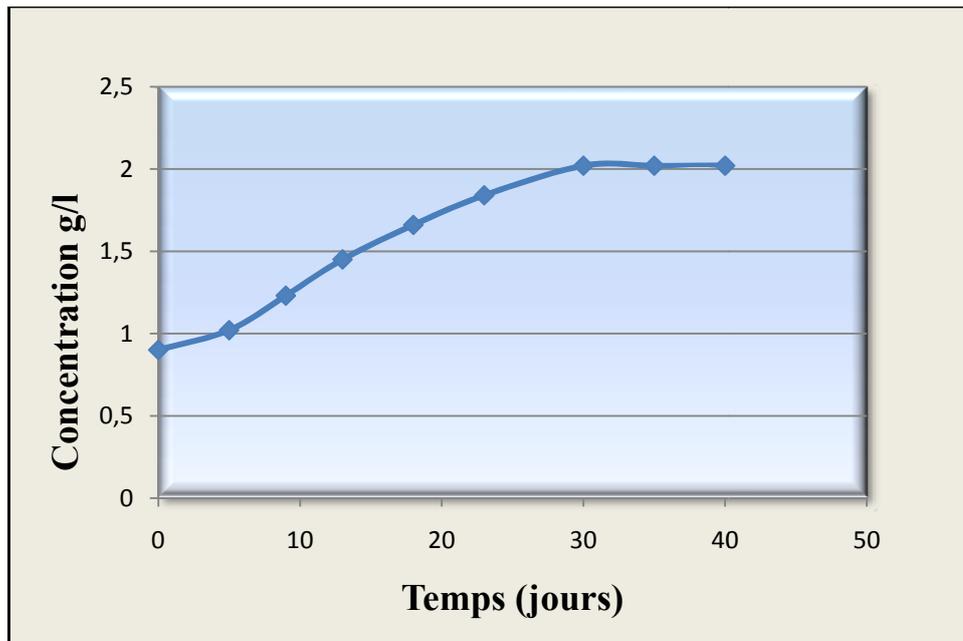


Figure VII.5 : Courbe de croissance de la souche de spiruline

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

- Une première phase dans l'intervalle de temps [0 j, 5 j], la légère remontée de la courbe correspond à la phase d'accélération, la présence de cette phase est due au changement de pH du milieu.
- Une deuxième phase dans l'intervalle de temps [5 j, 25 j]. L'accroissement de la courbe correspond à la phase exponentielle. Cet accroissement de la concentration cellulaire s'explique par une utilisation du substrat qui est abondant dans le milieu et qui permet à la spiruline de se multiplier de façon exponentielle.

- Une troisième phase dans l'intervalle de temps [25 j, 30 j]. On remarque un léger ralentissement de la croissance du au commencement de l'épuisement du substrat, et a l'accumulation des déchets.
- Une quatrième phase dans le domaine de temps [30 j, 40 j]. un palier est atteint, et il correspond à la phase stationnaire, avec un taux de croissance quasi nul. Durant cette phase on est face à un épuisement du substrat, dans ce cas il est donc nécessaire de renouveler le milieu de culture au bout de 30 j.

Le calcul du taux de croissance maximal est régit par la loi suivante :

$$\mu x = \frac{dx}{dt} \quad \Rightarrow \quad \mu = \frac{\ln x - \ln x_0}{t - t_0}$$

Dans notre cas le taux de croissance maximal est de l'ordre de 0,033 g/l h

Ce taux de croissance est inférieur a celui obtenus dans les lacs naturels. Cela est du au changement de conditions. Les conditions trouvées au laboratoire ne correspondent pas tout à fait aux conditions trouvées dans la nature. C'est pour ces raisons que le taux de croissance d'une souche cultivée au laboratoire est inférieur à celle cultivée naturellement dans les lacs ou bien dans les bassins.

VII.5 Effet du pH sur la vitesse de croissance

Le pH a également une influence sur la vitesse de croissance de la culture. C'est pour cette raison que nous avons suivie l'évolution de la vitesse de croissance en fonction du pH du milieu. Ainsi les résultats de cette étude sont illustrés dans la figure VII 6.

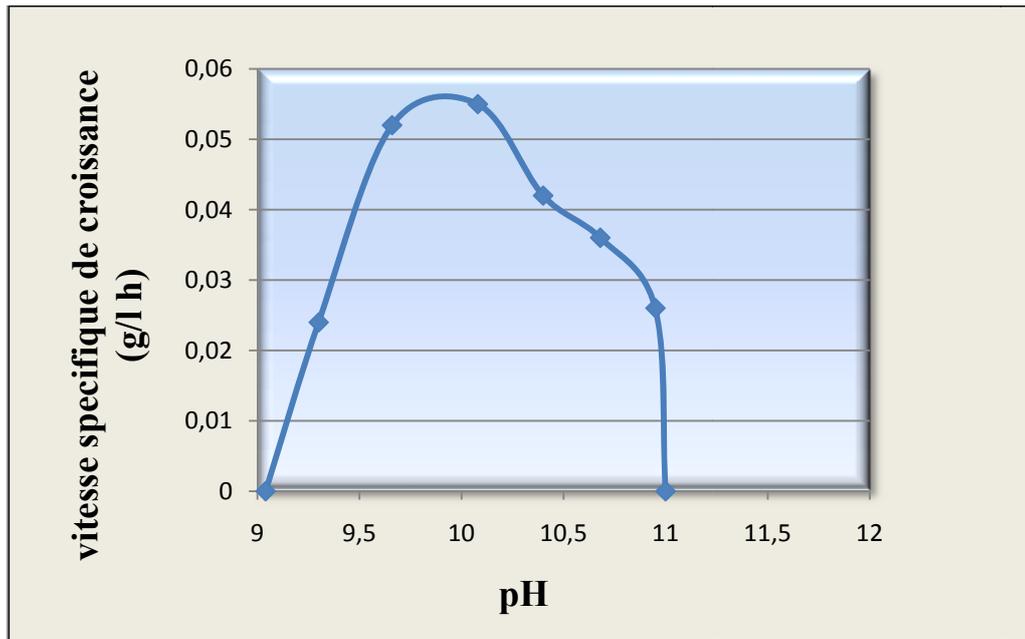


Figure VII.6 : Relation entre pH et vitesse spécifique de croissance

D'après la figure VII.6, nous remarquons que la vitesse de croissance atteint son maximum pour un pH de 10. Au delà de cette valeur ; plus le pH augmente plus la vitesse de croissance diminue cela se traduit par un épuisement du substrat. Plus le substrat s'épuise plus le pH augmente. Cela est dû à la croissance cellulaire, car durant la photosynthèse la spiruline fixe le carbone contenu dans le milieu, et pour chaque mole de carbone fixée la spiruline libère 1,196 moles d'ions hydroxydes OH^- dans le milieu de culture, c'est la libération de ces ions OH^- qui fait augmenter le pH du milieu.

Nous remarquons également que lorsque le pH atteint une valeur de 11 cela signifie que le taux de croissance est nul. Il est donc nécessaire de renouveler le milieu de croissance lorsque celui-ci atteint une valeur de 11, et d'après les expériences effectuées le pH du milieu de croissance atteint cette valeur au bout d'un mois. Les résultats obtenus sont similaires à ceux obtenus par D.Fox.Ripley [32].

