

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

ÉCOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE



Département de Génie de l'Environnement

Laboratoire des Biotechnologies Environnementales et Génie des Procédés

Thèse de Doctorat

En : Génie de l'Environnement

BIOPRODUCTION DE L'HYDROGENE PAR DES MICROORGANISMES

Présentée par :

Mme AKROUM-AMROUCHE Dahbia

Magister en Génie de l'Environnement de l'ENP

Sous la codirection de Mme. Nadia HAIDER-ABDI, Professeur et Mr. Hakim LOUNICI, Professeur

Présentée et soutenue publiquement le 26/01/2017

Composition du Jury :

Président	Mr.	Hocine	GRIB	Pr.	ENP
Rapporteur	Mme	Nadia	HAIDER-ABDI	Pr.	ENP
Rapporteur	Mr.	Hakim	LOUNICI	Pr.	Univ. Bouira
Examineur	Mme.	Lydia	DJABRI-ADOUR	Pr.	Univ. Alger
Examineur	Mr.	Rabah	BAKOUR	Pr.	USTHB
Examineur	Mr.	Djamal	ABDESSEMED	Pr.	USTHB
Examineur	Mr.	Rabah	BOUARAB	Pr.	ENP

ENP 2017

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

ÉCOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE



Département de Génie de l'Environnement

Laboratoire des Biotechnologies Environnementales et Génie des Procédés

Thèse de Doctorat

En : Génie de l'Environnement

BIOPRODUCTION DE L'HYDROGENE PAR DES MICROORGANISMES

Présentée par :

Mme AKROUM-AMROUCHE Dahbia

Magister en Génie de l'Environnement de l'ENP

Sous la codirection de Mme. Nadia HAIDER-ABDI, Professeur et Mr. Hakim LOUNICI, Professeur

Présentée et soutenue publiquement le 26/01/2017

Composition du Jury :

Président	Mr.	Hocine	GRIB	Pr.	ENP
Rapporteur	Mme	Nadia	HAIDER-ABDI	Pr.	ENP
Rapporteur	Mr.	Hakim	LOUNICI	Pr.	Univ. Bouira
Examineur	Mme.	Lydia	DJABRI-ADOUR	Pr.	Univ. Alger
Examineur	Mr.	Rabah	BAKOUR	Pr.	USTHB
Examineur	Mr.	Djamal	ABDESSEMED	Pr.	USTHB
Examineur	Mr.	Rabah	BOUARAB	Pr.	ENP

ENP 2017

Dédicace

*À mes très chers parents Mr et Mme Amrouche,
À ma très chère belle mère Mme Akroum,
À mon très cher mari Mr H. Akroum, À mes très chers enfants,
À ma très chère sœur et mes très chers frères,
À mes chères belles sœurs et beaux frères,
À mes chères nièces et mes chers neveux,
À toute ma famille,
À la mémoire de mon beau père Mr Akroum,
Et À tous ceux qui auront le plaisir de lire cette thèse.*

Remerciements

*Tout d'abord mes remerciements s'adressent à mes deux directeurs de thèse, Madame **N. ABDI-HAIDER**, Professeur à l'ENP, et Monsieur **H. LOUNICI**, Professeur à l'ENP, pour avoir accepté de diriger ce travail, pour l'aide, pour tous les conseils qu'ils m'ont apportés et l'encouragement constant qu'ils n'ont cessé de me prodiguer tout au long de cette étude, qu'ils trouvent ici l'expression de toute ma gratitude.*

*J'adresse mes plus vifs remerciements à Monsieur **H. GRIB**, professeur à l'ENP qui ma fait l'honneur de présider le jury.*

*J'adresse également mes sincères remerciements à Monsieur **R. BAKOUR** professeur à l'USTHB, à Monsieur **D. ABDESSEMED**, professeur à l'USTHB, à Monsieur **R. BOUARAB**, professeur à l'ENP et à Madame **L. DJABRI-ADOUR**, professeur à l'Université d'Alger, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de faire partie de mon jury de soutenance.*

*Mes remerciements les plus sincères sont adressés à Monsieur **N. MAMERI**, professeur à l'ENP, pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail et l'aide qu'il m'a apportée.*

*Il n'y a pas de mots suffisamment forts pour exprimer ma gratitude à mon époux Monsieur **H. AKROUM**. Je dois lui exprimer toute ma reconnaissance pour le soutien moral, la compréhension, le temps qu'il a su m'accorder et pour tous les conseils qu'il m'a apportés ainsi que pour la patience dont il a fait preuve pendant les longues années de thèse.*

Un grand merci à toute l'équipe du laboratoire biotechnologies environnementales et génie des procédés de l'Ecole Nationale Polytechnique (ENP).

*Je souhaite aussi exprimer ma gratitude aux laboratoires de microbiologie et biochimie, département Génie alimentaire, Université de Boumerdes en la personne de Monsieur **A. NOUANI**, Maître de conférences à l'université de Boumerdes, pour les moyens qu'il a mis en œuvre pour me donner accès aux laboratoires ainsi que pour la liberté qu'il m'a accordé pour réaliser une partie de mes expériences dans ses laboratoires. Je tiens à remercier Monsieur **S. ABAILIA**, professeur à l'université de Boumerdes pour l'aide technique. Merci également à Monsieur **H. BOURNISSA**, et **F. MOSTIFA**, ingénieurs de laboratoire à l'université de Boumerdes pour l'aide technique.*

*Je voudrais aussi remercier Mme **N. HADIOUI-AMROUCHE**, responsable au laboratoire de microbiologie de Sandoz, Oued Smar et aux personnels de SOMIVER, division verre technique de Thénia, Boumerdes, en particulier Monsieur **ALLALOU**, pour leur patience, compréhension et aide.*

Que mes amies de l'institut Pasteur, de l'université de Boumerdes et de l'Ecole Nationale Polytechnique l'ENP, trouvent ici ma gratitude pour le soutien moral.

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

« Merci sincèrement pour votre confiance et votre important soutien »

Mme AKROUM- AMROUCHE DAHBLA

المخلص: سلالتين بكتيريتين بوجه خاص اشيريشيا كولي عزلة رقم ATCC8739 و رودوباكتر سفيرويدس عزلة رقم CIP60.6 استخدمتا لإنتاج حيوي لغاز الهيدروجين ، وتمت دراسة تفصيلية بغية تحديد الظروف المثلى لإنتاج الهيدروجين. أجري إنتاج الهيدروجين من قبل هذه الكائنات الدقيقة في مفاعلات حيوية لاهوائية التي انجزت من قبلنا. فيما يتعلق بإنتاج الهيدروجين عن طريق التخمر استعملت أساليب التحسين بعامل واحد وبعدة عوامل أجريت على حد سواء لتحسين الظروف البيئية لاشيريشيا كولي عزلة رقم ATCC8739 وتحسين كفاءة العمليات الحيوية. ان نموذج التريعية يصف على نحو كاف سطح الاستجابة داخل المنطقة التجريبية التي تمت دراستها. إن معدل إنتاج التخمر الأقصى للهيدروجين $4,998 \pm 55.32$ مل / لتر / ساعة تم الحصول عليه عند تركيز الجلوكوز 21.09 غرام / لتر، ودرجة الحموضة 6.58 ودرجة حرارة 36.62 درجة مئوية.

من ناحية أخرى، تمت دراسة تأثير الكاتيونات الثنائية التكافؤ على فعالية التجهيز البيولوجي. في مجموعة مناسبة، يزيد الحديد في النشاط الحيوي لإنتاج H_2 ، في حين أن النيكل يحسن معدل إنتاج الكتلة الحيوية الخلوية. فقد تم الحصول على أعلى معدل 9.4 ملغ / لتر / ساعة وأقصى عائد 3.28 غرام / مول من الجلوكوز لإنتاج الكتلة الحيوية البكتيرية عند تركيز Ni^{2+} 0.9 ملغ / لتر. بشأن الإنتاج التخمر الضوئي، كنا قادرين على إثبات إمكانية تطبيق قانون Luedeking- Piret على النواتج الغازية. اظهرنا أيضا أن معدل الإنتاج الضوئي للهيدروجين يتناسب مع معدل نمو الخلايا وتركيز الخلية رودوباكتر الكرائية عزلة CIP60.6. تم تنفيذ النمذجة الخطية وغير الخطية. لوحظ أيضا أن بيانات إنتاج الهيدروجين التي تم الحصول عليها، من النماذج المتوقعة ، في اتفاق جيد مع النتائج التجريبية.

الكلمات المفتاحية: الهيدروجين الحيوي، التخمر الضوئي، التخمر الظلامي، اشيريشيا القولونية، رودوباكتر الكرائية، الحديد، النيكل، RSM، "صندوق بينكين ، Luedeking- Piret ، تعديل نموذج جومبرتز.

ABSTRACT: Two bacterial strains producing H_2 particularly interesting (*Escherichia coli* ATCC 8739, a fermentative bacterium and *Rhodobacter sphaeroides* CIP60.6, a purple non-sulfur photofermentative bacterium) newly used, were studied in more detail with a view to acquired new knowledge and to determine the optimal culture conditions for the hydrogen production. The bioprocesses, using these microorganisms, were conducted in anaerobic bioreactors that have been made by us and switched in parallel to carry out our doctoral thesis works. Regarding the fermentative hydrogen production, optimization methods to one and several factors at the same time were carried out to optimize environmental conditions of *E. coli* ATCC 8739 and to improve the bioprocesses effectiveness. The quadratic model allows us to efficiently obtain optimized values, especially the maximum fermentative hydrogen production rate of 55.32 ± 4.998 ml / l / h was obtained at a glucose concentration of 21.09 g / l, a pH of 6.58 and a temperature of 36.62 °C.

On the other hand, the effect of divalent cations on the bioprocess effectiveness was studied. In an appropriate range, iron increases the H_2 production bioactivity. while the nickel improves the cellular biomass production yield. A maximum rate of 9.4 mg / l / h and a maximum yield of 3.28 g / mol glucose of bacterial biomass production were obtained at a concentration of Ni^{2+} 0.9mg/l. Regarding photofermentative production, we were able to prove the feasibility of the applicability of the Luedeking- Piret law for photofermentation gaseous product (biohydrogène). We have also been able to show that, the hydrogen photobioproduction rate is proportional to the cell growth rate and cell concentration of *Rhodobacter sphaeroides* CIP60.6. Linear and non-linear models were performed. It was also observed that the production profile of the hydrogen obtained from models predicted are in good agreement with the experimental results found.

Keywords: Biohydrogen, photofermentation, dark fermentation, *Escherichia coli*, *Rhodobacter sphaeroides*, iron, nickel, RSM "Box Behnken", Luedeking- Piret, modified Gompertz model.

RÉSUMÉ : Deux souches bactériennes productrices d' H_2 particulièrement intéressantes, *Escherichia coli* ATCC 8739, une bactérie fermentaire aéro-anaérobie et *Rhodobacter sphaeroides* CIP60.6, une bactérie photofermentaire pourpre non sulfureuse, ont nouvellement utilisées et étudiées de façon plus approfondie. La production de l'hydrogène par ces microorganismes été menée en anaérobiose dans des bioréacteurs qu'on a réalisés et conçus au laboratoire et mis en marche en parallèle pour mener à bien nos travaux de thèse de doctorat. Concernant la production fermentaire de l'hydrogène, des méthodes d'optimisation à un et à plusieurs facteurs à la fois ont été réalisées pour optimiser les conditions environnementales de *E coli* ATCC 8739. Le modèle quadratique nous a permis d'obtenir efficacement les valeurs, notamment le taux maximal de production fermentaire de l'hydrogène qui est de $55,32 \pm 5$ ml/l/h obtenu à une concentration de glucose de 21,09 g/l, un pH de 6,58 et une température de 36,62°C.

D'autre part, l'effet des cations bivalents sur l'efficacité du bioprocédé a été étudié démontrant que dans une gamme appropriée, le fer Fe^{2+} augmenterait la bioactivité de la production de l' H_2 , Par contre le nickel améliore le rendement de production de la biomasse cellulaire. Un taux maximal de 9,4 mg/l/h et un rendement maximal de production de biomasse bactérienne de 3,28 g / mol de glucose ont été obtenu à une concentration de Ni^{2+} de 0,9 mg / l. Concernant la production photofermentaire, nous avons pu prouver la faisabilité de l'applicabilité de la loi de Luedeking- Piret pour les produits gazeux de la photofermentation (biohydrogène). Nous avons également pu montrer que, le taux de photobioproduction de l'hydrogène est proportionnel au taux de la croissance cellulaire et à la concentration cellulaire de *Rhodobacter sphaeroides* CIP60.6. Des modélisations linéaires et non linéaires ont été effectuées. Il a été observé également que le profil de production de l'hydrogène obtenu, des modèles prédits, est en bon accord avec les résultats expérimentaux trouvés.

Mots clés : Biohydrogène, photofermentation, fermentation sombre, *Escherichia coli*, *Rhodobacter sphaeroides*, fer, nickel, RSM "Box Behnken", Luedeking- Piret, modèle modifié de Gompertz.

TABLE DES MATIERES

Résumé

Liste des Tableaux

Listes des Figures

Introduction	15
Chapitre I. Revue sur la production biologique de l'hydrogène	20
1.1. Introduction.....	21
1.2. Les méthodes de production du biohydrogène.....	22
1.2.1. La bioconversion de l'énergie solaire.....	22
1.2.1.1. La biophotolyse	22
2.1.1.1. La biophotolyse directe.....	23
2.1.1.2 La biophotolyse indirecte.....	25
1.2.1.2. La photofermentation anoxygénique	27
2.1.2.1. La nitrogénase et l'hydrogénase.....	28
2.1.2.1. Le métabolisme de la production de l'hydrogène par photofermentation.....	28
1.2.2. La fermentation sombre.....	29
2.2.1. le métabolisme de la production d'hydrogène par fermentation.....	29
2.2.2. Les [Ni-Fe]-Hydrogénases et les [Fe-Fe]- hydrogénases.....	30
2.2.3. Les voies fermentatives des bactéries anaérobies strictes et anaérobies facultatives....	32
1.2.3. Etude comparative	33
1.3. Les stratégies d'augmentation de l'efficacité des bioprocédés.....	35
1.4. Conclusion.....	37
 Chapitre 2. <i>Escherichia coli</i>	38
2.1. Introduction.....	39
2.2. Taxonomie.....	39
2.1. <i>E coli</i>	39
2.2. Classification.....	39
2.3. Critères taxonomiques.....	39
2.3. Physiologie de croissance.....	39
3.1. Localisation.....	39
3.2. Besoins nutritionnels.....	40
2.4. Production et utilisation commerciale et Environnementale.....	40
2.5. Métabolisme et mécanisme respiratoire et fermentaire.....	41
5.1. Métabolisme.....	41
5.2. La membrane cytoplasmique.....	41
5.3 La fermentation.....	42
A. Détails de la fermentation acide mixte de <i>E coli</i>	42
A.1. Formation de pyruvate (Réactions de l'étape 1)	43
A.2. Formation d'acides et d'éthanol (Réactions de l'étape 2)	44
A.2.1. Formation de lactate.	44
A.2.2. Clivage pyruvate en acétyl- CoA et le formate.....	44
A.2.3. La formation de l'hydrogène et du dioxyde de carbone.....	44
A.2.4. Formation d'acide acétique.....	44
A.2.5. Formation d'éthanol.....	44
A.2.6. Formation du succinate	44
B. Les enzymes clés de la voie de fermentation d'acide mixte	44
2.6. Étude physiologique des mécanismes de production de l'hydrogène par <i>E. coli</i>	44

2.6.1. Métabolisme	46
2.6.2. Les enzymes responsables de la production de l'hydrogène.....	46
6.2.1. Les Hydrogénases de <i>E coli</i>	46
6.2.2. Etude comparative entre les trois hydrogénase.....	47
6.2.3. Conditions opératoires.....	48
2.6.3. Mécanisme de production de l'hydrogène	48
2.6.4. Les stratégies d'augmentation de l'efficacité des bioprocédés	50
2.6.4.1. L'inoculum.....	50
2.6.4.2. Conditions physico-chimiques.....	50
6.4.2.1. Milieu de production de l'hydrogène.....	50
1.1. Substrat.....	50
1.2. Azote et phosphore.....	50
6.4.2.2. Température et pH.....	51
2.6.4.3. La modification génétique.....	51
2.6.4.4. Les bioréacteurs.....	51
 Chapitre 3. <i>Rhodobacter sphaeroides</i>.....	52
3.1. Introduction.....	53
3.2. Taxonomie.....	53
2.1. <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	53
2.2. Classification.....	53
2.3. Critères taxonomiques.....	53
3.3. Physiologie de croissance.....	54
3.1. Localisation.....	54
3.2. Besoins nutritionnels.....	54
3.4. Production et utilisation commerciale et environnementale.....	55
3.5. Métabolisme et mécanisme de photosynthèse.....	56
3.5.1. Métabolisme.....	56
3.5.2. Mécanisme de photosynthèse, de respiration et de transfert d'électrons.....	58
3.5.2.1. La membrane photosynthétique.....	58
3.5.2.2.1. Bactéριοchlorophylle – caroténoïde (le complexe antennaire LHs).....	59
3.5.2.2.2. Le centre réactionnel (CR).....	60
3.5.2.2.3. Les caroténoïdes.....	60
3.5.2.2.4. Les facteurs affectants la synthèse des pigments.....	61
3.5.2.3. Mécanisme de photosynthèse, de respiration et de transfert d'électrons.....	61
3.6. Étude physiologique des mécanismes de production de l'hydrogène par <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	63
3.6.1. Métabolisme.....	63
3.6.2. Les enzymes responsables de la production de l'hydrogène.....	64
3.6.2.1. La nitrogénase.....	64
3.6.2.2. Hydrogénase.....	65
3.6.2.3. Etude comparative.....	65
3.6.3. Mécanisme de production de l'hydrogène.....	66
3.7. Les stratégies d'augmentation de l'efficacité des bioprocédés	67
3.7.1. Effet du rapport carbone/azote sur la photofermentation.....	67
3.7.2. Effet de la concentration des micronutriments	67
3.7.3. La modification génétique.....	68
3.7.4. L'immobilisation	68
3.7.5. L'utilisation d'un substrat complexe	69
3.7.6. L'utilisation des systèmes intégrés.....	70
3.7.7. Les photobioréacteurs.....	71

Chapitre 4. Matériels et méthodes	72
Partie 1 : Production d'hydrogène par voie Fermentaire	74
4.1.1 Matériel	74
4.1.1.1. Matériel biologique “La souche <i>Escherichia coli</i> ATCC8739”.....	74
4.1.1.2. Appareillage.....	74
4.1.2. Méthodes de culture d' <i>E. coli</i> et les conditions de croissance.....	75
1.2.1. Préparation du milieu de croissance Luria Bertani (LB)	75
1.2.2. Revivification et activation de la bactérie lyophilisée.....	75
1.2.3. Conservation des bactéries	76
4.1.3. Caractérisation de la souche.....	77
1.3.1. Critères culturels.....	77
1.3.1.1. Détermination du mode de croissance en milieu liquide (respiratoire ou fermentaire)	77
A) Etude du mode de croissance cellulaire.....	77
B) Etude de la cinétique de croissance en aérobiose et en anaérobiose.....	77
1.3.1.2. L'arrangement des bactéries en colonies sur milieu solide.....	77
1.3.2. Caractères morphologiques.....	77
1.3.2.1. Coloration Gram.....	77
1.3.2.2. Etat frais (Test de Mobilité)	78
1.3.3. Caractères biochimiques.....	78
1.3.3.1. Test de catalase.....	79
1.3.3.2. Réaction des oxydases.....	79
1.3.3.3. Lactose.....	79
1.3.3.4. Etude des caractères biochimiques par une Micro-méthode (galerie API 20E).....	79
1.3.3.4.1. Identification de la méthode.....	80
1.3.3.4.2. Principe.....	80
1.3.3.4.3. Préparation de l'inoculum.....	80
1.3.3.4.4. Ensemencement et incubation.....	80
1.3.3.4.5. Lecture et identification.....	82
4.1.4. Production de l'hydrogène par <i>E. coli</i> ATCC8739 en bioréacteur.....	82
1.4.1. Préparation de l'inoculum primaire	82
1.4.2. Préparation des précultures.....	82
1.4.3. Préparation du milieu de production d'hydrogène (le milieu M9).....	82
1.4.4. Les micro-organismes et les conditions de culture au cours du métabolisme fermentaire en bioréacteurs.....	83
4.1.5. Étude d'optimisation.....	84
1.5.1. Optimisation d'un facteur à la fois.....	85
1.5.2. Optimisation à trois facteurs à la fois	85
4.1.6. Etude de l'effet des cations bivalents.....	86
1.6.1. Etude de l'effet du fer (macroélément)	86
1.6.2. Etude de l'effet du Nickel (oligoélément)	86
4.1.7. Les méthodes analytiques.....	86
1.7.1. Mesure du taux de la croissance cellulaire.....	86
1.7.2. Mesure de la valeur du pH.....	73
1.7.3. Dosage du glucose.....	87
1.7.4. Mesure du volume d'hydrogène	89
1.7.4.1. Description du système	89
1.7.4.2. Principe	89
Partie 2: Production de l'hydrogène par voie Photofermentaire	89
4.2.1. Matériel biologique “La bactérie <i>Rhodobacter sphaeroides</i> CIP 60.6 (DSM 158, ATCC 17023) ...	89
4.2.2. Méthodes de culture de <i>Rhodobacter sphaeroides</i> et conditions de croissance.....	89

2.2.1. Préparation des milieux de croissance	89
2.2.1.1. Le milieu Sistrom A	89
2.2.1.2. Le milieu aSy	91
2.2.2. Revivification et activation de la bactérie lyophilisée <i>R. sphaeroides</i> CIP 60.6	92
2.2.2.1. Sur milieu liquide	92
2.2.2.2. Sur milieu solide	93
2.2.3. Caractérisation de la souche	93
2.2.3.1. Observation des colonies	93
2.2.3.2. Teste de mobilité	93
2.2.3.3. Coloration Gram	93
4.2.3. Conservation des bactéries	93
4.2.4. La production d'hydrogène par <i>Rhodobacter sphaeroides</i> CIP60.6	94
2.4.1. Préparation de la préculture de <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	94
2.4.2. Préparation du milieu de production d'hydrogène (le milieu gL)	94
2.4.3. Préactivation à la production et optimisation de l'âge de culture	95
2.4.4. Production d'hydrogène en photobioréacteur parfaitement agité	95
2.4.5. Etude de l'effet des intensités lumineuses	96
a) Etude de la cinétique de croissance et de production du biohydrogène	96
b) Etude de l'accroissement du taux de production de l'hydrogène	96
c) Modélisation non linéaire	96
d) Etude de la faisabilité de l'utilisation du model Luedeking-Piret" LP" (modélisation linéaire)	97
2.4.6. Etude de l'évolution et l'effet du pH sur la production d'hydrogène	97
2.4.7. Etude de l'effet de la pression partielle de l'hydrogène et de l'agitation	97
4.2.5. Mesure du taux de la croissance cellulaire	97
4.2.6. Mesure du volume d'hydrogène	97
4.3. Contrôle de stérilité des différents milieux	98
Résultats et discussions	99

Chapitre 5. Caractérisation de la souche <i>Escherichia coli</i> ATCC8739 et de la souche <i>Rhodobacter sphaeroides</i> CIP 60.6	100
5. 1. Pré-enrichissement de la souche <i>E. coli</i> ATCC8739	101
5. 2. Critères d'identification de la souche <i>E. coli</i> ATCC8739	101
5.2.1. Caractères culturels	101
2.1.1. Croissance cellulaire en milieu liquide (Métabolisme respiratoire et fermentaire)	101
2.1.2. Cinétique de croissance en aérobiose et en anaérobiose	101
2.1.3. L'arrangement des bactéries en colonies sur milieu solide	103
5.2.2. Caractères morphologiques	104
2.2.1. Coloration Gram	104
2.2.2. Test de mobilité	104
2.2.3. Observation au microscope électronique à balayage	104
5.2.3. Caractères biochimiques	105
2.3.1. Test oxydase	105
2.3.2. Test catalase	105
2.3.3. Test lactose	106
2.3.4. La galerie API 20E	106
5.2. Caractérisation de la souche <i>Rhodobacter sphaeroides</i> CIP 60.6	108
5.2.1. Pré-enrichissement de la souche <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	108
5. 2.2. Critères d'identification de la <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	108
2.2.1. Caractères culturels	108

2.2.1.1. Croissance cellulaire en milieu liquide (Métabolisme respiratoire et photofermentaire)	108
2.2.1.2. Cinétique de croissance en aérobiose et en anaérobiose	109
2.2.1.3. L'arrangement des bactéries en colonies sur milieu solide.....	110
5.2.2.2. Caractères morphologiques.....	111
2.2.2.1. Coloration Gram.....	111
2.2.2.2. Test de mobilité.....	112
2.2.2.3. Observation au microscope électronique à balayage.....	112
5.2.2.3. Caractères biochimiques.....	112
Chapitre 6. Production de l'hydrogène par <i>E coli</i> ATCC8739.....	113
6. 1. Introduction.....	114
6. 2. Optimisation classique de la production du biohydrogène par <i>E coli</i> ATCC8739	115
6. 2.1. Effet du pH initial.....	115
6.2.2. Effet de la température.....	117
6.2.3. Effet de la concentration initiale en substrat sur la production de l'hydrogène.....	118
6.3. L'optimisation du taux de production de l'hydrogène par <i>E coli</i> ATCC8739 en utilisant la méthodologie de surface de réponse « RSM »	120
6.3.1. Les buts d'utilisation du plan factoriel 3K Box-Behnken.....	120
6.3.2. Le plan d'expérience et le domaine d'étude.....	113
6.3.3. Les résultats expérimentaux de la conception de Box Behnken	121
6.3.3.1. Evaluation de l'incertitude (coefficients de détermination)	122
6.3.3.2. Analyse statistique (Test ANOVA)	124
6.3.3.3. Effet de la concentration du glucose, du pH et de la température sur RH ₂	126
6.3.3.4. Optimisation du taux de production de l'hydrogène.....	130
6.3.4. Conclusion.....	131
6.4. Etude comparative entre des deux modes d'optimisation.....	131
6.5. Etude comparative entre les différents taux de production de l'hydrogène des différentes souches de <i>E coli</i>	132
Chapitre 7 : Effet du Fe²⁺ sur la croissance et l'efficacité de la bioproduction de l'hydrogène par <i>E. coli</i> ATCC 8739.....	133
7. 1. Introduction.....	134
7.2. Effet de Fe ²⁺ sur l'efficacité de production de l'hydrogène	135
2. 1. Effet de Fe ²⁺ sur l'évolution de la production de l'hydrogène.....	135
2.2. Effet de Fe ²⁺ sur le taux et le rendement de la production de l'hydrogène.....	137
2.2.1. Effet de Fe ²⁺ sur le taux de production de l'hydrogène.....	137
2.2.2. Effet de Fe ²⁺ sur le rendement de production de l'hydrogène.....	139
2.2.3. Les proportionnalités d'augmentation de la cinétique de production de l'hydrogène en présence du fer.....	140
2.2.4. Effet du Fe sur l'efficacité de production de l'hydrogène par <i>E coli</i> ATCC 8739.....	142
7.3. Effet de Fe ²⁺ sur la croissance cellulaire	142
3.1. Effet de Fe ²⁺ sur l'évolution de la croissance cellulaire.....	142
3.2. Effet de Fe ²⁺ sur le taux et le rendement de la croissance bactérienne	143
3.3. Etude de la relation entre les cinétiques de croissance et de production de l'hydrogène.....	145
7.4. Effet de Fe ²⁺ sur l'efficacité de consommation de substrat.....	146
7.5. Effet de Fe ²⁺ sur le changement du pH.....	148
7.6. Etude comparative entre la réponse des bactéries productrices de l'hydrogène aux différentes concentrations en Fe ²⁺	150
7.7. Conclusion.....	152

Chapitre 8 : Effet du Ni^{2+} sur la croissance et l'efficacité de la bioproduction de l'hydrogène par <i>E. coli</i> ATCC 8739.....	153
8.1. Introduction.....	154
8.2. Effet de Ni^{2+} sur l'efficacité de production de l'hydrogène	155
2. 1. Effet de Ni^{2+} sur l'évolution de la production de l'hydrogène.....	155
2.2. Effet de Ni^{2+} sur le taux et le rendement de la production de l'hydrogène.....	157
2.2.1. Effet de Ni^{2+} sur le taux de production de l'hydrogène.....	157
2.2.2. Effet de Ni^{2+} sur le rendement de production de l'hydrogène	158
8.3. Effet de Ni^{2+} sur la croissance cellulaire	160
3.1. Effet de Ni^{2+} sur l'évolution de la croissance cellulaire.....	160
3.2. Effet de Ni^{2+} sur le taux et le rendement de la croissance	161
3.3. Etude de la relation entre les cinétiques de croissance et de production de l'hydrogène.....	162
8.4. Effet de Ni^{2+} sur l'efficacité de consommation de substrat.....	163
8.5. Effet de Ni^{2+} sur le changement du pH.....	164
8.6. Etude comparative entre la réponse des bactéries productrices de l'hydrogène aux différentes concentrations en Ni^{2+}	167
8.7. Conclusion.....	167
 Chapitre 9. Production de l'hydrogène par <i>R. sphaeroides</i> CIP 60.6.....	168
9.1. Préactivation de la culture pour la production d'hydrogène	169
1. 1Choix du milieu de base pour la production de l'hydrogène.....	169
1.2. Choix de l'âge de la culture.....	170
9. 2. Effet de l'intensité de la lumière sur les caractéristiques de croissance et sur la production de l'hydrogène.....	171
9. 3. Etude de la faisabilité de l'utilisation du modèle Luedeking-Piret" LP" pour la détermination du type de l'activité métabolique de la production de l'hydrogène	173
9. 4. Cinétique de croissance et de production de l'hydrogène.....	176
9. 5. L'accélération du taux de production de l'hydrogène.....	178
9.6. Le modèle de Gompertz modifié (La régression non linéaire des données expérimentales).....	179
9.7. Effet du pH sur la production d'hydrogène au cours de photofermentation.....	183
9.8. Effet de la pression partielle de l'hydrogène et de l'agitation	184
9.9. Etude comparative des données sur la production de l'hydrogène avec les différentes souches de <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	186
9.10. Conclusion.....	186
 Conclusion générale	188
 Références.....	195
 Annexes.....	208

LISTE DES TABLEAUX

Tableau. 1.1. Etude comparative entre les différents processus biologique utilisés pour la production de l'hydrogène.....	34
Tableau 3.1. Quelques éléments nécessaires à la croissance de <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	55
Tableau 3.2. Les caractéristiques enzymatiques de la nitrogénase et l'Hydrogénase.....	65
Tableau 3.3. Résultats d'utilisation des substrats complexes pou la production de l'hydrogène par différentes souches de <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	69
Tableau 4.1.1. La composition chimique du milieu LB.....	75
Tableau 4.1.2. Ensemble des tests biochimiques contenus dans la galerie API 20E et la lecture des résultats (annexes).....	81
Tableau 4.1.3. La composition chimique du milieu M9.....	82
Tableau 4.1.4. La composition chimique de la solution des oligo-éléments de Pfennig et Lippert.....	83
Tableau 4.2.1. Préparation d'1 litre du milieu Sistrom A 10X.....	90
Tableau 4.2.2. Solution des éléments en trace (100 ml).....	90
Tableau 4.2.3. Solution de vitamines (100 ml).....	90
Tableau 4.2.4. Préparation d'1L du milieu Sistrom A (1X).....	91
Tableau 4.2.5. La composition chimique du milieu basal.....	91
Tableau 4.2.6. La composition chimique du milieu asy.....	91
Tableau 4.2.7. La composition chimique du milieu gL.....	94
Tableau 5 .1. Caractérisation de la souche <i>E coli ATCC8739</i>	105
Tableau 5.2. Les résultats de la galerie API 20E.....	107
Tableau. 6.1. La conception expérimentale de Box Behnken pour l'optimisation du taux de production de l'hydrogène par <i>E coli ATCC 8739</i>	122
Tableau .6.2: Test ANOVA pour le taux de production de l'hydrogène par <i>E coli ATCC 8739</i>	124
Tableau. 6.3. Les valeur de la probabilité « p ».....	126
Tableau. 6.4. Taux maximaux de production de l'hydrogène par les différentes souches de <i>E coli</i>	132
Tableau.9.1. Les constantes de l'équation de Gompertz Modifié et les valeurs expérimentales pour les différentes intensités.....	180
Tableau. 9.3. La production de l'hydrogène par des différentes souches de <i>Rhodobacter sphaeroides</i> (R sp).....	186

LISTE DES FIGURES

Fig.1.1. Les différentes voies de transport d'électrons dépendant de la lumière pour la photobioproduction de l'hydrogène.....	23
Fig. 1.2. Representation schematique de la (A) [FeFe]-hydrogenases et (b) [NiFe]-hydrogenases	24
Fig. 1.3. Biophotolyse direct.....	25
Fig. 1.4. Biophotolyse indirecte.....	26
Fig. 1.5. La nitrogénase et l'hydrogénase	28
Fig. 1.6. Production de l'hydrogène par photofermentation.....	29
Fig. 1.7. Production de l'hydrogène par fermentation.....	30
Fig. 1.8. Les hydrogénases (a) Structure cristalline et (b) le site actif de (à droite) [Ni-Fe] Hydrogénase et de (à gauche) [Fe-Fe] hydrogénase.....	31
Fig. 1.9 Principales voies métaboliques de la production de biohydrogène par voie fermentaire...	32
Fig. 1.10. La Synergie des bioprocédés.....	37
Fig.2.1. Taux de croissance de <i>E coli</i> (mésophile).....	40
Fig.2.2. Le métabolisme fermentaire chez <i>E coli</i>	42
Fig.2.3. La glycolyse (Voie d'Emden-Meyerhof-Parnas EMP).....	43
Fig.2.4. Mécanisme de production de l'hydrogène (a, b) et le modèle structural du complexe FHL de <i>E. coli</i> (b).....	49
Fig.3.1. <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	54
Fig.3.2 Le métabolisme central de <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	57
Fig.3.3. (a)Chromatophore, (b) Invaginations membranaire renfermant l'appareil photosynthétique	58
Fig. 3.4. L'appareil photosynthétique de <i>Rhodobacter sphaeroides</i> (a) Structure tridimensionnelle, (b) Topographie à grande résolution des différents composants de l'appareil photosynthétique de <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	59
Fig.3.5. Structure tridimensionnelle du centre réactionnel.....	60
Fig.3.6. (a) Spectre d'absorption des composants de l'appareil photosynthétique, (b) Effet de l'oxygène sur la synthèse des composants de l'appareil photosynthétique...	61
Fig.3.7. Mécanisme de photosynthèse et de transfert d'électrons.....	62
Fig.3.8. Mécanisme de production de l'hydrogène chez <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	66
Fig.3.9. Principe des systèmes hybrides des bactéries fermentaires et photo -Fermentaires « <i>Rhodobacter sphaeroides</i> ».....	70
Fig.4. 1.1. Revivification de la souche bactérienne.....	76
Fig.4.1.2. La galerie API 20E utilisée pour l'étude des caractères biochimiques (a) avant et (b) après inoculation (ensemencement).....	80
Fig.4.1.3. Ensemencement des bactéries dans une galerie de milieu pour identification des caractères biochimiques.....	81
Fig. 4.1.4. Fiche de résultats de la galerie Api 20E.....	81
Fig.4.1.5. Bioréacteur (a), photo ; (b), schéma.....	84
Fig.4.1.6 Courbe d'étalonnage pour déterminer les concentrations en biomasse à partir de leurs densités optiques.....	87
Fig.4.1.7. Courbe d'étalonnage pour déterminer les concentrations du glucose à partir de leurs densités optiques.....	88
Fig.4.2.1. Revivification de la bactérie lyophilisée <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	92
Fig.4.2.2. Réacteur cylindrique parfaitement agité.....	95

Résultats et discussions

Fig.5.1. Courbe de croissance de <i>E coli</i> ATCC8739 en aérobiose.....	102
Fig.5.2. Courbe de croissance de <i>E coli</i> ATCC8739 en anaérobiose.....	103
Fig.5.3. L'aspect de la culture bactérienne de la souche <i>E coli</i> sur milieu solide dans des boites de Pétri.....	103
Fig.5.4. Observation au microscope photonique Gx400 (Coloration Gram).....	104
Fig.5.5. Observation au microscope électronique à balayage.....	104
Fig.5.6. <i>Escherichia coli</i> sur milieu de MacConkey.....	106
Fig.5.7. La galerie API 20E après incubation.....	107
Fig.5.8. Temps nécessaire à la revivification de <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	108
Fig.5.9. Aspect des milieux de croissance.....	109
Fig.5.10. La cinétique de croissance en aérobiose (♦) et en anaérobiose (□).....	110
Fig.5.11. (a) Croissance en anaérobiose (b) Croissance en aérobiose.....	110
Fig.5.12. Différenciation de la membrane cellulaire en présence (a) en présence d'oxygène, b) en absence d'oxygène.....	111
Fig.5.13. Observation au microscope photonique de <i>Rhodobacter sphaeroides</i> CIP 60.6 Après coloration Gram.....	112
Fig.5.14. Observation au microscope électronique à balayage de <i>Rhodobacter sphaeroides</i> CIP 6....	112
Fig.6.1. Evolution du taux de production de l'hydrogène à différents pH initiaux.....	116
Fig.6.2. Evolution du taux de production de l'hydrogène à différents températures.....	117
Fig.6.3. Evolution du taux de production de l'hydrogène à différents concentration initiales en glucose.....	119
Fig. 6.4. Valeurs du taux de production de l'hydrogène aux sommets du domaine d'étude.....	121
Fig.6.5. Un plot des valeurs actuelles en fonction des valeurs prédites.....	123
Fig.6.6. Les surfaces de la méthodologie de réponse en trois dimensions pour RH_2	128
Fig.6.7. Courbes d'isoréponses dans les plans, pH–concentration pour une température optimale (a), température-substrat pour un pH optimal (b) et température-pH pour une concentration optimale (c).....	129
Fig.6.8. Profile d'optimisation du taux de production de l'hydrogène.....	130
Fig.6.9. Profile du taux de production de l'hydrogène par le modèle validé.....	131
Fig.7.1. Effet de Fe^{2+} sur l'évolution de la production de l'hydrogène.....	136
Fig.7.2. Effet de Fe^{2+} sur la production cumulatif de l'hydrogène.....	137
Fig.7.3. Effet de Fe^{2+} sur les taux de la production de l'hydrogène.....	138
Fig.7.4. Effet de Fe^{2+} sur le rendement de la production de l'hydrogène.....	139
Fig.7.5. Effet de Fe^{2+} sur le pourcentage d'augmentation (%) du taux de production (a) et du rendement de la production de l'hydrogène (b).....	141
Fig.7.6. Effet de Fe^{2+} sur l'évolution de la croissance cellulaire.....	142
Fig.7.7. Effet de Fe^{2+} sur le rendement (a) et le taux (b) de la production en biomasse.....	144
Fig.7.8. Effet de Fe^{2+} sur le pourcentage d'augmentation (%) du taux (R_x) et du rendement (Y_x) de production en biomasse	145
Fig.7.9. Effet de Fe^{2+} sur la consommation du glucose par <i>E coli</i> ATCC 8739 en mode fermentaire.....	146
Fig.7.10. Effet de Fe^{2+} sur l'efficacité de consommation du glucose par <i>E coli</i> ATCC 8739.....	147
Fig.7.11. Effet de Fe^{2+} sur l'évolution du pH au cours de la fermentation.....	148
Fig.7.12. Evolution de la valeur final du pH en fonction des différentes concentrations de Fe^{2+}	149

LISTE DES FIGURES

Fig.8.1. Effet de Ni^{2+} sur l'évolution de la production de l'hydrogène.....	155
Fig.8.2. Effet de Ni^{2+} sur la production cumulatif de l'hydrogène.....	156
Fig.8.3. Effet de Ni^{2+} sur les taux de la production de l'hydrogène.....	157
Fig.8.4. Effet de Ni^{2+} sur le pourcentage d'augmentation (%) du taux de production de la production de l'hydrogène.....	158
Fig.8.5. Effet de Ni^{2+} sur le rendement de la production de l'hydrogène.....	159
Fig.8.6. Effet de Ni^{2+} sur le pourcentage d'augmentation (%) du rendement de la production de l'hydrogène.....	159
Fig.8.7. Effet de Ni^{2+} (mg/l) sur l'évolution de la croissance cellulaire.....	160
Fig.8.8. Effet de Ni^{2+} sur le rendement (a) et le taux (b) de la production en biomasse & sur le pourcentage d'augmentation (%) du taux (Rx) et du rendement (Yx) de production en biomasse (c)....	161
Fig. 8.9. Effet de Ni^{2+} sur la consommation du glucose par <i>E coli ATCC 8739</i> en mode fermentaire.....	163
Fig. 8.10. Effet de Ni^{2+} sur l'efficacité de consommation du glucose par <i>E coli ATCC 8739</i>	164
Fig. 8.11. Effet de Ni^{2+} sur l'évolution du pH au cours de la fermentation.....	165
Fig 8.12. Evolution de la valeur finale du pH en fonction des différentes concentrations de Ni^{2+}	165
Fig. 9.1. Taux spécifique de croissance bactérienne dans le milieu basal.....	169
Fig.9.2. Optimisation de l'âge de la culture bactérienne.....	170
Fig.9.3. L'effet de l'intensité lumineuse sur la croissance cellulaire.	172
Fig.9.4. L'effet de l'intensité lumineuse sur la production de l'hydrogène.	172
Fig.9.5. Le model de Leudeking pir pour les cinétiques de production de l'hydrogène par <i>Rhodobacter sphaeroides CIP 60.6</i>	174
Fig.9.6. La variation de (a) et (β) avec l'intensité lumineuse.....	175
Fig.9.7. Cinétique de la production d'hydrogène (a) et de la croissance de <i>R.sphaeroides CIP 60,6(b)</i>	177
Fig.9.8. Évolution dans le temps du taux de production d'hydrogène au cours de photofermentation à différentes intensités lumineuses. ♦, 1000lux; □, 2500lux; ▲, 4500lux; ■, 8500lux.....	178
Fig.9.9. Modélisation non linéaire de la cinétique de production de l'hydrogène et plot des valeurs actuelles en fonction des valeurs prédites.....	181
Fig.9.10. Effet de l'intensité lumineuse sur l'évolution pH.	183
Fig.9.11. Effet de la pression partielle de l'hydrogène PH_2 sur la production du biohydrogène...	184

Introduction

Les sociétés industrielles dépendent d'approvisionnements mondiaux abondants et constants en ressources énergétiques pour fonctionner et progresser. À l'aube du XXI^e siècle, l'énergie reste un enjeu majeur, tant au niveau politique, économique, scientifique qu'environnemental, elle est l'une des plus importante, mais aussi l'une des plus abstraite car elle n'est pas directement tangible.