VII.6 L'étude de la production d'hydrogène par la spiruline

VII.6.1 Etalonnage le la CPG

Avant de procéder à l'analyse par la CPG, il faudrait dans un premier temps étalonner cette dernière, afin de pouvoir identifier le biogaz produit.

Avec un débit total $Q = 1$ l/h, nous avons injectés 25% d' H_2 et 75% d' N_2

Les pics des deux gaz injectés ainsi que leurs temps de rétention sont illustrés dans la figure suivante :

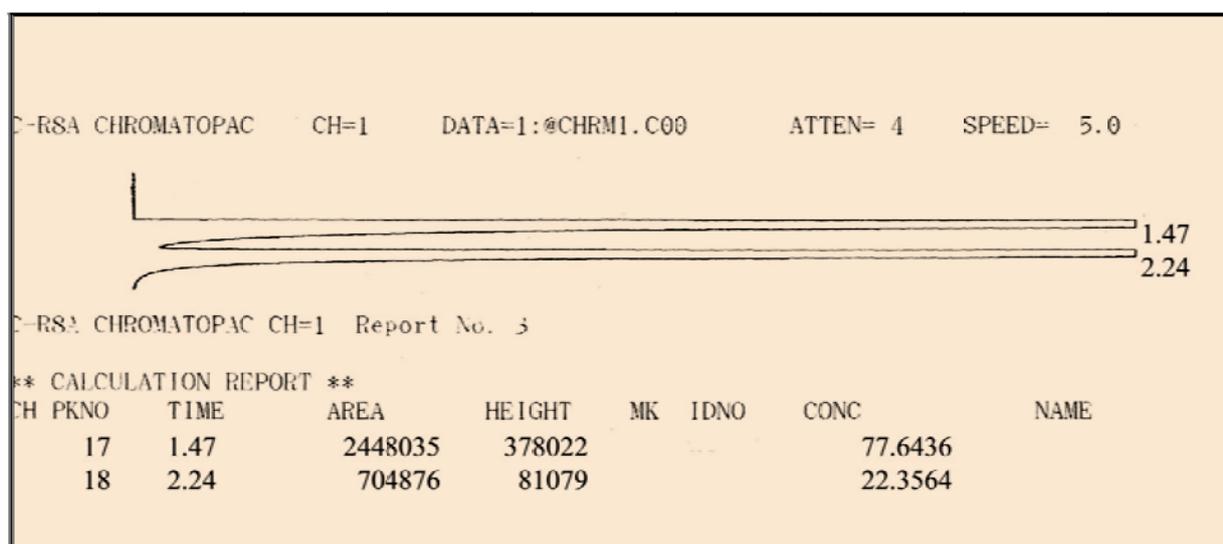


Figure VII.7 : Chromatogramme obtenu après étalonnage de la CPG

Le gaz hydrogène étant plus léger que l'azote, sort en premier donc le premier pic correspond à l'hydrogène avec un temps de rétention $t_R = 1.47$

Le deuxième pic correspond à l'azote, son temps de rétention $t_R = 2.24$

A l'aide de ces temps de rétention nous pouvons identifier le biogaz produit par la spiruline.

VII.6.2 Production d'hydrogène en présence de lumière

Comme nous l'avons évoqué précédemment dans le chapitre matériels et méthodes, la concentration de la culture est de 1g/l, et le biogaz produit est récolté dans une colonne.

Le biogaz contenu dans la colonne est introduit dans la CPG à l'aide de l'azote, qui pousse le biogaz vers l'appareil. Les pics obtenus par la CPG sont illustrés dans la figure VII.6

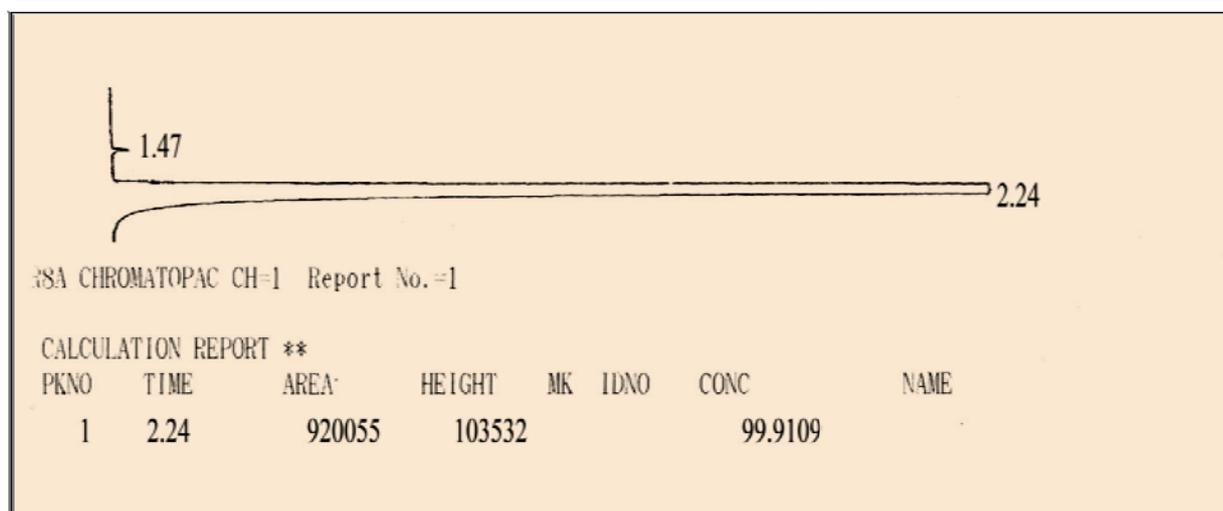


Figure VII.8 : Chromatogramme obtenu pour une concentration de 1g/l à une intensité lumineuse de 1000 lux

D'après la figure ci-dessus, nous avons obtenu un grand pic avec un temps de rétention égale à 2.24 correspondant à l'azote et un tout petit avec un temps de rétention de 1.47 correspondant à l'hydrogène. Donc par ce protocole de production, nous avons obtenu des traces d'hydrogène.

Afin d'améliorer la production nous avons modifié quelques paramètres comme l'intensité lumineuse et la concentration de la culture, mais les résultats étaient toujours les mêmes, l'hydrogène produit est à l'état de traces.

Les quantités minimales d'hydrogène obtenues sont dues à la présence d'oxygène [26]. Sachant que durant le processus de production, 25% de l'hydrogène est produit pendant la phase obscure et les 75% d'hydrogène sont produits pendant la phase lumineuse [27].

Nous savons également qu'en présence de lumière, la spiruline libère de l'oxygène et cela par le processus de la photosynthèse. Donc l'oxygène ainsi produit inhibe l'enzyme responsable de la production d'hydrogène [26]. Ce qui explique les faibles quantités d'hydrogène obtenues.

VII.6.3 Production d'hydrogène à l'obscurité

Ce protocole a été utilisé durant longtemps par les chercheurs, son principe met en œuvre les capacités du métabolisme fermentatif de la spiruline à produire de l'hydrogène.