Aujourd'hui, la technologie permet d'en produire en grande quantité, en utilisant toutes les ressources possibles [1,2]. On distingue deux types de source d'énergie primaire, les ressources énergétiques renouvelables (Le rayonnement solaire [3-5], la géothermie, les interactions gravitationnelles Terre-Lune-Soleil [3] et les déchets[1]) , et les ressources énergétiques non renouvelables (le pétrole [5], le charbon [3, 6], le gaz naturel [5, 7], la fission et la fusion nucléaire [3, 8]). Cependant, avec l'accroissement de la population mondiale, la demande énergétique est en pleine expansion et ne cessera de croître dans les années à venir [9].

En conséquence, l'épuisement des réserves d'énergies fossiles est aujourd'hui reconnu, tant par les scientifiques, les pays producteurs que par les industriels, à quelques nuances chronologiques près. Cette raréfaction des matières premières est un problème mondial majeur particulièrement critique au niveau des ressources énergétiques. L'estimation des réserves accessibles de pétrole est difficile car elle est influencée par divers facteurs technologiques, politiques et économiques [3,10,11]. De plus, les utilisations énergétiques dont la combustion massive [12], conduisent à de fortes pollutions dont les rejets de gaz à effet de serre [13]. Toutefois, l'énergie et l'environnement sont les deux soucis les plus importants sur le plan social et économique.

La croissance de la consommation mondiale, la raréfaction des matières premières, la flambée et l'instabilité des coûts et les violentes pollutions, déjà amorcées et qui vont sans doute s'amplifier, conduiront à changer de ressources pour se tourner vers des solutions moins coûteuses : celles d'origine renouvelable. Ainsi, l'indice de développement durable est de classer les pays en fonction de leur capacité à fournir un système énergétique sûr, abordable et respectant l'environnement [14].

A l'heure actuelle, les deux principaux vecteurs énergétiques sont l'électricité et la chaleur [15]. L'hydrogène est un nouveau vecteur, qui pourrait devenir prépondérant [2]. C'est un carburant non toxique et très énergétique, il est largement accepté comme un remplaçant potentiel de carburants de fossiles, c'est le moyen le plus efficace pour convertir l'énergie chimique en une énergie électrique [2,16]. A présent, l'hydrogène est l'une des alternatives fréquemment évoquées avec la capacité de jouer un rôle de premier ordre dans les prochaines décennies [17,18].

Cependant, dans la nature l'hydrogène n'existe pas à l'état libre, il ne s'y trouve qu'à l'état combiné, surtout dans l'eau, les hydrocarbures et la biomasse. Ses procédés de production sont variés. Généralement, presque tout l'hydrogène produit est lié à la conception des fuels fossiles

[19]. Actuellement, 95% de l'hydrogène est fabriqué à partir de sources d'énergies fossiles. Il existe actuellement trois procédés de production, le reformage du gaz naturel, la gazéification du charbon et l'électrolyse de l'eau[16].

L'électrolyse de l'eau constitue en effet une autre technique de production, permettant le stockage de l'énergie électrique, sous une forme chimique stable qui, au moment voulu, peut à nouveau être transformée en électricité ou en chaleur. Son utilisation dans des piles à combustible ou sa combustion résulte essentiellement en un rejet d'eau [2] et à priori, dans l'avenir si l'hydrogène doit remplacer ces carburants, il doit être produit de façon renouvelable, en très grandes quantités, à des coûts compétitifs et sans émission de gaz à effet de serre. L'hydrogène produit à partir des énergies renouvelables semble être la solution parfaitement compatible avec l'environnement tenant compte de son caractère inépuisable. Sa production exige des investissements importants. Pour relever ce défi, la communauté scientifique travaille sans relâche pour mettre au point des procédés de production innovateurs et durables [2,17].

L'énergie solaire, la biomasse, l'énergie éolienne, l'énergie hydraulique peuvent être utilisées indirectement pour produire l'hydrogène par plusieurs processus tels (la photoélectrolyse, la thermolyse de l'eau, les cycles thermochimiques et la production biologique de l'hydrogène) [20]. Malheureusement, les deux procédés de production de l'hydrogène électrochimiques et thermochimique nécessitent des apports élevés en énergie obtenus à partir de ressources non-renouvelables. Dans la dernière décennie, des expériences ont démontré qu'il est possible de produire l'hydrogène biologiquement, aussi appelé biohydrogène. Les processus biologiques peuvent être techniquement et économiquement viables et faciles [21]. Cette voie biologique est considérée comme l'une des perspectives en biotechnologie, suggérant la génération des énergies renouvelables et propres écologiquement à partir d'une variété de substrats et dans différentes conditions environnementales, c'est une excellente alternative.

Dans un tel bioprocédé, l'hydrogène peut être produit par biophotolyse directe ou indirecte, par fermentation sombre et par photofermentation. Il est le produit de plusieurs voies métaboliques fermentaires ou phototrophes qui convertissent le substrat organique et l'énergie solaire en une énergie chimique sous forme d'hydrogène [22-25]. Des travaux récents [17, 18,21] ont porté sur l'optimisation de la production biologique de l'hydrogène par voie fermentaire et phototrophe pour améliorer et maximiser le taux de production et l'efficacité des bioprocédés qui reçoivent une attention considérable par plusieurs chercheurs dans le monde. Plusieurs types de microorganismes photosynthétiques et fermentaires sont généralement utilisés pour la production biologique de l'hydrogène [26].

C'est dans ce cadre que s'inscrit notre sujet de thèse de Doctorat. Deux types de microorganismes producteurs de l'hydrogène photofermentaire et fermentaire, ainsi que plusieurs paramètres ont été étudiés en vue d'améliorer les productivités et les rendements de production du biohydrogène et de bien comprendre la réponse d'une culture bactérienne suite à la modification volontaire des conditions environnementales menant à la production de l'hydrogène.

La photofermentation est la voie la plus avantageuse pour la production de biohydrogène par rapport à d'autres bioprocédés photosynthétiques en raison, de sa capacité d'utiliser une grande variété de substrats organiques, de son rendement élevé de conversion du substrat, de sa production d'ATP par la photosynthèse et de son incapacité de produire de l'oxygène qui inhibe l'activité enzymatique [21]. Ce sont des organismes aquatiques trouvés dans un grand choix

d'environnements, incluant les systèmes d'eau douce et marine [27]. Parmi ces bactéries, les bactéries pourpres non sulfureuses photosynthétiques facultatives (BPNS) qui présentent une très grande diversité métabolique [28], elles sont capables de convertir des petits acides organiques pour assurer la croissance et la production de l'hydrogène dans des conditions anaérobies en présence de lumière, par une enzyme dite nitrogénase [18, 29]. Par exemple, parmi ces bactéries pourpres non soufrées, on peut évoquer *Rhodobacter sphaéroïdes*, une candidate favorable à la production à grande échelle en raison de sa capacité d'employer une large variété de substrats et de sa haute activité et rendement dans la production de l'hydrogène. C'est une bactérie très prometteuse [30-35].

Inversement aux bactéries photo-fermentaires, les bactéries fermentaires anaérobies n'ont pas besoin d'illumination pour produire du bio-hydrogène permettant ainsi d'éviter les problèmes associés au design de bioréacteurs en tenant compte de la distribution de la lumière à l'intérieur des bioréacteurs. Une production de biohydrogène se basant sur cette voie métabolique, désignée par le terme de « Dark Fermentation », peut fonctionner à « capacité maximale » toute la journée et toute la nuit, ce qui n'est point le cas des productions liées à une voie photo-trophique.

Dans le processus de fermentation anaérobie, le substrat est dégradé par des voies métaboliques en acides organiques plus simples et il y a une production concomitante de l'hydrogène par ces microorganismes en oxydant les éléments réducteurs s'accumulant pendant le métabolisme [36,37]. Parmi les bactéries fermentaires anaérobies, on trouve l'espèce *E. coli*, une idéale représentative des bactéries anaérobies facultatives, elle peut produire de l'hydrogène sans lumière et peut utiliser différents types de substrats, elle peut rapidement consommer de l'oxygène et de récupérer l'activité enzymatique dans des conditions anoxiques contrairement aux bactéries anaérobies strictes qui sont très sensibles à l'inhibition par l'oxygène. *E. coli* fournit aussi d'autres avantages importants par rapport aux autres micro-organismes, elle est rapidement et facilement cultivée (en aérobiose) et elle n'est pas sporulante [38,39].

Par ailleurs, le développement et l'amélioration d'un procédé microbiologique, tel que le procédé de production de l'hydrogène, repose sur l'optimisation des conditions environnementales et la maximisation des productivités (biomasse microbienne et hydrogène). Ces critères impliquent la définition des conditions conduisant aux meilleurs profils en ce qui concerne les courbes de croissance et de production.

Concernant les microorganismes fermentaires, nous nous sommes proposés d'étudier la bactérie fermentaire anaérobie facultative *E. coli* ATCC 8739. Des méthodes d'optimisation à un et à plusieurs facteurs à la fois ont été utilisées pour optimiser et améliorer l'efficacité du bioprocédé. Pour définir ces conditions, une méthode statistique d'optimisation a été mise en œuvre en utilisant les données expérimentales quantitatives pour déterminer et résoudre simultanément des équations multivariées. Pour cela, 8 réacteurs ont été réalisés par nos soins et mis en marche en parallèle pour mener à bien nos expériences.

Certaines molécules telles que le fer et le nickel sont essentielles à la survie des microorganismes et sont impliquées dans la traduction d'enzymes productrices de biohydrogène, leurs effets sur le métabolisme cellulaire, le mécanisme et l'efficacité de la production du biohydrogène et la croissance cellulaire ont été étudiés dans le cadre de ce travail dans le but de déterminer leurs effets et leurs quantités optimales.

Concernant les microorganismes photo-fermentaires, la souche *Rhodobacter sphaeroides* CIP60.6 a été étudiée de façon plus approfondie dans l'optique d'une bonne acquisition de nouvelles connaissances sur le mécanisme et le métabolisme de la production de l'hydrogène et sur les caractéristiques microbiennes de la souche. Plusieurs paramètres ont été étudiés en vue d'améliorer les productivités ainsi que les rendements de production de biohydrogène.

Le modèle Luedeking-Piret a été utilisé pour la première fois pour déterminer le mode de production de l'hydrogène et la relation entre la croissance cellulaire et la production de l'hydrogène. L'équation modifiée de Gompertz a été appliquée pour les données expérimentales pour vérifier l'exactitude et l'accord du modèle avec les résultats expérimentaux. Une étude comparative a été faite, la productivité de ces deux souches, a été comparée à celle des autres souches de la même espèce.

Cette thèse est structurée en dix chapitres :

Le premier chapitre est consacré à la bioproduction de l'hydrogène. Les différents modes de production de biohydrogène, les différents microorganismes, leurs mécanismes de production, les inconvénients rencontrés, la rentabilité, les bioréacteurs employés sont présentés.

Le deuxième chapitre décrit la taxonomie, le métabolisme et le mécanisme de fermentation et de production de l'hydrogène par *E. coli*, une bactérie fermentaire aéro - anaérobie facultative ; ainsi que les travaux scientifiques réalisés pour l'amélioration de la production du biohydrogène ;

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

Le quatrième chapitre est consacré aux matériel et méthodes utilisés, ce chapitre est divisé en deux parties une décrit le plan opératoire effectué pour la production de l'hydrogène par voie fermentaire et la seconde présente le plan expérimental pour la production de l'hydrogène par voie photo-fermentaire.

Le volet résultats et discussions est présenté dans les cinq chapitres suivants dont

- Le cinquième chapitre concerne l'identification des deux souches étudiées *E. coli* ATCC 8739 et *Rhodobacter sphaeroides* CIP 60. A présent, la caractérisation d'une bactérie repose sur l'étude de ses critères culturels, morphologiques et biochimiques.
- Le sixième chapitre, concerne la production fermentaire de l'hydrogène en bioréacteur. La souche *E. coli* ATCC 8739 est nouvellement utilisée pour la production de l'hydrogène. Cependant, pour développer un bioprocédé plus pratique, les conditions opératoires doivent être optimisées. Pour cela, deux mode d'optimisation ont été employé, un « classique » qui permet d'optimiser et d'étudier l'effet des '*facteurs individuels*' sur la réponse étudiée et l'autre « *statistique* » qui utilise la méthodologie de surface de réaction (RSM) pour :
 - (i) identifier les facteurs influant la production de l'hydrogène,

(ii) obtenir un modèle expérimental basé sur la modélisation statistique qui permettra d'évaluer les interactions entre un ensemble de facteurs expérimentaux indépendants et les réponses observées,
iii) et pour déterminer les conditions optimales de fonctionnement afin de maximiser le taux de production de l'hydrogène.

- Le septième chapitre contient l'effet du cofacteur « Fer » sur l'efficacité de production de l'hydrogène, la croissance cellulaire, l'évolution du pH et l'efficacité de consommation du substrat ;
- Le huitième chapitre est consacrée pour l'étude de l'effet du métal lourd « le Nickel » sur l'efficacité de production de l'hydrogène, la croissance cellulaire, l'évolution du pH et l'efficacité de consommation du substrat.
- Le neuvième chapitre concerne la production photofermentaire de l'hydrogène en photobioréacteur. La souche *Rhodobacter sphaeroides* CIP 60.6 est nouvellement utilisée pour la production de l'hydrogène. Plusieurs paramètres ont été étudiés et optimisés, essentiellement l'effet de l'environnement physico-chimique sur la production biologique de l'hydrogène et la caractérisation cinétique de la souche. Des méthodes de modélisations linéaires et non linéaires ont été employées. Des études comparatives ont été effectuées entre les résultats expérimentaux trouvés et les profils de la production hydrogène obtenus des modèles prédits, et entre la productivité de la souche étudiée par rapport à d'autres souches de la même espèce.

Enfin et pour finir, une conclusion générale reprend les principaux apports scientifiques de ce modeste travail.

Chapitre 1.

Revue sur la production biologique de l'hydrogène

Sommaire

1.1. Introduction.....	21
1.2. Les méthodes de production du biohydrogène.....	22
1.2.1. La bioconversion de l'énergie solaire.....	22
1.2.1.1. La biophotolyse	22
1.2.1.1.1. La biophotolyse directe.....	23
1.2.1.1.2 La biophotolyse indirecte.....	25
1.2.1.2. La photofermentation anoxygénique	27
1.2.1.2.1. La nitrogénase et l'hydrogénase.....	28
1.2.1.2.1. Le métabolisme de la production de l'hydrogène par photofermentation.....	28
1.2.2. La fermentation sombre.....	29
1.2.2.1. le métabolisme de la production d'hydrogène par fermentation.....	29
1.2.2.2. Les [Ni-Fe]-Hydrogénases et les [Fe-Fe]- hydrogénases.....	30
1.2.2.3. Les voies fermentatives des bactéries anaérobies strictes et anaérobies facultatives....	32
1.2.3. Etude comparative	33
1.3. Les stratégies d'augmentation de l'efficacité des bioprocédés.....	35
1.4. Conclusion.....	37

1.1. Introduction

Avec la prise de conscience collective sur les méfaits de l'effet de serre, occasionnés par l'utilisation des combustibles ou carburants fossiles et, suite à l'édition d'une directive mondiale en faveur du développement des biocarburants, l'intérêt des « biotechnologies environnementales » a été, récemment, totalement relancé. Ce terme désigne des technologies exploitant des processus cellulaires ou moléculaires grâce à la biochimie, la microbiologie en vue de synthèse et de production de nouveaux produits pour des fins industrielles, environnementales.

Les micro-organismes, sont des êtres vivants microscopiques et ubiquitaires qui représentent la biomasse la plus importante de la terre. On considère qu'ils sont apparus il y a environ 3,8 milliards d'années et leur mise en évidence, remonte au XVII^e siècle [40]. Ils sont avant tout indispensables à l'équilibre de la biosphère en participant aux cycles élémentaires de la nature et des producteurs du biogaz et de biohydrogène.

L'hydrogène moléculaire est un élément propre et de haute énergie, il est le combustible idéal des piles à combustible, le moyen le plus efficace pour convertir l'énergie chimique en énergie électrique. L'hydrogène est devenu dans ces dernières années l'une des questions les plus débattues dans les milieux spécialisés de l'énergie [2, 16], avec la capacité de jouer un rôle de premier ordre dans les prochaines décennies. Il est considéré comme un vecteur énergétique le plus apte à répondre aux exigences socioéconomiques, environnementales et industrielles actuelles indemnes de toute pollution [17, 18] et un potentiel substitutionnel des fuels fossiles.

L'hydrogène n'est pas disponible dans la nature et nécessite différents procédés de production qui varie en termes de matière première, de complexité, de rendement, de pureté et de coût de l'hydrogène obtenu. La voie la plus commune de production de l'hydrogène repose sur l'utilisation des ressources fossiles, et plus spécifiquement des hydrocarbures [12]. Ces méthodes sont fort coûteuses, à fortes intensités énergétiques et polluantes. Contrairement à ces méthodes, la production biologique de l'hydrogène est propre, efficace, renouvelable et moins coûteuse, elle se caractérise par un processus environnemental inoffensif, qui se réalise dans des conditions opératoires douces [21].

La production du biohydrogène, soit par des microorganismes photosynthétiques ou fermentaires, semble être la solution parfaitement compatible avec l'environnement tenant compte de son caractère inépuisable et des avancées techniques et technologiques qui améliorent sa performance et sa compétitivité [22-25].

Ce chapitre vise à présenter les nouvelles options énergétiques durables comme celle qui pourrait naître de la culture industrielle des microorganismes.

1.2. Les méthodes de production de biohydrogène

On dénombre plusieurs méthodes de production biologique de l'hydrogène se retrouvant chez une panoplie de microorganismes. Effectivement, les microorganismes photosynthétiques comme les bactéries pourpres tel que *Rhodobacter sp.*, les cyanobactéries et les algues ou encore comme les microorganismes fermentaires comme *E. coli* et *E. aerogenes* sont utilisées pour la production de l'hydrogène [19]. Il est donc apparu primordial de développer une recherche relative à la production de l'hydrogène.

1.2.1. La bioconversion de l'énergie solaire

Le soleil est une source d'énergie disponible partout et renouvelable, et son utilisation dans la production d'énergie est non polluante. Mais les technologies qui permettent son exploitation ont un coût encore un peu élevé, et certaines étapes d'élaboration sont polluantes. La photosynthèse est l'une des technologies qui bio-convertit l'énergie solaire en une énergie chimique. Elle n'est réalisée que par les algues et un groupe restreint de micro-organismes : les cyanobactéries et les bactéries photosynthétiques. Celles-ci captent l'énergie lumineuse et la convertissent en énergie chimique [41].

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

La production de l'hydrogène photobiologique met en jeu une partie des mécanismes du processus de la photosynthèse oxygénique ou anoxygénique, respectivement chez les cyanobactéries/microalgues et les bactéries photosynthétiques. Ces dernières utilisent la lumière et le carbone organique (photofermentation), tandis que les cyanobactéries et les microalgues peuvent utiliser la lumière et le CO₂ comme seule source de carbone pour produire de l'hydrogène (photolyse de l'eau directe ou indirecte), en conditions d'anaérobie [5]. La figure 1.1, présente les différentes voies de transport d'électrons dépendant de la lumière pour la photobioproduction de l'hydrogène.

1.2.1.1. La biophotolyse

La biophotolyse est l'action de la lumière sur un système biologique qui se traduit par la dissociation d'un substrat, habituellement de l'eau, pour produire l'hydrogène. Cette méthode de production de l'hydrogène pourrait être attrayante pour le secteur industriel puisque l'hydrogène produit provient de la biophotolyse de l'eau rendant cette plus efficiente que certaines alternatives au niveau du rendement énergétique.

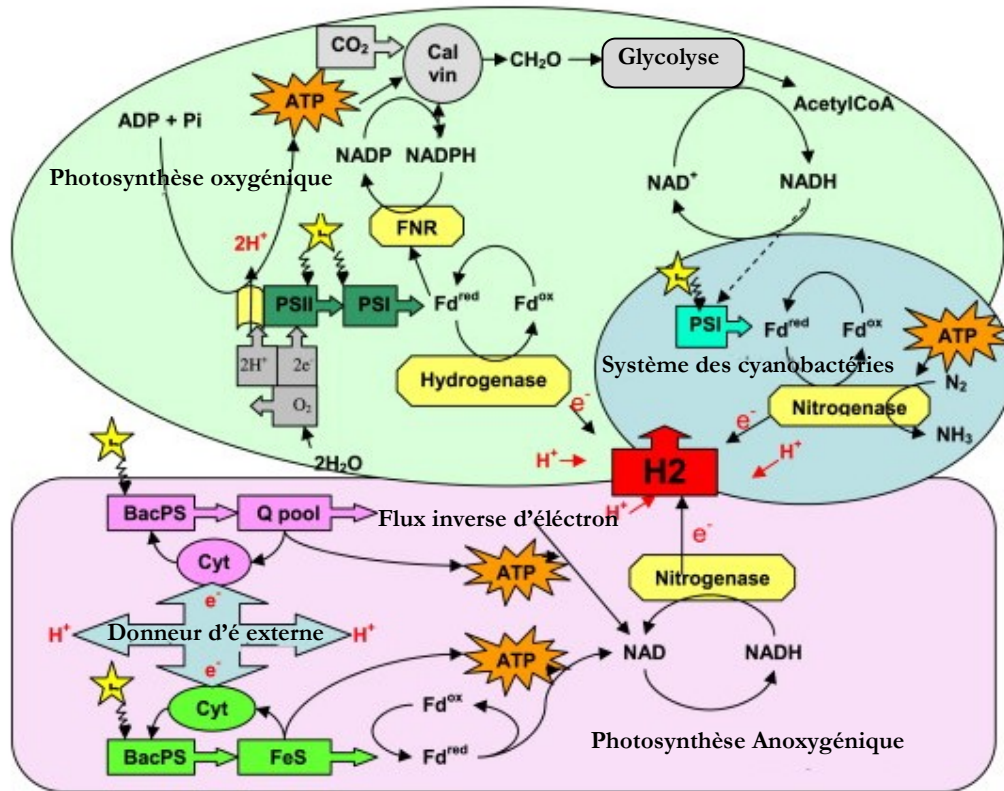


Fig.1.1. Les différentes voies de transport d'électrons dépendant de la lumière pour la photobioproduction de l'hydrogène [32]

1.1.1.1. La biophotolyse directe

Une biophotolyse directe est un processus biologique qui utilise de l'énergie solaire et les systèmes photosynthétiques des algues et des cyanobactéries pour convertir l'eau en une énergie chimique. Les algues vertes sont des organismes eucaryotes photoautotrophes oxygéniques.

L'appareil photosynthétique et les voies métaboliques sont similaires à ceux des plantes, on cite comme exemple *Scenedesmus obliquus*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella*, et *Scenedesmus*. La photosynthèse nécessite les chloroplastes qui constituent les photosystèmes PSI et PSII et les complexes pigments-protéines contenant la chlorophylle a et b.

Les algues sont très abondantes sur terre, principalement dans les eaux douces et les eaux de mer [42]. En 1942, Gaffron et Rubbin [43] étaient les premiers à avoir observé la production de l'hydrogène par les algues vertes, *Scenedesmus obliquus*, après une phase d'anaérobiose. Elles décomposent la molécule d'eau en hydrogène et en oxygène (biophotolyse directe). L'enzyme impliqué dans cette réaction est une [FeFe]-hydrogénase [12, 43,44].

Les cyanobactéries représentent un large groupe de microorganismes procaryotes photoautotrophes dont beaucoup sont capables de fixer l'azote atmosphérique, on cite comme exemple *Anabaena variabilis*, *Nostoc punctiforme*, et *Synechocystis sp.* [42]. Les recherches sur les fossiles ont

déterminé que les cyanobactéries existent depuis 3 milliards d'années et sont donc les premiers à avoir produit de l'oxygène sur terre. L'appareil photosynthétique est similaire à celui des chloroplastes et la différence principale est le système pigmentaire. Les cyanobactéries dépendent de la chlorophylle (a) et du complexe protéique phycobiline, caroténoïdes ainsi que de l'énergie lumineuse ; ils ne contiennent pas de chlorophylles (b) [42].

Chez ces cyanobactéries fixatrices d'azote, comme chez les bactéries photosynthétiques, la production de l'hydrogène est principalement associée à la nitrogénase et l'hydrogène produit est souvent dégradé par une hydrogénase « uptake » associée. Une hydrogénase réversible bidirectionnelle permettant l'oxydation ou la synthèse de l'hydrogène est présente, cependant les réactions catalysées par les hydrogénases (chez les cyanobactéries et bactéries photosynthétiques) ne sont généralement pas en faveur de la production de l'hydrogène. Il faut noter que les hydrogénases chez les cyanobactéries sont de type Ni/Fe (Figure 1.2).

Dans la Figure I.2.B, nous pouvons voir que la [NiFe] hydrogénase bidirectionnelle des cyanobactéries se compose de cinq sous-unités. Une grande sous-unité, HoxH, représente le centre de la sous-unité catalytique de l'hydrogénase pentamérique. Elle contient des atomes de Fe et du Ni associés à des ligands CN et CO et à des atomes de soufre. Une petite sous-unité hydrogénase, HoxY, contient un groupe [4Fe-4S] qui est nécessaire pour transférer les électrons à la grande sous-unité catalytique. Pour le reste, trois sous-unités qui font partie du complexe diaphorase qui sont HoxF, HoxU, et HoxE et qui fonctionnent comme un canal d'électrons entre la NAD (P) H et le site actif des hydrogénases [26].

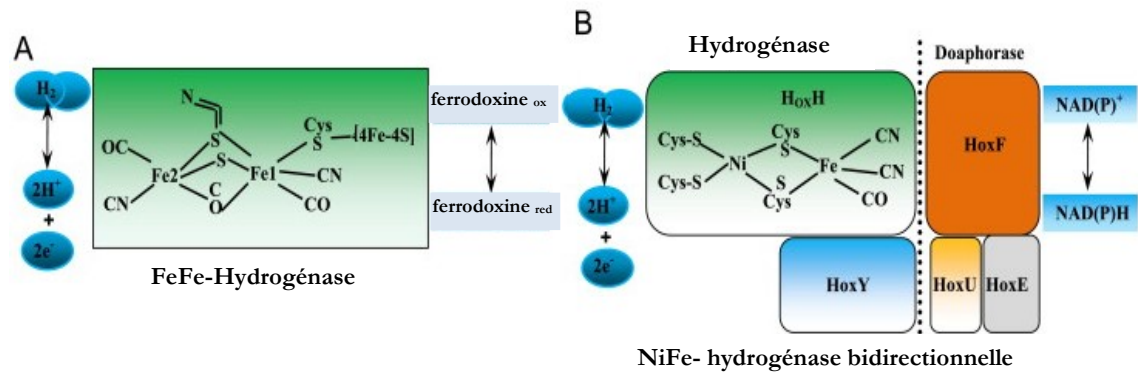
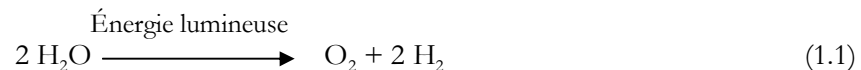


Fig. 1.2. Représentation schématique de la (A) [FeFe]-hydrogénases et (b) [NiFe]-hydrogénases. Adapté par Maness et al.[26]

Telle qu'illustrée dans la figure I.3, l'évolution de l'hydrogène durant la biophotolyse de l'eau implique deux systèmes de captage de photons qui sont situés dans la membrane du thylacoïdal chez les algues ou dans la membrane plasmique chez la cyanobactérie, le photosystème I (PSI) et le photosystème II (PSII). L'énergie des photons captée par le PSII catalyse la lyse de l'eau en O₂ et en électrons [45].



Ces électrons, après avoir interagi avec plusieurs molécules telles qu'avec certains cytochromes [46] réduiront alors le PSI [47]. Le PSI amorcera une autre chaîne de transfert d'électrons qui finiront par réduire la ferrédoxine oxydée pour générer la ferrédoxine réduite. Dans le contexte de croissance influencé par la photosynthèse, la Fd(red) réduira alors NADP⁺ pour générer NADPH et fixe le CO₂ par le cycle de Calvin [48]. Lorsqu'il y a production de l'hydrogène, les électrons provenant du PSI sont plutôt détournés vers une hydrogénase chez les algues et vers une nitrogénase chez les cyanobactéries, par les molécules de Fd(red). Le pouvoir réducteur et l'énergie (ATP) nécessaires à la formation de l'hydrogène par la nitrogénase sont fournis directement par les réactions liées à la lumière. La force protomotrice ainsi créée est à l'origine de la synthèse d'ATP. Les réactions s'écrivent comme suit [43,44] :

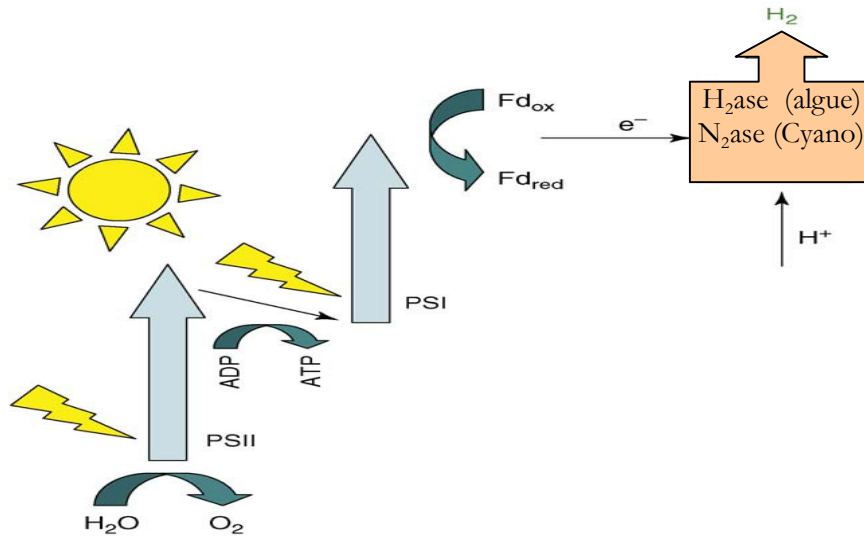
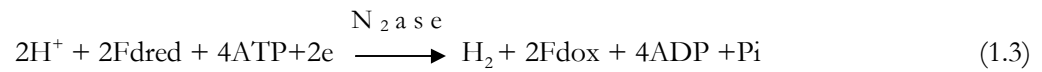
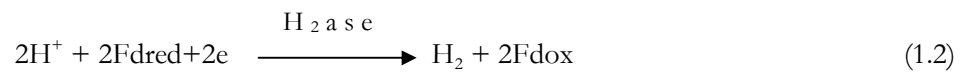


Fig.1.3. Biophotolyse Direct [49]

L'hydrogénase et la nitrogénase étant fortement sensibles à l'oxygène, elles ne sont donc actives qu'en conditions anaérobies. L'oxygène, étant, un produit de la photosynthèse oxygénique, la production d'H₂ photo-induite est rapidement inhibée et se limite donc en conditions normales à un phénomène transitoire [50].

1.2.1.1.2. La biophotolyse indirecte

Certains organismes ont développé des stratégies temporelles pour se protéger de l'inactivation par l'oxygène. Certaines cyanobactéries séparent physiquement le dégagement

d'oxygène et l'activité de la nitrogénase. On rencontre chez ces organismes, une différenciation de deux types de cellules. Les hétérocystiques ce sont les cellules végétatives à l'intérieur desquelles se déroulent la photosynthèse et les cellules spécialisées hétérocystes, à l'intérieur desquelles fonctionne la nitrogénase alors protégée de l'oxygène par une paroi cellulaire épaisse et imperméable du fait qu'elle ne possède pas de PSII.

Les cellules végétatives fournissent en partie aux hétérocystes le pouvoir réducteur (sous forme de composés carbonés) et l'ATP nécessaires aux réactions de réduction. Et un deuxième type de cellules, les non hétérocystiques qui ne possèdent pas cette adaptation ; et séparent donc dans le temps le dégagement d'oxygène et l'activité de la nitrogénase au cours biophotolyse indirecte (deux périodes éclairées et sombres). Nous citons comme exemple *Nostoc muscorum* qui réalise une biophotolyse indirecte [51,12].

Ce bioprocédé est utilisé en recherche, pour d'autres microorganismes qui n'ont pas ce type de mécanisme, dont l'objectif est d'éviter, d'une part, l'inhibition de l'hydrogénase et de la nitrogénase par l'oxygène et d'augmenter le taux de production de l'hydrogène. Plusieurs travaux convergent vers cette approche [43,52]. Dans une première phase les conditions sont favorables à la photosynthèse, permettant la croissance et l'accumulation de réserves carbohydratés ; de l'amidon chez les microalgues et du glycogène chez les cyanobactéries.

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 de l'hydrogène en présence de lumière [43, 52] (Figure 1.4). Par ailleurs cette deuxième étape peut être éliminée par l'inhibition du PSII, permettant le maintien des algues en anoxie et la production d'H₂. En effet, dans des conditions où le photosystème II (PSII) n'est pas actif, comme lors d'une carence en soufre ou en présence d'un inhibiteur, il y a production d'H₂ en présence de lumière sans dégagement d'O₂ [50, 51,53].

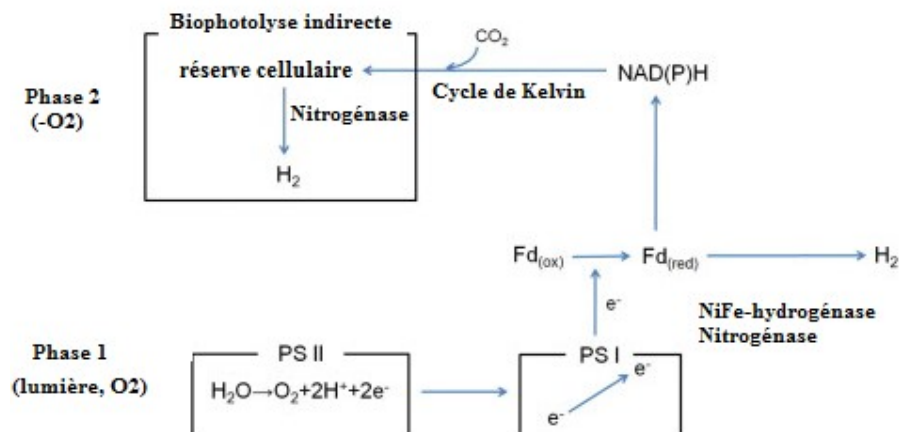
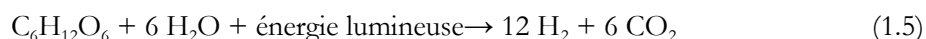
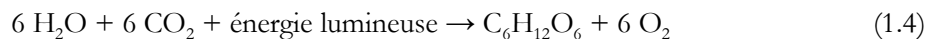


Fig. 1.4. Biophotolyse indirecte [36]

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



Le $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ joue le rôle de transporteur d'électrons intermédiaires entre la photosynthèse et les réactions de production de l'hydrogène séparées spatialement ou temporairement. Ces équations représentent un maximum théorique de conversion des substrats en hydrogène [18]. Pratiquement une augmentation du taux de production est observée chez *Gloeocapsa alpicola* (cyanobacters) [51] et chez *Chlamydomonas reinhardtii* (algues) [50].

1.2.1.2. La photofermentation anoxygénique

La photofermentation est un autre procédé qui tire profit de l'énergie solaire pour la croissance des microorganismes anoxygénique photohétérotrophe. Cependant, contrairement à la photosynthèse qui utilise l'eau comme donneur d'électrons, la photofermentation utilise plutôt des molécules organiques pour fournir les électrons qui sont requis pour la croissance.

Un avantage de poids pour la photofermentation est le fait que les bactéries pourpres non sulfureuses 'BPNS' sont un groupe de bactéries de taxonomie assez large faisant partie des alpha-protéobactéries dont la polyvalence et la capacité d'adaptation à leur environnement sont très grandes [58], on cite comme exemple *Allochromatium vinosum*, *Thiocapsa roseopersicina*, *R. sphaeroides*, *Chlorobium vibrioforme*, *Desulfuromonas acetoxidans*, et *Chloroflexus aurantiacus*.

De plus, une très grande diversité de substrats peut être utilisée comme donneur d'électrons par les bactéries photosynthétiques [12] tels que les acides organiques (bactéries pourpres non sulfureuses) ou les composés sulfatés réduits (bactéries vertes ou pourpres sulfureuses) qui seront convertis en H_2 et CO_2 /composés sulfatés oxydés [5], en anaérobie et dans des conditions anoxygènes.

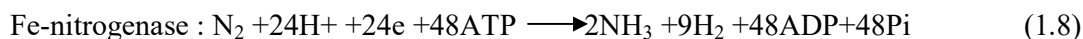
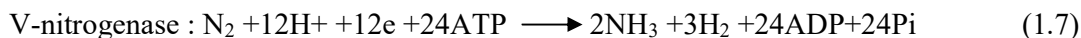
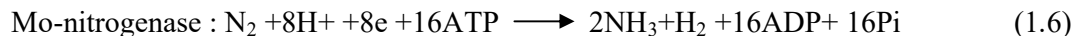
1.2.1.2.1. La nitrogénase et l'hydrogénase

La production de l'hydrogène par photofermentation est associée à l'action de la nitrogénase [59], une enzyme dont la fonction première est de réduire l'azote atmosphérique N_2 en ammoniacale.