Les résultats ainsi obtenus sont représentés dans la figure VII.9

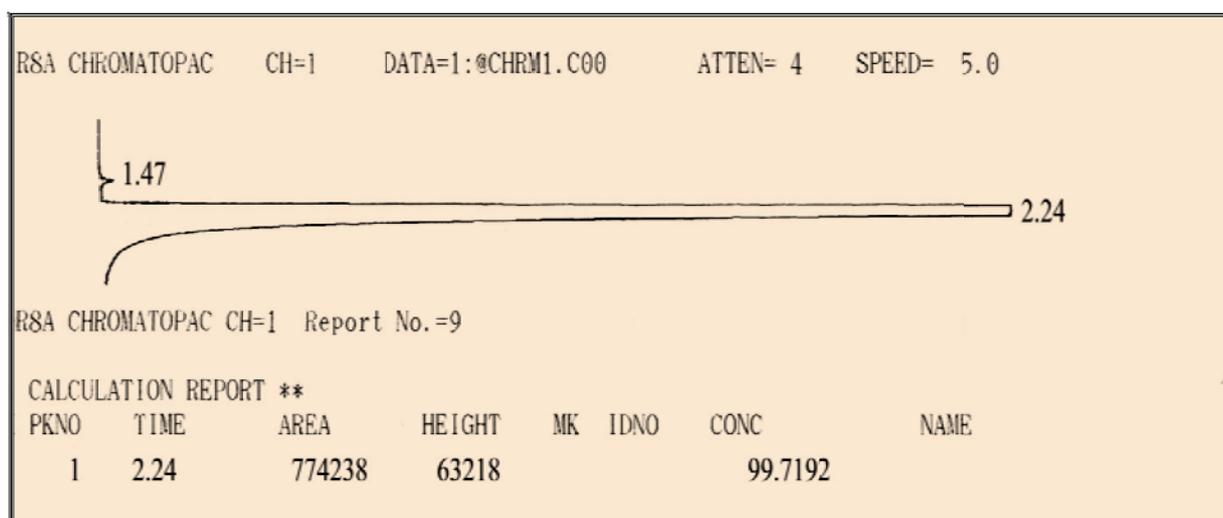


Figure VII.9 : Chromatogramme obtenu pour une concentration de 1g/l à l'obscurité

L'hydrogène obtenu par cette méthode est à l'état de traces, afin d'optimiser la production par ce protocole nous avons utilisé différentes concentrations de la culture, mais les résultats n'ont pas changé l'hydrogène est toujours présent à l'état de traces. Ces résultats confirment ce qui a été dit précédemment [26], c'est-à-dire que durant la phase obscure une très petite quantité d'hydrogène est produite, et elle est de l'ordre de 25%.

VII.7 Production d'hydrogène avec une carence en soufre

N'ayant pas obtenu une grande quantité d'hydrogène avec les deux derniers protocoles, et après avoir suggérer que la principale cause était l'oxygène, nous avons tenté d'améliorer les résultats en utilisant un milieu de production différent de celui utilisé précédemment, nous avons donc utiliser un milieu qui présente une carence en soufre [25].

L'étude a été faite sur une concentration de 1g/l, exposée à une intensité lumineuse de 1000 lux. Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure VII.10

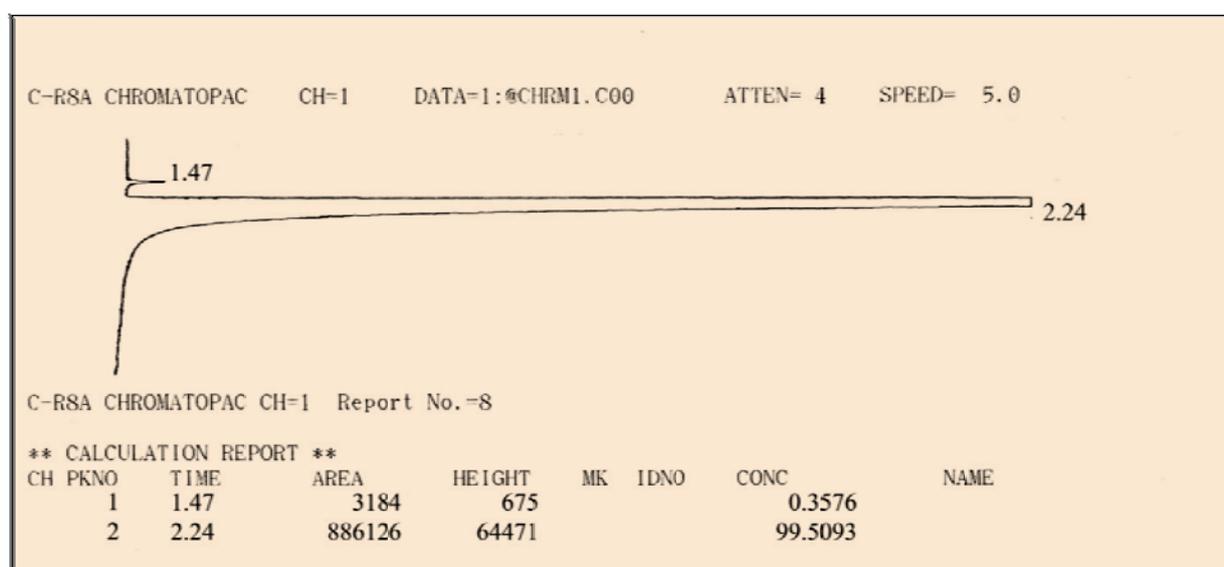


Figure VII.10 : chromatogramme obtenu pour une concentration de 1 g/l avec une intensité lumineuse de 1000 lux

Le premier pic obtenu correspond a celui de l'hydrogène, donc par cette méthode nous avons enfin réussi à produire de l'hydrogène.

En utilisant ce protocole notre but était d'inhiber la production d'oxygène en présence de lumière, nous avons donc utilisé un milieu de production appauvrie en soufre. Avec une carence en soufre le photosystème II qui est responsable de la production d'oxygène à été inhibé, nous n'avons donc pas eu de dégagement d'oxygène, et cela a donc permis une production d'hydrogène [26, 27, 28].

La quantité d'hydrogène obtenue est calculée à travers la relation suivante :

$$X_{H_2} = K_f \cdot S_i$$

S_i représente l'aire du pic, il est donné par le chromatogramme

K_f c'est le facteur de réponse spécifique à l'hydrogène, et il est calculé comme suit :

Lors de l'étalonnage de l'appareil 25% d'hydrogène a été injecté, donnant une surface S_i du pic

$$K_f = \frac{X_{H_2}}{S_i} = \frac{25}{2448035} = 1.02 \cdot 10^{-5}$$

Donc : $X_{H_2} = 1.02 \cdot 10^{-5} \cdot 3184 = 0.032\%$

La quantité d'hydrogène produite en pourcentage massique est égale à 0.032%

Donc pour une concentration de 1g/l et une intensité lumineuse de 1000 lux, le pourcentage massique de l'hydrogène est égale à 0.032%.

VII.8 Production d'hydrogène avec une carence en soufre à l'obscurité

L'étude de la production d'hydrogène avec un milieu appauvri en soufre a été également établie avec ce protocole à l'obscurité. Les résultats obtenus ont montré que l'hydrogène est présent à l'état de trace, donc même en essayant d'optimiser les paramètres, ce protocole de production à l'obscurité nous donnera toujours des traces d'hydrogène.

VII.9 Effet de l'intensité lumineuse sur la production d'hydrogène

Après avoir trouver le bon protocole de production en utilisant un milieu appauvri en soufre, nous avons essayé d'optimiser quelques paramètres afin de permettre une meilleure production d'hydrogène.

La luminosité joue un rôle très important dans le processus de production d'hydrogène, sachant que 75% de l'hydrogène est produit durant cette phase, nous avons donc tenté de trouver l'intensité lumineuse qui donne la meilleure production. Une concentration de 0.8 g/l à été

exposé à trois intensités lumineuses différentes 1000, 2000, 3000 lux. Les résultats obtenus sont donnés dans les figures VII.11

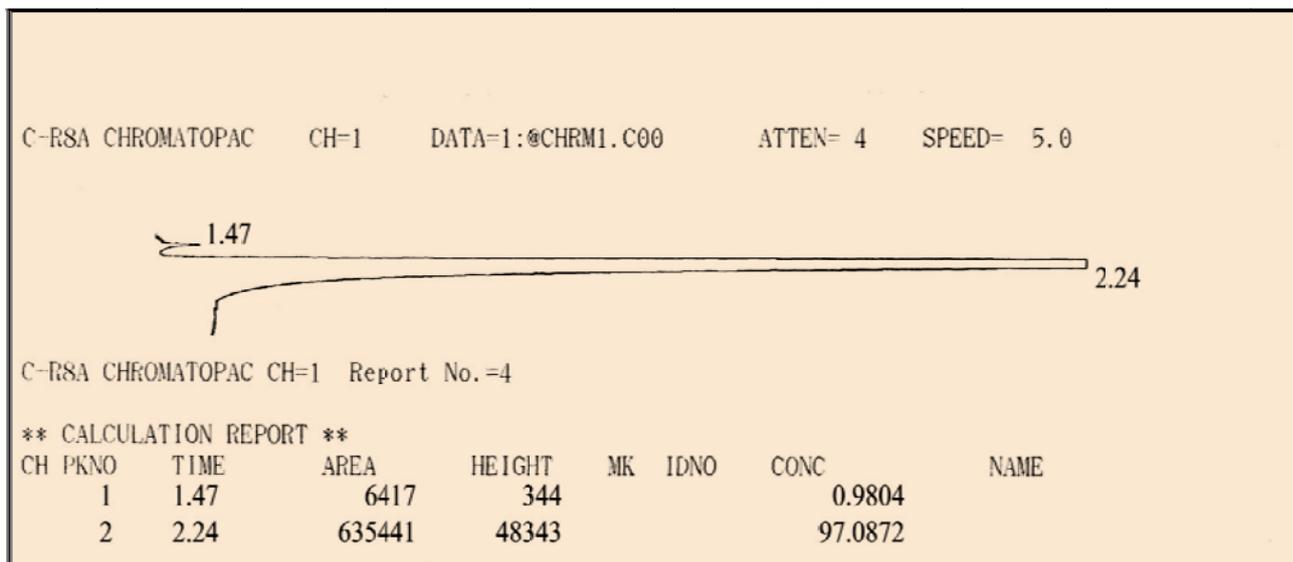


Figure VII.11 : Chromatogramme obtenu pour une concentration de 0,8 g/l sous une intensité lumineuse de 1000 lux.

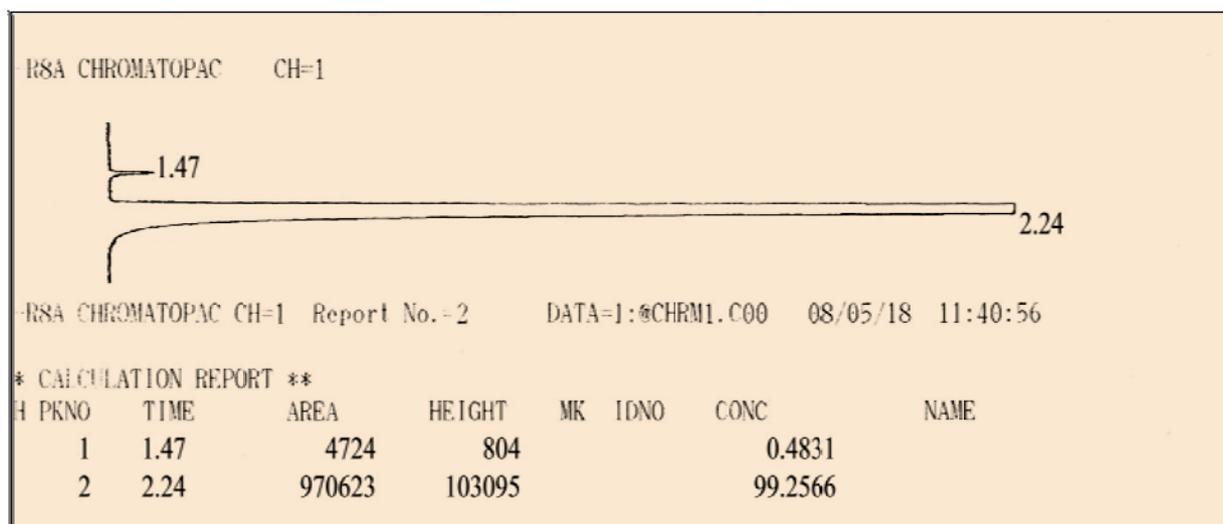


Figure VII.12 : Chromatogramme obtenu pour une concentration de 0,8 g/l sous une intensité lumineuse de 2000 lux.

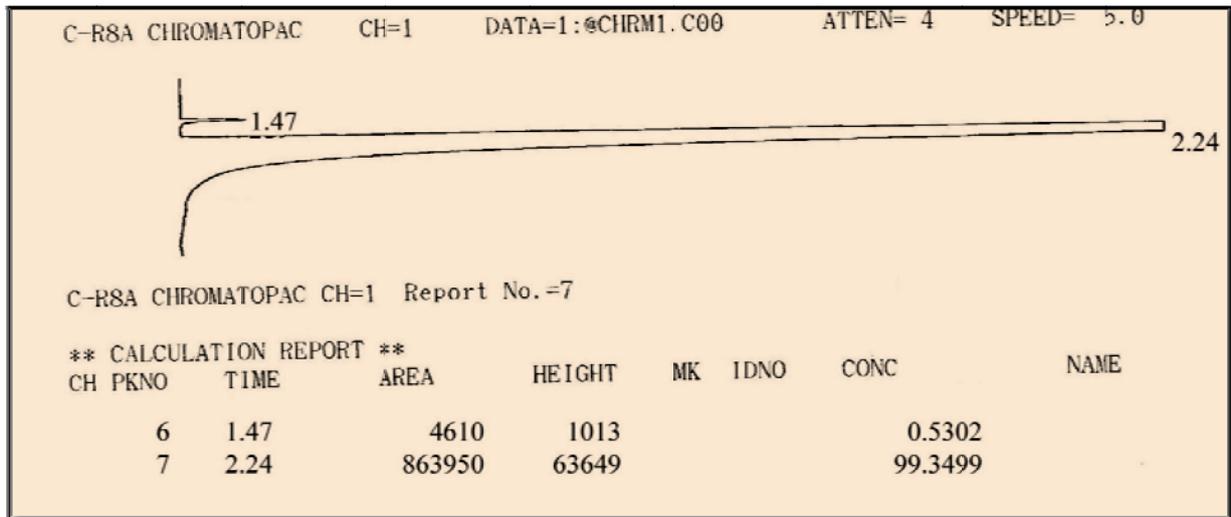


Figure VII.13 : Chromatogramme obtenu pour une concentration de 0,8 g/l sous une intensité lumineuse de 3000 lux.