Selon le type du cofacteur métallique unique présent dans les sites actifs de ces enzymes, au niveau des sites de liaison à l'azote et de la réduction, les nitrogénases sont classées, en trois types (i) les molybdènes, (ii) les vanadiums et les fers nitrogénases. La Mo-nitrogénase est de loin la plus largement caractérisée, elle est constituée de deux protéines, la protéine dinitrogénase MoFe et la protéine dinitrogénase réductase-Fe, ce sont les composants cruciaux de la nitrogénase.

Les " nitrogénases alternatives " contiennent du vanadium ou du fer, au lieu du molybdène. Elles sont structurellement similaires aux Mo-nitrogénases conventionnelles mais elles ont des

grappes catalytiques contenant le cofacteur FeVa ou le cofacteur FeFe, respectivement. Comme cela est représenté dans les équations. (1.7) et (1.8), ces nitrogénases alternatives favorables à la production de l'hydrogène, nécessitent une proportion plus élevée d'électrons pour la réduction de H^+ en H_2 par rapport aux Mo-nitrogénase. Actuellement, la souche *R. palustris CGA009* est la seule bactérie photosynthétique connue procédant ces trois nitrogénases [36].



Cependant, en absence d'azote, en conditions d'anaérobiose et en présence de lumière, elle catalyse la réduction des protons en hydrogène en utilisant l'énergie chimique de la cellule, selon la réaction (1.3) [60].

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

Nitrogénase et hydrogénase « uptake » sont donc étroitement liées (Figure 1.5) faut noter que la nitrogénase et l'hydrogénase sont extrêmement sensibles à l'oxygène et actives uniquement en conditions anoxiques [18, 23].

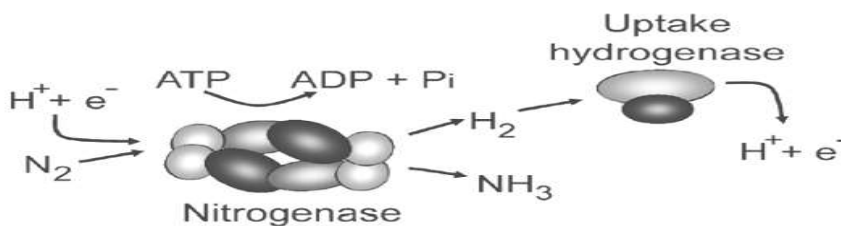


Fig. 1.5. La nitrogénase et l'hydrogénase [18]

1.2.1.2.2. Le métabolisme de production de l'hydrogène par photo fermentation

Les bactéries photosynthétiques utilisent les substrats organiques ou les substrats sulfatés comme donneurs d'électrons, ces électrons sont ensuite pris en charge par les transporteurs de la chaîne photosynthétique, et dirigés vers la nitrogénase grâce à l'énergie lumineuse (Figure 1.6). Ces électrons à bas potentiel sont alors utilisés pour la production de l'hydrogène. L'ATP, nécessaire au fonctionnement de l'enzyme, est générée par le transfert cyclique des électrons au niveau de cette chaîne [12,23].

Le processus de production de l'hydrogène par photofermentation est donc conduit par la lumière et est ATP-dépendant. L'équation de la réaction de conversion d'un substrat organique en hydrogène est la suivante [23] :

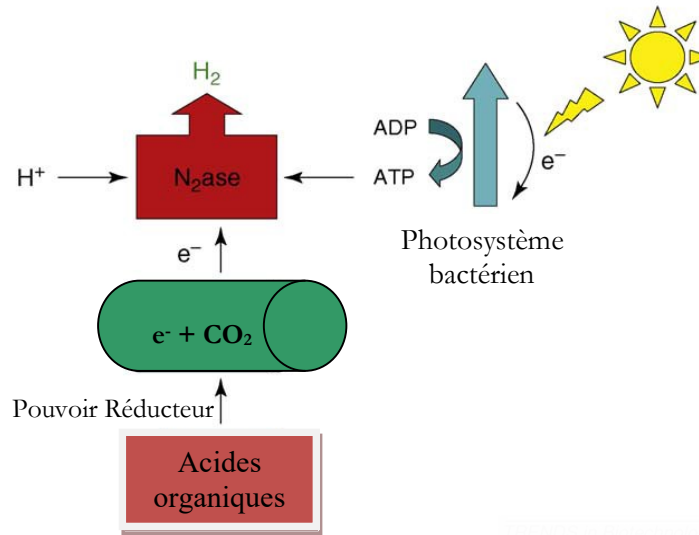
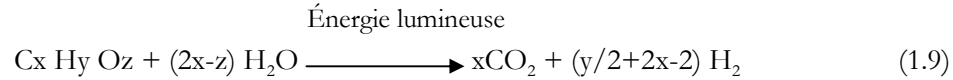


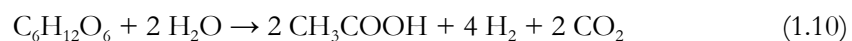
Fig. 1.6. Production de l'hydrogène par photofermentation. [49]

1.2.2. La fermentation sombre

Contrairement à la biophotolyse directe et à la photofermentation, la fermentation anaérobie, aussi appelé « Dark Fermentation », est un processus indépendant de la lumière, il n'a pas besoin d'une illumination pour produire du biohydrogène. La fermentation a un rendement énergétique faible et de ce fait elle n'est utilisée par les bactéries qu'en absence de tout accepteur exogène d'électrons. Elle permet la production d'ATP à partir de substrats organiques tels que le glucose ou le pyruvate [65].

1.2.1. Le métabolisme de la production de l'hydrogène par fermentation

Effectivement, dans le processus de fermentation anaérobie (Figure 1.7) un sucre est dégradé par des voies métaboliques en dioxyde de carbone, acides organiques plus simples, ou alcools et il y a production concomitante de l'hydrogène par l'organisme pour oxyder les éléments réducteurs qui s'accumulent pendant le métabolisme [2,5], selon la réaction suivante [60]:



Le principal avantage de la fermentation anaérobie pour la production de l'hydrogène est bien entendu le fait qu'aucune source lumineuse n'est nécessaire et, donc, que les inconvénients qui y sont liés ne posent pas de problèmes. En surcroît, une production de biohydrogène se basant sur cette voie métabolique peut fonctionner à capacité maximale toute la journée et toute la nuit, ce qui n'est pas le cas des productions liées à une voie phototrophique pour les raisons citées précédemment. Egalement, plusieurs types de micro-organismes hétérotrophes mésophiles anaérobies sont capables de produire de l'hydrogène par fermentation anaérobie notamment les familles des Clostridiaceae (anaérobies strictes tel que *Clostridium botulinum* [66], des Entérobactériaceae (anaérobies facultatives tel que *Enterobacter aerogenes* [67] et *E. coli* [68]).

1.2.2. Les [Ni-Fe]-Hydrogénases et les [Fe-Fe]-hydrogénases

La vie dépend de nombreuses séries de réactions chimiques, mais beaucoup de ces réactions se déroulent trop lentement. Par conséquent, la nature a conçu des catalyseurs pour accélérer grandement les taux de réactions biochimiques, que nous appelons maintenant des enzymes. Le mécanisme de production de l'hydrogène est biocatalysé par des enzymes dites hydrogénases qui présentent une grande sensibilité à l'oxygène.

Il existe trois types d'hydrogénases, les [Fe-Fe]-hydrogénases contenant uniquement des noyaux fer-soufre, et les [Ni-Fe]-hydrogénases possédant en plus, du nickel dans leur site actif (Figure I.8). Un autre type est les [Fe]-hydrogénase, ces enzymes diffèrent des [NiFe] - et [FeFe] -hydrogénases non seulement par les structures primaires et tertiaires, mais aussi par le fait que le fer, nécessaire à l'activité de l'enzyme redox n'est pas actif. Ils ne catalysent pas la réaction d'oxydo-réduction réversible. Ce type d'enzyme a été trouvé chez *Methanothermobacter marburgensis*, qui catalyse la réduction du CO_2 avec H_2 en méthane. Elle ne contient pas des clusters Fe-S ou du nickel, et il a été initialement nommé comme "hydrogénase sans métal". Plus tard, il a été rebaptisé "fer-soufre-cluster hydrogénase libre" ou tout simplement [Fe]-hydrogénase [36].

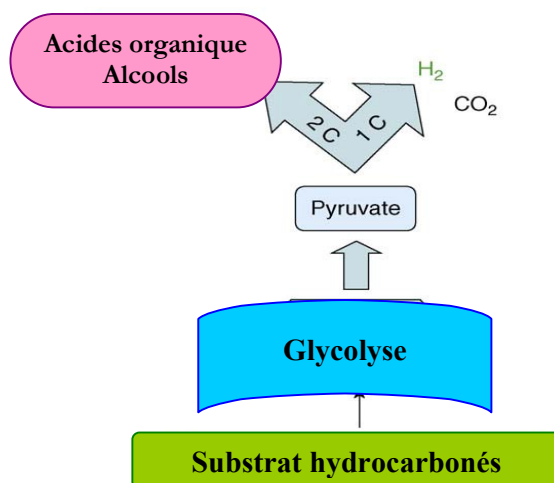


Fig. 1.7. Production de l'hydrogène par fermentation. [49]

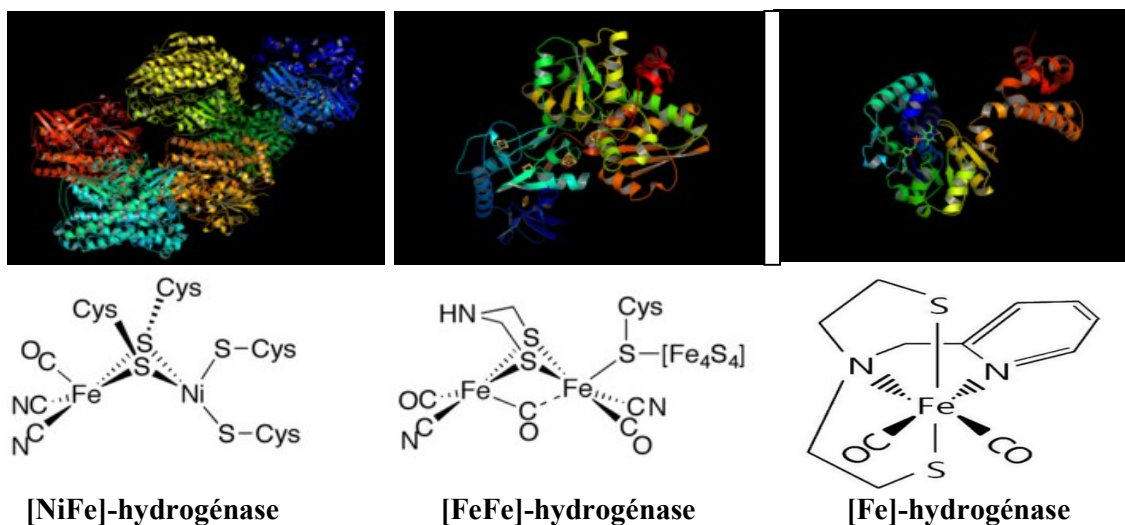


Fig.1.8. Les hydrogénases (a) Structure cristalline et (b) le site actif de (à droite) [Ni-Fe] Hydrogénase et de (à gauche) [Fe-Fe] hydrogénase [22, 36]

Chez *Clostridium. acetobutylicum*, une bactérie anaérobie stricte, une [Ni-Fe]-hydrogénase et une [Fe-Fe]-hydrogénase sont présentes sous forme soluble dans le cytoplasme [2]. En général, les [Ni-Fe]-hydrogénases s'apprêtent à catalyser l'oxydation de l'hydrogène, bien que des exceptions sont connus par exemple, l'Hyd3 des bactéries entériques est responsable du dégagement de l'hydrogène, tandis que, les [Fe-Fe] hydrogénases sont extrêmement actives dans la réduction des protons, mais là encore il y a des exceptions par exemple, les [Fe-Fe] hydrogénases périplasmiques des bactéries sulphato-réductrices. Ainsi, en fonction de l'organisme, le dégagement de l'hydrogène peut être catalysée par une [Fe-Fe] hydrogénase soluble chez *Clostridium* ou une classe spéciale [Ni-Fe]-hydrogénase liée à la membrane, Ech hydrogénase chez *Escherichia coli*, une bactérie anaérobie facultative [69, 70].

Les [Ni-Fe] -hydrogénases constituent le plus grand nombre des hydrogénases. Il est considéré que les hydrogénases contenant le Ni ont tendance à être moins sensible à l'inhibition par le CO et l'O₂ que [FeFe] -hydrogénases [36]. Toutefois, les [Fe-Fe]-hydrogénases sont les hydrogénases les plus intéressantes pour la production de l'hydrogène car leur activité de synthèse d'H₂ à partir de la ferrédoxine, leur substrat physiologique, est environ 100 fois plus élevée que celle des [Ni-Fe]-hydrogénases [2].

Les Ech hydrogénases, trouvés dans une variété d'organismes, sont intéressants car elles semblent capables de coupler le dégagement de l'hydrogène avec la génération d'un gradient de proton de la membrane [69,70]. En fait, selon les conditions de la croissance de l'organisme, les Ech hydrogénases sont probablement capables de coupler l'oxydation de l'hydrogène à la réduction de la ferrédoxine utilisant le gradient de la membrane pour entraîner le transport des électrons ou pour exciter la membrane au cours de la réduction des protons en hydrogène. Ces hydrogénases ont également été trouvés dans *Hyperthermophile archaeon*, *Pyrococcus furiosus* [71,72] et

le Gram positif *Thermoanaerobacter tengcongensis* [73] et peut être relativement répandue comme ils ont été trouvés par analyse récente dans 56 différents génomes et 28 différents archeal bactériennes [69].

1.2.2.3. Les voies fermentatives des bactéries anaérobies strictes et anaérobies facultatives

A ce jour, la plupart des études sur la production biologique de l'hydrogène à travers le processus de fermentation ont été effectuées en utilisant les bactéries anaérobies facultatives par exemple, *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae*, *Escherichia coli*, *Citrobacter intermedius* et les bactéries anaérobies strictes par exemple, *Clostridium beijerinckii*, *C. paraputrificum*, et *Ruminococcus albus*. Les principales voies métaboliques de la production de biohydrogène par voie fermentaire sont représenté dans la (Figure 1.9).

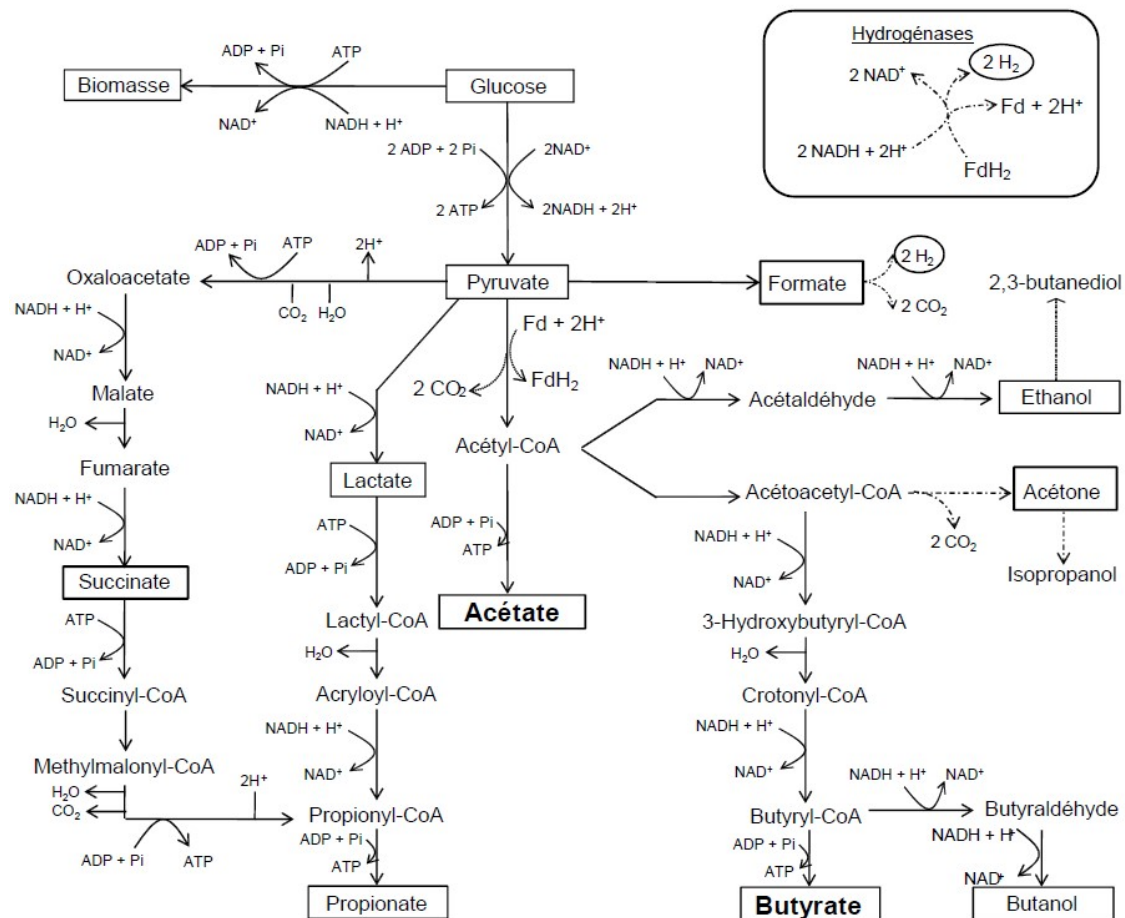


Fig.1.9 Principales voies métaboliques de la production de biohydrogène par voie fermentaire [77].

En pratique, la fermentation d'une variété de substrats pour une production possible de l'hydrogène est limitée à des matériaux riches en glucides. Les protéines sont hydrolysées en acides aminés qui sont principalement fermentés par paires par des réactions dites Strickland où un acide aminé sert d'accepteur d'électrons pour l'oxydation du second acide aminé [74]. Ces réactions

ainsi ne donneront pas de l'hydrogène. Les lipides sont hydrolysés en glycérol et à chaîne longue acides gras (LCFA). LCFA sont dégradés en acétate et hydrogène dans les systèmes naturels par des bactéries syntrophiques [75], mais cette réaction n'est possible qu'à la très faible pression partielle de l'hydrogène (PH_2s) maintenu par les bactéries méthanogènes ou associé aux bactéries sulfato-réductrices. Ainsi, certains déchets, même s'ils sont présents en grandes quantités, tels que les effluents du traitement secondaire des eaux usées, sont de mauvais substrats pour la production de l'hydrogène en raison de leur manque relatif de fermentescible des hydrates de carbone.

Le pyruvate est la clé intermédiaire dans les principales voies de fermentation (Figure 1.9) conduisant à l'hydrogène à partir de la décomposition de la glycolyse sucres (dérivé carbohydrate). Deux enzymes différents sont impliqués dans la répartition du pyruvate en produits intermédiaires impliquées dans l'hydrogène la production en fonction du type métabolique; pyruvate: formate lyase (PPA) en fermentation acide mixte et pyruvate-ferrédoxine oxydoréductase (pFor) dans la fermentation type anaérobie stricte ex du *Clostridium*. Dans les deux cas, l'acétyl-CoA produit peut être converti en acétate en concomitance de la synthèse d'ATP à partir de l'intermédiaire acétyl-phosphate [49].

Enfin, théoriquement, le rendement du métabolisme du sucre pour la production de l'hydrogène est de 2 H_2 par mole de glucose consommé par les Entérobactéries et de 4 H_2 par mole de glucose consommé par les Clostridies, si le glucose est complètement métabolisé. Dans ce processus anaérobie, l'hydrogène, le dioxyde de carbone et l'acétate sont ainsi produits [76]. C'est le cas de *C. acetobutylicum* optimisée à 37°C [2]. L'accumulation des composés organiques issus de la fermentation inhibent la croissance et la production de l'hydrogène [51, 76]. Cependant, il est difficile d'atteindre une complète dégradation du glucose en CO_2 et en hydrogène à travers une fermentation anaérobie [76]

1.2.3. Etude comparative

Une présentation des voies biologiques pour la production de l'hydrogène, chez les différents types de microorganismes photosynthétiques (Figure 1.1) [32] et fermentaires (Figure 1.9) [77], et une évaluation des facteurs qui influent potentiellement et limitent les opérations de la production de biohydrogène, est illustrée dans le tableau I.1, ceci nous permettra de considérer l'efficacité et l'applicabilité pratique de ces technologies. Les productivités et les rendements de production de biohydrogène, varient en fonction des microorganismes utilisés. Ces variations sont également observées chez des germes de même genre, d'une espèce à une autre, et d'une sous espèce à une autre. L'efficacité de conversion de l'énergie lumineuse en une énergie chimique est plus importante chez les bactéries photofermentaires comparées aux algues [42, 87]. De même, l'efficacité de production de biohydrogène par le processus de fermentation sombre est plus élevée que celle des procédés de photofermentation et photolyse. Le taux de production de biohydrogène varie de $22\text{-}55 \text{ ml d'H}_2/\text{l/h}$ chez les bactéries fermentaires [53], de $2 \text{ à } 2,5 \text{ ml d'H}_2/\text{l.h}^{-1}$ chez les algues [5], de $14,9 \text{ ml d'H}_2/\text{l.h}^{-1}$ chez les cyanobactéries [5] et de 2 ml/l/h à 80 ml/l/h chez les bactéries photosynthétiques [5,23].

Tableau. 1.1. Etude comparative entre les différents processus biologique utilisés pour la production de l'hydrogène [26, 32, 52, 87].				
Bioprocess	Les voies métaboliques, Système photosynthétique, Enzyme productrice de l'H ₂	Microorganismes (Type)	Avantages	Inconvénients
Biophotolyse directe	$2 \text{ H}_2\text{O} + \text{lumière} \longrightarrow 2 \text{ H}_2 + \text{O}_2$ Algues PSI, PSII, pigment-chlorophylle a, b, caroténoïdes ; Enzyme [Fe-Fe] Hydrogénase	Algues vertes (Aérobies, oxygéniques, eucaryotes)	-La production de l'hydrogène à partir de l'eau	-Présence de lumière ; -Production d'inhibiteur de production (l'oxygène). -l'exigence de photobioréacteurs personnalisés. -Très faible efficacité de conversion de la lumière
	Cyanobactéries PSI, PSII, pigment-chlorophylle a, caroténoïdes, phycobilosome Enzyme Nitrogénase, et ou [Ni-Fe] Bidirectionnelle Hydrogénase	Cyanobactéries (Aérobies, oxygéniques, Gram +, procaryotes)	-La production de l'hydrogène à partir de l'eau ; -La nitrogénase a la capacité de production de l'hydrogène et la fixation d'azote moléculaire	-Présence de lumière ; -La présence d'une hydrogénase uptake; -Production d'inhibiteur de production (30% O ₂). -Exigence de photobioréacteurs personnalisés. -Très faible efficacité de conversion de la lumière
Biophotolyse indirecte	$6 \text{ H}_2\text{O} + 6 \text{ CO}_2 + \text{énergie lumineuse} \longrightarrow \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6 \text{ O}_2$ $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6 \text{ H}_2\text{O} + \text{énergie lumineuse} \longrightarrow 12 \text{ H}_2 + 6 \text{ CO}_2$	Algues vertes Cyanobactéries	-Une diminution d'inhibition par l'O ₂	-Un rendement en H ₂ inférieure causé par hydrogénase (s) -Exigence d'une source de lumière externe -Une très faible efficacité de conversion de la lumière.
Photo-fermentation	$\text{CH}_3\text{COOH} + 2 \text{ H}_2\text{O} + \text{lumière} \longrightarrow 4 \text{ H}_2 + 2 \text{ CO}_2$ Système photosynthétique similaire à PSII, pigment-Bactériochlorophylle a, b, caroténoïdes Enzyme Nitrogénase, et ou Bidirectionnelle Hydrogénase	Bactéries pourpres Microalgues (Anaérobies, anoxygéniques, Gram -, procaryotes)	-Peuvent produire de l'hydrogène en présence de plusieurs substrats carbonés ; - pas de production d'oxygène	-Présence de lumière ; -Le processus est limité par des cycles de jour et de nuit, la lumière du soleil comme source de lumière -Exigence de photobioréacteurs personnalisés. -Un rendement en H ₂ faible causé par la très faible efficacité de conversion de la lumière
Fermentation sombre	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 2 \text{ H}_2\text{O} \longrightarrow 4 \text{ H}_2 + 2 \text{ CH}_3\text{COOH} + 2 \text{ CO}_2$ $2 \text{ CH}_3\text{COOH} \longrightarrow 2 \text{ CH}_4 + 2 \text{ CO}_2$ Absence du système photosynthétique ; Enzyme Hydrogénase	Bactéries: Fermentaires Méthanogéniques Anaérobies, anoxygéniques, procaryotes)	- 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. - Un faible rendement de conversion substrat
	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6 \text{ H}_2\text{O} \longrightarrow 12 \text{ H}_2 + 6 \text{ CO}_2$	Bactéries fermentaires	Une conversion complète des composés organiques en hydrogène : Réduction de la demande chimique en oxygène (DCCO) dans les effluents. L'augmentation du rendement de production de l'hydrogène dans un bioprocédé à deux étapes par rapport à celui d'une seule étape.	Le problème majeur rencontré dans la photofermentation est l'inhibition causée par les AGVs et NH ₄ -N ; contrôle sever des conditions physicochimiques ; Le milieu utilisé pour la production de l'hydrogène par Rhodobacter est effluent de la fermentation sombre, qui nécessite d'autres additifs nutritionnels
Système hybride	$6 \text{ H}_2\text{O} + 6 \text{ CO}_2 + \text{lumière} \longrightarrow \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6 \text{ O}_2$ $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 2 \text{ H}_2\text{O} \longrightarrow 4 \text{ H}_2 + 2 \text{ CH}_3\text{COOH} + 2 \text{ CO}_2$ $2 \text{ CH}_3\text{COOH} + 4 \text{ H}_2\text{O} + \text{lumière} \longrightarrow 8 \text{ H}_2 + 4 \text{ CO}_2$ Reaction totale: $12 \text{ H}_2\text{O} + \text{lumière} \longrightarrow 12 \text{ H}_2 + 6 \text{ O}_2$	Algues vertes Cyanobactéries Bactéries fermentaires		

1.3. Les stratégies d'augmentation de l'efficacité des bioprocédés

Les principaux inconvénients de la production biologique de l'hydrogène sont décrits ci-dessus. À cause de ces limitations, le rendement global de l'hydrogène est bien faible présentement pour que le processus soit économiquement faisable et commercialement applicable. Récemment, de nombreuses stratégies ont été proposées pour surmonter les limites de plusieurs bioprocédés et pour augmenter l'efficacité de la production de l'hydrogène au sein de ces bioprocédés. Toutefois, basée sur un processus entièrement propre et renouvelable, ce mode de production reste l'une des voies alternatives les plus attrayantes à long terme dans le contexte énergétique et environnemental actuel [12].

Pour augmenter l'efficacité de la production de l'hydrogène par la photolyse et réduire la sensibilité des enzymes à l'oxygène, des enzymes résistantes à l'oxygène ont été sélectionnées, comme celle de *Ralstonia eutropha* une bactérie aérobie ou bien mutée par génie génétique [54]. Le développement d'un système d'expression purification-mutation permet l'étude cinétique et biophysique de la protéine native et des mutants obtenus par mutagenèse dirigée. Une meilleure résistance à l'oxygène constitue en effet le facteur déterminant pour une utilisation performante de cette hydrogénase dans des applications industrielles de production de l'hydrogène [2].

D'autres approches potentielles sont présentement à l'étude comme l'ingénierie génique de micro-organismes dont l'appareillage photosynthétique serait moins efficace [55, 56], l'immobilisation des microorganismes sur des membranes [57] ou le design de bioréacteurs ayant la capacité de distribuer la lumière efficacement.

A première vue, la photo-fermentation de composés organiques pour la production de biohydrogène pourrait s'avérer un choix intéressant. Cependant, plusieurs obstacles restent à surmonter pour que cette technique puisse être rentable économiquement.

Comme pour la biophotolyse directe, la lumière a un rôle très important dans le processus, donc, les mêmes limitations concernant la lumière incidente s'appliquent. Ces défis peuvent être surmontés grâce à la conception de bioréacteurs efficaces pour la production de l'hydrogène [89, - 93].

Deuxièmement, la nitrogénase est une enzyme beaucoup moins efficace au niveau énergétique que les hydrogénases à cause de son besoin en ATP. Effectivement, la réaction catalysée est irréversible et, pour chaque mole d' H_2 produite, deux moles d'ATP seront nécessaires. Il serait théoriquement possible, par ingénierie génétique, de pallier à ce problème en modifiant l'expression des gènes d'un microorganisme producteur de l'hydrogène par photofermentation. Effectivement, la redirection des électrons disponibles lors de la photofermentation vers une hydrogénase-FeFe pourrait rendre la réaction beaucoup plus efficace. D'autre part, l'optimisation des paramètres physicochimiques [61], la réduction du nombre de pigments synthétisés [62], la défaillance du gène codant pour la synthèse de l'hydrogénase « uptake » (Hup-) [63] et l'utilisation des systèmes hybrides [64] augmentent le taux de production de l'hydrogène par les bactéries photohétérotrophes.

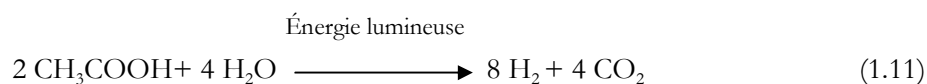
Le principal avantage de la fermentation anaérobie est bien entendu l'absence de la nécessité d'une source lumineuse lors de la fermentation. Cela permet d'éviter tous les problèmes qui sont associés au design de bioréacteurs qui doivent tenir compte de la distribution de la lumière à l'intérieur de ceux-ci. Cependant, le rendement maximal de quatre moles d'H₂ par mole d'hexose rend cette méthode de production d'H₂ très peu probable pour combler le besoin d'énergie mondial grandissant.

Effectivement, contrairement à la réaction se produisant lors de la photo-fermentation, la réaction de fermentation anaérobie a une enthalpie libre de Gibbs négative et peut donc se produire sans besoin d'énergie. Il n'est donc pas possible (et pas très avantageux) pour la bactérie de surmonter l'énergie nécessaire pour oxyder davantage le produit de la fermentation pour produire plus de l'hydrogène.

En effet, cette réaction est possible lors de la photo-fermentation puisque l'énergie solaire permet de surmonter la demande en énergie [78]. Une solution intéressante à ce problème serait de combiner fermentation anaérobie et photo fermentation au sein d'un même procédé [76]. Par exemple, on pourrait fermenter des résidus d'industrie alimentaire et produire quatre moles d'H₂ par mole d'hexose initiale et ensuite alimenter un bioréacteur fonctionnant par un processus de photo fermentation avec les effluents du premier bioréacteur et extraire huit moles d' H₂ supplémentaires par mole de substrat initial.

Egalement, la sélection des souches microbiennes approprié et efficace, l'étude des hydrogénases, des voies métaboliques [2] et de l'effet des ions métalliques permettent d'une part, l'amélioration de l'efficacité productrice des microorganismes dans des cultures en batch et en continue [43,49] dans des réacteurs classiques, à lit fluidisé [79], immobilisés [80] et sur des biofilms [81] et d'autre part connaître les conditions de culture en terme de concentration inhibitrice ou activatrice [82].

La synergie des bioprocédés cités pourrait être également l'une des voies prometteuses pour l'amélioration des rendements de production de l'hydrogène et la maximisation des taux de conversion du substrat [26, 87]. Lors de la fermentation, la durée de production de l'hydrogène est limitée par l'accumulation des sous-produits qui réduisent le pH du milieu, conduisant à une inhibition de la croissance et de la production de l'hydrogène chez les bactéries fermentaires. Cependant le développement d'un système hybride, bactéries fermentaires et bactéries photosynthétiques (bactéries phototrophes et algues), maximise la production de l'hydrogène [76]. Ces dernières dégradent les sous-produits de la fermentation, lors de la photo-fermentation et de la fermentation (au cours de la deuxième étape de production), respectivement [76,83]. Les voies métaboliques se déroulent selon les équations, (1.4), (1.10) et (1.11) [76]:



Au cours de la photosynthèse les organismes phototrophes produisent les substrats carbohydatés dont ont besoin les bactéries fermentaires [53]. C'est dernières dégradent ce substrat en acides organiques, hydrogène et CO₂. Il est difficile d'atteindre une complète

dégradation du glucose en CO_2 et hydrogène, cependant, c'est aux microorganismes photofermentaires de dégrader les produits de la fermentation pour une meilleure productivité et une complète dégradation [12] ; (Figure 1.10). Wu et al, (2012) [84] et Kaushik Nath et al, (2005) [76] ont travaillé sur ce type de système de Co-culture avec *Chlamydomonas reinhardtii* , *Bradyrhizobium japonicum* et *Rhodobacter sphaeroides* KD131, *Enterobacter cloacae* DM11, respectivement.

Pour que ces systèmes hybrides, soient rentable et plus pratique, les souches de contrôle doivent être correctement sélectionné [85,86].Cependant, les conditions d'exploitation ont besoin d'être optimisés et améliorés [87].

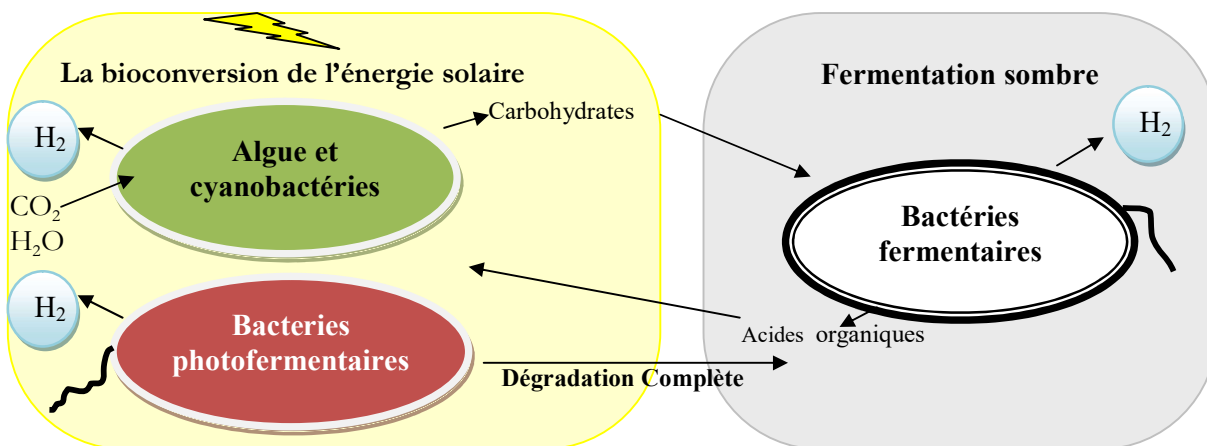


Fig.1.10. La Synergie des bioprocédés

1.4. Conclusion

Partout dans le monde, les méthodes biologiques de production de l'hydrogène « *bioénergies* » font l'objet de recherches intenses en raison du potentiel énergétique que représente la biomasse. Bien utilisée, la biomasse permettrait de réduire, et peut-être un jour de remplacer, la consommation de carburants pétroliers.

Les recherches poursuivent donc un triple objectif :

- Lutter contre le réchauffement climatique : produits localement, les biocarburants permettent de réduire de 25 à 90 % les émissions de gaz à effet de serre (GES) par rapport à l'utilisation d'un carburant produit à partir de pétrole. Leur généralisation devrait ainsi contribuer à atteindre l'objectif fixé par le Grenelle de l'environnement : diviser par quatre les émissions de GES;
- Diversifier les sources d'énergie : pour anticiper la disparition inéluctable des ressources pétrolières;
- Limiter les importations d'énergies fossiles : Dans plusieurs pays, le montant de ces importations représentait plusieurs milliards de devise, soit l'équivalent du déficit de leurs balance commerciale.

Chapitre 2.

Escherichia coli

Sommaire

2.1. Introduction.....	39
2.2. Taxonomie.....	39
2.2.1. <i>E. coli</i>	39
2.2.2. Classification.....	39
2.2.3. Critères taxonomiques.....	39
2.3. Physiologie de croissance.....	39
2.3.1. Localisation.....	39
2.3.2. Besoins nutritionnels.....	40
2.4. Production et utilisation commerciale et Environnementale.....	40
2.5. Métabolisme et mécanisme respiratoire et fermentaire.....	41
2.5.1. Métabolisme.....	41
2.5.2. La membrane cytoplasmique.....	41
2.5.3 La fermentation.....	42
A. Détails de la fermentation acide mixte de <i>E. coli</i>	42
A.1. Formation de pyruvate (Réactions de l'étape 1).....	43
A.2. Formation d'acides et d'éthanol (Réactions de l'étape 2).....	44
A.2.1. Formation de lactate.....	44
A.2.2. Clivage pyruvate en acétyl- CoA et le formate.....	44
A.2.3. La formation de l'hydrogène et du dioxyde de carbon.....	44
A.2.4. Formation d'acide acétique.....	44
A.2.5. Formation d'éthanol.....	44
A.2.6. Formation du succinate.....	44
B. Les enzymes clés de la voie de fermentation d'acide mixte.....	44
2.6. Étude physiologique des mécanismes de production de l'hydrogène par <i>E. coli</i>	44
2.6.1. Métabolisme.....	46
2.6.2. Les enzymes responsables de la production de l'hydrogène.....	46
2.6.2.1. Les Hydrogénases de <i>E. coli</i>	46
2.6.2.2. Etude comparative entre les trois hydrogénase.....	47
2.6.2.3. Conditions opératoires.....	48
2.6.3. Mécanisme de production de l'hydrogène.....	48
2.6.4. Les stratégies d'augmentation de l'efficacité des bioprocédés.....	50
2.6.4.1. L'inoculum.....	50
2.6.4.2. Conditions physico-chimiques.....	50
2.6.4.2.1. Milieu de production de l'hydrogène.....	50
1.1. Substrat.....	50
1.2. Azote et phosphore.....	50
2.6.4.2.2. Température et pH.....	51
2.6.4.3. La modification génétique.....	51
2.6.4.4. Les bioréacteurs.....	51

2.1. Introduction

Escherichia coli, également appelée colibacille et abrégée en *E. coli*, découverte en 1885 par Theodor Escherich, Pédiatre et bactériologiste allemand-autrichien, il enseigna dans les universités de Munich, Graz et Vienne. Son nom actuel lui est ensuite donné en 1919 par Castellani et Chambers [96]. Cette bactérie présente la capacité de produire de l'hydrogène d'où l'intérêt qui lui a été porté dans le cadre de ce travail.

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

2.2. Taxonomie

2.2.1. *E. coli* : *Escherichia coli* est une bactérie chimio hétérotrophe, aéro- anaérobies facultatifs, capable de métabolisme respiratoire et fermentaire. Elle effectue une fermentation d'acide mixte.

2.2.2. Classification: *Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Escherichia; Escherichia coli* [97].

2.2.3. Critères taxonomiques

Escherichia coli, appartient à la famille des Enterobacteriaceae. Ce sont des bacilles à Gram négatif, radiorésistant, aéro-anaérobies facultatifs qui peuvent fermenter les nitrates et qui ne possèdent pas d'oxydase, mésophile, thermotolérants, non halophiles (Fig. 2.1) [98], développant une relation de commensalisme avec son hôte. Sa taille varie en fonction des conditions de croissance (entre 0,5 à 3 μm), c'est un coliforme généralement commensal. Cependant, certaines souches d'*E. coli* peuvent être pathogènes [99].

Elle fait partie de la flore commensale de l'intestin de l'homme et de nombreux animaux à sang chaud et elle est la première bactérie à coloniser l'intestin du nouveau-né. Son génome, composé de 4,7 millions de paires de bases, forme un chromosome unique et circulaire sur lequel sont organisés environ 4300 gènes [100].