Afin de comparer les résultats obtenus, il est nécessaire de calculer la quantité d'hydrogène produite pour chaque intensité lumineuse.

Intensité lumineuse = 1000 lux

$$X_{H_2} = K_f \cdot S_i = 1.02 \cdot 10^{-5} \cdot 6472 = 0.066 \%$$

Intensité lumineuse = 2000 lux

$$X_{H_2} = K_f \cdot S_i = 1.02 \cdot 10^{-5} \cdot 4724 = 0.048 \%$$

Intensité lumineuse = 3000 lux

$$X_{H_2} = K_f \cdot S_i = 1.02 \cdot 10^{-5} \cdot 4610 = 0.047 \%$$

Les résultats ainsi obtenus sont regroupés dans la figure VII.14 donnant la quantité d'hydrogène en fonction de l'intensité lumineuse

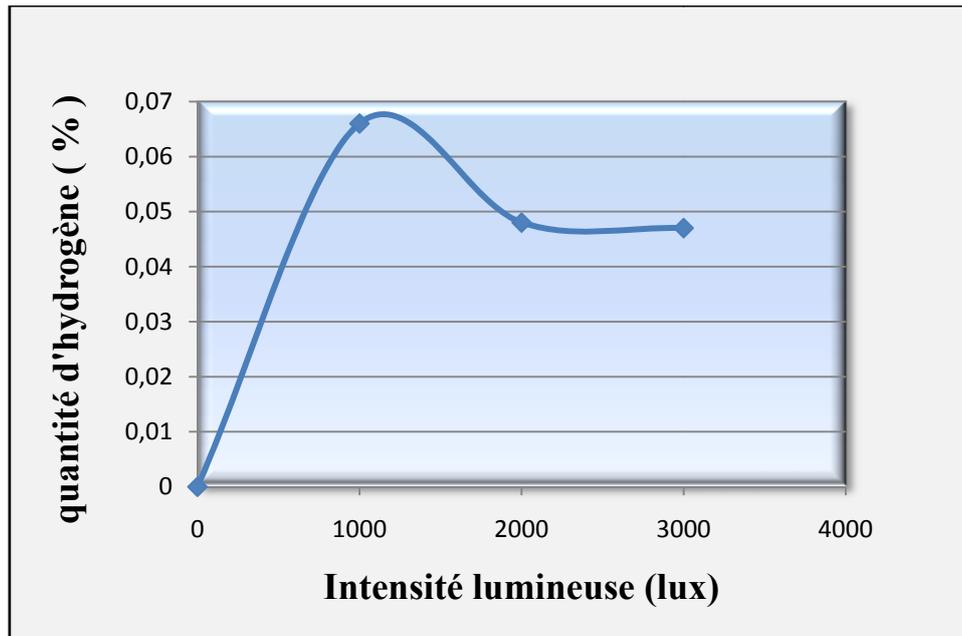


Figure VII.14 : Etude de l'effet de l'intensité lumineuse sur la production d'hydrogène

D'après les résultats illustrés dans le graphe ci-dessus, la quantité maximum de l'hydrogène produit est obtenue pour une intensité lumineuse de 1000 lux. Avec l'augmentation de la lumière, on remarque une diminution de la production d'hydrogène, celle-ci se stabilise ensuite entre 2000 et 3000 lux.

Arrivé à un certain seuil l'augmentation de l'intensité lumineuse a peut-être un effet de saturation observé à des intensités excessives [48].

VII.10 Effet de la concentration cellulaire sur la production d'hydrogène

Il est clair que la concentration cellulaire influence énormément la production d'hydrogène, donc afin d'établir une relation entre la concentration et la production d'hydrogène. Nous avons tenté de produire de l'hydrogène avec trois concentrations différentes 0.4 g/l, 1.5g/l et 2 g/l ces concentrations ont été exposées à une intensité lumineuse de 1000 lux.

L'analyse du biogaz par CPG a donné les résultats suivants :

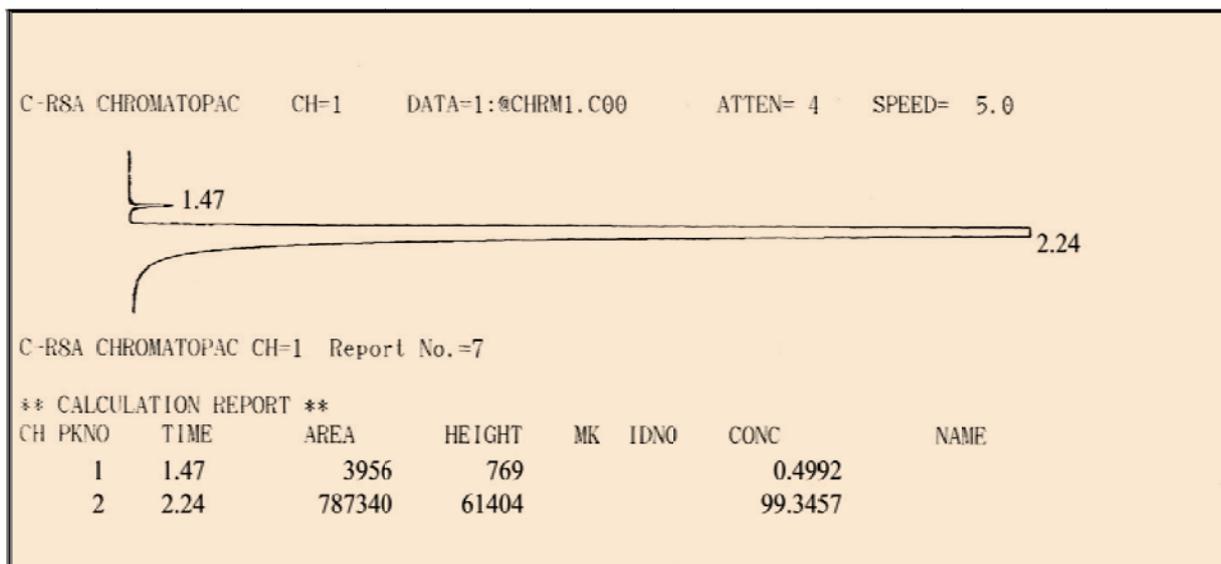


Figure VII.15 : Chromatogramme obtenu pour une concentration de 0,4 g/l sous une intensité lumineuse de 1000 lux.

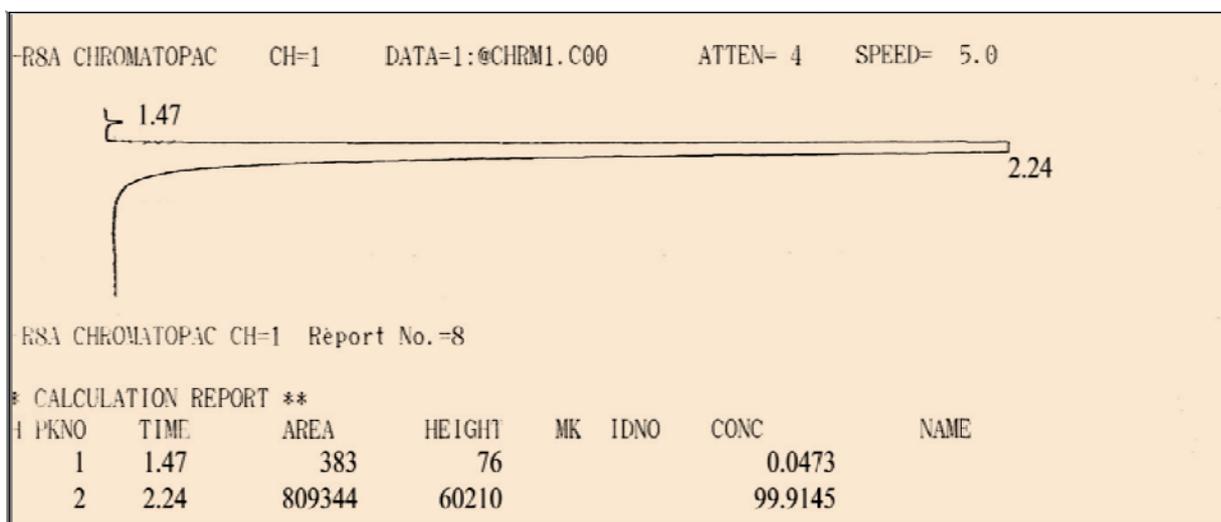


Figure VII.16 : Chromatogramme obtenu pour une concentration de 1,5 g/l sous une intensité lumineuse de 1000 lux.

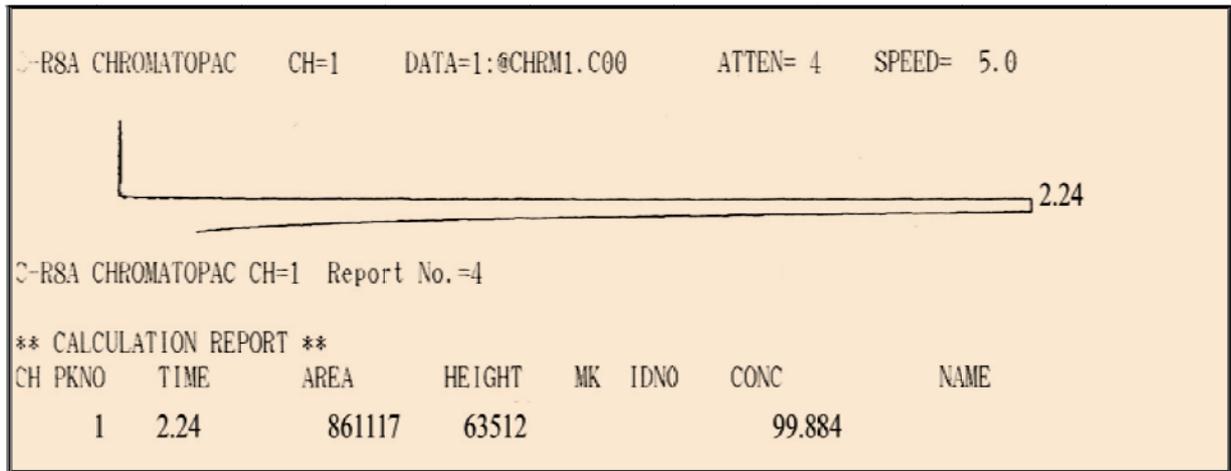


Figure VII.17 : Chromatogramme obtenu pour une concentration de 2 g/l sous une intensité lumineuse de 1000 lux.

D'après les différents pics obtenus et les résultats obtenus précédemment nous avons calculé la quantité d'hydrogène pour chaque concentration cellulaire

Tableau VII.1 : le taux de production d'hydrogène à une intensité lumineuse de 1000 lux

Concentration cellulaire (g/l)	Quantité d'hydrogène (%)
0.4	0.04
0.8	0.066
1	0.032
1.5	traces 0.004
2	0

Afin d'interpréter ces résultats nous avons établi une courbe donnant la quantité d'hydrogène produite en fonction de la concentration cellulaire.

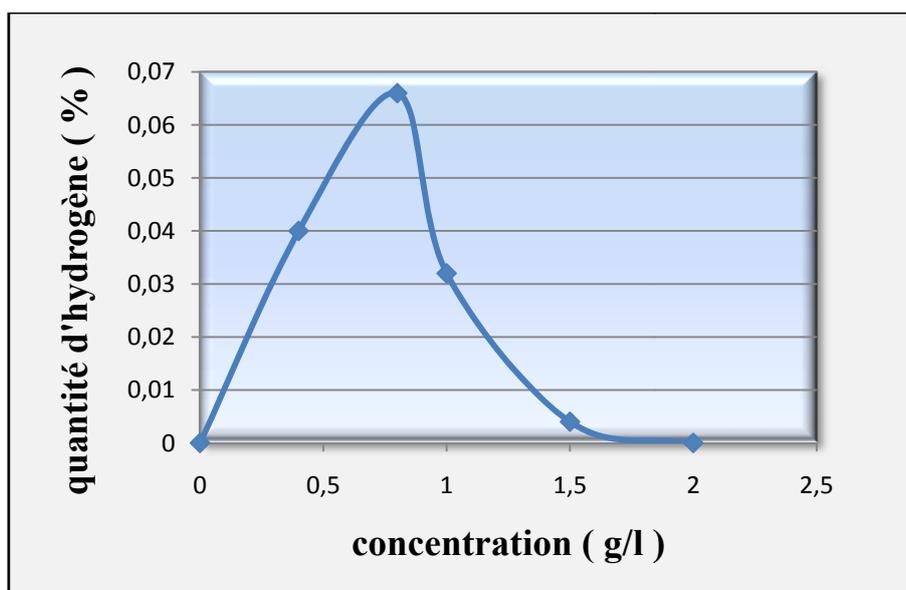


Figure VII.18 : Etude de l'effet de l'intensité lumineuse sur la production d'hydrogène

D'après ce graphe, nous remarquons que le taux maximum de production d'hydrogène est réalisé avec une concentration de l'ordre de 0,8 g/l, au delà de cette valeur plus la concentration augmente plus la production diminue, jusqu'à atteindre une valeur nulle pour une concentration égale à 2 g/l. Cela est peut être du à l'opacité de la culture. C'est-à-dire qu'à des concentrations élevées la culture de spiruline est très dense et cela empêche la lumière d'y pénétrer, c'est pour ces raisons qu'à des concentrations élevées le taux de production d'hydrogène est nul.

Les résultats obtenus sont différents de ceux trouvés par d'autres chercheurs. Comme **katsuhiko Aoyama [49]**, qui a fait une étude avec une souche de spiruline provenant du Japon, l'optimum de la production d'hydrogène a été obtenue pour une concentration de l'ordre de 1,62 g/l. Citons également **A.U. Juantorena [50]**, en utilisant une souche de spiruline provenant du Mexique, le taux maximum de l'hydrogène produit a été obtenu pour une concentration de 0,32 g/l.