2.3. Physiologie de croissance

2.3.1. Localisation

Ces bactéries sont en général des hôtes normaux ou pathologiques, suivant les souches microbiennes, du tube digestif de l'homme et des animaux. Mais ce caractère écologique n'est pas

exclusif des *E. coli*, elles peuvent proliférer en abondance dans l'environnement (sols et eaux) et participer aux grands cycles de dégradation des matières organiques.

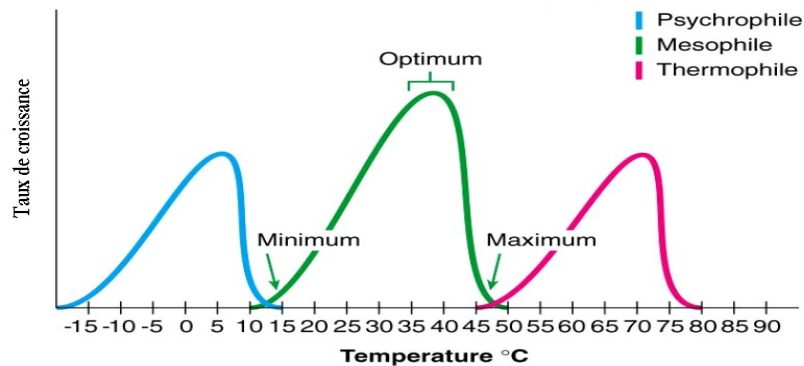


Fig.2.1. Taux de croissance de *E. coli* (mésophile)

2.3.2. Besoins nutritionnels

Une bactérie est constituée de 95% de C, H, O, N, S, P, K, Ca, Mg, Fe. L'ensemble constitue les macroéléments, que l'on subdivise en 2, en fonction de la quantité nécessaire pour les microorganismes :

- Eléments majeurs (g/L) : Pour la synthèse de glucide, lipide (CHONSP)
- Eléments mineurs (mg/L) : Pour l'équilibre physico-chimique des cellules sous forme de cation, jouent un rôle dans la catalyse enzymatique (KCaMgFe)

Elles ont besoin d'autres éléments en très faible quantité, les micro-éléments comme le Mn, Co, Mo, Ni, Cu, qui jouent un rôle dans la catalyse enzymatique.

E. coli se multiplie dans les milieux simples, alors que d'autres bactéries tel que, *Proteus* a besoin d'une vitamine "la nicotinamide", elle est dit auxotrophe pour la nicotinamide. *E. coli* fabrique elle-même cette vitamine [101].

2.4. Production et utilisation commerciale et Environnementale

Escherichia coli est très utilisée pour sa capacité à produire l'enzyme de restriction EcoRI. En 2008, après un premier pilote industriel (installé en 2007 sans la raffinerie de Pomacle-Bazancourt près de Reims), *E. coli* est également utilisée pour produire de l'acide succinique à partir de sucres et résidus lignocellulosiques fermentés en atmosphère enrichie en CO₂. Cette raffinerie dispose d'une capacité de production de 2000 t/an [102].

L'acide succinique est notamment utilisé comme excipient dans le vaccin PREVENAR de Wyeth Lederle Vaccines SA (Pfizer). Ce tout nouveau vaccin est le principal vaccin utilisé pour

les enfants et nourrissons contre la diphtérie, le tétanos et la poliomyélite, depuis son autorisation de mise sur le marché européenne le 9 décembre 2009 [103].

E. coli a une fonction utile dans le corps en supprimant la croissance d'espèces de bactéries nuisibles et en synthétisant des quantités appréciables de vitamines. Il s'agit d'une composante importante de la biosphère [104].

Certaines espèces du genre *Escherichia* pourraient être utilisées pour aider à nettoyer l'environnement car une souche de *Escherichia* s'est avérée capable de dépolluer l'environnement et de produire de l'hydrogène.

2.5. Métabolisme et mécanisme respiratoire et fermentaire

2.5.1. Métabolisme

Le colibacille appartient à la famille des bactéries aérobies-anaérobies facultatives. Ces microorganismes sont capables de produire leur énergie par voie :

- Respiratoire aérobie ;
- Respiratoire anaérobie ;
- Fermentative.

Pour leur respiration en absence d'oxygène, ils ont la capacité de respirer en utilisant des accepteurs d'électrons exogènes alternatifs qui sont en général des molécules de petit poids moléculaire contenant de l'oxygène.

Afin d'assurer sa croissance, *E. coli* est ainsi capable de respirer à partir de différents substrats en fonction du milieu dans lequel elle se trouve. En absence d'oxygène, *E. coli* peut de ce fait, par le biais de plusieurs chaînes respiratoires, produire de l'énergie grâce à la réduction des composés oxygénés alternatifs comme le nitrate, le nitrite, le fumarate, le diméthylsulfoxyde (DMSO) ou le triméthylamine N-oxyde (TMAO). C'est chez cette bactérie que les systèmes respiratoires ont été les mieux caractérisés. Elle représente ainsi une bactérie modèle pour l'étude de ces systèmes respiratoires et en particulier pour l'étude du système respiratoire utilisant le TMAO comme accepteur final d'électrons [100]. Cette multiplicité des chaînes respiratoires permet ainsi aux bactéries de s'adapter à leur biotope et aux différentes conditions de croissance.

2.5.2. La membrane cytoplasmique

A l'instar des bactéries à gram négatif, *E. coli* possède une double membrane. La membrane externe, en contact direct avec le milieu extérieur, est composée d'une double couche de phospholipides et contient de nombreuses protéines dont des porines chargées d'assurer le passage de molécules hydrophiles en formant des canaux.

La membrane interne est également composée d'une double couche phospholipidique hydrophobe dont la perméabilité est rendue possible par la présence de protéines dénommées perméases. De nombreuses enzymes et notamment celles qui interviennent dans le métabolisme énergétique sont insérées dans cette membrane. Entre ces deux membranes se trouve le

périplasma. Il contient une mince couche de peptidoglycane et un espace dans lequel s'accumulent des enzymes capables de dégrader des substances prélevées dans le milieu extérieur et nécessaires au métabolisme de la bactérie, des enzymes de détoxification (vis-à-vis des antibiotiques par exemple), des protéines affines pour des sucres, des acides aminés, des vitamines ou des minéraux dont elles aident l'absorption [100].

2.5.3. La fermentation

La fermentation est un procédé utilisé par les cellules pour produire de l'énergie où un substrat approprié est métabolisé à fabriquer de l'ATP par phosphorylation au niveau du substrat (SLP). Les voies de fermentation fonctionnent dans des conditions de croissance anaérobies lorsque les accepteurs d'électrons ne sont pas disponibles pour soutenir la respiration cellulaire (par exemple, sans O₂, nitrate, nitrite, TMAO, ou DMSO présent). Les rendements énergétiques de fermentation sont faibles et, par conséquent, les cellules se développent plus lentement que quand elles respirent.

A. Détails de la fermentation acide mixte de E coli.

E. coli effectue une fermentation d'acide mixte à base de sucre qui génère un mélange de produits finaux qui peuvent comprendre le lactate, l'acétate, l'éthanol, le succinate, le formiate, le dioxyde de carbone et de l'hydrogène. Le procédé est atypique de la plupart des autres types de fermentations microbiennes en des quantités variables des produits finaux. *E. coli* comprend également une réaction de respiration anaérobie pour réduire le fumarate en succinate (Fig.2.2).

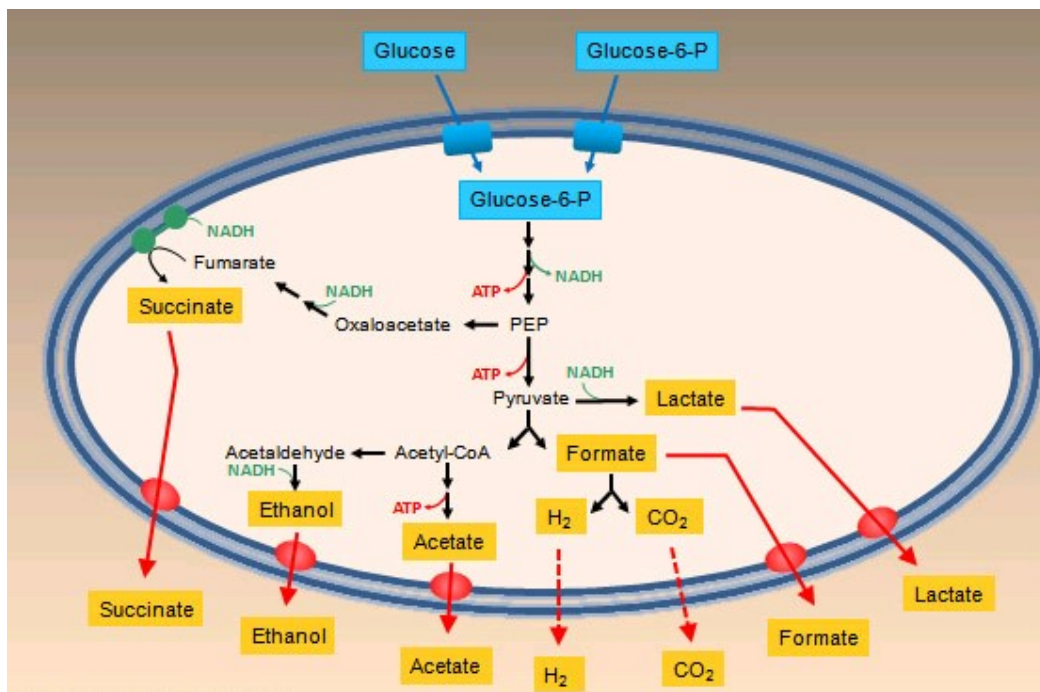


Fig.2.2. Le métabolisme fermentaire chez E coli [107]

A.1. Formation de pyruvate (Réactions de l'étape 1)

Dans des conditions d'anaérobies, le glucose est métabolisé en pyruvate d'abord par l'intermédiaire de la voie de la glycolyse dite également la voie d'Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) (Fig.2.3).



Ces réactions produisent également 2 molécules de NADH et 4 molécules d'ATP. Depuis deux ATP sont consommés dans les premières étapes de la voie, un total de 2 ATP sont produites par molécule de glucose consommé [111].

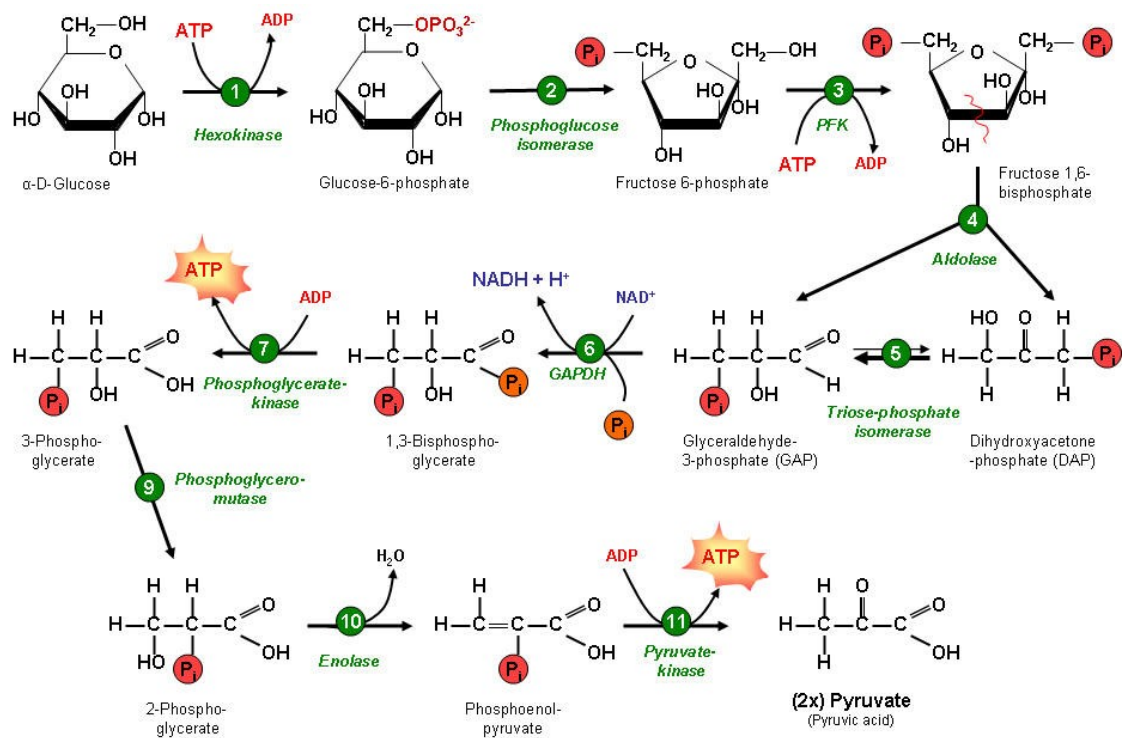
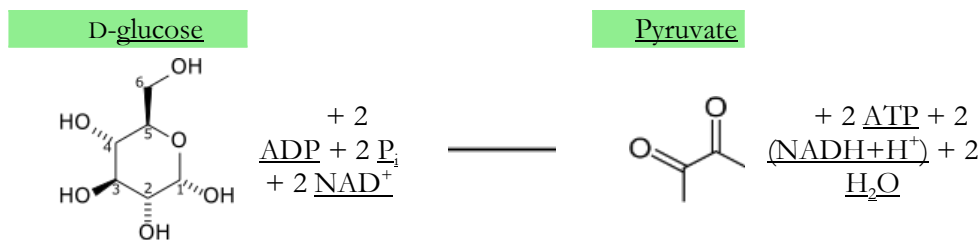


Fig.2.3. La glycolyse (Voie d'Embden-Meyerhof-Parnas EMP)[112]

La réaction globale (2.9) s'écrit comme suit :

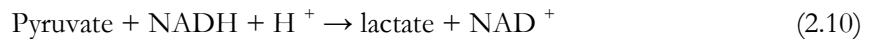


A.2. Formation d'acides et d'éthanol (Réactions de l'étape 2)

Le pyruvate est ensuite converti en un ou plusieurs produits finals suivants : lactate, acétate, éthanol, succinate, formiate, CO₂ et H₂. Les deux molécules de NADH à l'étape 1 sont recyclées en NAD⁺.

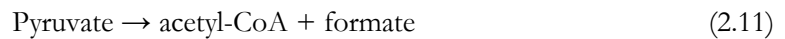
A.2.1. Formation de lactate.

La fermentation lactate est une étape d'une réaction qui convertit le pyruvate en acide lactique. L'enzyme clé est la lactate déshydrogénase, une enzyme NADH – dépendante qui ré-oxyde NADH généré au cours de la glycolyse par la réduction du pyruvate.



A.2.2. Clivage pyruvate en acétyl- CoA et formate

Le clivage pyruvate en acétyl - CoA et formate est catalysée par le pyruvate - formate lyase qui est l'une des enzymes clés de la voie de fermentation d'acide mixte. Si le formiate est accumulé, la croissance des cellules va ralentir en raison de l'acidification du milieu cellulaire [107].



Par opposition aux fermentations butyriques dans lesquels la formation de l'acétyl-CoA, le dioxyde de carbone, et dihydrogène se fait généralement sans formate comme intermédiaire, le formate est toujours trouvée en tant que produit du métabolisme des sucres par les bactéries entériques [113].

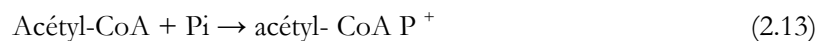
A.2.3. La formation de l'hydrogène et du dioxyde de carbone.

Comme beaucoup d'autres bactéries fermentaire, *E. coli* peut convertir le formate en dihydrogène et de dioxyde de carbone. Cela empêche l'acidification de l'environnement de la cellule. L'enzyme clé est la formate -hydrogène lyase.



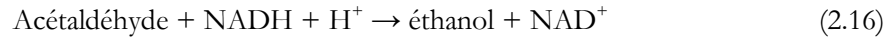
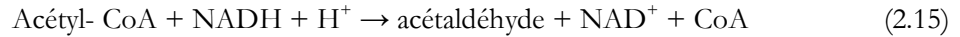
A.2.4. Formation d'acide acétique

De nombreuses bactéries fermentaires, y compris *E. coli* peuvent convertir l'acétyl-CoA en acétate et de générer de l'ATP. Les deux enzymes clés sont le phosphate acétyltransférase et de l'acétate kinase. Cette mini - voie génère une mole d'acétate et une mole d'ATP par une mole l'acétyl-CoA consommée.



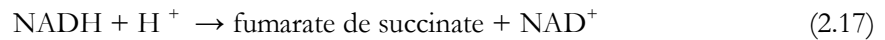
A.2.5. Formation d'éthanol

Les souches d'*E. coli* peuvent générer l'éthanol à partir de l'acétyl-CoA en deux étapes en utilisant NADH comme réducteur. Dans la première réaction CoA est libéré et l'acétaldéhyde est formé. La même enzyme catalyse alors la deuxième réaction qui réduit l'acétaldéhyde en éthanol. L'enzyme clé est l'alcool déshydrogénase.



A.2. 6. Formation du succinate

La conversion de la voie intermédiaire glycolyse, phosphoénol-pyruvate (PEP), en succinate est effectuée en plusieurs étapes. Le mélange réactionnel final est catalysé par l'enzyme de transport d'électrons liée à la membrane, la fumarate réductase. Cette étape génère un gradient de protons à travers l'enzyme cytoplasmique qui à son tour peut être utilisée pour générer de l'ATP par l'ATP synthase liée à la membrane. La réduction du fumarate par la fumarate réductase utilise des électrons issus de NADH de la chaîne respiratoire associée « NADH déshydrogénase ».



B. Les enzymes clés de la voie de fermentation d'acide mixte

Le diagnostic des enzymes clés est de déterminer la capacité d'un organisme à effectuer un type de fermentation. Pour *E. coli*, les enzymes clés de la fermentation d'acide mixte sont :

- pyruvate - formate lyase,
- une lyase de formiate - hydrogène,
- et enzyme réductase de fumarate de la voie respiratoire anaérobie [107].

2.6. Étude physiologique des mécanismes de production d'hydrogène

La fermentation orientée vers la production de l'hydrogène est un procédé qui est apparu récemment dans le domaine des biotechnologies. En effet, la production de l'hydrogène par fermentation s'applique à une large gamme de substrats organiques et de bactéries telles que *E. coli*. L'hydrogène ainsi produit serait de l'hydrogène « biosourcé » (ou biohydrogène).

2.6.1. Métabolisme

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

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

- Dans des conditions d'anaérobies en présence d'un gaz inerte ;
- En présence d'un substrat organique donneur d'électrons exemple : Glucose...
- En l'absence d'accepteurs d'électrons tels que le nitrate.

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

En conditions de croissance anaérobies, l'entérobactérie *Escherichia coli* synthétise trois iso-enzymes hydrogénase (HYD).

2.6.2.1. Les Hydrogénases de *E coli*

C'est en 1985 que Ballantine et Boxer [115] montrent l'existence de deux isoenzymes hydrogénases membranaires dans *E. coli* cultivée en conditions anaérobies en présence de glucose et de fumarate, l'hydrogénase 1 (HYD1) et l'hydrogénase 2 (HYD2). C'est des protéines intégralement membranaires. L'HYD 2 peut être libérée de la membrane cytoplasmique après action de la trypsine, à l'inverse de l'HYD 1 qui n'est pas relarguée.

Les deux hydrogénases contiennent du nickel. L'HYD1 purifiée est composée de deux sous-unités, l'une de 64 kDa, l'autre de 35 kDa [116]. L'HYD2 purifiée est composée de deux sous-unités de 61 et 35 kDa. L'HYD1 et l'HYD2 sont homologues; cependant les anticorps dirigés contre l'une ne reconnaissent pas l'autre. Des expériences de sédimentation à l'équilibre ont permis de montrer qu'à l'état natif, l'HYD2 est un tétramère formé de deux grandes sous-unités et de deux petites [116].

Les hydrogénases 1 et 2 sont consommatrices de l'hydrogène. L'expression de HYD2 est induite par la croissance sur hydrogène-fumarate ou glycérol-fumarate. La quantité de HYD1 est augmentée par addition de formiate exogène, à l'instar de l'HYD3 [117]. D'autre part contrairement aux résultats initialement trouvés par Sawers [117], l'expression de HYD1 serait également induite en présence de glycérol-fumarate [118].

Le rôle proposé pour HYD2 est l'oxydation de l'hydrogène couplée à la réduction d'accepteurs d'électrons tel le fumarate. Le rôle proposé pour HYD1 est le recyclage de l'hydrogène formé par le complexe formiate hydrogène-lyase durant la croissance fermentative [115]. Une autre hypothèse suppose que HYD1 est une protéine transporteur d'électrons intermédiaire, dans une voie métabolique où le formiate sert de donneur d'électrons et le fumarate d'accepteur

physiologique d'électrons [118]. Dans cette voie les électrons passeraient à travers HYD1 sans qu'il y ait production de l'hydrogène [119].

L'activité de l'HYD3, responsable de la production de l'hydrogène, et dont l'expression est stimulée par le formiate, a ensuite été mise en évidence [117]. Cette enzyme est très labile ce qui rend sa caractérisation difficile [120]. L'HYD 3 est un alliage de nickel contenant des protéines Fe-S, c'est une protéine périphérique de la membrane cytoplasmique. Elle contient les petites et grandes sous-unités qui sont caractéristiques des hydrogénases [Ni-Fe] "standard" et deux sous-unités hydrophiles supplémentaires et deux sous-unités de la membrane interne. Les groupes Fe-S prosthétiques qui se trouvent dans la partie hydrophile de l'ensemble peuvent former la voie de transport d'électrons [121].

L'HYD 3 est codée par les gènes de hyc. Leur expression est réprimée par l'oxygène et par le nitrate et induite par le formiate dans des conditions de croissance en mode fermentaire [122]. L'HYD3 constitue le dernier élément de la voie formiate hydrogène-lyase (FHL) présente durant la croissance fermentative. Ce système est composé d'un formiate déshydrogénase (FDH-H) et de l'hydrogénase 3 [123].

La Formate déshydrogénase -H est l'une des trois isoenzymes formate déshydrogénase associées à la membrane de la bactérie *E. coli*. Toutes sont fonctionnelles dans le métabolisme anaérobie de l'organisme. La Formate déshydrogénase -H (FDH -H) est située dans le cytoplasme [117]. L'enzyme est sensible à l'oxygène et contient d'une grappe de [4Fe- 4S] [124]. La Formiate déshydrogénase -H (FDH -H) est codé par les gènes de fdhF. L'expression de fdhF est induite par le formiate et l'absence d'accepteurs d'électrons externes, et elle est réprimée par le nitrate, le nitrite, triméthylamine N- oxyde et l'oxygène. La Formate peut surmonter la répression par les nitrates, mais pas par l'oxygène [122].

Le formate est un inducteur obligatoire des gènes du complexe (FHL) [125]. Cette voie (FHL) catalyse l'oxydation du formiate endogène en dioxyde de carbone grâce à (FDH -H) et donne les électrons ainsi générés aux protons pour former de l'hydrogène gazeux grâce à l'HYD3. Cette réaction, non conservatrice d'énergie, sert à éliminer les équivalents redox et à empêcher l'acidification du milieu durant la croissance fermentative [126]. Une autre hydrogénase 4 (HYD 4) est moins bien caractérisée [127].

2.6.2.2. Etude comparative entre les trois hydrogénases

HYD1 et HYD2 sont des protéines intégralement membranaires, composées chacune d'une petite et d'une grande sous-unité, tandis que HYD3 est une protéine périphérique de la membrane cytoplasmique. HYD1 et HYD2 catalyse l'oxydation de l'hydrogène couplée à la réduction d'un accepteur terminal d'électrons. HYD3 est responsable de la production de l'hydrogène en liaison avec l'oxydation du formiate.

2.6.2.3. Conditions opératoires

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

- D'éliminer l'oxygène inhibiteur de l'activité enzymatique ;
- De diriger l'activité enzymatique vers la production de l'hydrogène.

2.6.3. Mécanisme de production de l'hydrogène

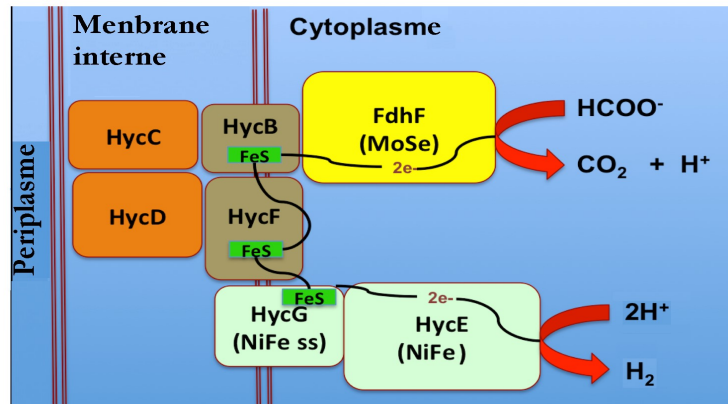
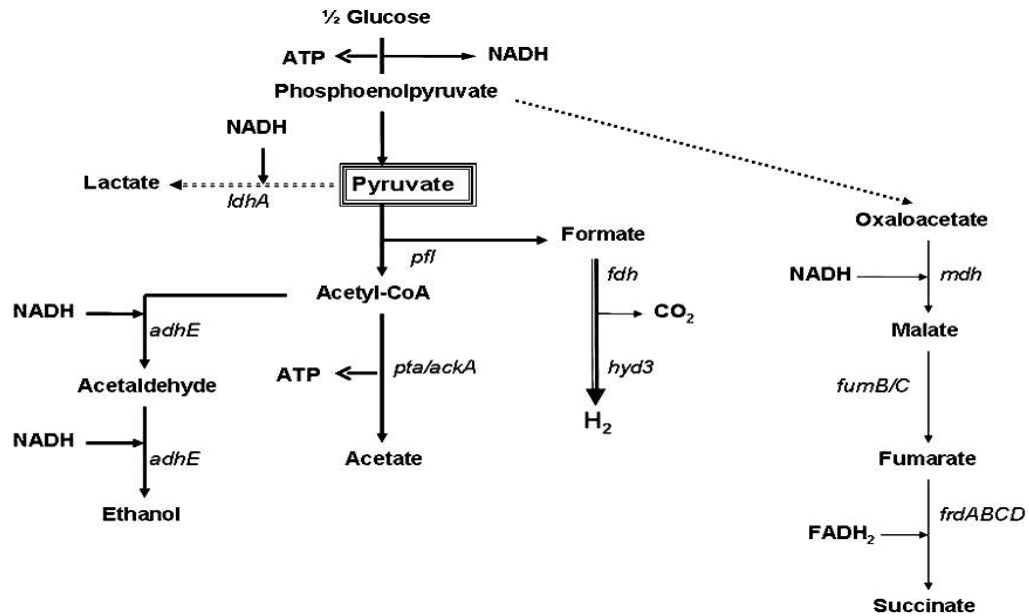
Pendant la croissance en mode fermentaire, le formate est produit à partir du pyruvate par le pyruvate formate lyase (PFL). La fonction physiologique de la réaction FHL est d'empêcher l'acidification du cytoplasme par la conversion du formiate en CO_2 et H_2 le complexe FHL peut fonctionner efficacement à un pH inférieur à 7,0. Récemment, un second potentiel H_2 produit par l'hydrogénase HydG-4, codé par l'opéron HYF, a été identifié dans *E. coli*. Ce système a été désigné FHL 2 et il est entraîné par le F0F1 -ATPase, il est composé de HYD 4 et FDH-H. La production de l'hydrogène par l'intermédiaire de la HYD 3 et de la voie FDH -H- dépendante par rapport à la voie Hyd- 4, H - FDH et F0F1 -ATPase dépendante a été montré pour être dépendante du pH [128].

La Formiate déshydrogénase H (FDH-H) et l'hydrogénase 3 forment ensemble le complexe membranaire formiate hydrogène-lyase 1 (FHL1) d'*Escherichia coli*. Il oxyde le formiate produit de façon endogène pour produire du dioxyde de carbone et transmet les électrons générés à H^+ via l'HYD 3 pour produire de l'hydrogène dans des conditions d'anaérobies.

La Formiate déshydrogénase H, un seleno-polypeptide codé par FDHF, catalyse l'oxydation du formiate pour la génération du CO_2 et de transfert des électrons de l'hydrogénase 3, qui est la première partie de la réaction. Un modèle a été proposé qui montre comment fdhF transfère les électrons à la sous-unité catalytique de HycE de l'hydrogénase 3 via les sous-unités HycB, HycF et HycG. L'HycB et HycF sont toutes les deux des protéines de transport d'électrons de type [4Fe- 4S] ferrédoxine, tandis l'HycE et l'HycG sont homologues aux sous-unités de NADH ubiquinone oxydoréductase (nuo) de mitochondries et les chloroplastes [129]. Le modèle proposé démontre le transfert d'électrons de fdhF à HycB à HycF à HycG à HycE, avec HycC et HycD agissant comme des protéines d'ancrage membranaire [130].

La biosynthèse du complexe FHL est contrôlée par la concentration de formiate dans les cellules [131, 132]. Donc, au cours d'un processus de production de l'hydrogène catalysé par le [Ni-Fe] hydrogénases, des électrons sont transportés à travers une chaîne intra-moléculaire de transfert d'électrons à partir du couple redox (NADH et NADPH) au site actif de la [Ni-Fe] hydrogénases, quant à lui, les protons sont également transférés au site actif, là les protons sont ensuite réduits par les électrons au niveau du site actif pour produire de l'hydrogène.

Le mécanisme de production de l'hydrogène chez *E. coli* est illustré dans la Figure 2.4.



* *pfl*, pyruvate formate lyase; *ldhA*, lactate déshydrogénase; *fdh*, formate déshydrogénase; *hyd3*, hydrogenase 3; *adhE*, alcool déshydrogénase; *mdh*, malate déshydrogénase; *fumBC*, fumarate hydratase; *frdABCD*, fumarate réductase; *pta / ackA*, phosphotransacétylase / acétate kinase.

Fig. 2.4. Mécanisme de production de l'hydrogène (a, b) et le modèle structurel du complexe FHL de *E. coli* (b) [49, 133]

2.6.4. Les stratégies d'augmentation de l'efficacité des bioprocédés

La production de l'hydrogène par fermentation sombre est une voie très intéressante pour la production renouvelable de l'hydrogène, cela pour un certain nombre de raisons :

- Plusieurs substrats peuvent être utilisés ;

- Les réacteurs nécessaires seraient probablement et relativement de conception simple et basée sur la technologie qui est déjà bien connue et largement utilisée ;
- Les voies métaboliques impliquées sont bien comprises.

D'un point de vue industriel, la filière de production de l'hydrogène par fermentation sombre n'a pas encore un réel intérêt économique, mais le développement de nouvelles recherches, fait naître de nouveaux espoirs via l'optimisation de la production biologique de l'hydrogène.

Afin d'améliorer les taux et les rendements de cette filière, des travaux récents [37-39, 134] ont été effectués dont un grand nombre ont porté sur les facteurs influençant les rendements et les taux de production de l'hydrogène lors de la fermentation de divers substrats soit par des cultures bactériennes définies ou de la flore microbienne naturelle et certains des points saillants pertinents sont discutés. Enfin, les voies de fermentation connues peuvent fournir au plus $4\text{H}_2/\text{glucose}$, au mieux, un rendement de 33%.

Quatre stratégies différentes pour extraire plus de l'hydrogène ou de l'énergie ont été proposées et sont actuellement à l'étude. Les progrès actuels dans ce sens sont présentés :

2.6.4.1. L'inoculum

Un grand nombre d'études utilisent des cultures pures pour la production de l'hydrogène par fermentation [134-136]. D'autres études utilisent des cultures mixtes avec d'autres bactéries fermentaires ou photofermentaires en co-cultures ou dans un système hybride [37, 38].

Des cultures pures qui croissent sur des substrats définis sont les préférables inocula qui permettent une meilleure examination des facteurs limitant et les effets des manipulations génétiques, alors que les cultures mixtes sont probablement plus appropriées pour la fermentation des substrats complexes. Avec les cultures pures, la fermentation peut être contrôlée par le choix de l'organisme, mais avec un mélange de cultures, les voies métaboliques doivent être manipulées grâce à des paramètres de bioprocédés [137].

2.6.4.2. Conditions physico-chimiques

2.6.4.2.1. Milieu de production de l'hydrogène

a) Substrat : L'hydrogène peut être produit à partir de différents substrats. Le glucose, le saccharose et l'amidon ont été plus largement utilisés comme substrats pour la production de l'hydrogène par fermentation. Cependant, dans ces dernières années, quelques études ont commencé à utiliser les déchets organiques comme substrat pour la production de l'hydrogène [138]. Certains substrats complexes ne sont pas idéals pour la production de l'hydrogène par voie fermentaire en raison de leurs structures complexes. Cependant, après avoir été prétraité par certaines méthodes, ils peuvent être utilisés par des bactéries produisant de l'hydrogène [39].

b) Azote et phosphore : L'azote est un élément très important pour les protéines, les acides nucléiques et les enzymes et qui sont d'une grande importance à la croissance des bactéries

productrices de l'hydrogène. Ainsi, un niveau approprié d'addition d'azote est bénéfique pour la croissance de ces bactéries et en conséquence à la production de l'hydrogène par fermentation [135].

La production de l'hydrogène par fermentation est en effet favorisée par un nombre relativement C/N élevé, et qui varie de 33 à 200 selon la diversité des substrats utilisés [136,137]. Avec des cultures pures, la limitation en azote produit des rendements maximaux

Le phosphate est nécessaire pour la production de l'hydrogène en raison de sa valeur nutritive ainsi que sa capacité tampon. Il a été démontré que dans une gamme appropriée, le phosphate pourrait augmenter la capacité de bactéries pour produire de l'hydrogène au cours de la fermentation, mais son ajout à des concentrations plus élevées, le phosphate pourrait diminuer cette production [135, 136].

2.6.4.2.2. Température et pH : Le pH et la température sont deux facteurs trop importants car ils influent sur l'activité enzymatique des bactéries productrices de l'hydrogène. Au cours de la fermentation la production d'acides organiques conduit à une forte acidification du milieu. Cela peut affecter à la fois la distribution des produits et la viabilité cellulaire [141]. En outre, l'augmentation de la température pourrait augmenter la capacité des bactéries productrices de l'hydrogène pour produire d'avantage de l'hydrogène, mais à des niveaux beaucoup plus élevés, la température pourrait diminuer cette production.

2.6.4.3. La modification génétique : Récemment, des efforts ont été faits pour améliorer le rendement et la vitesse de la production de l'hydrogène en utilisant des approches d'ingénierie métabolique [58, 86,142]. La plupart de ces efforts ont été concentrés sur la modification ou l'élimination par exemple, des hydrogénases uptake et de la voie métabolique du carbone (lactate déshydrogénase) [85, 135, 136,143, 144]

2.6.4.4. Le design et le type des bioréacteurs : En outre, la plupart des études sur la production de l'hydrogène par fermentation ont été réalisées en mode batch, d'autres études menées en mode continu [136] ont été également effectuées en bioréacteurs classiques agités ou en cultures immobilisées [145].

Chapitre 3.

Rhodobacter sphaeroides

Sommaire

3.1. Introduction.....	53
3.2. Taxonomie.....	53
3.2.1. <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	53
3.2.2. Classification.....	53
3.2.3. Critères taxonomiques.....	53
3.3. Physiologie de croissance.....	54
3.3.1. Localisation.....	54
3.3.2. Besoins nutritionnels.....	54
3.4. Production et utilisation commerciale et environnementale.....	55
3.5. Métabolisme et mécanisme de photosynthèse.....	56
3.5.1. Métabolisme.....	56
3.5.2. Mécanisme de photosynthèse, de respiration et de transfert d'électrons.....	58
3.5.2.1. La membrane photosynthétique.....	58
3.5.2.2. L'appareil photosynthétique.....	58
3.5.2.2.1. Bactéριοchlorophylle – caroténoïde (le complexe antennaire LHs).....	59
3.5.2.2.2. Le centre réactionnel (CR).....	60
3.5.2.2.3. Les caroténoïdes.....	60
3.5.2.2.4. Les facteurs affectants la synthèse des pigments.....	61
3.5.2.3. Mécanisme de photosynthèse, de respiration et de transfert d'électrons.....	61
3.6. Étude physiologique des mécanismes de production de l'hydrogène par <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	63
3.6.1. Métabolisme.....	63
3.6.2. Les enzymes responsables de la production de l'hydrogène.....	64
3.6.2.1. La nitrogénase.....	64
3.6.2.2. Hydrogénase.....	65
3.6.2.3. Etude comparative.....	65
3.6.3. Mécanisme de production de l'hydrogène.....	66
3.7. Les stratégies d'augmentation de l'efficacité des bioprocédés.....	67
3.7.1. Effet du rapport carbone/azote sur la photofermentation.....	67
3.7.2. Effet de la concentration des micronutriments.....	67
3.7.3. La modification génétique.....	68
3.7.4. L'immobilisation.....	68
3.7.5. L'utilisation d'un substrat complexe.....	69
3.7.6. L'utilisation des systèmes intégrés.....	70
3.7.7. Les photobioréacteurs.....	71

3.1. Introduction

Les bactéries photosynthétiques anoxygéniques ont la particularité commune de pouvoir effectuer la photosynthèse en anaérobiose et sans produire d'oxygène.

Dans cette étude, nous nous intéresserons tout particulièrement au groupe des bactéries pourpres non sulfureuses, la famille des *Rhodobacteraceae*, dans laquelle on retrouve *Rhodobacter sphaeroides*. Depuis sa première description par Van Neil en 1944 [49], *Rhodobacter sphaeroides*, dont l'origine est nommée *Rhodopsseudomonas sphaeroides*, est devenue le centre bioénergétique de plusieurs laboratoires dans le monde. Elle est capable d'acquérir de l'énergie par plusieurs méthodes. Elle présente également la capacité de produire de l'hydrogène [59, 62] d'où l'intérêt qui lui a été porté dans le cadre de ce travail.

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

3.2. Taxonomie

2.1. *Rhodobacter sphaeroides* : *Rhodobacter sphaeroides*, une bactérie photosynthétique pourpre non sulfureuse et non oxygénique. Les bactéries non oxygéniques seraient les plus anciennes sur le plan évolutif, leur mécanisme de photosynthèse est fondamentalement anaérobie, non producteur d'oxygène [15,27].

2.2. Classification : Une bactérie, *Proteobacteria*, *Rhodobacterales*, *Rhodobacteraceae*, *Rhodobacter*, *Rhodobacter sphaeroides* [147].

2.3. Critères taxonomiques : *Rhodobacter sphaeroides*, est une bactérie pourpre, ovoïde, Gram négative [76], mobile par son flagelle unidirectionnel qui produit des rotations dans le sens d'une aiguille d'une montre.

Ce moteur s'arrête périodiquement au moment où la cellule doit changer de direction, ce qui explique son mécanisme chimiotactique nécessaire pour son métabolisme. Celui-ci nécessite un apport de chimioeffecteurs tel que les acides organiques, par exemple : l'acide succinique, du fait que le système complexe sensoriel de *Rhodobacter sphaeroides* répond dans les deux cas à l'augmentation et la diminution des gradients de concentration des attracteurs avec des sensibilités différentes [148].

Chez cette bactérie, la reproduction se fait par division binaire [149] (Figure 3.1). Elle est capable de dégrader une variété de substrats azotés contenant des complexes aromatiques, de pyridine, d'acide nicotinique, de guanine et d'uracile [150].