On constate que la concentration optimale utilisée pour la production d'hydrogène dépend principalement de la nature de la souche, c'est-à-dire de la région d'où elle provient.

Il faut savoir que chaque souche de spiruline possède ces propres caractéristiques. Donc lors de la production d'hydrogène, on ne peut pas généraliser les paramètres de production pour n'importe quelle souche de spiruline.

CONCLUSION GENERALE

Conclusion :

Notre présent travail avait pour but la bio production d'hydrogène par une cyanobactérie photosynthétique surnommée la spiruline.

Afin de mener à bien ce projet, nous avons essayé dans un premier temps de suivre le développement de la souche, pour ensuite optimiser les paramètres de croissance.

Les résultats obtenus ont montré que sous les conditions les plus favorables, le taux de croissance maximum est de l'ordre de 0,033 g/ l h. en étudiant également l'effet du pH sur la vitesse de croissance, nous avons constaté que la vitesse de croissance atteint son maximum pour un pH égale à 10.

En seconde partie nous avons tenté de produire de l'hydrogène. En montrant que la production de ce biogaz dépend de plusieurs paramètres, tel que le milieu de production, l'intensité lumineuse, et la concentration de la biomasse.

Durant nos travaux, la production de ce biogaz a été réalisée avec deux protocoles opératoires différents : - la production en présence de lumière

- la production à l'obscurité.

En comparant les résultats obtenus avec ces deux protocoles, on constate que les taux de productivité obtenus sont largement supérieurs en présence de lumière qu'à l'obscurité totale.

Les connaissances acquises sur l'activité de l'enzyme responsable de la production d'hydrogène, nous ont permis de choisir un milieu appauvri en azote et en soufre comme milieu de production.

Une variation de l'intensité lumineuse affecte le taux de production d'hydrogène, nous avons constaté que le taux de production le plus élevé est donné pour une intensité lumineuse de 1000 lux. A des intensités plus élevés nous remarquons une diminution de la productivité.

L'étude de l'évolution du taux d'hydrogène produit en fonction de la concentration cellulaire, nous a permis de déterminer que la production d'hydrogène atteint son maximum pour une concentration de l'ordre de 0,8 g/l.

Il est clair que d'après les résultats obtenus, le taux d'hydrogène produit par la spiruline est faible. Afin d'augmenter la productivité de l'hydrogène il faudrait dans un premier lieu trouver un milieu plus favorable à la production sans toute fois affecter la croissance de la spiruline. On

peut également avoir recours aux manipulations génétiques afin d'augmenter l'activité des enzymes responsables de la production.

Enfin, il serait intéressant de faire une étude technico économique, afin d'envisager une production d'hydrogène par ce procédé à grande échelle.

Références bibliographiques

- [1] **C.A Aceves Lara.** Modélisation, estimation et commande de procédés de digestion anaérobie en vue de l'optimisation de la production de bio hydrogène. Université Montpellier II Science et Techniques du Languedoc, Octobre 2007.
- [2] **G.Peltier.** Production photo biologique d'hydrogène : un défi pour la recherche. Conférence débat et controverses « Les défis de l'Hydrogène » Mardi 1er avril 2008.
- [3] **C.E Chitour** Quelle stratégie énergétique pour l'Algérie à l'horizon 2030 ? Cinquième journées de l'énergie .Ecole Nationale Polytechnique d'el Harrach, Alger, Avril 2007.
- [4] **S.Chader, M.Belhamel, A.Spiros.** Procèdes biologiques de production de l'hydrogène : aperçu et perspectives. Centre de Développement des Energies Renouvelables Bouzaréah, Alger, Algérie. Unité Génie Biologique, Université Catholique Louvain La Neuve, Belgique. 27-29 Octobre 2007, Ghardaïa – Algerie.
- [5] **R.Benchrifa, D.Zejli, A.Bennouna, K.Zazi.** L'hydrogène combustible du futur. Centre National de Recherche Scientifique et Technique. Unité de Technologies et Economies des Energies Renouvelables.
- [6] **M.Dufoix ,O.J.F Mastrangel , F.Valmage.** Quelle place pour l'hydrogène dans les Systèmes énergétiques? 08 Mars 2004.
- [7] **R.J. Reynolds.** The gas between the stars. Scientific Americans the University of New South Wales. 15 Janvier 2002.
- [8] **J.Wakefield.** The ultimate clean fuel . Radio National, Australian Broadcasting Corporation . 4 mai 2002
- [9] **J.L. Sloop.** Liquid hydrogen as a propulsion fuel. Washington, D.C., NASA, Scientific and Technical Information Office, 1978 (The NASA History Series)
- [10] **P. Hollmuller, B. Lachal, F. Romerio, W. Weber, J.M. Zraggen .** L'hydrogène future vecteur énergétique. Centre universitaire d'étude des problèmes de l'énergie. Colloque du cycle de formation du Cuepe 2004-2005
- [11] **R. Benchrifa, D. Zejli et A. Bennouna .** Hydrogène solaire : Vecteur d'énergie de l'avenir .L'espace marocaine, Magazine Scientifique pour une Nouvelle Dynamique, n°5, 1992.
- [12] **A. Bennouna .** Vers un Maroc Exportateur d'Energie . Ouvrage publié en 1994 en langue Arabe.

- [13] Energie matière première : L'hydrogène comme vecteur énergétique : concurrence ou complémentarité avec les combustibles fossiles ; n° 20 ; pp 9 – 16 ; 2ème trimestre 2002
- [14] **S. His.** Manuscrit définitif remis .Diffusion des Connaissances. 4 décembre 2003
- [15] **S. His.** IFP, L'Hydrogène vecteur énergétique du futur ? Décembre 2003
- [16] **K. Yamashita, L.Barreto.** IASA, Integrated Energy Systems for the 21th Century : Coal Gasification for Co-producing Hydrogen. Electricity and Liquid Fuels. Septembre 2003
- [17] **M.I.Hoffert, K.Caldeirat.** Advanced Technology Paths to Global Climate Stability : Energy for a Greenhouse Planet, Science. Novembre 2002
- [18] **L.B.Systemtechnik.** Well-to-Wheel Analysis of Energy Use and Greenhouse Gas Emissions of Advanced Fuel/Vehicle Systems - A European Study. Juillet 2003
- [19] **D.B.Levin, L. Pitt, M.Love.** Biohydrogen production: prospects and limitations to practical. Application. International Journal of Hydrogen Energy 29 (2004) 173 – 185
- [20] **F. Gloaguen, J. D. Lawrence, T. B. Rauchfuss, M. Benard, M.M. Rohmer.** Bimetallic carbonyl thiolates as functional models for Fe-only hydrogenases Inorg. Chem. 41 (2002) 6573-6582.
- [21] **J.F.Capon, F. Gloaguen, P. Schollhammer, J. Talarmin, J. Electroanal.** Electrochemical proton reduction by thiolate-bridged hexacarbonyl diiron clusters. Chem. 566 (2004) 241-247
- [22] **J. Talarmin, F. Gloaguen, P.Schollhammer.** Electrocatalysis of H₂ evolution by di- iron sub-site models.
- [23] **P. Das, J-F. Capon, F. Gloaguen, F. Y. Pétilon, P.Schollhammer, J. Talarmin, K. W. Muir.** Di-iron aza Diphosphido complexes: new generation of molecules inspired by the active site of Fe-only hydrogenase.
- [24] **P.C.Hallenbeck, J.R. Benemann.** Biological hydrogen production, fundamentals and limiting Processes. International Journal of Hydrogen Energy 27 (2002) 1185 – 1193
- [25] **J.R. Benemann.** Hydrogen production by microalgae. Journal of Applied Phycology 12: 291–300, 2000.
- [26] **D.Dutta, S.Chaudhuri, S.K. Bhattacharya.** Hydrogen production by Cyanobacteria. Department of Biotechnology.
- [27] **J. R. Benemann.** Feasibility Analysis of photobiological hydrogen production. 343 Caravelle Drive, Walnut Creek. CA 94598.

- [28] **J. Rupprecht , B. Hankamer , J. H. Mussnug ,G. Ananyev ,C. Dismukes ,O. Kruse.** Perspectives and advances of biological H₂ production in microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* (2006) 72:442–449.
- [29] **A.Fernando. L.Pinto, O.Troshina, P.Lindblad.** A brief look at three decades of research on cyanobacterial hydrogen evolution. *International Journal of Hydrogen Energy* 27 (2002) 1209 – 1215
- [30] **A. A. Tsygankov.** Biological Generation of Hydrogen.*Journal of General Chemistry*, 2007, Vol. 77, No. 4, pp. 693. September 24, 2006
- [31] **J.H. Reith, R.H. Wijffels,H.Barten .** Barten.Statue and perspectives of biological methane and hydrogen production .*Dutch Biological Hydrogen Fondation*,2003.
- [32] **D.Fox.Ripley.**Spiruline technique pratique et promesse.1999.
- [33] **J.P Jourdan .**Cultivez votre spiruline. Manuel de culture artisanale pour la production de spiruline.2006
- [34] **J. Falquet ,J.P. Hurni.** Spiruline Aspects Nutritionnels. *Antenna Technologies* Novembre 2006.
- [35] **D.L Ardiet, D. Von Der Weid.** Spirulina as a food complement to improve health and cognitive . *Antenna Technologies - Geneva, Switzerland.*
- [36] **L.Charpy.** Compte rendu du mini colloque sur la production de spiruline artisanale à Mialet. *Institut de recherche pour le développement.*
- [37] Spiruline, le micro-organisme comestible. *Revue microbiologiques*, déc.1983, P. 551-578 vol. 47, numéro 4 0146-0749/83/040551
- [38] **G. Peltier.** Production d'hydrogène par les énergies renouvelables. Rapport final du programme de recherche intégrer.
- [39] **St-Laurent.** La photosynthèse et la respiration. *Campbell, N. (1995) Biologie.*
- [40] **J. Legrand.** Bio production d'hydrogène par les microorganismes photosynthétiques . Mémento de l'Hydrogène FICHE 3.3.2
- [41] **M. J. LLAMA, J. L. SERRA, K. Krishna RAO, O. HALL.** Isolation and characterisation of the hydrogenase activity from the non heterocystous cyanobacterium *Spirulina Maxima*. Department of Plant Sciences, University of London King's College, 68 Half Moon Lane, London SE24 9JE, England. 6 December 1978
- [42] **L.Cournac.**De l'hydrogene a partir du soleil et de l'eau.*Direction des science du vivant.* 2004-2005.

- [43] **M. Ludwig, J.Appel.** Occurrence of Hydrogenases in Cyanobacteria and Anoxygenic Photosynthetic Bacteria: Implications for the Phylogenetic Origin of Cyanobacterial and Algal Hydrogenases. *Journal of molecular evolution*.
- [44] **P.Tamagnini, R.Axelsson, P. Lindberg,F.Oxelfelt, R.Wünschiers, P.Lindblad.** Hydrogenases and Hydrogen Metabolism of Cyanobacteria. *Micobiology and molecular biology reviews*.
- [45] **F.G.Kitson, S.Larsen,M.Mcwen.** Gas chromatography and mass spectrometry.A partical guide.
- [46] **R.Marchal.** Chromatographie. Lycée Louis Vincent – METZ. Janvier 1998.
- [47] **W.M.A .Niessen.** Current practice of gas chromatography mass spectrometry.
- [48] **Wakayama.T, Nakada.J.E, Assada.Y and Miyake.J.** Effect of light/ dark cycle on bacterial hydrogen production by rodobacter sphaeroides RV . *Applied biochemistry and biotechnology*. Humana Press, 2000; 48-86.
- [49] **k.Aoyama, I.Uemura, J.Miyake and Y.Asada .** Fermentative Metabolism to Produce Hydrogen Gas and Organic Compounds in a Cyanobacterium, *Spirulina platensis*.
- [50] **A.U. Juantorenaa, P.J. Sebastiana, E. Santoyoa, S.A. Gamboaa, O.D. Lastresa, D. Sánchez-Escamillac, A. Bustosd, D. Eapene.** Hydrogen production employing *Spirulina maxima* 2342:Achemical analysis.

Résumé :

Actuellement, l'hydrogène est considéré comme futur vecteur énergétique, il peut être produit par différentes voies y compris celle biologique. Dans ce travail nous avons tenté de produire de l'hydrogène par une cyanobactérie photosynthétique surnommée la spiruline. Pour ce nous avons tout d'abord optimisé les paramètres de croissance afin d'avoir un bon développement de la culture. Une fois avoir maîtriser les paramètres de croissance, nous avons produit de l'hydrogène à partir de cette cyanobactérie, en tenant compte de l'effet de l'intensité lumineuse et de la concentration cellulaire sur le taux de productivité.

Mots clefs : la spiruline, cyanobactérie, production biologique d'hydrogène, photosynthèse.

Abstract :

Currently hydrogen is regarded as future energy vector, it can be produced by various ways including that biological. In this work we tried to produce hydrogen by a called photosynthetic cyanobacteria the spirulina. For this we first of all optimized the parameters of growth in order to have a good development of the culture. Once to have maîtrise the parameters of growth, we produced hydrogen starting from this cyanobacteria, by taking account of the effect of the luminous intensity and the cellular concentration on the rate of productivity.

Key words: spirulina, cyanobacteria, biological production of hydrogen, photosynthesis.

ملخص:

حالياً، الهيدروجين يعتبر كمصدر طاقي للمستقبل، يمكنه التشكل بعدة طرق منها الطريقة البيولوجية. في عملنا هذا حاولنا إنتاج الهيدروجين باستعمال سيانو-بكتيريا تقوم بعملية التركيب الضوئي تدعى "سبيريلين". لهذا بدأنا بتحديد عوامل التضاعف للحصول على أحسن ظروف التطور. عند تحديد العوامل المساعدة على التضاعف نقوم بإنتاج الهيدروجين عن طريق هاته البكتيريا، مع الأخذ بعين الاعتبار شدة الضوء و تركيز الخلايا في نسبة الإنتاج.

المفتاح: سبيريلين، سيانو-بكتيريا، الإنتاج البيولوجي للهيدروجين، التركيب الضوئي.