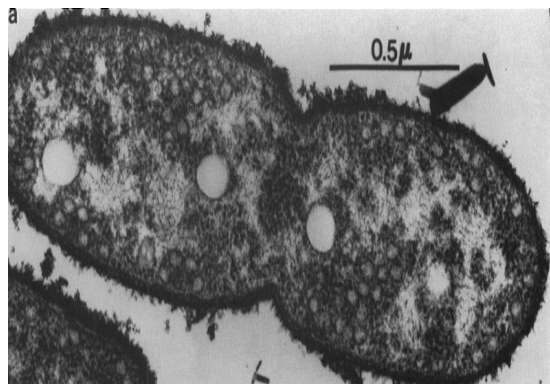


Fig.3.1. *Rhodobacter sphaeroides* [151]

3.3. Physiologie de croissance

La croissance d'un microorganisme peut être considérée comme une série d'interactions entre les cellules et l'environnement. Le milieu apportant les éléments nécessaires à la croissance étant lui-même modifié par le métabolisme des cellules [152].

3.1. Localisation

Les bactéries pourpres non sulfureuses prédominent dans la vase, l'eau des lacs et des étangs où la matière organique est abondante et le niveau en soufre est faible [153]. Elles vont donc pouvoir proliférer à une certaine distance de la surface aquatique en fonction des critères suivants :

- La concurrence des algues et des cyanobactéries est moins vive ;
- Le milieu est appauvri en oxygène grâce à l'action des autres microorganismes, ce qui gêne le mouvement des prédateurs planctoniques qui se nourrissent de bactéries ;
- Elles profitent des émanations de gaz carbonique, d'hydrogène et d'acides organiques qui proviennent des fermentations du fond ;
- Elles sont capables de s'adapter à un faible éclaircissement [27].

3.2. Besoins nutritionnels

Le milieu de culture doit apporter tous les éléments nécessaires aux synthèses cellulaires et aux besoins énergétiques du microorganisme. A savoir que les sulfures inhibent la croissance cellulaire, alors que l'abondance en matières organiques et un faible taux de soufre favorise leur croissance [15].

Le tableau 3.1 présente quelques éléments chimiques nécessaires à la croissance de *Rhodobacter sphaeroides* et le rôle biologique apporté par chaque élément.

Tableau 3.1. Quelques éléments nécessaires à la croissance de *Rhodobacter sphaeroides* [152, 154].

Eléments chimiques	Rôle biologique
Carbone (succinate, lactate...)	Source de carbone, source d'énergie...
Azote	Synthèse de vitamine, d'acide aminé et de nucléotide...
Potassium (KH ₂ PO ₄)	Régulation, effecteurs d'enzyme...
Magnésium	Activateur d'enzyme glycolytique, régulateur des ATPase membranaires...
Calcium (CaCl ₂)	Favorise le maintien de l'intégrité cellulaire...
Zinc (ZnSO ₄)	Indispensable dans la glycolyse, stimule la pénétration de certains oses, stimule l'action du magnésium... [152]
Fer (FeSO ₄ · 7H ₂ O)	Participe au site de certaines enzymes, ex ; Hydrogénase...
Molybdate (Na ₂ Mo O ₄ · 2H ₂ O)	Participe au site de la nitrogénase et joue le rôle de cofacteur pour certaines enzymes DMSO réductase periplasmique, on parle de molybdoenzyme [154]
Thiamine (Vitamine B₁)	Métabolisme respiratoire, photosynthétique, de la glycolyse et des lipides...
Acide nicotinique	Impliqué par l'intermédiaire de NAD ⁺ dans la synthèse de l'ATP
Biotine	Facteur de croissance, impliqué dans de nombreux réactions anaboliques, synthèse des bases puriques et pyrimidiques, des nucléotides, des protéines, des polysaccharides et des acides gras...[152]

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

3.4. Production et utilisation commerciale et environnementale

R. sphaeroides est une bactérie photosynthétique non-toxique. Elle présente donc un grand intérêt puisqu'elle produit naturellement un nombre très important de membranes photosynthétiques, et par conséquent de grandes quantités de protéines unicellulaires membranaires.

En outre, elle contient des matières de grande valeur, y compris les bactériochlorophylles, les biopolymères tels que PHA et PHB, la vitamine B12, l'acide 5-aminolévulinique et les caroténoïdes. Elle est largement utilisée comme aliments pour les animaux d'aquaculture commerciale et des suppléments de poulet, et elle a une application potentielle en industries pharmaceutiques et alimentaires. De plus, *R.sphaeroides*, a montré un grand potentiel dans le traitement de divers effluents organiques. Elle peut également produire de l'hydrogène. Par

conséquent, *R. sphaeroides* est une bactérie très intéressante et tire l'attention de plusieurs chercheurs [31].

3.5. Métabolisme et mécanisme de photosynthèse

5.1. Métabolisme

Les bactéries pourpres non sulfureuses (PNSB; Rhodospirillaceae) sont largement utilisés comme organismes modèles en microbiologie. Ils ont été largement étudiés par rapport à la structure moléculaire de leur appareil photosynthétique et d'en tirer davantage d'attention de l'activité de recherche en raison de leur polyvalence métabolique et de leur adaptation exceptionnelle aux conditions de culture.

Dans des conditions d'aérobiose et dans l'obscurité, ces bactéries grandissent chimohétérotrophiquement par la respiration. Lorsque, l'apport en oxygène devient limité et la lumière est disponible, ces bactéries photosynthétiques facultatives répondent leur synthèse photosynthétique intracytoplasmiques capteur de lumière. Ils passent ensuite à la croissance photohétérotrophes (avec un substrat organique en tant que source de carbone et d'électrons) ou à la croissance photoautotrophe (si CO₂ et un donneur d'électrons inorganique). PNSB possèdent le cycle de Calvin-Benson-Bassham bien connu (cycle de Calvin) qui est essentiel pour les voies photoautotrophes, mais partiellement aussi pour les voies photohétérotrophes.

Dans l'obscurité sans oxygène, ces bactéries peuvent se développer par fermentation [28] ou par respiration anaérobie [146] en présence d'un accepteur d'électron tel que le diméthyl sulfoxide DMSO [156]. La possibilité d'utiliser de di-azote (N₂) comme source d'azote organique (par l'intermédiaire d'une nitrogénase) indique en outre le large spectre de capacités métaboliques de ces bactéries. Cette polyvalence métabolique extraordinaire, ces mécanismes clés permettent à ces organismes de basculer entre les différents modes de vie, maintenant ainsi l'équilibre d'oxydoréduction qui a été un élément important de la recherche [28, 155].

Le mode de croissance privilégié de ces bactéries est phototrophique, sous anaérobiose en présence de lumière. La photosynthèse est une conversion d'énergie particulièrement efficace. Une énergie lumineuse ($h\nu$) parvenant au pigment récepteur y réalise une excitation, forme très labile d'énergie photochimique qui est transmissible de molécule en molécule [27].

R. sphaeroides est une bactérie capable d'utiliser une très grande variété de substrat carboné. Le carbone le plus utilisé dans la croissance de *Rhodobacter sphaeroides* est le D-glucose. Une partie du carbone est utilisé par *R. sphaeroides* pour soutenir sa croissance grâce à l'enzyme NADPH glucose-6-phosphate déshydrogénase basé sur la voie de la glycolyse. Autre exemple de source de carbone est l'acétate qui nécessite un processus anabolique pour convertir l'acétate en éthylmalonyl-CoA dans la voie EM-CoA. Ce processus implique également la consommation de NADPH. Ainsi, il faut du temps pour augmenter la densité optique des cellules. Le troisième groupe de source de carbone est constitué de succinate, malate et lactate, ces acides organiques

sont capables d'entrer dans le cycle TCA et rendre la croissance cellulaire rapide par rapport aux cellules cultivées dans l'acétate. D'autre part, *R. sphaeroides* est en mesure de produire une grande quantité d'acides gras, photopigments et d'autres composants de l'appareil photosynthétique [29].

La figure 3.2 représente un schéma simplifié du cycle du carbone chez ces bactéries avec une accentuation sur les propriétés de *Rhodobacter sphaeroides* [23].

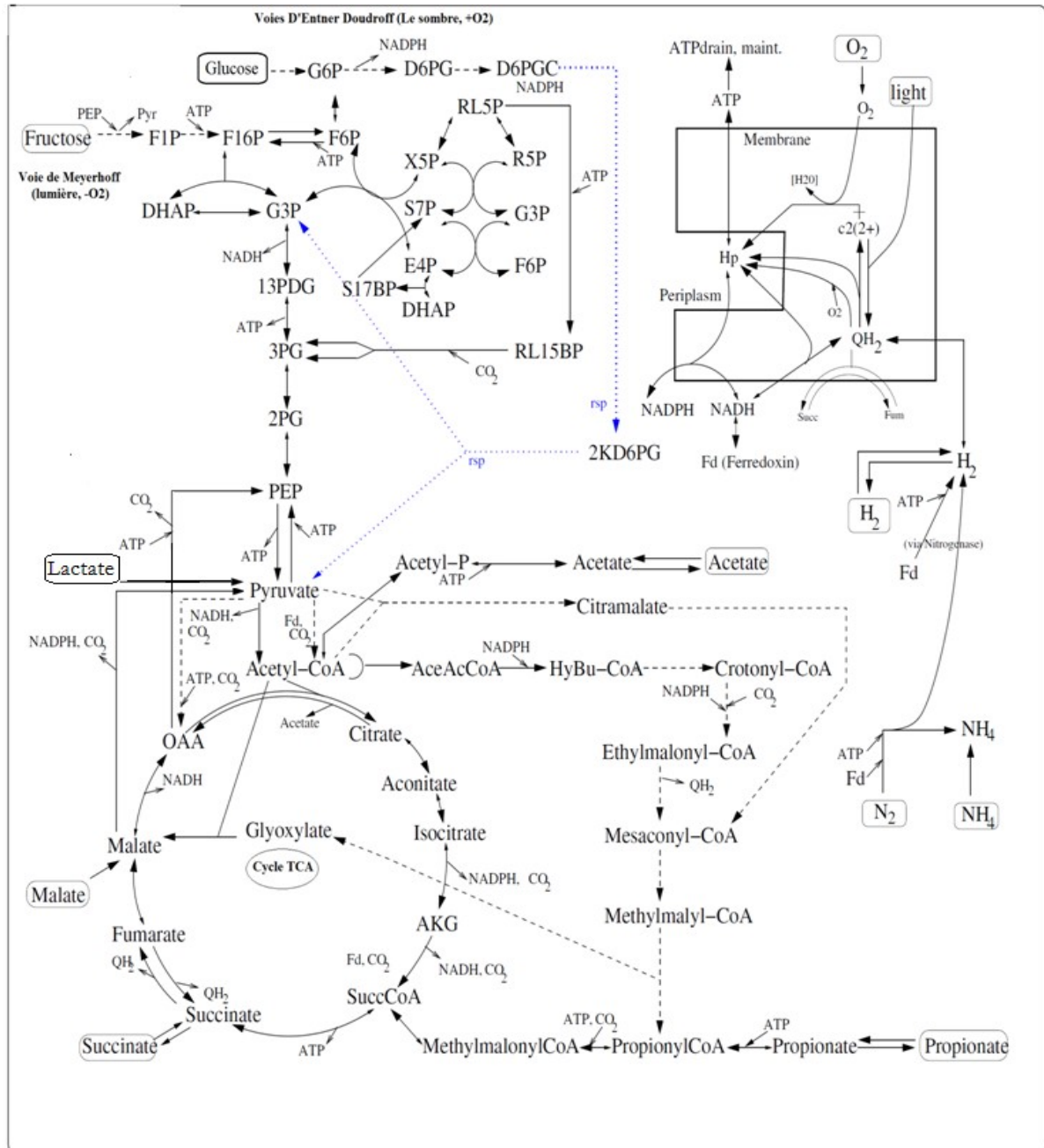


Fig.3.2. Le métabolisme central de *Rhodobacter sphaeroides* (réactions catabolique, amphibolique et le cycle d'acide citrique (TCA).) [28]

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

5.2.1. La membrane photosynthétique

Les membranes photosynthétiques bactériennes sont appelées « *chromatophores* », elle est le site où s'effectuent les mécanismes de la photosynthèse (Figure 3.3. a). Les observations microscopiques ont permis de montrer que les chromatophores prennent forme à partir d'invaginations de la membrane cytoplasmique et que la structure et l'arrangement de ces membranes photosynthétiques diffèrent selon le genre bactérien observé.

Rhodobacter sphaeroides, est une bactérie photosynthétique ayant une organisation typique de la membrane cellulaire intracytoplasmique [62, 157]. Elle présente des invaginations membranaires intracytoplasmiques (ICM) développées vers l'intérieur de la cellule conduisant à un entassement de vésicules biochimiquement différenciées où l'on trouve des pigments chlorophylliens [27] (Figure 3.3.b). Elle se présente sous forme de vésicules. La formation et le développement de ces membranes sont influencés par des facteurs extérieurs et les conditions de croissance comme la tension en oxygène et l'intensité lumineuse qui déterminent la différenciation membranaire et la formation de l'appareil photosynthétique [62, 157].

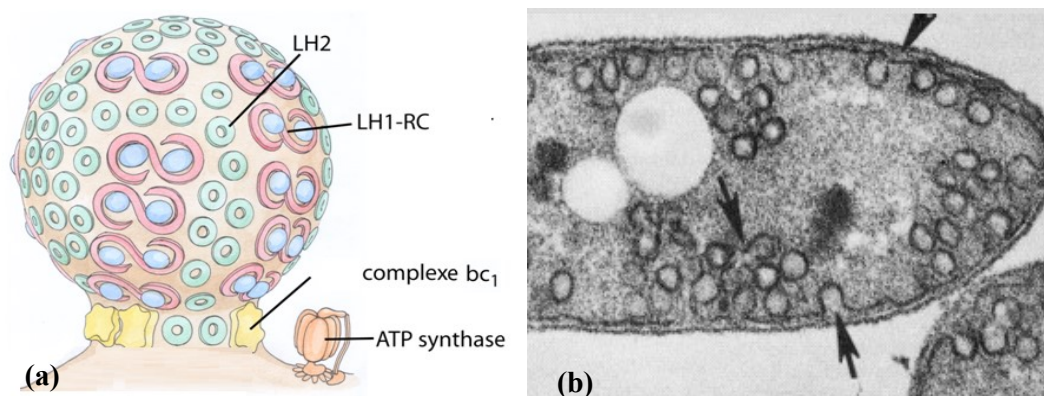


Fig.3.3. (a)Chromatophore, (b) Invaginations membranaire renfermant l'appareil photosynthétique [158]

5.2.2. L'appareil photosynthétique

Les pigments et l'appareil photosynthétique sont localisés et surexprimés dans des membranes intracytoplasmiques, qui se développent à partir d'invaginations de la membrane cytoplasmique. Selon le genre bactérien, ces membranes adoptent des formes différentes telles que des tubules, des lamelles ou des vésicules, c'est le cas chez *Rhodobacter sphaeroides*. Cette diversité morphologique est, notamment, observée au niveau des structures moléculaires de l'appareil photosynthétique et des pigments. La fonction principale de ces pigments est de capturer et transporter l'énergie lumineuse pour alimenter leur métabolisme et donc développent un appareil hautement efficace constitué de multiples protéines. Ce sont également ces pigments qui

confèrent aux cultures bactériennes leur coloration distincte, du pourpre en passant par le marron, le rouge et parfois le beige.

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

- Les bactériochlorophylles - caroténoïdes « LHs » ;
- Le centre réactionnel photosynthétique « CR » [159,160].

Une nappe du complexe protéique contenant de la bactériochlorophylle entoure les centres réactionnels et joue le rôle d'antenne qui capte la lumière [27] ; elle transfère l'énergie d'excitation au CR, qui sert à amorcer un processus de séparation de charge [160].

5.2.2.1. Bactériochlorophylle – caroténoïde (le complexe antennaire LHs)

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

- Les LH1 entourent directement les centres réactionnels formant le « Cœur CR-LH ». Chaque LH1 possède des polypeptides α et β , la bactériochlorophylle B875 et un nombre équivalent de caroténoïdes.
- Les LH2 renferment la plus grande partie de la bactériochlorophylle B850 et B800, avec une quantité comparable de caroténoïdes [27, 161-163].

La figure 3.4 représente l'organisation de l'appareil photosynthétique au sein de la membrane.

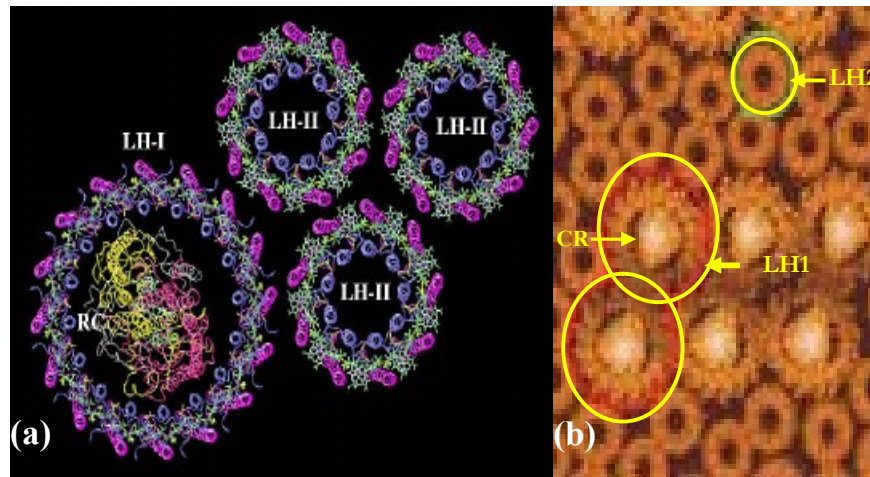


Fig. 3.4. *L'appareil photosynthétique de Rhodobacter sphaeroides (a) Structure tridimensionnelle [158], (b) Topographie à grande résolution des différents composants de l'appareil photosynthétique de Rhodobacter sphaeroides [163]*

5.2.2.2. Le centre réactionnel (CR)

Le centre réactionnel contient :

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

Ces composants sont liés de manière covalente aux deux sous unités (Puf L et Puf M) de la protéine du centre réactionnel. Une autre sous unité protéique transmembranaire (Puf H) est attachée au complexe (L-M). Une molécule de caroténoïde est liée à chaque particule du centre réactionnel [164,165] (Figure 3.5).

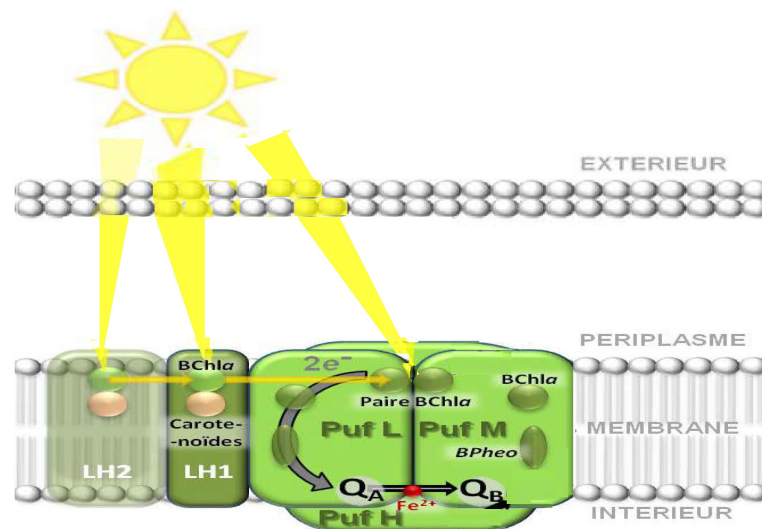


Fig. 3.5. Structure tridimensionnelle du centre réactionnel [165]

5.2.2.3. Les caroténoïdes

Les caroténoïdes possèdent trois fonctions principales :

- Elles participent à la collecte de la lumière aux niveaux des antennes dans la région spectrale 400-550nm, complémentaire à celle de la bactériochlorophylle qui absorbe efficacement les radiations situées dans l'infrarouge (Figure 3.6a)
- Elles protègent l'appareil photosynthétique des entités réactives engendrées par photo-oxidation [27] ;
- La couleur des bactéries et leur spectre d'absorption n'est pas seulement liée aux bactériochlorophylles, les pigments accessoires comme les caroténoïdes y contribuent fortement [15, 166].

5.2.2.4. Les facteurs affectant la synthèse des pigments

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

1. Une élévation de température ;
2. Une augmentation de l'intensité lumineuse ;
3. Une montée de la pression partielle de l'oxygène [27].

Ce dernier facteur exerce l'effet le plus sévère et inhibe la synthèse du pigment [153] (Figure 3.6.b, c).

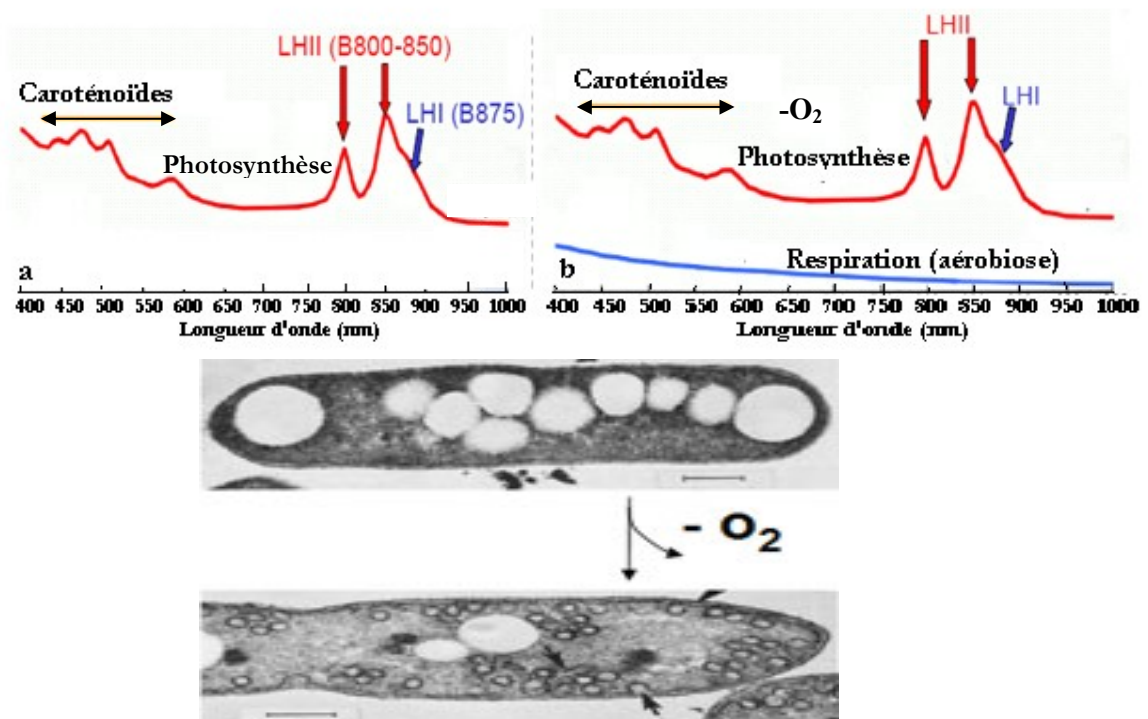


Fig. 3.6. (a) Spectre d'absorption des composants de l'appareil photosynthétique (b,c) Effet de l'oxygène sur la synthèse des composants de l'appareil photosynthétique. [167].

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

Les bactéries photosynthétiques présentent une chaîne de transfert d'électrons simplifiée, limitée à un transfert cyclique d'électrons photoinduit. Les complexes protéiques nécessaires sont les complexes antennaires (LHI et LHII) pour la collection de l'énergie lumineuse, le centre réactionnel où s'effectue la séparation de charge sous l'action d'un photon, et le complexe bCj qui complète le transfert cyclique d'électrons via des transporteurs solubles (quinones du côté réducteur, cytochromes ou H₂PIP côté oxydant). Les mécanismes de transfert d'électrons sont comme suit :

L'énergie lumineuse captée par les pigments antennaires est canalisée vers les centres réactionnels qui constituent le siège d'oxydoréduction [27].



P : Pigment des centres réactionnels ;

P^* : Etat excité ;

P^+ : Forme cationique [165].

Les molécules de bactériochlorophylles sont appariées et partagent la fonction de donneur photochimique d'électrons. Une des bactériophéophytines intervient comme transporteur intermédiaire d'électrons entre les bactériochlorophylles et la ménaquinone (Q). Ces électrons vont à l'ubiquinone (QH₂) [164,165]. Lorsque les quinones sont réduites, l'accepteur secondaire expédie les électrons :

- Vers un système qui fabrique des coenzymes réduits de type NADH ou NADPH nécessaires à l'assimilation du CO₂ [27] ;
- Vers le complexe cytochrome b-c₁ où leur passage aboutit à l'exclusion des protons [164,165]. La valeur théorique est de 4H⁺ par paires d'électrons. Tous ce qui faut pour créer une force proton- motrice, ΔP, autorisant ultérieurement une synthèse de l'ATP.

Le transfert des électrons pousse les protons vers l'intérieur des cavités cytoplasmiques membranaires qui communiquent avec des périplasmes, établissant ainsi une force proton-motrice. L'ATP synthétase (ou ATP ase) effectue en sens inverse une translocation de protons vers le cytoplasme et catalyse la synthèse de l'ATP à partir de l'ADP et phosphate [27] (Figure 3.7).

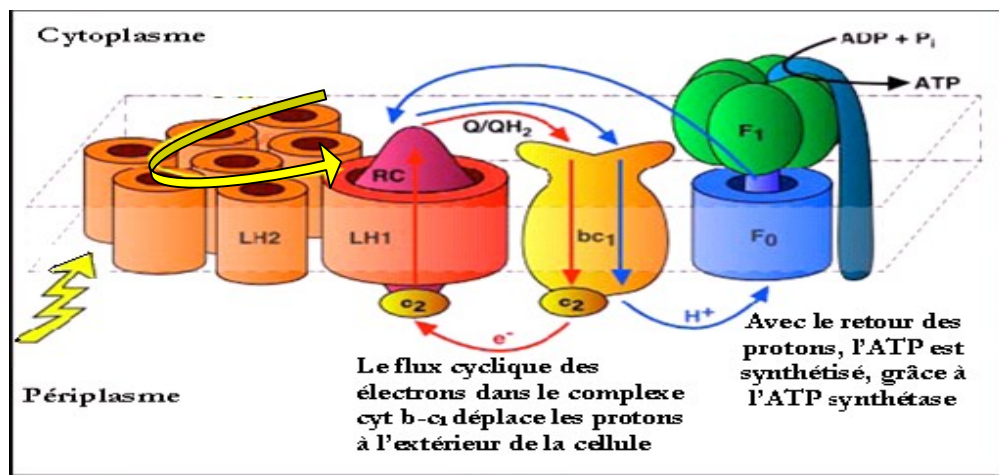


Fig. 3.7. Mécanisme de photosynthèse et de transfert d'électrons [27,150]

Chaque fois que le centre réactionnel cède un électron destiné à réduire l'accepteur primaire, il se trouve du même coup déficitaire et incapable de fonctionner à nouveau dans cet état. Il lui faut donc récupérer un électron. Cette restriction peut avoir lieu par le canal du complexe membranaire b-c₁ et se fait habituellement par l'intermédiaire d'un cytochrome soluble de type c. Il y a des pertes en cours de route car les électrons de l'accepteur primaire ont été détournés vers la réduction d'une ferrédoxine (Fd) ou vers la transformation du NAD⁺ en NADH [27]. Ce déficit peut être comblé par une source d'électrons externe : hydrogène, composants organiques comme l'acide succinique, l'acide lactique, ou l'acide malique [42].

Au cours de la respiration, les cytochromes b et c (composants communs de la photosynthèse et de la respiration) sont conservés, alors que les bactériochlorophylles et les caroténoïdes sont inhibés. En présence d'oxygène, le cytochrome c₂ transfère les électrons de l'ubiquinone-cytochrome c₂ oxydoréductase (le complexe cytochrome b-c₁) vers le cytochrome a-a₃ oxydase terminale. Dans les conditions de photosynthèse, le cytochrome c₂ fonctionne pour compléter la chaîne de photophosphorylation cyclique par le transfert des électrons du complexe cytochrome b-c₁ pour réduire le centre réactionnel photo- oxydé [156,165].

3.6. Étude physiologique des mécanismes de production d'hydrogène par *R. sphaeroides*

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

6.1. Métabolisme

Au cours du métabolisme photohétérotrophe, les bactéries utilisent le substrat, la lumière et les enzymes, qui constituent la clef de toute biotransformation, pour leur développement. La production biologique d'hydrogène, comme toutes réactions biologiques, nécessite des conditions opératoires permettant un bon déroulement voir même, l'optimisation du processus biologique. Elle se déroule en présence :

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

Dans la littérature plusieurs sources lumineuses, substrats et milieux sont utilisés. Le choix du substrat repose du fait que, si ce substrat favorise la production d'hydrogène ou d'autres produits

tels que le Poly Hydroxy Butyrate (PHB). Les substrats appartenant à la catégorie favorisant la production d'hydrogène sont le lactate et le malate [23].

Kaushik Nath et al [76], Harun Koko et al [23] ont déterminé que le glutamate représente une excellente source d'azote pour cette production, il pourra également être utilisé comme une source de carbone.

Le cycle d'acide citrique (TCA) (Figure 3. 2), la membrane photosynthétique et les enzymes jouent un rôle important dans le mécanisme de production de l'hydrogène [23].

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

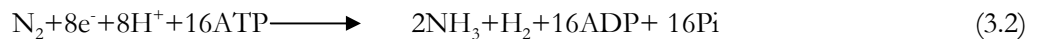
6.2.1. La nitrogénase

La nitrogénase est une enzyme qui catalyse la fixation de N_2 , elle est essentielle pour le maintien du cycle de l'azote sur la terre. Une large gamme de micro-organismes possède cette enzyme, y compris les *R. sphaeroides*. La nitrogénase est un complexe métalloenzyme convertissant l'azote en ammoniac avec l'hydrolyse de l'ATP. Au cours de la fixation de N_2 , la nitrogénase est également capable de produire de l'hydrogène [36].

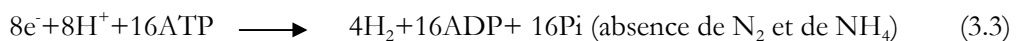
La nitrogénase est un complexe métalloenzyme convertissant l'azote en ammoniac avec l'hydrolyse de l'ATP. La protéine-Fe et la protéine MoFe sont les composants cruciaux de la nitrogénase. La protéine-Fe fonctionne comme réductase ATP-dépendante pour la protéine MoFe. La protéine MoFe fournit un centre catalytique pour la réduction de l'azote. La protéine-Fe est réduite par la ferrédoxine et transfère des électrons à la protéine MoFe, qui est liée avec l'hydrolyse de l'ATP. Les électrons sont finalement transférés à l'azote au site catalytique de la protéine MoFe aboutissant à la formation de molécules d'ammoniac [168]. L'oxygène et l'ammoniac constituent des inhibiteurs de l'activité enzymatique. Une grande quantité en ATP et de force réductrice augmente l'efficacité de l'activité de la nitrogénase [23,88].

La réduction de l'azote en ammonium, catalysée par la nitrogénase, est une réaction fortement endergonique nécessitant de l'ATP. Deux ATP sont requises pour chaque transfert d'électrons, et donc, 16 ATP au total sont nécessaires pour fixer une mole de N_2 , comme indiqué dans l'équation. (3.2). En l'absence de N_2 et en absence d'oxygène, la nitrogénase agit comme une hydrogénase ATP-alimenté, produisant exclusivement de l' H_2 (Eq. (3.3) [36]

En présence de N_2 :



En absence de N_2 (sous argon) :



Les milieux de préactivation et de production étaient barbotés avec un gaz inerte, l'argon. Ce barbotage a pour rôle :

- D'éliminer l'oxygène, inhibiteur de l'activité enzymatique, par barbotage avec de l'argon [88];
- D'éviter l'inhibition de l'activité enzymatique de la nitrogénase, en présence d'une concentration élevée en ammoniac. Une bonne production d'hydrogène se déroule dans des milieux de très faibles concentrations en NH_4 comprises entre 0 et 10 mM [59];
- De diriger l'activité enzymatique vers la production d'hydrogène seul [60].

6.2.2. Hydrogénase

L'hydrogénase est une enzyme protéine- nickel, elle a la capacité de produire et de consommer l'hydrogène moléculaire. La production de l'hydrogène est attribuée à la nitrogénase, puisque l'activité de production par l'hydrogénase est négligeable comparée à celle de la nitrogénase productrice d'hydrogène [24] et à celle de l'hydrogénase consommation d'hydrogène. Cependant, elle constitue un antagonisme métabolique de la nitrogénase. Le monoxyde de carbone, l'oxygène et l'EDTA (acide éthylènediaminetétraacétique) inhibent l'activité de cette enzyme. Une limitation en nickel peut atténuer la synthèse de cette enzyme [23].

6.2.3. Etude comparative

Une étude comparative entre la nitrogénase, enzyme productrice d'hydrogène et l'hydrogénase, enzyme consommatrice d'hydrogène, est représentée dans le tableau 3.2.

Tableau 3.2. Les caractéristiques enzymatiques de la nitrogénase et l'Hydrogénase [23]

Propriétés	Nitrogénase	Hydrogénase
Substrats	ATP, H^+ ou N_2 , Électrons	H_2
Produits	H_2 ou NH_4^+	H^+ , électrons
Nombre de protéines	deux (Mo-Fe et Fe)	Un
Composants métalliques	Mo, Fe	Ni, Fe, S
Temperature optimale	30°C (<i>A. vinelandii</i>)	55°C (<i>R. rubrum</i>) 70°C (<i>R. capsulatus</i>)
pH optimal	7.1–7.3 (<i>A. vinelandii</i>)	6.5–7.5 (<i>R. sulfidophilus</i>)
Inhibiteurs, répresseurs	N_2 (production d' H_2 Seul), NH_4^+ , O_2	CO, EDTA, O_2 , présence de composants organiques
Stimulateurs	Lumière Rapport C/N élevé	H_2 (<i>R. sphaeroides</i>) Absence des composants organiques

6.3. Mécanisme de production de l'hydrogène

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

Les protons sont produits en partie par le cycle TCA présenté dans la figure 3.2, le reste est alimenté par l'action de l'ATP synthétase qui fait partie de l'appareil photosynthétique. Finalement la nitrogénase réduit les protons en molécules d'hydrogènes. L'hydrogénase fonctionne dans le sens inverse, elle consomme l'hydrogène pour la production d'électrons, de protons et d'ATP.

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



Le mécanisme de production de l'hydrogène chez *Rhodobacter sphaeroides* est illustré dans la Figure 3.8.

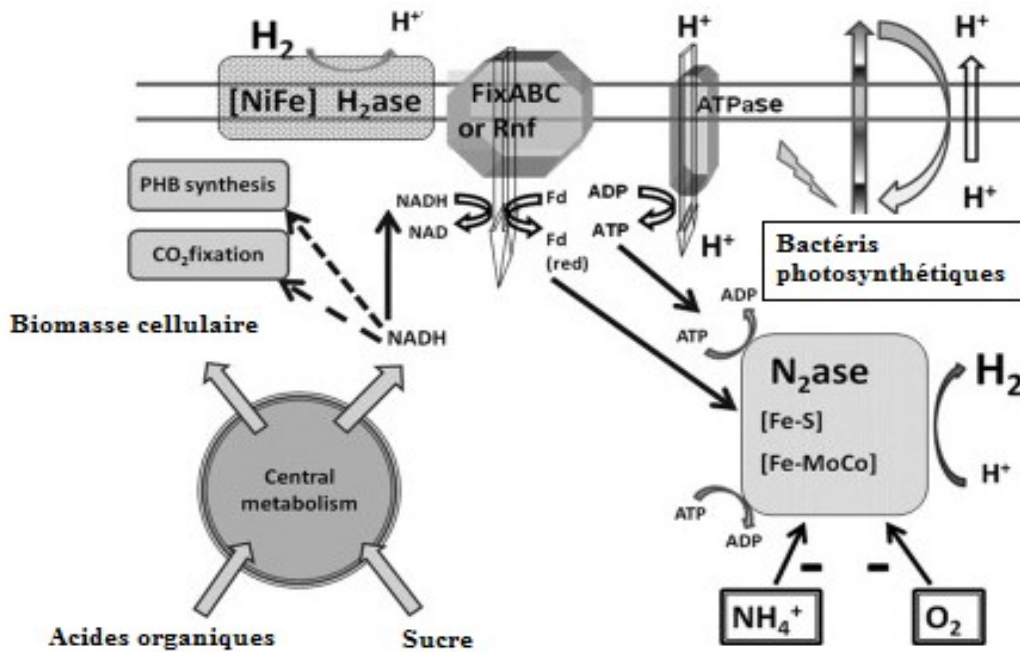


Fig. 3.8. Mécanisme de production de l'hydrogène chez *Rhodobacter sphaeroides* [34]

3.7. Les stratégies d'augmentation de l'efficacité des bioprocédés

Des efforts systématiques ont été entrepris pour améliorer l'efficacité et le rendement de la production. Certains de ces progrès sont brièvement décrits ci-dessous. Ils concernent :

7.1. Effet du rapport carbone/azote sur la photofermentation

Plusieurs organismes peuvent produire de l'hydrogène par photofermentation à partir d'un acide organique. Il a été établi que le lactate [169], l'acétate [76], le butyrate [170], le propionate [171] et le malate [172] sont tous des donneurs d'électrons potentiels pour la photofermentation, le meilleur donneur d'électrons variera en fonction de l'espèce et de la souche étudiée.

La source d'azote influencera aussi beaucoup l'efficacité de production. De plus, comme l'équation de la nitrogénase le démontre, un surplus d'azote dans le milieu défavorisera la réaction de fixation d'azote et, donc, diminuera la production d'hydrogène concomitante. Pour ces raisons, le rapport molaire carbone/azote dans le milieu de croissance joue un rôle dans la définition de la production photofermentaire de l'hydrogène. Selon Eroglu et al [173], un rapport de 15 mM (acide malique) pour 2 mM (glutamate) dans le milieu de culture représenterait le rapport idéal pour la production d'hydrogène par photofermentation.

Ainsi, la source d'azote a également une considération importante étant donné que les sels d'ammoniac NH_4^+ ont tendance à inhiber l'activité enzymatique de la nitrogénase. En l'absence de sels d'ammonium, la production de l'hydrogène est améliorée. Cependant, l'utilisation d'une source d'azote qui ne libère pas d'ions ammonium, comme le glutamate, sera favorisée.

7.2. Effet de la concentration des micronutriments

L'effet de différents paramètres sur la quantité de l'hydrogène produit est en association directe avec l'activité de la nitrogénase. Les micronutriments représentent l'un des facteurs qui affecte l'activité de cette métallo-enzyme. L'absence des ions des métaux essentiels tels que le molybdène et le fer entraîne une diminution de l'activité enzymatique. La disponibilité de ces ions métalliques (molybdène et fer) est jugée critique car ils sont les cofacteurs du Mo-Fe-nitrogénase.

Une étude présentée par Zhua et al. [174] démontre l'effet de la concentration d'ions ferreux libre dans le milieu de culture sur la production d'hydrogène par photo-fermentation. Effectivement, le fer étant cofacteur de plusieurs enzymes et molécules essentielles à la survie des organismes, il n'est pas étonnant qu'une quantité limitante de fer nuise à la photo-fermentation. De plus, comme la nitrogénase et la ferredoxine contiennent à leur tour plusieurs atomes de fer dans leur structure [175], il devient clair qu'une quantité suffisante de fer ionique doit être accessible aux microorganismes. Cette quantité est évaluée à environ 2.4 mg L^{-1} dans l'étude présente. Une quantité plus grande n'entraînant pas une amélioration de la production.

7.3. La modification génétique

Des modifications génétiques et métaboliques des enzymes, ont été réalisées, afin d'optimiser le flux de réduction équivalents à ces enzymes en redirigeant les trajectoires électroniques. C'est une stratégie qui peut être très prometteuse pour atteindre une quantité satisfaisante de l'hydrogène, de l'eau ou des substances organiques.

Parmi ces manipulations génétiques, la suppression du gène de hydrogénase-uptake, l'insertion d'un gène pour l'expression de l'enzyme comme une sur-expression ou une augmentation de l'efficacité productrice de l'hydrogène de ces enzymes dans les cellules, et en augmentant la tolérance de ces enzymes à l'O₂ [36] et à l'ammoniaque [176]. La répression de la synthèse de PHB (polyβ hydroxy butyrate) [23], et ou par la délétion des deux gènes à la fois Hup SL et Phb_c codants pour la synthèse de l'hydrogénase et de PHB synthétase, respectivement [63]. Des mutations ont été également réalisées dans le but de réduire la photo-saturation des pigments. Un mutant MTP4 isolé à partir de *Rhodobacter sphaeroides* RV, montre une réduction des pigments de l'ordre de 41-49%. Avec ce mutant une augmentation de 50% de la production est observée [62]. Un autre mutant PUC1 isolé à partir de *Rhodobacter sphaeroides* KCTC 12085 présentant une délétion du gène puc BA du complexe B800-B850, conduisant à une augmentation de production de l'hydrogène de deux fois plus [177].

7.4. L'immobilisation

L'immobilisation des cellules sur un substrat solide confère des avantages par rapport aux cellules libres en suspension, étant donné que la matière cellulaire immobilisée occupe moins d'espace, nécessite un plus petit volume de milieu de croissance, et elle est plus facile à être manipuler, et peut être utilisée de façon répétée pour la production de produits. Plusieurs matrices solides ont été utilisées avec succès pour l'immobilisation des bactéries photohétérotrophes, tels que le verre poreux, gel d'agar et même des surfaces d'argile [35].

Zagrodnik et al (2015) [33], ont rapporté que l'immobilisation de la souche *Rhodobacter sphaeroides* OU001, sur des plaques de verre poreuses ou des perles de verre poreuses et non poreuses en présence d'acide malique (milieu Biebl et Pf), dans des conditions semi-continues et continues, pour produire du biohydrogène, augmente la performance et la stabilité des cultures. Le volume total de l'hydrogène produit était de 4.19 L / réacteur alors que le taux de production d'hydrogène moyenne a été de 12,7 ml / L / h au temps moyen de rétention hydraulique (HRT) de 22 h. Pour les expériences en suspension la quantité d'hydrogène cumulée était de 2,39 L/ réacteur. Zhu et al (1999) [59] utilisent *Rhodobacter sphaeroides* RV immobilisée sur un gel composé de chitosan- agar en présence d'ammonium (inhibiteur de la nitrogénase), et observent une augmentation de la production d'hydrogène. Ce gel chargé positivement résiste à la diffusion de l'ammonium et agit comme tampon. Cette méthode présente un avantage important lors de l'utilisation des eaux résiduaires (source de carbone) contenant une concentration importante en ammonium.

7.5. L'utilisation d'un substrat complexe

Le choix de la matière première, utilisée pour la production de l'hydrogène, est un facteur environnemental et économique important. Les critères de sélection des déchets appropriés, qui seront employés comme matière première pour la production d'hydrogène, prennent en considération le coût, la disponibilité, la biodégradabilité, et le rapport carbone / azote, ce qui est particulièrement important pour les bactéries photofermentaires.

Dans la littérature, une variété de matériaux, de déchets ou de substrats riches en hydrate de carbone ont été utilisés pour la production de l'hydrogène par photofermentation. D'autre part, les chercheurs travaillent également à trouver la charge optimale, en utilisant des eaux résiduaires de différente origine, de sorte d'améliorer le rendement et l'économie de la production d'hydrogène. Yetis et al (2000) [178] utilisent les eaux résiduaires d'une raffinerie de sucre, comme source de carbone. Aucune production d'hydrogène n'est observée avec les différentes dilutions de l'eau résiduaire seules. Lorsque 20% de cette eau est utilisée en présence de malate, le taux de production est similaire à celui obtenu lorsque la seule source de carbone est le malate.

Zhu et al (1999) [179] utilisent des eaux résiduaires de tofu riche en glucose, *Rhodobacter sphaeroides* RV immobilisée sur de l'agar produit de l'hydrogène en utilisant plus de 41% du carbone organique. Eroglu et al (2004) [30] utilisent comme substrat des eaux résiduaires prélevées au niveau des moulins d'huileries en présence de *Rhodobacter sphaeroides* OU.001. La croissance cellulaire est observée à une dilution de 1 à 20% alors que la production de l'hydrogène est obtenue à une dilution inférieure à 4%. Ces mêmes auteurs (2006) [180] observent une augmentation de la production en hydrogène de l'ordre de 50% (V/V), lorsqu'ils utilisent un effluent, issu de la fermentation des eaux résiduaires produites à partir d'huilerie par des boues activées, comme substrat pour la photofermentation.

L'ensemble des résultats obtenus dans ces travaux est donné dans le tableau 3.3

Tableau 3.3. Résultats d'utilisation des substrats complexes pour la production d'hydrogène par différentes souches de *Rhodobacter sphaeroides*

Source des eaux résiduaires et additives	Souche	Taux de production (ml/ml/h)	Fraction (ml gaz/ml eau résiduaire)	% d'eau résiduaire	Réf
Raffinerie de sucre + malate	OU.001	0.0043	8.6	20	[178]
Usine de tofu	RV	0.059	1.9	100	[179]
Eau résiduaire d'huilerie	OU.001	0.0035	13.9	2	[30]
		0.0095	9.8	1	
		0.008	29	50	
Eau résiduaire laitière	sp	3.62 (l/l)	32.7 (mmol/g)	60	[34]
Amidon du blé	sp	1.23 (l/l)	6.4 (mmol/g)	-	

7.6. L'utilisation des systèmes intégrés

Les systèmes hybrides peuvent être utilisés pour augmenter la production de l'hydrogène et assurer une complète dégradation du substrat (équation 3.7 et 3.8), dont le principe est illustré sur la Figure 3.9.

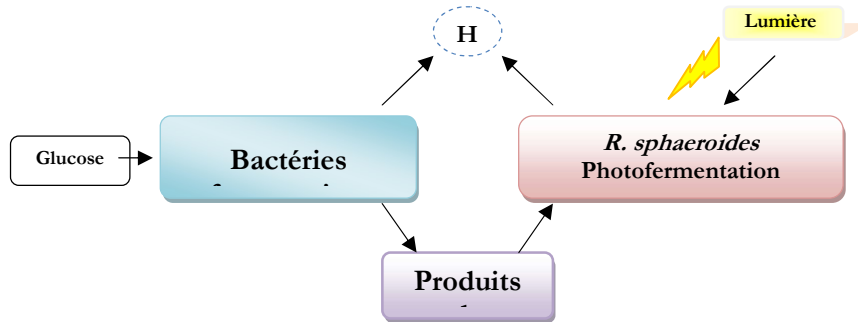


Fig.3.9. Principe des systèmes intégrés

Des chercheurs ont utilisé ce type de bioprocédé intégré en deux étapes distinctes d'où on parle d'une culture hybride. Kaushik Nath et al (2005) [76] réalisent une production biologique de l'hydrogène en deux étapes, la première est une fermentation du glucose par la bactérie *Enterobacter cloacae* DM11, avec un taux de production de 1.86 mol/mol de glucose, la seconde est une photofermentation sur le milieu de fermentation, par *Rhodobacter sphaeroides* OU.001, avec un taux de production de 1.5-1.72 mole/mole de glucose. Redwood et al (2006) [60] suivent le même principe en utilisant *Escherichia coli* HD 701 pour la fermentation du glucose. Récemment, Laurinavichene et al. (2010) [181] démontrent que la production H_2 dans ce processus intégrée en utilisant la fermentation sombre suivie de la photofermentation augmente le rendement de production à 5.6 mol/mol de glucose.

D'autres chercheurs utilisent des co- cultures de bactéries fermentaires (productrices et non productrices d'hydrogène) et photofermentaires. Laurinavichene et al (2015)[17] , ont démontré que le rendement de H_2 de la co-culture de *Clostridium butyricum* et *Rhodobacter sphaeroides*, en utilisant l'amidon comme substrat, est plus élevé que celui de la culture pure de *C. butyricum* (4,9 et 1,5 moles d'hexose / mole, respectivement). Frang et al (2006) [182] observent une augmentation de la production, lors d'une co-culture de *Clostridium butyricum* et de *Rhodobacter sphaeroides*.

L'hydrogène peut être produit à partir du sucrose [183]. Pour Yong Zhen Taob et al (2007) [94], le sucrose fermenté par la microflore de boues activées serait utilisé comme substrat (butyrate et acétate) pour la production de l'hydrogène par *Rhodobacter sphaeroides* SH2C. Cette deuxième étape double le rapport molaire d'hydrogène/ sucrose. Yokoi et al (2001) [184]

effectuent la production de l'hydrogène à partir d'une co- culture de bactéries fermentaires *Clostridium butyricum* et *Enterobacter aerogenes* en présence d'amidon issu de la pomme de terre. Le milieu de fermentation produit est utilisé pour la production de l'hydrogène par *Rhodobacter sp M19*, permettant ainsi une augmentation de production de 2.4 à 7 moles d'hydrogène/ mole de glucose. Yasuo Asada et al (2006) [185] effectuent une co- immobilisation des cultures bactériennes, en utilisant une bactérie lactique non productrice d'hydrogène, *Lactobacillus delbrueckii* pour la conversion du glucose en acide lactique ; un substrat favorable pour la production de l'hydrogène par *Rhodobacter sphaeroides*.

Le taux de production maximal est de 7.4 moles d'hydrogène/ mole de glucose, avec une dilution au cinquième. Une étude technico-économique sur l'utilisation des deux processus en un système combiné est réalisée par Ljunggren et al (2011) [186]

7.7. Les photobioréacteurs

La saturation lumineuse de la photosynthèse est un paramètre important qui présente un impact sur l'efficacité et le rendement de production de l'hydrogène par photofermentation en bioréacteur, en particulier dans la culture de masse élevée. D'une part, le rayonnement solaire est une source d'énergie diffusé, d'autre part, les organismes phototrophes évoluent de manière à capter le plus de photons pour favoriser leur survie. Une relation inverse entre le rendement de conversion de l'énergie dans la photosynthèse et l'intensité de la lumière solaire incidente. Dans une culture dense en bioréacteur, les micro-organismes en surface capturent donc beaucoup plus de photons qu'il leur est nécessaire. Cela contribue à diminuer le rendement théorique de telles cultures de deux façons :

- Premièrement, les micro-organismes en surface disposent des photons en trop en émettant de la chaleur ou des infrarouges.
- Deuxièmement, la lumière incidente s'appauvrit très rapidement avec la profondeur dans le bioréacteur.

Donc, les microorganismes en surface reçoivent trop d'illumination alors que ceux se situant plus en profondeur n'en reçoivent pas assez. Une relation inverse entre le rendement de conversion de l'énergie dans la photosynthèse et l'intensité de la lumière solaire incidente. Parmi les solutions potentielles le design des bioréacteurs ayant la capacité de distribuer la lumière efficacement.

Pour réduire l'atténuation de l'énergie lumineuse au sein du réacteur et augmenter le taux de production d'hydrogène, un réacteur tubulaire plan enroulé en spirale, d'un faible diamètre étudié, a été conçu [93].

Dans ce présent chapitre, nous avons présenté la bactérie photosynthétique pourpre non sulfureuse, *Rhodobacter sphaeroides*.

Chapitre 4.

Matériel et Méthodes

Sommaire:

4.1. Production d'hydrogène par voie Fermentaire.....	74
4.1.1 Matériel	74
4.1.1.1. Matériel biologique "La souche <i>Escherichia coli</i> ATCC8739".....	74
4.1.1.2. Appareillage.....	74
4.1.2. Méthodes de culture d' <i>E. coli</i> et les conditions de croissance.....	75
1.2.1. Préparation du milieu de croissance Luria Bertani (LB)	75
1.2.2. Revivification et activation de la bactérie lyophilisée.....	75
1.2.3. Conservation des bactéries	76
4.1.3. Caractérisation de la souche.....	77
1.3.1. Critères culturels.....	77
1.3.1.1. Détermination du mode de croissance en milieu liquide (respiratoire ou fermentaire)	77
A) Etude du mode de croissance cellulaire.....	77
B) Etude de la cinétique de croissance en aérobiose et en anaérobiose.....	77
1.3.1.2. L'arrangement des bactéries en colonies sur milieu solide.....	77
1.3.2. Caractères morphologiques.....	77
1.3.2.1. Coloration Gram.....	77
1.3.2.2. Etat frais (Test de Mobilité)	78
1.3.3. Caractères biochimiques.....	78
1.3.3.1. Test de catalase.....	79
1.3.3.2. Réaction des oxydases.....	79
1.3.3.3. Lactose.....	79
1.3.3.4. Etude des caractères biochimiques par une Micro-méthode (galerie API 20E)....	79
1.3.3.4.1. Identification de la méthode.....	80
1.3.3.4.2. Principe.....	80
1.3.3.4.3. Préparation de l'inoculum.....	80
1.3.3.4.4. Ensemencement et incubation.....	80
1.3.3.4.5. Lecture et identification.....	81
4.1.4. Production de l'hydrogène par <i>E. coli</i> ATCC8739 en bioréacteur.....	82
1.4.1. Préparation de l'inoculum primaire	82
1.4.2. Préparation des précultures.....	82
1.4.3. Préparation du milieu de production d'hydrogène (le milieu M9).....	82
1.4.4. Les micro-organismes et les conditions de culture au cours du métabolisme fermentaire en bioréacteurs.....	83
4.1.5. Étude d'optimisation.....	84
1.5.1. Optimisation d'un facteur à la fois.....	85
1.5.2. Optimisation à trois facteurs à la fois	85
4.1.6. Etude de l'effet des cations bivalents.....	86
1.6.1. Etude de l'effet du fer (macroélément)	86
1.6.2. Etude de l'effet du Nickel (oligoélément)	86

4.1.7. Les méthodes analytiques.....	86
1.7.1. Mesure du taux de la croissance cellulaire.....	86
1.7.2. Mesure de la valeur du pH.....	86
1.7.3. Dosage du glucose.....	87
1.7.4. Mesure du volume d'hydrogène	89
1.7.4.1. Description du système	89
1.7.4.2. Principe	89
4.2. Production de l'hydrogène par voie Photofermentaire.....	89
4.2.1. Matériel biologique "La bactérie <i>Rhodobacter sphaeroides</i> CIP 60.6 (DSM 158, ATCC 17023) ...	89
4.2.2. Méthodes de culture de <i>Rhodobacter sphaeroides</i> et conditions de croissance.....	89
2.2.1. Préparation des milieux de croissance	89
2.2.1.1. Le milieu Sistrom A	89
2.2.1.2. Le milieu aSy.....	91
2.2.2. Revivification et activation de la bactérie lyophilisée <i>R. sphaeroides</i> CIP 60.6	92
2.2.2.1. Sur milieu liquide.....	92
2.2.2.2. Sur milieu solide.....	93
2.2.3. Caractérisation de la souche.....	93
2.2.3.1. Observation des colonies	93
2.2.3.2. Teste de mobilité.....	93
2.2.3.3. Coloration Gram	93
4.2.3. Conservation des bactéries	93
4.2.4. La production d'hydrogène par <i>Rhodobacter sphaeroides</i> CIP60.6	94
2.4.1. Préparation de la préculture de <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	94
2.4.2. Préparation du milieu de production d'hydrogène (le milieu gL)	94
2.4.3. Préactivation à la production et optimisation de l'âge de culture.....	95
2.4.4. Production d'hydrogène en photobioréacteur parfaitement agité.....	95
2.4.5. Etude de l'effet des intensités lumineuses.....	96
a) Etude de la cinétique de croissance et de production du biohydrogène.....	96
b) Etude de l'accroissement du taux de production de l'hydrogène.....	96
c) Modélisation non linéaire.....	96
d) Etude de la faisabilité de l'utilisation du model Luedeking-Piret" LP" (modélisation linéaire.....	97
2.4.6. Etude de l'évolution et l'effet du pH sur la production d'hydrogène.....	97
2.4.7. Etude de l'effet de la pression partielle de l'hydrogène et de l'agitation	97
4.2.5. Mesure du taux de la croissance cellulaire	97
4.2.6. Mesure du volume d'hydrogène	97
4.3. Contrôle de stérilité des différents milieux.....	98

Dans ce chapitre, nous allons présenter le matériel et les méthodes utilisés pour le besoin de nos essais en tenant compte des différentes conditions opératoires.

Cette présentation est divisée en deux parties, la première 4.1 concerne la présentation des protocoles expérimentaux et le matériel utilisé pour la production de l'hydrogène par voie fermentaire et la seconde 4.2 concernera la production de l'hydrogène par voie photo-fermentaire. De même nous présenterons les outils statistiques utilisées pour le plan expérimental.

4.1. Production d'hydrogène par voie Fermentaire

4.1.1. Matériel

4.1.1.1. Matériel biologique “ la souche *Escherichia coli* ATCC8739”

La souche *Escherichia coli* est une bactérie chimio-organotrophe, mésophile, anaérobie facultative. Elle est capable de croître selon son métabolisme respiratoire et fermentaire. *E. coli* est une composante importante de la biosphère. Pour les besoins de notre travail, nous avons opté d'utiliser la souche *E. coli* ATCC8739 (American Type Culture Collection 8739) pour produire de l'hydrogène. Notre contribution serait l'amélioration de l'efficacité de production d'hydrogène et d'en étudier l'impact de différentes facteurs opératoires.

4.1.1.2. L'appareillage

- pH-mètre (HANNA 209 pH- mètre) et (691 pH meter, Ω Metrohm).
- Spectrophotomètre (Lamda 20, Perkin Elmer®, USA) et (UV mini 1240 SHIMADZU)
- Autoclave
- Agitateur magnétique monoposte et multipostes
- Incubateur (Mettler)
- Réfrigérateur
- Congélateur
- Vortex (IKA)
- Balance électronique de précision ((Sartorius CP224S) : d=0.1 mg, max.=220 g)
- Etuve (Mettler)
- Chromatographie en phase gazeuse (SHIMADZU GC-14B)
- Thermorégulateur
- Centrifugeuse réfrigérée (HERMELE labortechnik GmbH. Z36HK)
- Bain marie (Mettler)
- Luxmètre numérique (Testo 545).

4.1.2. Méthodes de culture d'*E. coli* et les conditions de croissance

1.2.1. Préparation du milieu de croissance Luria Bertani (LB)

Dans ce présent travail, le milieu Luria Bertani (LB) est utilisé pour la croissance et le maintien des souches. La composition du milieu LB est donnée dans le Tableau N° 4.1.1 ci-dessous :

Tableau 4.1.1. : La composition chimique du milieu LB [187]

<i>La composition chimique</i>	<i>Milieu liquide (g/l)</i>
Bacto-tryptone	10
NaCl	10
Extrait de levures	05

Pour préparer ce milieu, on introduit les composants chimiques cités ci-dessus dans un volume de 800 mL d'eau distillée, ce mélange est ensuite agité jusqu'à ce que tous les ingrédients soient dissous. Le volume est complété à 1 L avec de l'eau distillée et le pH est ajusté à 7.0 avec du NaOH 3N. Le milieu (LB) est stérilisé à l'autoclave à 121 °C sous 1 atm pendant 20 minutes [187].

1.2.2. Revivification et activation de la bactérie lyophilisée

La revivification est une réactivation des souches lyophilisées, elle a été effectuée dans le milieu LB. Pour cela, l'unité KWIK-STIK™, retirée du réfrigérateur (2 – 8°C), est laissée à la température ambiante sans l'ouvrir, jusqu'à ce que l'équilibre thermique soit atteint (Fig. 4.1.1.a).

Le sachet est ensuite ouvert pour retirer l'unité KWIK-STIK™ (Fig. 4.1.1.b). Déchirer la partie à arracher de l'étiquette du KWIK-STIK™, coller l'étiquette identificatrice sur la fiche (Fig. 4.1.1.c). Noter que la pastille se trouve au fond du dispositif et que le réservoir du liquide d'hydratation se situe dans la partie supérieure (bouchon) du dispositif. Casser l'ampoule en pinçant le milieu du capuchon du dispositif afin de libérer le fluide Hydratant, laissez le s'écouler sur l'écouvillon jusqu'au fond du dispositif contenant la pastille de gélatine (Fig. 4.1.1.d). Donner de petits coups sur l'extrémité inférieure du dispositif, tout en le tenant verticalement et le capuchon vers le haut, afin de faciliter l'écoulement du liquide (Fig.4.1.1.e).

En pinçant la partie inférieure du dispositif, écraser et mélanger la pastille avec le liquide jusqu'à ce que les particules de la pastille aient une taille uniforme et que la suspension ait une apparence homogène (Fig. 4.1.1.f). Imbiber à saturation l'écouvillon avec cette suspension et le transférer sur un milieu approprié, non sélectif, le milieu LB, voir figure ci-contre (Fig. 4.1.1.g). Inoculer la culture primaire sur milieu gélosé à l'aide de l'écouvillon (Fig. 4.1.1.h) et incubé le milieu inoculé suivant la température et les conditions appropriées (35-37°C) pendant 24 à 48h (Fig. 4.1.1).

Après incubation, choisir des colonies représentatives bien isolées pour les ensemercer sur des tubes de gélose, (ex : milieu LB), des tubes de la conservation qui serviront pour le repiquage des souches et l'utilisation courante.

Incuber immédiatement les tubes dans des conditions adéquates de température pendant une durée nécessaire de croissance, tout en vérifiant le bon développement de la culture. Conserver ensuite les souches sur les milieux gélosés entre 2 et 8°C.

Chaque tube doit être correctement étiqueter avec une étiquette portant les mentions suivantes : nom de la souche, référence, date de repiquage, nom d'opérateur.

Tout matériel réhydraté restant doit être conformément jeté selon les protocoles de laboratoire concernant la destruction de matériels à risque biologique après autoclavage, suivant la procédure de gestion des déchets microbiologiques en vigueur. Les souches restantes sur le matériel réhydraté peuvent survivre lorsqu'ils sont libérés dans l'environnement naturel, ce qui permet une large diffusion à de nouveaux hôtes [188].

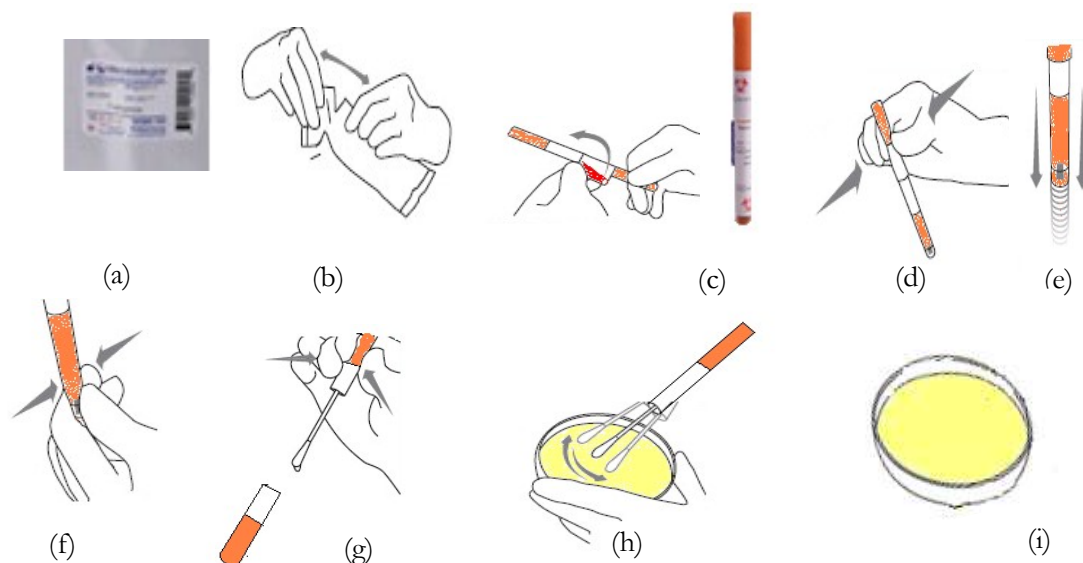


Fig.4.1.1. Revivification de la souche bactérienne

1.2.3. Conservation des bactéries

La préparation du milieu solide est nécessaire pour la conservation et l'entretien des souches et qui se fait par un repiquage mensuel des souches dans des tubes à gélose inclinés, à une température de 4°C.

Il suffit d'ajouter 15 g d'agar agar au milieu (LB) avant de compléter le volume à 1 L, ensuite on verse ce milieu dans des flacons scellés et les autoclaver. Le milieu sortant de l'autoclave est versé dans des tubes en verre à bouchon métallique stériles, avant qu'il ne commence à se solidifier, de manière à faire incliner le milieu gélosé. Les repiquages des souches bactériennes se font par des ensemencements en surface par la méthode des stries, suivie d'une incubation à

l'étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures afin d'obtenir une culture jeune et des colonies bien isolées. Les colonies isolées vont servir à préparer l'inoculum.

4.1.3. Caractérisation de la souche

Différentes méthodes de caractérisation des bactéries ont été développées au fil des progrès scientifiques et permettent d'identifier le genre et l'espèce du micro-organisme. L'identification d'une bactérie repose sur l'étude de ses critères culturels, morphologiques et biochimiques.

4. 1.3.1. Critères culturels

4. 1.3.1.1. Détermination du mode de croissance en milieu liquide (respiratoire ou fermentaire)

A) Etude du mode de croissance cellulaire

Le principe de la détermination du mode de croissance des bactéries est basé sur leurs capacités de croître en anaérobiose et en aérobiose. La croissance se déroule sur deux tubes à essai contenant le milieu LB et de la suspension bactérienne, l'un ouvert et l'autre fermé.

B) Etude de la cinétique de croissance en aérobiose et en anaérobiose

Pour l'étude de la cinétique de croissance bactérienne en aérobiose et en anaérobiose, deux Erlen Meyer de 100ml contenant le milieu LB (pH 7) ont été préparés :

- Les conditions d'aérobiose ont été obtenues en couvrant l'Erlen Meyer avec du papier aluminium, tout en permettant un passage aseptique de l'air.
- Les conditions d'anaérobiose ont été effectuées en barbotant le milieu du second Erlen Meyer avec de l'azote, il sera ensuite scellé avec un bouchon en caoutchouc imperméable aux gaz et une capsule en aluminium.

Les deux Erlen Meyer sont stérilisés à l'autoclave et incubés à 37°C pendant 24h.

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

Cette observation permet de connaître l'arrangement des bactéries en colonies sur milieu solide. En bactériologie, chaque famille présente un arrangement qui lui est caractéristique.

1.3.2. Caractères morphologiques

Les caractères morphologiques sont révélés par les examens microscopiques soit photonique (coloration Gram et à l'état frais) ou électronique.

1.3.2.1. Coloration Gram : La coloration Gram est établie en 1884 par Hans Christian Gram. La coloration Gram des cellules bactériennes permet à la fois de connaître la morphologie des bactéries et de les classer en deux groupes en testant la différence de leur composition chimique et leur perméabilité pariétale.

Les réactifs utilisés, issus de l'institut Pasteur d'Alger, sont:

Le colorant primaire: violet de gentiane phénirique;

Le mordant: Lugol (fixation du colorant);

L'agent de décoloration: Alcool éthylique 96°;

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

Une coloration fiable s'effectue à partir des cultures jeunes en bouillon ou sur gélose, elle se fait comme suit:

- Etaler le frottis prélever des colonies en aérobie sur une lame propre;
- Fixation;
- Recouvrir la lame avec du violet de gentiane pendant deux minutes, jeter l'excès de coloration;
- Laisser agir le Lugol pendant une minute, égoutter;
- Décolorer deux fois pendant 45 secondes;
- Laver abondamment avec de l'eau distillée;
- Recolorer à l'aide de la fuchsine;
- Laver abondamment avec de l'eau distillée;
- Sécher la lame au dessus de la flamme du bec bunsen;
- Observer au microscope photonique sans lamelle à sec, après la mise au point de l'objectif Gx100, déposer une goutte d'huile à immersion sur la lame avant de passer à l'objectif Gx1000 [189,190].

Les bactéries à Gram positif sont colorées en violet, les bactéries à Gram négatif sont colorées en rose.

1.3.2.2. Etat frais (Test de Mobilité)

L'examen direct à l'état frais permet d'apprécier la morphologie des bactéries, leur groupement, leur abondance et d'observer leur mobilité [153].

L'examen direct à l'état frais se réalise :

- entre lame et lamelle en déposant sur une lame porte-objet une goutte de suspension bactérienne, cette lame est ensuite recouverte d'une lame-couvre-objet ;
- ou mieux en gouttes.

La préparation est examinée au microscope photonique grossissement Gx100 puis Gx400.

1.3.3. Caractères biochimiques

Sachant que tous les micro-organismes ne sont pas capables de dégrader les mêmes substrats, des tests biochimiques ont été mis en place afin de connaître le phénotype des micro-organismes. Il s'agit d'identifier l'activité enzymatique de la bactérie en observant ce qu'elle dégrade et ce qu'elle produit. Les différentes enzymes produites par la bactérie permettent la dégradation de certains substrats. Les produits de dégradation ainsi formés peuvent être colorés (substrats chromogènes), fluorescents (substrats fluorogènes), former un précipité avoir des propriétés acido-basiques qui seront révélées avec un indicateur coloré [191]. C'est sur l'étude des caractères

biochimiques que repose en pratique le diagnostic de genre et d'espèce qui ne doit être abordé qu'après que le diagnostic de famille a été établi avec certitude [192].

1.3.3.1. Test de catalase

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatives. Elle permet l'hydrolyse du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau (H_2O) et en oxygène (O_2). A partir des colonies prélevées avec soin sur la gélose, nous avons réalisé un frottis sur lequel on dépose quelques gouttes de peroxyde d'hydrogène 3 (v/v). La présence de catalase se matérialise par une production de bulles [193].

1.3.3.2. Réaction des oxydases

Cette réaction est recherchée sur des cultures en milieu gélosé exempt de sucres fermentescibles, TSA, gélose MH. Les bactéries possédant des oxydases en présence de sucres donnent des métabolites qui se combinent avec le réactif utilisé pour donner une coloration variable selon la bactérie.

La réaction des oxydases se fait à l'aide de disques Biomérieux® imprégnés de réactif sur lequel on dépose une colonie.

Une réaction positive se traduit par l'apparition d'une coloration violette à l'endroit où on a déposé la colonie peut être immédiate, si ce n'est le cas il faut attendre quelques secondes (jusqu'à 30 secondes, après, la lecture doit être faite) [194].

On dit qu'une bactérie est oxydase + si un fragment de culture est capable d'oxyder la forme réduite de dérivés N-méthylé du paraphénylènediamine en semi-quinone (rose violacée).

1.3.3.3. Lactose

Quant au lactose, il permet d'emblée de faire un diagnostic présomptif des différents germes de bacilles à Gram négatif par la fermentation ou non du lactose. La gélose Mac Conkey® est recommandée pour isoler et dénombrer les entérobactéries c'est un milieu adéquat pour l'isolement des bacilles à Gram négatif [195]. Ce choix s'explique entre autres par le rôle des différents éléments qui la composent à savoir :

- le violet de cristal qui inhibe la croissance des bacilles à gram positif,
- le lactose qui permet de faire un diagnostic présomptif des colonies lactose positive et lactose négative.

Les bactéries serontensemencées sur la gélose Mac Conkey et incubées à l'étuve à 37°C durant 18 à 24 heures.

Lorsqu'il y a fermentation du lactose, les colonies deviennent rouge brique, entourées d'un halo opaque de sels biliaires précipités et quand il n'y a pas de fermentation, on observe des colonies de couleur blanche [195].

1.3.3.4. Etude des caractères biochimiques par la Micro-méthode (galerie API 20E)

L'étude de l'ensemble des caractères biochimiques nécessite l'ensemencement d'une série de milieux de culture constituant une galerie. Actuellement, les kits d'identification rapide

commercialisés (galerie API) s'appuient sur la détection colorimétrique et fournissent une réponse en 24 heures (Fig. 4.1.2).



Fig.4.1.2. La galerie API 20E utilisée pour l'étude des caractères biochimiques (a) avant et (b) après inoculation (ensemencement)

1.3.3.4.1. Identification de la méthode

Il s'agit d'une méthode miniaturisée, de la fermentation des sucres et de la croissance en milieu hostile. La galerie API 20 *E coli* permet de réaliser 21 tests biochimiques. La technique consiste à ensemencer des microtubes constitués de cupules renfermant des substrats destinés à la mise en évidence d'activités enzymatiques ou d'assimilation des substrats carbonés. Les cupules étaient ensemencées avec un inoculum qui reconstitue le milieu.

Après incubation, la lecture des réactions est effectuée à partir d'un tableau.

1.3.3.4.3. Préparation de l'inoculum : La suspension bactérienne doit avoir une turbidité égale à 0,5 dans 1,5 ml d'eau distillée. Cette suspension est préparée avec des colonies cultivées sur milieu solide et ayant été incubées durant 18 à 24 heures.

1.3.3.4.4. Ensemencement et incubation : Déposer soigneusement 150 µl de la suspension bactérienne dans chaque cupule de la galerie en utilisant un embout stérile.

- Remplir les cupules et les tubes des tests : CIT, VP, GEL, dont le sigle est encadré, avec la suspension bactérienne, la cupule doit être remplie de manière à créer un ménisque.
- Recouvrir les puits destinés à la recherche des décarboxylases (ADH, LDC, ODC), d'uréase et des sucres, dont le sigle est souligné, avec 2 gouttes de paraffine afin de maintenir soit l'anaérobiose nécessaire aux réactions, soit les ions volatils produits par la réaction en solution et ainsi assurer le virage de l'indicateur coloré de pH. Remplir uniquement les tubes des autres tests.
- Refermer la boîte d'incubation et l'incuber à 37°C sur un plateau recouvert de papier buvard imbibé d'eau. Lire après 4 heures, puis après 18 à 24 heures d'incubation (Fig.4.1.3).

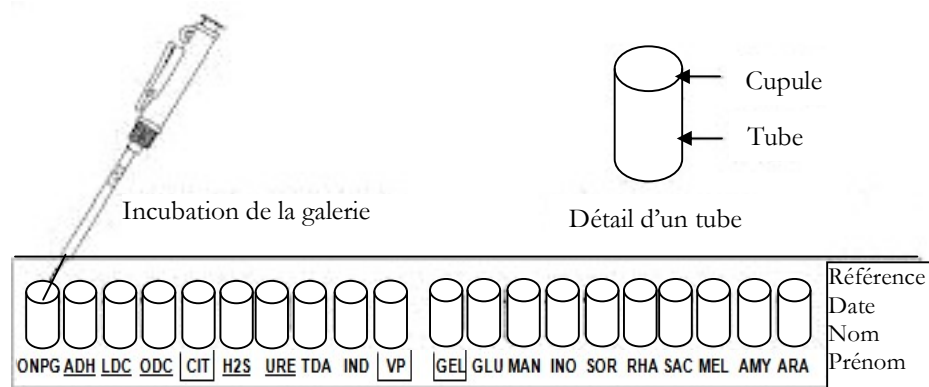


Fig. 4.1.3. Ensemencement des bactéries dans une galerie de milieu pour identification des caractères biochimiques

1.3.3.3.5. Lecture et identification

La lecture repose sur le changement de la coloration initiale des différents milieux. Cette lecture se fait soit directement, soit après l'addition de réactifs de révélation. La lecture des résultats de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de lecture (voir tableau 4.1.2 en annexes).

Lors de la lecture il faut suivre les directives suivantes :

- (1) Une très légère couleur jaune est également positive.
- (2) Une couleur orange apparaissant après 36-48 H d'incubation doit être considérée négative.
- (3) Lecture dans la cupule (zone aérobie).
- (4) La fermentation commence dans la partie inférieure des tubes, l'oxydation commence dans la cupule.
- (5) Une légère coloration rose apparaissant après 10 minutes doit être lue négative.

Les résultats lus de ces réactions sont notés sur une fiche de lecture ou Fiche de résultat, (Fig. 4.1.4).

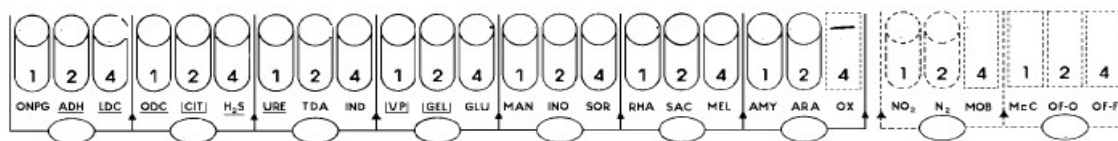


Fig. 4.1.4. Fiche de résultats de la galerie Api 20E [196]

L'identification est obtenue à partir du profil numérique. Sur la fiche de résultats, les tests sont séparés par groupes de trois et une valeur 1, 2 ou 4 est indiquée pour chacun. La galerie API 20 E comportant 20 tests, en additionnant à l'intérieur de chaque groupe les valeurs correspondant à des réactions positives, on obtient 7 chiffres ; la réaction de l'oxydase qui constitue le 21ème test est affectée de la valeur 4 lorsqu'elle est positive.

L'identification est basée sur la mesure de similitude entre leur profil et ceux des espèces identifiables de référence à l'aide de données recueillies dans :

- Des tables d'identification (catalogue analytique), pour rechercher le profil numérique dans la liste des profils.
- grâce à un logiciel d'identification (apiwebTM), pour faire entrer manuellement au clavier le profil numérique à 7 chiffres [196, 197].

4.1.4. Production de l'hydrogène par *E. coli* ATCC8739 en bioréacteur

VI.1.4.1. Préparation de l'inoculum primaire

Les cultures bactériennes ont été cultivées en aérobose dans un Erlen Meyer de 150 ml contenant le milieu Luria Bertani (LB), à un pH 7, une température de 37 °C et une agitation de 150 tours/min, jusqu' à la fin de la phase logarithmique afin d'enrichir le milieu [134]. L'aérobiose est obtenue en couvrant l'Erlen Meyer avec du papier aluminium, tout en permettant un passage aseptique de l'air. Cette culture servira comme inoculum primaire des précultures pour la production de l'hydrogène et pour préparer une série de tubes qui serviront à la fois, pour le repiquage des souches et pour des utilisations courantes.

4.1.4.2. Préparation des précultures

Pour une inoculation directe des bioréacteurs conçus pour la production de l'hydrogène, les souches d'*E. coli* ont été d'abord précultivées en anaérobiose dans un Erlen meyer (200ml) contenant le milieu M9 glucose, (la concentration du glucose est de 15 g/l), stérilisé à l'autoclave sous 1 bar à 121°C pendant 20 minutes.

Le milieu de préculture sera inoculé, à l'aide d'une seringue stérile par l'inoculum primaire d'*E. coli* à une densité égale à 1, et incubé à 37°C, pH 7.0, sous une agitation de 150 tours/minutes pendant 12 à 18h [134].

4.1.4.3. Préparation du milieu de production d'hydrogène (le milieu M9)

Le milieu de production de l'hydrogène M9 contient les composants suivants (par litre),
Tableau 4.1.3. et 4.1.4.:

Tableau 4.1.3. : La composition chimique du milieu M9 [198]

<i>La composition chimique</i>	<i>g/l</i>
K ₂ HPO ₄	19,3
KH ₂ PO ₄	9,4
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,25
NaCl	1,0
NH ₄ Cl	1,6
Extrait de levure	3,0
CaCl ₂	1,0
Solution des éléments en traces de Pfennig et Lippert	2 mL

Tableau 4.1.4. : La composition chimique de la solution des oligo-éléments de Pfennig et Lippert [198]

<i>La composition chimique</i>	<i>mg/l</i>
FeSO ₄ 7H ₂ O	210
ZnSO ₄ 7H ₂ O	50
MnCl ₂ 4H ₂ O	50
H ₃ BO ₃	15
CoCl ₂ 6H ₂ O	100
CuSO ₄ 5H ₂ O	6,7
NiCl ₂ 6H ₂ O	10
Na ₂ SeO ₃	5,0
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	15

Compléter le volume à 1 litre avec de l'eau distillée.

Le glucose est un monomère de cellulose, il représente le plus abondant substrat dans le monde et une bonne source pour la production de l'hydrogène par de nombreux micro-organismes. Dans notre présent travail le glucose a été utilisé comme source de carbone à des concentrations différentes.

4.1.4.4. Les micro-organismes et les conditions de culture au cours du métabolisme fermentaire en bioréacteurs

Pour mener à bien nos travaux expérimentaux, huit bioréacteurs ont été conçus par nos soins et mis en marche (Fig.4.1.5). Cependant, pour étudier la production d'hydrogène en fermentation anaérobie, il est primordial que la croissance se fasse sans oxygène. Pour ce faire, les bioréacteurs, contenant le milieu M9, ont été barbotés avec de l'argon (Ar) (99,9%) pendant 10 minutes afin de s'assurer qu'ils étaient complètement dépourvus d'O₂.

Les bioréacteurs ont ensuite été scellés avec des bouchons en caoutchouc imperméables aux gaz et avec des capsules en aluminium et stérilisés à l'autoclave. À la partie supérieure, le bioréacteur communique avec trois canalisations verticales ouvertes munies de vannes ; la première permet le passage du gaz inerte à l'intérieur du réacteur (conditions d'anaérobiose), les deux autres permettent la sortie des gaz (air et argon) et (biogaz).

5 mL de la suspension bactérienne en fin de phase logarithmique de croissance, après préculture dans le milieu (M9), sont ajoutés dans chacun des bioréacteurs de manière aseptique en utilisant des seringues stériles.

Les bioréacteurs sont incubés en anaérobiose avec une agitation de 150 tours /min jusqu'à stabilisation de la production d'hydrogène. La régulation de la température est faite par un thermorégulateur disposé au sein du bain-marie où baigne le réacteur.

Au cours de la fermentation, des échantillons ont été prélevés périodiquement pour déterminer la croissance cellulaire, la quantité de substrat résiduel, et la valeur du pH.

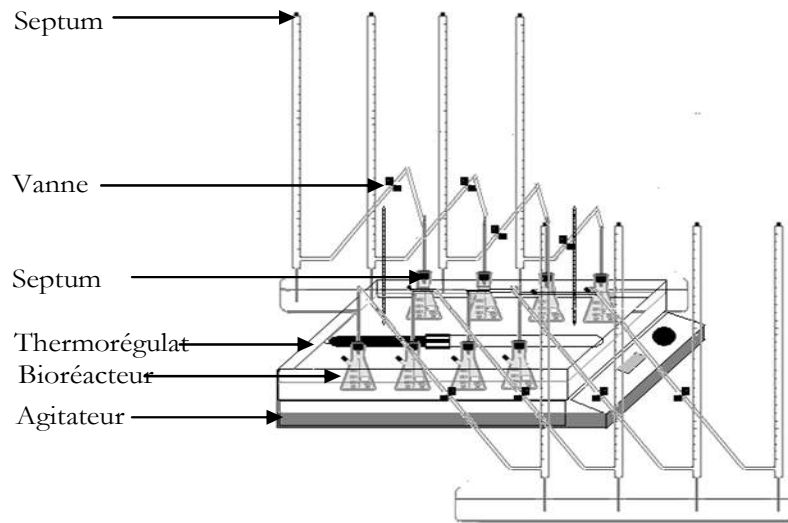


Fig.4.1.5. Bioréacteur (a), photo ; (b), schéma

4.1.5. Étude d'optimisation

L'optimisation des conditions nutritionnelles et environnementales joue un rôle important dans le développement des bioprocédés et l'amélioration de leur performance. Dans ce présent travail deux modes d'optimisation ont été effectués :

- un classique ;
- et l'autre statistique.

1.5.1. Optimisation d'un facteur à la fois : C'est une méthode classique qui permet d'étudier l'effet individuel des facteurs affectant la production de l'hydrogène et ainsi leur optimisation.

1.5.2. Optimisation à trois facteurs à la fois : C'est une méthode qui permet d'évaluer l'effet individuel et interactif entre l'ensemble des facteurs expérimentaux et les réponses observées. L'expérimentation est basée sur la définition d'un plan d'expérience.

L'optimisation de la production de biohydrogène a été réalisée grâce à une analyse statistique ANOVA en utilisant la RSM. Pour cela, un modèle factoriel de Box-Behnken 3K a été utilisé comme modèle expérimental pour optimiser les paramètres clés du bioprocédé et d'améliorer la production d'hydrogène. La variable X_i , a été codée comme x_i selon l'Eq. (4.1), où X_i^* correspond à la valeur centrale:

$$x_i = (X_i - X_i^*) / DX_i \quad (4.1)$$

Avec:

- x_i est la valeur codée de la variable indépendante;
- X_i est la valeur non codée de la i -ième variable indépendante;
- X_i^* est la valeur non codée de la i -ième variable indépendante au niveau du point central, et DX_i est la valeur de variation de pas [199].

Le taux de production d'hydrogène dépend de la concentration en substrat (glucose), du pH et de la température. Ces paramètres ont été choisis comme variables indépendantes dans des intervalles de 5 à 25 g / L, de 5,5 à 7,5 et 25 à 40°C, respectivement. Au total 15 essais ont été réalisés, dont 12 essais expérimentaux décidés par la conception factorielle de Box-Behnken 3K, et un essai pour le point central, qui a été répété trois fois pour estimer les erreurs expérimentales.

Pour prédire les conditions optimales, l'équation polynomiale quadratique a été adaptée à corrélérer la relation entre les variables et la réponse (tel que, le taux de production de l'hydrogène). L'équation polynomiale du second degré est donnée par Eq. (4.2):

$$Y_i = \alpha_0 + \sum_{i=1}^3 \alpha_i X_i + \sum_{i=1}^3 \alpha_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=1}^3 \alpha_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad (4.2)$$

Avec : Y_i est la réponse prévue,

- $X_i X_j$ sont les variables d'entrée qui influencent la réponse de la variable Y ;
- α_0 est le terme de décalage;
- α_i est le i -ème coefficient linéaire;
- α_{ii} est le i -ème coefficient quadratique ;
- α_{ij} est le ij -ème coefficient d'interaction [200].

Les valeurs d'entrée X_1 , X_2 et X_3 correspondant à la valeur optimale de Y ont été résolus par la mise des dérivées partielles de la fonction à zéro. Les coefficients de deuxième ordre des polynômes ont été également calculés.

4.1.6. Etude de l'effet des cations bivalents

De nombreuses références montrent l'importance de la composition du milieu pour les bactéries productrices d'hydrogène [201,202]. La définition de la concentration en ions Fe^{2+} et Ni^{2+} dans le milieu est très important car ils s'agissent des constituants essentiels du site actif des enzymes productrices de l'hydrogène.

4.1.6.1. Etude de l'effet du fer (macroélément)

La quantité nécessaire d'ions Fe^{2+} varie en fonction des microorganismes étudiés, des conditions expérimentales utilisées et des voies métaboliques désirée à être activée. La détermination de la concentration optimale en ions Fe^{2+} conduit à une meilleure activité des enzymes productrices de l'hydrogène.

Pour étudier l'effet des ions Fe^{2+} sur la performance du bioprocédé, cinq séries de tests ont été effectuées en duplicata, le fer a été ajouté à des concentrations différentes allant de (0- 1500 mg/l) dans les bioréacteurs contenant le milieu M9, tout en maintenant les conditions opératoires pH, température et concentration en substrat optimales.

L'effet activateur des ions Fe^{2+} sur la croissance bactérienne, la production de l'hydrogène, l'évolution du pH et l'efficacité de consommation du substrat a été étudié par le suivie de la fermentation jusqu'à la stabilisation totale de la production.

4.1.6.2. Etude de l'effet du Nickel (oligoélément)

Pour étudier l'effet du nickel (Ni^{2+}) sur l'efficacité de production de l'hydrogène, cinq séries de tests ont été effectuées en duplicata dans des bioréacteurs contenant le milieu M9, dans lesquels le Ni^{2+} a été ajouté à des concentrations différentes allant de 0.3 à 1.8 mg/l, tout en maintenant les conditions opératoires pH, température et concentration en substrat optimales.

L'effet activateur ou inhibiteur du métal à une concentration donnée a été quantifié, respectivement, par l'augmentation ou la baisse, du volume d'hydrogène produit, de son taux de production, de sa cinétique de croissance et de son efficacité à dégrader son substrat par rapport aux témoins.

4.1.7. Les méthodes analytiques

4.1.7.1. Mesure du taux de la croissance cellulaire

Des échantillons de 3 ml ont été soutirés des bioréacteurs, à des intervalles de temps déterminés durant la fermentation afin de suivre l'évolution de la cinétique bactérienne. Le dénombrement des germes incubés s'est effectué directement en milieu liquide par la mesure de

la turbidité à 600 nm [60]. Cette mesure a été réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre (Lamda 20, Perkin Elmer®, USA).

La croissance cellulaire a été déterminée par la mesure du poids sec des cellules en utilisant une corrélation entre la DO_{600nm} et le poids sec cellulaire. (C_m (g/L) = 0,31 DO_{600nm} de cellules lavées). Pour déterminer, cette corrélation, de faibles volume (10 ml) des cultures bactériennes, ayant des DO différents, ont été lavées deux fois avec 50 ml d'eau distillée [60] par centrifugation à 10.000 x g pendant 5 min [203] et à froid (4°C ou 0°C), puis on les filtre à l'aide d'un filtre de 0.2µm, on les sèche au étuve à 105°C, jusqu'à ce qu'on observe qu'il n'y a pas eu un changement de poids entre les mesures consécutives [204].

La courbe d'étalonnage obtenue est présentée sur la figure 4.1.6).

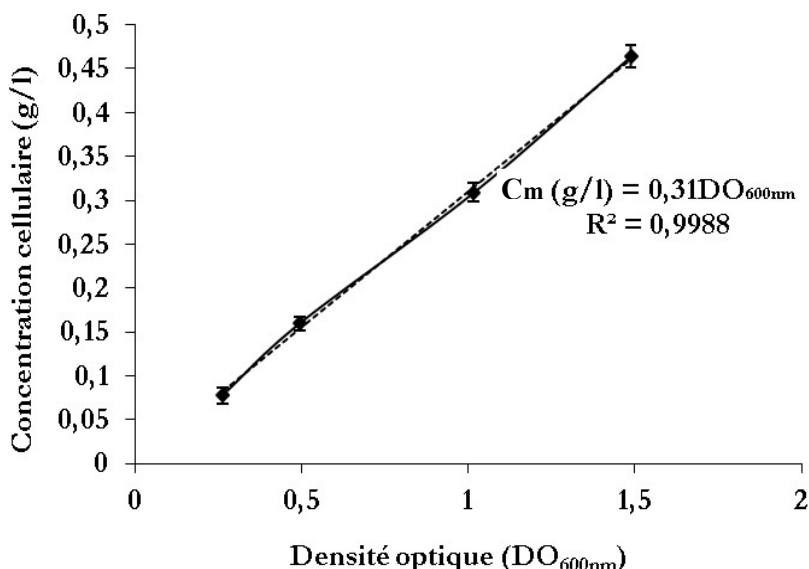


Fig. 4.1.6 Courbe d'étalonnage pour déterminer les concentrations en biomasse à partir de leurs densités optiques

4.1.7.2. Mesure du pH

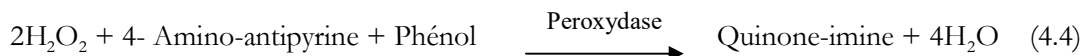
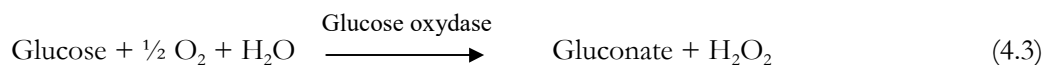
Cette mesure est réalisée périodiquement au cours de la culture à chaque prise d'essais et pour toutes les expérimentations. Elle est déterminée grâce à un pH-mètre (HANNA 209 pH- mètre).

Les mesures de la DO_{600nm} et du pH sont réalisées immédiatement avant la séparation des cellules par centrifugation. Les surnageants contenant le glucose résiduaire seront stockés à -20°C avant de les analyser.

4.1.7.3. Dosage du glucose

Le dosage du glucose est effectué grâce au Kit de dosage BioSystems® contenant l'enzyme « la glucose oxydase (GOD)/Peroxydase ». Les surnageants des échantillons préalablement conservés à une température de 2 - 8°C, après centrifugation à 10.000 x G pendant 5 min [203] et à froid (4°C ou 0°C), seront préalablement placés à une température ambiante et ensuite

soumis à un dosage enzymatique. Le glucose résiduaire présent dans les échantillons donne, selon les réactions couplées ci-dessous, un complexe coloré « la Quinone-imine » quantifiable par spectrophotométrie :



La réaction démarre en ajoutant 1000 µl du mélange glucose oxydase/péroxydase à 10 µl de l'échantillon. L'échantillon est incubé pendant 10 mn à température ambiante ou pendant 5 min d'incubation en utilisant un bain thermostaté à 37°C. Le produit final des réactions est dosé à l'aide d'un spectrophotomètre. On lit l'absorbance de l'échantillon en tenant compte du blanc (Réactif) à 500 nm [205]. La coloration est stable au moins deux heures.

La gamme d'étalon permettra de déterminer une corrélation entre la $\text{DO}_{500\text{nm}}$ et la concentration en glucose (poids du glucose/volume), (Fig. 4.1.7). Pour cela, une gamme de concentrations en glucose, comprise entre 0 et 5 g l⁻¹, placée à une température ambiante, sera pipetée à l'aide d'une micropipette dans des tubes à essais à un volume de 10 µl, et doser par la glucose oxydase/péroxydase à 500 nm. Chaque expérimentation est réalisée en double. La limite de linéarité est de 5g/l. Pour les échantillons ayant des concentrations en glucose élevées, on les dilue au 1/4 et on répète l'essai.

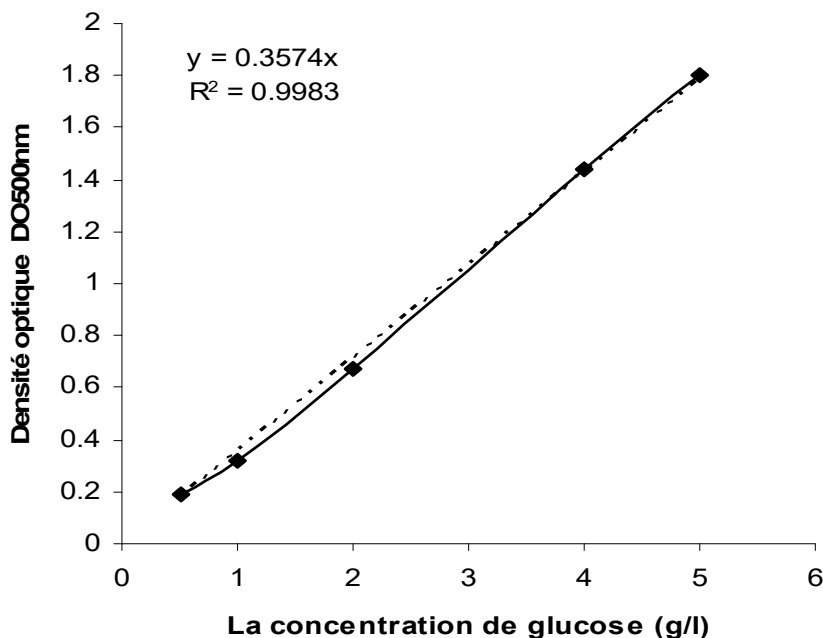


Fig. 4.1.7. Courbe d'étalonnage pour déterminer les concentrations du glucose à partir de leurs densités optiques

4.1.7.4. Mesure du volume d'hydrogène

1.7.4.1. Description du système

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

L'extrémité du tube est mise à barboter dans une solution concentrée en NaCl 20% [62].

1.7.4.2. Principe

Le volume déplacé dans le tube correspond au volume du biogaz produit. Le CO₂ présent dans le biogaz sera piégé par le passage du mélange gazeux à travers une solution concentrée à 20% de NaOH donc le volume de déplacement de NaOH correspond au volume d'hydrogène produit. La solution concentrée en NaCl à 20%, présente dans le barboteur, a pour rôle, de maintenir l'anaérobiose [60], d'empêcher l'apport de germes contaminants, de saturer le liquide et donc d'empêcher le passage d'autres gaz autres que le biogaz.

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

4.2. Production de l'hydrogène par voie Photofermentaire

4.2.1. Matériel biologique “ *Rhodobacter sphaeroides* CIP 60.6 (DSM158, ATCC 17023)”

Rhodobacter sphaeroides CIP 60.6 est une bactérie photosynthétique pourpre non sulfureuse, obtenue à partir du centre de ressources biologiques de l'institut Pasteur, Paris, France [206]. Elle peut croître à une température de $32 \pm 2^\circ\text{C}$, en présence de lumière, dans des conditions d'anoxie. Le pH initial de son milieu de croissance est de $6,8 \pm 0,2$ [76].

4.2.2. Méthodes de culture de *Rhodobacter sphaeroides* et conditions de croissance

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

4.2.2.1. Préparation des milieux de croissance

2.2.1.1. Le milieu Sistrom A

Le milieu de culture spécifique, utilisé pour la croissance de *Rhodobacter sphaeroides* est le milieu minimal succinate de Sistrom A, décrit par Sistrom en 1962 [207], dans des conditions adéquates de température et de pH. La préparation de ce milieu est donnée dans les Tableaux 4.2.1 à 4.2.4 :

Tableau 4.2.1: Préparation d'1 litre du milieu Sistrom A 10X [207]

<i>Le milieu Sistrom A (10X)</i>	<i>g/l</i>
K ₂ HPO ₄	34.80
Ou KH ₂ PO ₄	27.20
(NH ₄) ₂ SO ₄	05.00
Ou NH ₄ Cl	01.95
Acide succinique	40.00
Acide L-Glutamique	01.00
Acide L-Aspartique	00.40
NaCl	05.00
Acide Nitrilotriacétique	02.00
MgSO ₄ · 7H ₂ O	03.00
Ou MgCl ₂ · 6H ₂ O	02.44
CaCl ₂ · 2H ₂ O	00.334
FeSO ₄ · 7H ₂ O	00.02
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ (solution 1%)	0.2 ml
Solution des éléments en trace	1 ml
Solution de Vitamines	1 ml

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

Tableau 4.2.2: Solution des éléments en traces (100 ml)

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

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

Tableau 4.2.3: Solution de vitamines (100 ml)

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

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

Tableau 4.2.4: Préparation d'1L du milieu Sistrom A (1X)

<i>Le milieu Sistrom A (1X)</i>	<i>Milieu liquide (g/l)</i>	<i>Milieu solide (g/l)</i>
Le milieu Sistrom A (10X)	100 ml	100 ml
Extrait de levure	1	1
Agar Bactériologique	—	15 [208]

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

2.2.1.2. Le milieu asy : Ce milieu est préparé à base d'un litre du milieu basal, décrit par Mao et al 1986 [209], (Tableau 4.2.5) auquel on ajoute les composants chimiques donnés dans le Tableau 4.2.6.

Tableau 4.2.5: La composition chimique du milieu basal [185]

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

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

Tableau 4.2.6 : La composition chimique du milieu asy [59]

<i>Le milieu asy</i>	<i>Milieu liquide (g/l)</i>
Succinate de sodium $\text{C}_4\text{H}_5\text{NaO}_4$	9.8g
Sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.25g
Extrait de levures	1g

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

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

La mise en culture des bactéries lyophilisées nécessite un milieu d'activation contenant des composants chimiques énergétiques. La revivification de la souche bactérienne s'effectue selon les étapes suivantes. (Figure 4.2.1)

- Après avoir désinfecter la surface du verre à l'alcool, bien limer tout autour de l'étranglement de l'ampoule contenant la bactérie lyophilisée (Figure 4.2.1. (a))
- Provoquer un choc thermique en appliquant, sur le trait de lime, une pipette pasteur coupée court et chauffée au rouge.
- Ouvrir l'ampoule, dans des conditions d'asepsie usuelles, en appuyant légèrement sur la partie supérieure de l'ampoule (Figure 4.2.1. (b))
- Avec une pipette Pasteur contenant environ 0.2ml du milieu Sistrom A (1X), réhydrater le lyophilisat (Figure 4.2.1. (c))
- Ensemencer un milieu approprié, Sistrom A (Figure 4.2.1. (d)), suivants deux modes: ensemencement sur milieu liquide et sur milieu solide.

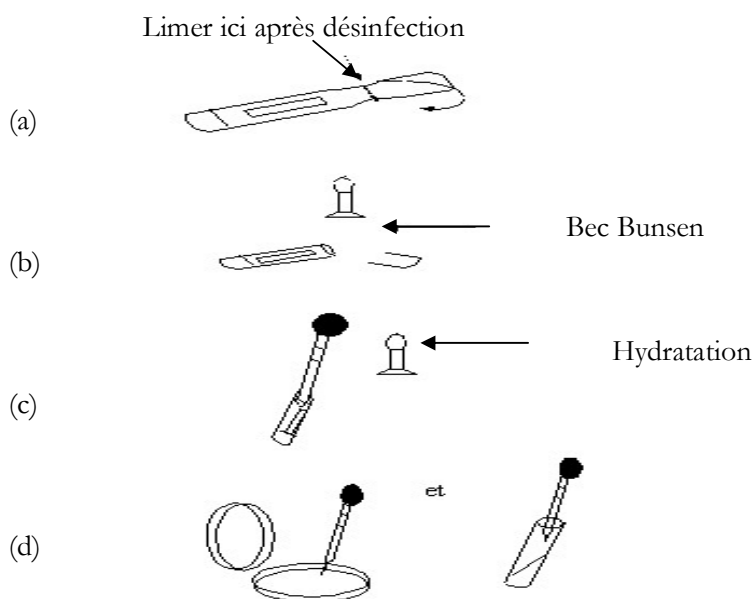


Fig. 4.2.1. Revivification de la bactérie lyophilisée *Rhodobacter sphaeroides* [206]

2.2.2.1. Sur milieu liquide

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

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

2.2.2.2. Sur milieu solide

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

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

Les conditions d'obscurité sont obtenues en couvrant les boîtes avec du papier aluminium.

Après incubation et au voisinage du bec bunsen, on effectue des repiquages par des ensemencements en stries, à partir des colonies obtenues, dans des conditions de température et de pH adéquates. Le repiquage nécessite des conditions de travail rigoureuses tel que la stérilisation du matériel et l'hygiène du manipulateur pour éviter toute contamination de la souche en question ainsi que de l'environnement. Une gélose inclinée est recommandée pour la mise en culture de départ.

4.2.2.3. Caractérisation de la souche

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

2.2.3.2. Test de mobilité : Observer à l'état frais, entre lame et lamelle ou mieux en gouttes la mobilité des cellules, au microscope photonique Gx400 [153].

2.2.3.3. Coloration Gram : Voir la partie 4.1.3.2.1.

2.2.3.4. Test biochimique : Catalase, oxydase, lactose.

4.2.3. Conservation des bactéries

La conservation des bactéries est une étape nécessaire qui suit la revivification. La périodicité des repiquages ou les repiquages successifs se font sur la pente d'une gélose inclinée en tube hermétiquement clos [153]. On prélève avec une pipette Pasteur stérile un petit volume des bactéries repiquées, qu'on ensemence sur la gélose des tubes inclinés contenant le milieu Sistrom A solide. L'incubation se fait en aérobiose à une température de 30°C, pH 6.8 pendant 24 - 72h dans des conditions d'aérobiose.

Une autre méthode consiste à ensemencer par piqûre centrale un culot de gélose [153]. La culture bactérienne sera ainsi conservée au réfrigérateur à 4°C [210]. La conservation peut être

faite également en mélangeant 0.95ml de la culture bactérienne avec 0.05ml de DMSO, suivie d'un stockage à -80°C [149].

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

4.2.4. La production d'hydrogène par *R. sphaeroides* CIP60.6

4.2.4.1. Préparation de la préculture de *Rhodobacter sphaeroides*

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

Après autoclave et au voisinage du bec bunsen, le milieu de préculture sera inoculé, à l'aide d'une seringue stérile par *Rhodobacter sphaeroides* à une densité égale à 1, et incubé à 30°C pendant 72h [62] sous une intensité lumineuse de 1500 Lux [157] et une agitation de 60 tours/minutes [211].

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

Le milieu de production d'hydrogène est le milieu glutamate Lactate, désigné par le nom "le milieu gL". Ce milieu contient une source de carbone (lactate de sodium), une source d'azote (glutamate de sodium), les facteurs de croissance et les oligo-éléments (Tableaux 4.2.2 et 4.2.3) nécessaires à cette production.

Le lactate et le glutamate sont les substrats les plus favorables pour la production d'hydrogène par *Rhodobacter sphaeroides* [185]. C'est la raison pour la quelle nous avons choisi le milieu glutamate Lactate pour la production d'hydrogène, avec un rapport C/N=50/10. Le choix de ce rapport C/N repose sur le fait que la production biologique d'hydrogène nécessite un milieu limité en source d'azote, avec un rapport C/N élevé [60]. Il est important de signaler que dans la littérature plusieurs milieux sont proposés. A titre d'exemple, pour le milieu gL le rapport C/N varie, il est de 32/10 pour Fang et al. [182] et de 50/10 pour Zhu et al. [59] et Nakada et al. [157].

Après une étude expérimentale comparative entre le milieu Sistrom A et le milieu basal, nous avons opté pour l'utilisation de ce dernier pour la production de l'hydrogène (voir le paragraphe 4.1.1). Le milieu de production d'hydrogène est le milieu glutamate Lactate (gL), il est préparé à base d'un litre du milieu basal, (Tableau 4.2.5), auquel on ajoute les composants chimiques donnés dans le Tableau 4.2.7.

Tableau 4.2.7: La composition chimique du milieu gL [59]

<i>Les composants chimiques</i>	<i>g/l</i>
Lactate de sodium ($\text{C}_3\text{H}_5\text{NaO}_3$)	5.603 g
Glutamate de sodium ($\text{C}_5\text{H}_8\text{NO}_4\text{Na}$)	1.691 g
Bicarbonate de sodium	1.5 g

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

4.2.4.3. Préparation et choix de l'inoculum

Pour la production de l'hydrogène, les cellules qui serviront pour inoculer les photobioréacteurs, seront réactivées dans un Erlen Meyer de 500 ml contenant 450 ml du milieu gL, barboté à l'argon pendant quelques minutes et stérilisé à l'autoclave à une température de 121°C pendant 20 minutes sous 1 bar.

Pour cela, la suspension bactérienne précultivée dans le milieu aSy, suivant la procédure décrite précédemment et dont la DO finale équivalente à 1,724, sera diluée dans le milieu de production gL [62] jusqu'à une DO initiale égale à 0,340 et incubée en anaérobiose à une température de 30°C sous une intensité lumineuse de 5000 Lux [146, 157, 211] et une agitation de 60 tours/minute [211].

Le choix de l'inoculum dépend de l'âge de la culture. L'optimisation de ce paramètre nous permet de déterminer le temps d'incubation nécessaire à la préactivation afin d'inoculer les photobioréacteurs par des cultures jeunes qui produisent de l'hydrogène efficacement [1, 34].

4.2.4.4. Production d'hydrogène en photobioréacteur parfaitement agité

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

Le bioréacteur schématisé dans la Figure 4.2.2, montre une conception générale d'un réacteur classique de 300 ml de volume. C'est une cuve cylindrique (11x6,5cm), scellée à sa partie supérieure par un septum permettant l'inoculation et la prise d'échantillonnage, il est muni d'un agitateur magnétique permettant le bon transfert des deux phases biotique et abiotique. La régulation de la température est faite par un thermorégulateur disposé au sein du bain-marie où baigne le réacteur.

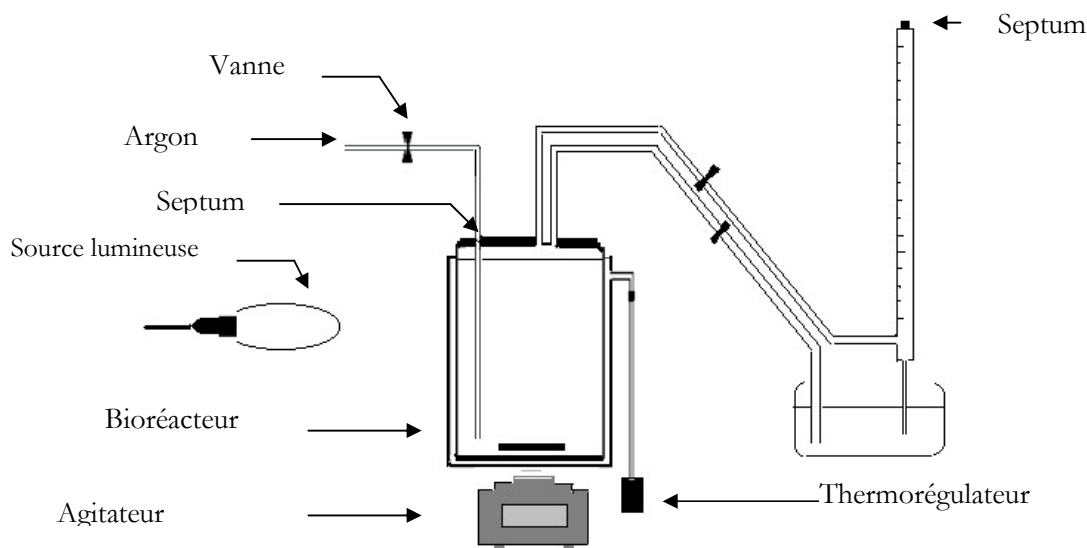


Fig. 4.2.2. Réacteur cylindrique parfaitement agité

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

a) Procédure expérimentale

Une culture bactérienne préactivée dans le milieu gL 1/6(v/v) sera introduite rapidement et stérilement dans le réacteur cylindrique parfaitement agité contenant le milieu gL, autoclavé et barboté à l'argon [23], jusqu'à avoir une DO initiale de 0.43.

b) Conditions de culture

La production d'hydrogène se fait à une température de 30°C, pH 6.8 sous une intensité lumineuse de 2500 Lux à la surface du réacteur. La source lumineuse utilisée est une lampe tungstène (200W, MAG) ; émettrice d'un spectre dont la grande partie est la gamme infrarouge. Ce choix repose sur le fait que la suspension bactérienne de *Rhodobacter sphaeroides* absorbe dans la gamme infrarouge à une longueur d'onde allant de 800-850nm [157, 160]. Dans la littérature, plusieurs types de lampes sont utilisées : fluorescente [60], halogène [63] et tungstène [76, 157].

V.2.4.5. Etude de l'effet des intensités lumineuses

Au cours de la photosynthèse, *Rhodobacter sphaeroides* CIP 60.6 utilise, pour sa croissance et pour le mécanisme de production d'hydrogène, la lumière comme source d'énergie [34].

A) Etude de la cinétique de croissance et de production du biohydrogène: La luminance de la culture bactérienne est un paramètre important à étudier, permettant d'étudier les cinétiques de la croissance cellulaire et la production du biohydrogène. Cette étude se fait en variant les intensités lumineuses, à la surface du réacteur et en face de la source lumineuse. Les intensités sont mesurées par un luxmètre numérique (Testo 545). La production de l'hydrogène se fait à une température de 30°C, sous les intensités suivantes 1000, 2500, 4500 et 8500 Lux.

B) Etude de l'accroissement du taux de production de l'hydrogène: Cette étude nous permet de mieux comprendre et d'identifier le (ou les) facteur(s) responsable(s) de l'activité enzymatique de la nitrogénase et de la réponse bactérienne de cette souche, durant les différentes conditions physico-chimiques. En outre, cette étude nous permet de déterminer les conditions optimales de la production du biohydrogène.

C) Modélisation non linéaire: Les données expérimentales de formation de l'hydrogène, à différentes intensités de la lumière, par *R. sphaeroides* CIP 60,6 ont été corrélées avec une équation modifiée de Gompertz. Ce modèle permet de prévoir la production. Son utilisation nous permet d'obtenir des constantes (H, P, Rm et λ), qui ont des significations biologiques, ce qui peut être d'une grande importance pour une meilleure compréhension de la production photofermentaire de l'hydrogène. Une étude comparative entre les données expérimentales et les valeurs prédites obtenues sera faite.

L'Équation modifiée de Gompertz a la forme suivante.

$$H = P \exp \left\{ - \exp \left[\frac{R_m \cdot e}{P} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (4.5)$$

Avec :

H , la production d'hydrogène cumulé (ml);

P , le potentiel maximum de formation de l'hydrogène (ml);

R_m , taux maximum de la formation de l'hydrogène (ml h⁻¹) et

λ , la durée du temps de retard (h).

D) Etude de la faisabilité de l'utilisation du modèle Luedeking-Piret" LP" (modélisation linéaire): Dans ce présent travail, nous avons étudié la faisabilité du «modèle Luedeking-Piret» pour décrire la relation entre le taux de croissance des bactéries productrices de l'hydrogène et le taux de production de l'hydrogène, un sous produit de fermentation gazeux. Ce modèle sera utilisé pour principal objectif de parvenir à comprendre les métabolismes liés aux interactions entre la population microbienne et les conditions opératoires, en lien avec un développement de procédé adapté permettant de lever certains freins métaboliques. Les résultats expérimentaux obtenus dans le présent travail ont été simulés au modèle de Luedeking-Piret" LP" pour déterminer le métabolisme de production de l'hydrogène photofermentaire par *R. sphaeroides* CIP 60,6:

$$v = \alpha\mu + \beta \quad (4.6)$$

Avec:

v , le taux spécifique de production (h⁻¹);

μ , le taux spécifique de croissance (h⁻¹);

α , coefficient associé à la croissance et

β , le coefficient non-associé à la croissance (h⁻¹), respectivement.

2.4.6. Etude de l'évolution et l'effet du pH sur la production de l'H₂

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

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

2.4.7. Etude de l'effet de la pression partielle de l'hydrogène

Nous avons étudié l'effet de la pression partielle de l'hydrogène (PH_2) sur le taux de production de l'hydrogène au cours de la photofermentation afin de voir mieux le comportement et l'activité productrice de cette souche. Les voies biologiques de production de biohydrogène sont très sensibles à la pression partielle de l'hydrogène (PH_2). Dans ce présent travail, les conditions de faible PH_2 ont été réalisées par l'agitation des cultures à une vitesse adéquate, afin de minimiser l'accumulation de l' H_2 dans le bouillon. Les conditions de haute PH_2 ont été établis par l'agitation des cultures à une très faible vitesse voir même l'arrêt de l'agitation, afin de saturer le système avec de l' H_2 et d'étudier l'effet du mélange hydrodynamique sur la production d'hydrogène.

4.2.5. Mesure du taux de la croissance cellulaire

La concentration cellulaire est déterminée par la mesure de la densité cellulaire à une longueur d'onde de 660nm par un spectrophotomètre (Spectrophotomètre UV mini 1240 SHIMADZU) [21], c'est une longueur d'onde où les pigments absorbent peu [157], Figure 4.6. (a).

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

4.2.6. Mesure du volume d'hydrogène

Le volume d'hydrogène est mesuré par la méthode décrite dans la partie 4.1.7.4.

4.3. Contrôle de stérilité des différents milieux

Après avoir préparé les milieux, il était nécessaire de s'assurer de la stérilité des différents milieux.

Quelques millilitres de chaque milieu solide et liquide préparé ont été déposés respectivement dans des boîtes de Pétri et des tubes à vises stériles, incubés à 37 °C pendant 24 heures. Les milieux sont considérés stériles, respectivement, en l'absence de colonies et en l'absence de trouble.

Résultats et discussions

Chapitre 5.

Caractérisation de la souche *E. coli* ATCC8739 et de la souche *R. sphaeroides* CIP 60.6

Sommaire

5. 1. Pré-enrichissement de la souche <i>E. coli</i> ATCC8739.....	101
5. 2. Critères d'identification de la souche <i>E. coli</i> ATCC8739.....	101
5.2.1. Caractères culturels.....	101
2.1.1. Croissance cellulaire en milieu liquide (Métabolisme respiratoire et fermentaire)	101
2.1.2. Cinétique de croissance en aérobiose et en anaérobiose	101
2.1.3. L'arrangement des bactéries en colonies sur milieu solide.....	103
5.2.2. Caractères morphologiques.....	104
2.2.1. Coloration Gram.....	104
2.2.2. Test de mobilité.....	104
2.2.3. Observation au microscope électronique à balayage.....	104
5.2.3. Caractères biochimiques.....	105
2.3.1. Test oxydase.....	105
2.3.2. Test catalase	105
2.3.3. Test lactose.....	106
2.3.4. La galerie API 20E.....	106
5.2. Caractérisation de la souche <i>Rhodobacter sphaeroides</i> CIP 60.6.....	108
5.2.1. Pré-enrichissement de la souche <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	108
5. 2.2. Critères d'identification de la <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	108
2.2.1. Caractères culturels.....	108
2.2.1.1. Croissance cellulaire en milieu liquide (Métabolisme respiratoire et photofermentaire)	108
2.2.1.2. Cinétique de croissance en aérobiose et en anaérobiose	109
2.2.1.3. L'arrangement des bactéries en colonies sur milieu solide.....	110
2.2.2. Caractères morphologiques.....	111
2.2.2.1. Coloration Gram.....	111
2.2.2.2. Test de mobilité.....	112
2.2.2.3. Observation au microscope électronique à balayage.....	112
2.2.2.3. Caractères biochimiques.....	112

5.1. Caractérisation de la souche *Escherichia coli* ATCC8739

5.1.1. Pré-enrichissement de la souche *E. coli* ATCC8739

La revivification de *E. coli* ATCC8739, nécessite un milieu de culture approprié liquide ou solide, le milieu doit apporter les éléments nutritifs ou nutriments élémentaires à la bactérie permettant ainsi sa réactivation.

Le milieu Luria Bertani LB est utilisé pour la revivification et la caractérisation de la souche.

En aérobiose et en mode chimio-organotrophe les bactériesensemencées sur milieu solide apparaissent au bout de 24 à 48h d'incubation sous forme d'amas de bactéries. La colonie bactérienne est visible à l'œil nu. Ces colonies bactériennes serviront pour un second repiquage.

Le repiquage est la ponction d'une petite partie d'une culture bactérienne pour inoculer sur un milieu neuf où elle continuera sa croissance. Cette deuxième étape est nécessaire, pour obtenir un nombre important de bactéries pour analyser et identifier une bactérie (une souche pure).

5.1.2. Critères d'identification de la souche *E. coli* ATCC8739

Chaque bactérie présente des critères d'identification caractéristiques qui varient selon l'espèce. Ce sont des facteurs principaux pour la taxonomie bactérienne.

Cette étude permet une identification et une classification de la souche à trois niveaux:

- **Famille :** par la coloration Gram (caractères morphologiques), l'étude de ses caractères culturels et la fermentation du glucose ;
- **Genre :** par la catalase, l'oxydase et la fermentation du lactose ;
- **Espèce :** par l'étude de ses caractères biochimiques.

C'est, donc, sur l'étude des caractères biochimiques que repose en pratique le diagnostic de genre et d'espèce qui ne doit être abordé qu'après que le diagnostic de famille ait été établi avec certitude [192]

5.1.2.1. Caractères cultureux

5.1.2.1.1. Croissance cellulaire en milieu liquide (Métabolisme respiratoire et fermentaire)

En milieu liquide LB et après 24 heures d'incubation à 37°C, la souche de *E. coli* pousse facilement dans les deux tubes en aérobose et en anaérobose (Bactéries à métabolisme respiratoire et fermentaire, ce qui fait d'elles des aérobies anaérobies facultatives).

Leurs exigences nutritionnelles sont, en général, réduites et se multiplient en milieu synthétique avec une source de carbone simple comme le glucose. Elles occasionnent durant leur croissance en aérobose et en anaérobose un trouble uniforme du bouillon.

5.1.2.1.2. Cinétique de croissance en aérobose et en anaérobose

D'après les résultats, *E. coli* est ainsi capable d'assurer sa croissance dans le milieu LB en présence et en absence d'oxygène.

En aérobose, *E. coli* peut de ce fait, par le biais de plusieurs chaînes respiratoires [100], produire de l'énergie grâce à la réduction de l'oxygène (Fig.5.1).

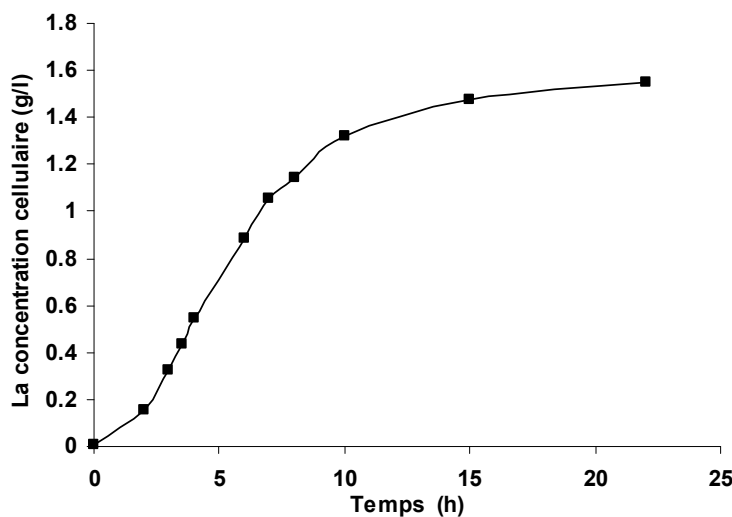


Fig.5.1. Courbe de croissance de *E. coli* ATCC8739 en aérobose
(Une température de 37°C, une concentration en substrat de 10 g/l, pH7)

En anaérobose, le cycle de Krebs ne peut pas fonctionner, *E. coli* peut produire de l'énergie par fermentation (Fig.5.2). Le taux de croissance maximal ($R_{x_{max}}$) et le taux de croissance total (R_x) obtenus en mode respiratoire ($R_{x_{max}} = 0.18$ g/l/h, $R_{xt} = 0.07$ g/l/h) sont plus grand que ceux obtenus en mode fermentaire ($R_{x_{max}} = 0.031$ g/l/h, $R_{xt} = 0.019$ g/l/h). Ce qui indique que les rendements énergétiques de fermentation sont faibles 2ATP par mole de glucose et, par conséquent, les cellules se développent plus lentement que quand elles respirent [107].

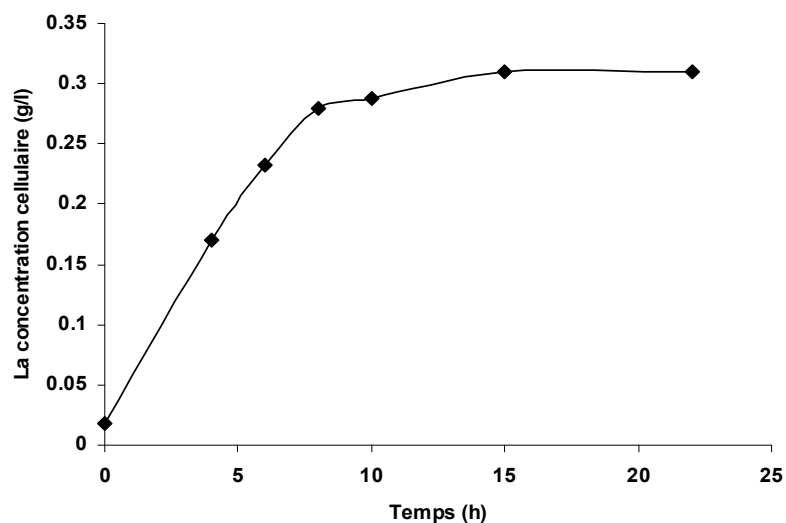


Fig.5.2. Courbe de croissance de *E. coli* ATCC8739 en anaérobiose
(Conditions opératoires : pH 7, T° 37°C)

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

Chaque famille bactérienne présente une morphologie habituellement typique. Les colonies de la souche *E. coli* ATCC8739 cultivées dans le milieu gélosé LB sont de forme circulaire, de taille irrégulière, de contour irrégulier, de couleur blanc-opaque, de surface brillante, l'élévation est bossue, sèche, la consistance est gluante. Ce type d'arrangement est caractéristique de la famille des Entérobactériaceae. La Fig.5.3, montre l'aspect des cultures en milieu solide.



Fig. 5.3. Aspect de la culture bactérienne de la souche *E. coli* sur milieu solide

5.1.2.2. Caractères morphologiques

5.1.2.2.1. Coloration Gram

La coloration de Gram met en évidence la forme et les propriétés tinctoriales de la bactérie. L'observation au microscope photonique, Fig.5.4, révèle que les bactéries d'*Escherichia* rassemblent des bacilles droits, à Gram négatif, et non sporulés.



Fig.5.4. Observation au microscope photonique Gx400 (Coloration Gram)

5.1.2.2.2. Test de mobilité

Les cellules d'*Escherichia coli* apparaissent mobiles à l'état frais, sous microscope photonique.

Les bactéries du genre *Escherichia coli* produisent des flagelles sur toute la surface cellulaire et possèdent donc une flagellation péritriche. Les flagelles des bactéries sont de longs appendices protéiques flexibles. Grâce à ces flagelles, les bactéries sont mobiles et peuvent se déplacer. Les bactéries *E. coli* ont deux modes distincts de circulation : des mouvements vers l'avant (natation) et également des mouvements de rotation ou mouvements de « roulis » [213].

5.1.2.3.3. Observation au microscope électronique à balayage

Au microscope électronique à balayage, les cellules d' *E. coli* présentent une morphologie de type bacilles de 2-3µm de long sur 0,6µm de large (Fig.5.5).

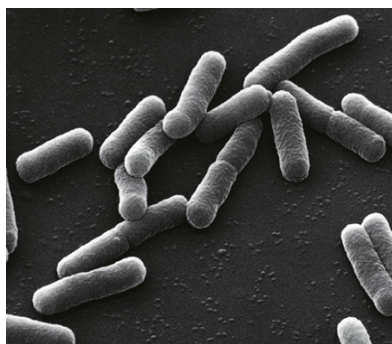


Fig.5. 5 . Observation au microscope électronique à balayage

Le tableau 5.1, résume les différentes caractéristiques de la souche étudiée.

Tableau 5.1. Caractérisation de la souche *E. coli* ATCC8739

Caractère morphologiques	
La coloration Gram	Gram négatif
Mobilité	Mobilité (+)
Forme	Tige droite (Bacille droit)
Sporulation	non sporulés
Environnement	
la salinité	non halophiles
La demande en Oxygène	Anaérobie Facultative
Habitat	Ubiquitaire et même associé à un Hôte
Température optimale	mésophile
Arrangement des colonies	blanc-opaque, sèches, contour irrégulier
Métabolisme	
	Chimio-organotrophe, métabolisme respiratoire, et métabolisme fermentaire

D'après les résultats obtenus la souche étudiée appartient à la famille des *Entérobactériaceae*.

5.1.2.3. Caractères biochimiques

L'étude des caractères biochimiques est indispensable pour l'identification précise des genres et des espèces bactériennes. Cette étude explore le métabolisme des glucides, des protéines, des lipides et le pouvoir réducteur, permettant ainsi la caractérisation des enzymes produites par cette bactérie.

5.1.2.3.1. Test oxydase

La réaction est négative, il n'y a pas eu d'apparition d'une coloration violette à l'endroit où on a déposé la colonie, ce qui explique que la bactérie est une oxydase négative.

Remarque :

A titre d'exemple, en fonction du délai d'apparition de la coloration, on a :

- *Entérobactéries* (test négatif)
- *Acinetobacter* (test négatif)
- *Pseudomonas aeruginosa* (test positif après 20 à 30 secondes)
- *Stenotrophomonas maltophilia* (positif tardivement).

5.1.2.3.2. Test catalase

La réaction est positives. Il y a eu production de bulles à l'endroit où on a déposé la colonie, ce qui explique que la bactérie est une catalase positive.

Remarque : Les entérobactéries sont toutes des catalases positives, à l'exception de *Shigella dysenteriae*.

5.1.2.3.1. Test lactose

Le milieu de MacConkey est sélectif des bactéries qui fermentent le lactose. Ce milieu contient des sels biliaires, du lactose et un indicateur de pH, le rouge neutre. Les colonies fermentant le lactose produisent des acides et colorent l'indicateur en rouge [213].

Après incubation des bactéries sur la Gélose de MacConkey à 37 °C pendant 18 h, les colonies se présentent sous forme de grosses colonies sèches, à contour irrégulier, et rouges (Fig.5.6). D'après ces résultats, les bactéries étudiées fermentent le lactose « lactose positive ».

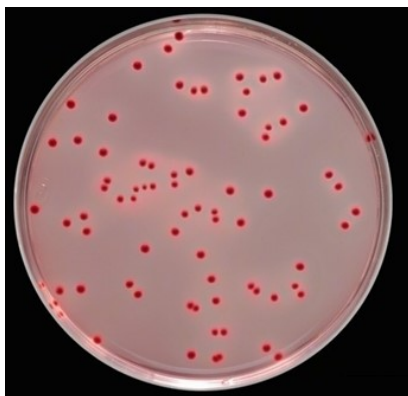


Fig.5.6. *Escherichia coli* sur milieu de MacConkey.

Remarque : Des limites dans la mesure ont été observées dans la littérature, où le Mac Conkey ne permet pas d'isoler certains bacilles à Gram négatif, du fait de leur exigence en facteurs de croissance. Parmi ces bactéries, nous avons : *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis*, *Campulobacter jejuni*, *Helicobacter pylori*.

5.1.2.3.4. La galerie API 20E

Après identification de la souche par les tests des caractères cultureux (arrangement des colonies et fermentation du glucose), de Gram, d'oxydase, de catalase et de la fermentation du lactose, il s'est révélé clairement que la souche étudiée est une bactérie de la famille des *Entérobactériaceae* et du genre *Escherichia*.

La galerie API 20E nous permet d'étudier d'autres caractères biochimiques, la Fig.5.7 et le Tableau 5.2., présentent les résultats obtenus. La lecture et l'identification sont basées sur la mesure de similitude entre leur profil et celui des espèces identifiables à l'aide de données recueillies dans des tables diagnostiques. Cependant, nous avons utilisé les résultats de la galerie API 20E comme références [196].



Fig.5.7. La galerie API 20E après incubation

Tableau 5.2. Les résultats de la galerie API 20E

Test	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
Lecture	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+

Les systèmes API utilisent le même principe que les techniques biochimiques conventionnelles d'identification des bactéries. Elles se présentent sous forme de cupules prêtes à l'emploi contenant le substrat lyophilisé nécessaire aux différents tests biochimiques. Les Versions miniaturisées ont l'avantage de standardiser les caractères biochimiques recherchés ceci permet d'améliorer la reproductibilité inter-laboratoire en éliminant le choix subjectif des tests « importants » pour la caractérisation, elles limitent la variabilité technique. Leur utilisation est simple, en conséquence, l'identification d'une bactérie consiste à obtenir une culture pure et de la comparer à l'aide de tests variés à un grand nombre d'autres espèces jusqu'à retrouver celle correspondante. Les résultats obtenus montrent que la souche étudiée est une *Escherichia coli* ATCC8739.

On rappelle que l'identification d'une bactérie consiste non seulement à obtenir une culture pure mais également à faire une différenciation entre les *E. coli* commensaux et pathogènes. Les bactéries pathogènes présentent une déficience respiratoire ou métabolique et certaines propriétés biochimiques ou enzymatiques peuvent être modifiées, tel que la perte de la catalase, la croissance difficile sur les milieux simples, la croissance difficile en aérobiose (les colonies sont petites et naines), une déficience en enzymes nécessaires au transport actif des antibiotiques (les bactéries deviennent résistantes aux antibiotiques).

Dans le cas des *E. coli* entérohémolytiques (EHEC), l'ensemencement des colonies sur un milieu au sorbitol donne des colonies incolores (sorbitol négatif) permettant une identification présomptive des EHEC. Il est important de connaître l'existence de ces mutants bactériens et de savoir les identifier. En conséquence, la souche étudiée dans cette présente étude, *Escherichia coli* ATCC8739, est une bactérie non pathogène. Elle pousse très bien sur milieu simple, en donnant

des colonies normales en anaérobiose et en aerobiose, elle est catalase positive, sorbitol positif et rhaminose positif [213].

5.2.Caractérisation de la souche *Rhodobacter sphaeroides* CIP 60.6

5.2.1. Pré-enrichissement de *Rhodobacter sphaeroides* CIP 60.6

Les bactéries, *Rhodobacter sphaeroides* CIP 60.6, ont été revivifiées ou pré-enrichies par leur immersion dans un milieu de culture approprié. Cette première étape permet la réactivation, la croissance et la multiplication des *Rhodobactéries*, elle permet également aux bactéries stressées de récupérer leur stabilité. Les bactéries réactivées sur un milieu solide et dans un milieu liquide donnent, respectivement, des colonies et des troubles bien visibles. Selon le mode métabolique utilisé, le temps de début d'apparition des colonies sur milieu solide ou du trouble dans un milieu liquide diffère (Fig 5.8.). Un deuxième repiquage est exigé avant toute utilisation, [206]. D'après les résultats obtenus, on constate que la durée d'apparition des colonies diminue considérablement après le deuxième repiquage, suite à une réduction de la phase de latence et une bonne adaptation des bactéries aux constituants du milieu de culture. Les résultats sont illustrés dans le Figure 5.8.

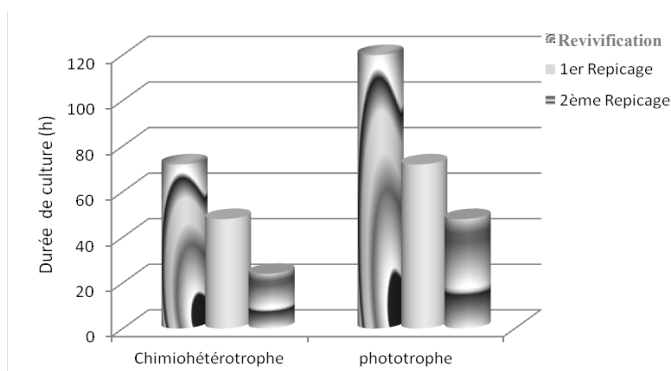


Fig 5.8: pré-enrichissement de *Rhodobacter sphaeroides*
(Conditions opératoires : pH 6.8, T° 30°C, 1500 lux)

5.2.2. Critères d'identification de la souche *R.sphaeroides* CIP 60.6.

5.2.2.1. Caractérisation culturaux

2.2.1.1. Croissance cellulaire en milieu liquide (Métabolisme respiratoire et photofermentaire)

Les cultures bactériennes de *Rhodobacter sphaeroides* cultivées en aerobiose et en anaerobiose, montrent l'apparition d'une coloration beige-marron clair, indiquant la croissance des souches de *Rhodobactère sphaeroides*. Au bout du troisième jour d'incubation, 72h, les milieux prennent la

couleur rouge spécifique aux pigments avec une couleur plus foncée en croissance photohétérotrophe, spécifique aux bactéries photosynthétiques pigmentaires (Figure 5.9).



Fig. 5.9. Aspect des milieux de croissance

Ces bactéries se cultivent facilement sur des milieux synthétiques simples contenant un certain nombre de substrats organiques tels que: le succinate, présent dans le milieu Sistrom A. Les bactéries poussent rapidement, en aérobiose et en obscurité (métabolisme chimiohétérotrophe) 24 heures d'incubation, et en anaérobiose et en présence de lumière (métabolisme photohétérotrophe), 48heures d'incubation (Fig.5.8).

Cependant d'après les résultats obtenus, nous avons pu vérifier que la souche étudiée présente différents modes de croissance selon la source d'énergie et la présence d'oxygène. Nous nous proposons d'étudier les cinétiques de la croissance bactérienne. Ces résultats confirment les données de la bibliographie concernant l'adaptation de *Rhodobacter sphaeroides* à plusieurs modes métaboliques [76, 62, 161, 214].

5.2.2.1.2. Cinétique de croissance en aérobiose et en anaérobiose

L'étude de la croissance d'une culture bactérienne constitue un chemin principal vers des connaissances de base sur la souche. Les courbes de croissance obtenues en présence et en l'absence de lumière ont une allure d'une courbe de croissance bactérienne classique avec ses différentes phases caractéristiques : la phase de latence, la phase d'accélération, la phase de croissance exponentielle, la phase de ralentissement et la phase stationnaire. Quelque soit le type de microorganisme, la croissance se déroule de façon identique et comporte les mêmes phases [152, 153].

Rhodobacter sphaeroides est une bactérie pourpre photosynthétique, possédant la capacité de croître en aérobiose en absence de lumière (Chimiotrophe) et en anaérobiose en présence de lumière (Phototrophe) [63]. En anaérobiose, la concentration maximale est atteinte au bout de 70h, correspondant à une DO de 1.88. En aérobiose et au bout de 71h, la concentration cellulaire a une DO de 2.84, elle atteint son maximum DO 3,6 au bout de 120h d'incubation. D'après les résultats présentés sur la Figure 5.10, on constate qu'en absence de lumière, croissance en mode Chimiotrophe, le taux de croissance est supérieur à celui d'une croissance en présence de lumière,

croissance en mode phototrophe. Ces résultats sont similaires à ceux de Calister et al,[215] et Lorrunguang et al [297].

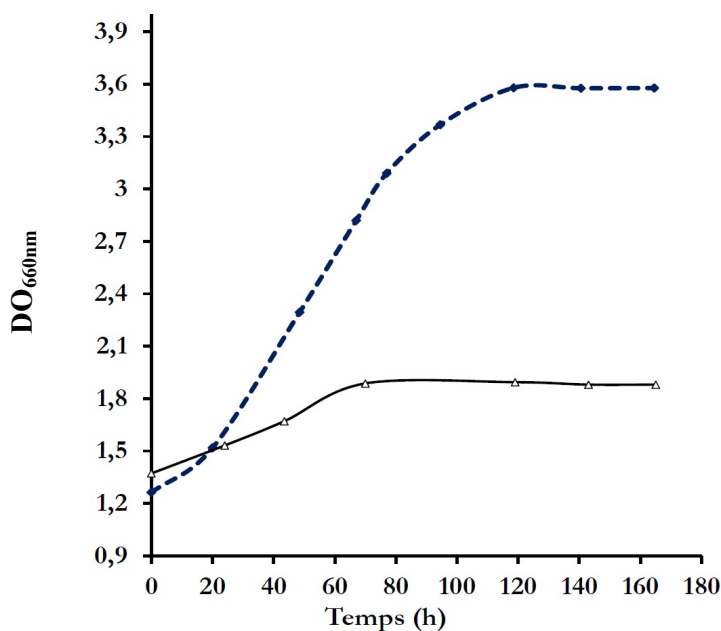


Fig. 5.10. La cinétique de croissance en aérobie (---) et en anaérobie (—)

5.2.2.1. 3. L'arrangement des bactéries en colonies sur milieu solide

Pour *Rhodobacter sphaeroides*, les colonies formées sur le milieu solide Sistrom A sont approximativement rondes, lisses, avec une odeur caractéristique. L'intensité de la coloration dépend de la présence (ou non) de l'oxygène et de la lumière. Leurs diamètres peuvent atteindre 1mm après 72h d'incubation. En effet, ces résultats sont en accord avec Chris Mackenzie [208].

L'arrangement des bactéries phototrophes présente des colonies ayant une couleur pourpre-brun (Figure 5.11.a) ; les chimiotrophes présentent une couleur beige-marron (Figure 5.11.b).

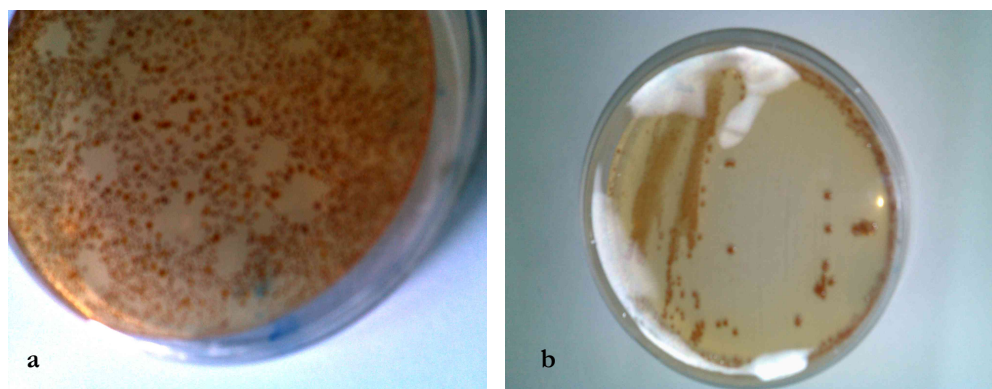


Fig. 5.11. (a) Croissance en anaérobie (b) Croissance en aérobie

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

L'anaérobiose induit une différenciation de la membrane cellulaire à travers un processus d'invagination, résultant dans la synthèse d'une membrane intra-cytoplasmique (ICM). L'ICM est structurellement en continue et fonctionnellement en discontinue avec la membrane cytoplasmique (CM), elle contient un complexe protéine-pigment et des composants redox nécessaires à la capture de l'énergie lumineuse et sa conversion en énergie cellulaire [156] (Figure 5.12) [158].

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

En aérobie, la synthèse des pigments est inhibée, les bactéries contiennent peu de pigments par unité de masse [214, 153].

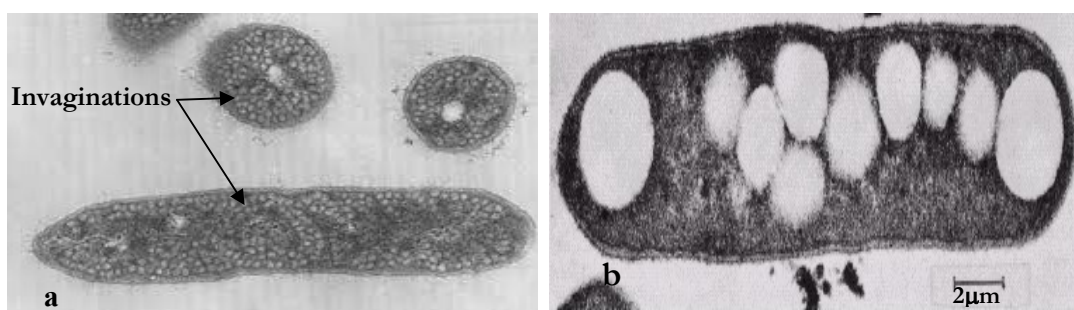


Fig. 5.12. Différenciation de la membrane cellulaire [158].
(a) en absence d'oxygène, b) en présence d'oxygène

5.2.2.2. Caractères morphologiques

5.2.2.2.1. Coloration Gram

Cette coloration des cellules bactériennes permet à la fois de connaître la morphologie des bactéries et de les classer en deux groupes Gram + ou Gram -, en fonction de leur capacité ou non de retenir la coloration violette. Cette division résulte principalement des différences dans la structure de la paroi cellulaire des deux groupes [189]. Après coloration et observation au microscope photonique, les bactéries sont colorées en rose "Gram négatif" et elles ont une forme ovoïde [153] (Figure 5.13).



Fig. 5.13. Observation au microscope photonique de *Rhodobacter sphaeroides* CIP 60.6 Après coloration Gram.

5.2.2.2.2. Test de mobilité

Les cellules de *Rhodobacter sphaeroides* apparaissent mobiles à l'état frais, sous microscope photonique. Elles présentent des mouvements photo-sensoriels dans leur réponse à une stimulation par la lumière [215], elles sont mobiles par leur flagelle unidirectionnel qui produit des rotations dans le sens des aiguilles d'une montre [148]. Calister et al [215] observent la présence de trois protéines chimiotactiques caractérisant les cultures photosynthétiques.

5.2.2.2.3. Observation au microscope électronique à balayage

L'observation au microscope électronique à balayage permet de fournir le détail sur la morphologie bactérienne, (Figure 5.14). *Rhodobacter sphaeroides*, vue sur MEB Gx15K, est une bactérie ovoïde ayant un diamètre allant de 0,5-0,7 μm et une longueur de 2-2,5 μm [76, 216], elle possède un flagelle qui lui permet de se mouvoir librement vers les emplacements les plus favorables à son développement.

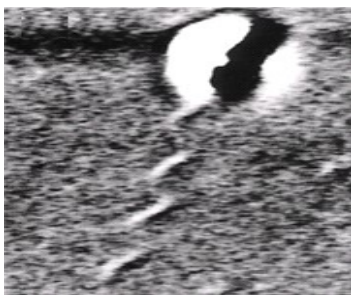


Fig. 5.14. Observation au microscope électronique à balayage de *Rhodobacter sphaeroides* CIP 60.6

5.2.2.3. Caractères biochimiques

Les résultats ont montrés que *Rhodobacter sphaeroides* est une catalase+ : Il y a eu production de bulles à l'endroit où on a déposé la colonie, oxydase+ : il y a eu apparition d'une coloration violette à l'endroit où on a déposé la colonie, lactose- : les bactéries étudiées ne fermentent pas le lactose.

Rhodobacter sphaeroides est capable de dégrader plusieurs acides gras tels le succinate et le lactate, des sucres à six carbone tels que le glucose et le fructose, des sucres à cinq carbone tels que l'arabinose et la xylose mais elle n'est pas capable d'utiliser des disaccharides tels que le lactose.

Chapitre 6.

Production de l'hydrogène par *E. coli* ATCC8739

Sommaire

6. 1. Introduction.....	114
6. 2. Optimisation classique de la production du biohydrogène par <i>E coli</i> ATCC8739	115
6. 2.1. Effet du pH initial.....	115
6.2.2. Effet de la température.....	117
6.2.3. Effet de la concentration initiale en substrat sur la production de l'hydrogène.....	118
6.3. L'optimisation du taux de production de l'hydrogène par <i>E coli</i> ATCC8739 en utilisant la méthodologie de surface de réponse « RSM »	120
6.3.1. Les buts d'utilisation du plan factoriel 3K Box-Behnken.....	120
6.3.2. Le plan d'expérience et le domaine d'étude.....	113
6.3.3. Les résultats expérimentaux de la conception de Box Behnken	121
6.3.3.1. Evaluation de l'incertitude (coefficients de détermination)	122
6.3.3.2. Analyse statistique (Test ANOVA)	124
6.3.3.3. Effet de la concentration du glucose, du pH et de la température sur RH ₂	126
6.3.3.4. Optimisation du taux de production de l'hydrogène.....	130
6.3.4. Conclusion.....	131
6.4. Etude comparative entre des deux modes d'optimisation.....	131
6.5. Etude comparative entre les différents taux de production de l'hydrogène des différentes souches de <i>E coli</i>	132

6. 1. Introduction

La fermentation anaérobie (dark fermentation) peut être réalisée par différentes bactéries chimiotrophes productrices d'hydrogène à partir de substrats fermentescibles. Les objectifs de ce travail, sur la production bactérienne de l'hydrogène seraient d'accroître les connaissances sur les consortiums de bactéries ainsi que les voies métaboliques impliquées. Jusqu'à présent, la plupart des recherches et développement sur ce procédé biotechnologique (production de biohydrogène) ont exploité des cultures mixtes (consortia non définis) de bactéries ou des cultures pures. Nous nous concentrerons principalement sur l'étude des potentialités de production dans les différentes conditions physico-chimiques, en mettant l'accent sur la souche *E. coli* ATCC8739.

En outre, la performance globale d'un bioprocédé tel que la production de l'hydrogène par voie fermentaire est exprimée par le taux élevé de production obtenus. Et comme la production de l'hydrogène par fermentation se fait par l'intermédiaire d'organismes vivants, il est normal qu'une panoplie de facteurs vienne influencer les taux de production de ce procédé évidemment et pourraient éventuellement les limiter. La nature même de l'organisme, l'espèce et la souche auront une très grande incidence sur les capacités de production de l'hydrogène.

Cependant, l'optimisation d'un bioprocédé repose sur une conception expérimentale qui peut être considérée comme un processus par lequel certains facteurs sont choisis et variés d'une manière contrôlée afin d'étudier leurs effets sur la réaction étudiée, à partir de l'analyse des résultats expérimentaux.

Toutefois, les principaux paramètres, les plus importants, sont probablement la concentration en substrat, la température et le pH. Tout d'abord, le pH est l'un des plus importants facteurs de la production de l'hydrogène en raison de ses effets sur les voies métaboliques, ainsi que, son éventuel effet sur la durée de la phase de retard [217-219]. La fourchette du pH initial choisie doit être comprise dans une gamme qui n'inhibe pas la croissance cellulaire et qui permet une expression à haut niveau des voies de fermentation. La température affecte également la croissance cellulaire, l'efficacité de consommation du substrat, et la voie métabolique des micro-organismes, il en résulte un changement majeur dans la composition du produit final de fermentation. En outre, la concentration initiale en substrat joue un rôle important sur le rendement et la vitesse de production de l'hydrogène. Selon le nombre de facteurs à étudier à un moment, la conception expérimentale peut être classée en deux catégories:

- Conception d'un facteur-à-un-temps (Conception d'un seul facteur, dite classique)
- Plan factoriel (conception multi-facteurs, dite plan d'expérience) [220].

Les plans d'expériences sont utilisés pour identifier les facteurs influant la production de l'hydrogène et pour déterminer les conditions opératoires optimales de fonctionnement. Le balayage rapide d'un nombre de facteurs supérieur à 6 s'effectue avec un plan d'expériences de Plackett–Burman pour déterminer uniquement les effets simples des facteurs. Les plans factoriels permettent le calcul des interactions et sont utilisés pour l'étude simultanée de moins de 3 facteurs. Il en est de même des plans d'expériences composites centrés et Box-Behnken qui fournissent des surfaces de réponses quadratiques et des valeurs de conditions opératoires optimales.

Le choix d'une conception expérimentale est d'une grande importance pour étudier un bioprocédé très complexe tel que la production de l'hydrogène par voie fermentaire, qui nécessite un protocole expérimental approprié permettant ainsi d'étudier les effets de divers facteurs sur le processus, afin de mieux le comprendre, de l'optimiser et d'améliorer sa performance [82].

Dans ce présent travail, deux conceptions expérimentales ont été utilisées pour étudier les effets du pH, de la température et de la concentration initiale en glucose sur la production fermentaire de l'hydrogène par la souche *E. coli ATCC8739*. Les conceptions expérimentales examinées comprennent une conception d'un facteur-à-un-temps et une conception factorielle fractionnaire Box-Behnken. Une étude comparative entre les deux conceptions est éventuellement effectuée.

6. 2. Optimisation classique de la production du biohydrogène par *E. coli ATCC8739*

6. 2.1. Effet du pH initial

Le pH est l'un des principaux facteurs qui influe sur la production de l'hydrogène par voie fermentaire. Son effet sur le taux de production de l'hydrogène a été étudié en faisant varier le pH initial du milieu M9 entre 5,5 et 7,5 tout en maintenant les autres conditions expérimentales constantes, la température à 35°C et la concentration en glucose à 15 g/l.

La Fig.6.1 montre la progression du taux de production de l'hydrogène à différents pH initiaux. On peut voir que la souche *E. coli ATCC 8739* est capable de produire de l'hydrogène sur une large gamme de pH initiale allant de 5,5 à 7,5.

Ces résultats montrent que le taux de production de l'hydrogène varie considérablement avec le pH.

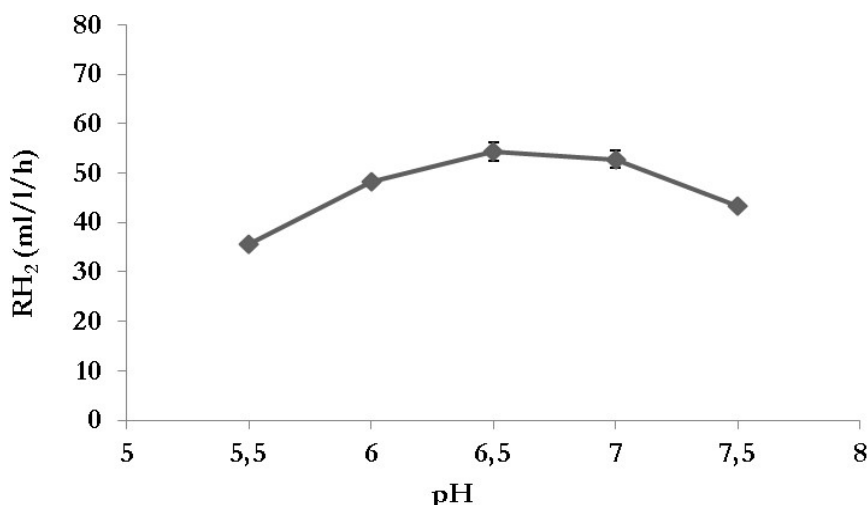


Fig. 6.1. Evolution du taux de production de l'hydrogène à différents pH initiaux
($T^\circ = 35^\circ\text{C}$, [glucose] = 15 g/l)

Le taux de production de l'hydrogène augmente avec l'augmentation du pH jusqu'à pH 6,5, puis il diminue en passant de pH 7 à 7,5. Les données expérimentales ont montré également que le taux maximal de production de l'hydrogène est obtenu à pH 6,5. Cependant, les faibles valeurs de vitesse de production de l'hydrogène ont été obtenus dans des conditions extrêmes à des valeurs de pH, supérieures à 7 et inférieures à 6, cela peut être due à l'effet de cette gamme de pH sur :

- (i) Le transport à travers la membrane cellulaire,
- (ii) L'activité de certains biocatalyseurs cellulaires,
- (iii) La redirection de leurs voies métaboliques qui sont en compétition pour le pyruvate.

En conséquence, le pH est capable de changer la composition des produits finaux de fermentation qui sont un mélange d'acides gras volatiles, d'alcools et de l'hydrogène [221, 222].

Bowles et al [221] et Chittibabu et al [222] ont rapporté qu'à de faibles valeurs de pH, la formation accrue de métabolites acides ou alcooliques, affecte la capacité de la cellule à maintenir son pH interne [221], il y aurait en conséquence une faible production de l'hydrogène et un abaissement du taux d'ATP intracellulaire, en inhibant l'absorption du glucose [222]. Ainsi, le gradient de pH à travers la membrane cytoplasmique détermine la vitesse de transport du glucose.

En outre, Rossmann et al [223], ont rapporté qu'à pH alcalin, les cellules excrètent le formate par un mécanisme symport donc la concentration de formate intracellulaire sera réduite et nous pouvons conclure que le complexe enzymatique FHL impliqué dans la conversion du formate en H_2 et CO_2 pourrait devenir moins actif, et donc le taux de conversion diminue.

Le pH optimal de 6,5 observé dans cette étude pour maximiser le taux de production de l'hydrogène est en bon accord avec les valeurs rapportées dans des études similaires en utilisant le

glucose et une culture pure de la souche *E. coli* DJT135 [224]. Alors que, Chittibabu et al. [222] ont rapporté que le pH 6,0 est le plus approprié pour la production de l'hydrogène par la souche *E. coli* BL-21.

Ce désaccord de la performance de bioprocédé par rapport au pH du milieu initial pour augmenter la vitesse de production de l'hydrogène dépend du mécanisme de production de l'hydrogène par fermentation, du type de micro-organismes et des conditions expérimentales utilisées [11].

6.2.2. Effet de la température

Afin de déterminer la température optimale pour élever le taux de production de l'hydrogène à partir de glucose par *E. coli* ATCC 8739, l'effet de la température allant de 25°C à 40°C sur la production fermentaire de l'hydrogène a été étudié. Les résultats sont présentés sur la figure.6. 2.

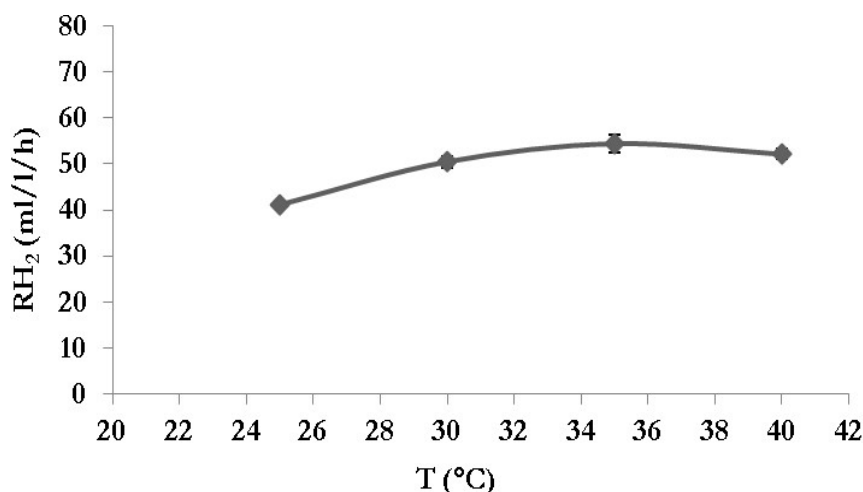


Fig. 6.2. Evolution du taux de production de l'hydrogène à différentes températures
(Un pH de 6,5 et [glucose]= 15 g/l)

Les résultats ont montré que le taux de production de l'hydrogène augmente avec l'augmentation de la température de 25°C à 35°C, cependant, il diminue quand la température augmente de 35°C à 40°C.

La raison possible du développement de l'efficacité des bioprocédés avec l'augmentation de la température de 25°C à 35°C est que la capacité des bactéries productrices de l'hydrogène à dégrader le substrat et à produire de l'hydrogène augmente avec l'augmentation de la température, ainsi, la température peut influencer l'activité des bactéries de façon significative en affectant l'activité des enzymes telles que la système formiate hydrogène lyase (FHL) de *E. coli*.

En outre, la littérature montre que des faibles taux de production de l'hydrogène ont été observés à des températures supérieures à 45°C [225] parce que certaines enzymes et des

protéines essentielles liées à la croissance cellulaire à la production de l'hydrogène, comme les hydrogénases, peuvent être inactivées [226, 227].

Le taux de production de l'hydrogène maximal a été obtenu à une température de 35°C, en utilisant la souche *E. coli* ATCC 8739. Cette observation a été également démontrée par l'étude de Ghosh et al. [224].

Enfin, en raison de la diversité des souches étudiées et la complexité des substrats possibles et des conditions de fonctionnement variables, aucune température optimale pour la fermentation hydrogène ne peut être recommandée [11].

6.2.3. Effet de la concentration initiale en substrat sur la production de l'hydrogène

Dans la fermentation anaérobie, le substrat, en général un hydrate de carbone tel que le glucose, d'une part fournit une source de carbone et d'énergie pour la croissance des bactéries et d'autre part conduit à des voies métaboliques impliquées dans la production de l'hydrogène par fermentation. Par conséquent, la concentration initiale en substrat est un paramètre essentiel à étudier pour améliorer la vitesse de production de l'hydrogène.

Pour étudier l'effet de la concentration en substrat initial sur le taux de production de l'hydrogène, les valeurs de la température et du pH approprié pour la production de l'hydrogène, par les cultures de la souche *E. coli* ATCC 8739, ont été prises en considération. Pour cela, les conditions opératoires ont été maintenues à un pH initial optimal du milieu pH 6,5 et à une température optimale de fermentation 35°C. Les concentrations de glucose varient dans un intervalle de 5 g/l à 30 g/l, et le glucose est utilisé comme substrat dans des milieux de cultures M9.

Le glucose est un monomère de cellulose, il représente le substrat le plus abondant dans le monde et une bonne source pour la production de l'hydrogène par de nombreux micro-organismes [140].

L'effet des différentes concentrations initiales du glucose sur le taux de production de l'hydrogène est représenté dans la figure.6.3. Les résultats suggèrent qu'à des faibles concentrations initiales en glucose, les taux de production de l'hydrogène sont faibles. En variant la concentration initiale en glucose de 5 g/l à 20 g/l, la vitesse de production de l'hydrogène augment considérablement.

La figure 6.3 montre une baisse du taux de production de l'hydrogène sans aucune inhibition, à une concentration en glucose de 25 g/l. L'inhibition par substrat à des concentrations élevées en glucose pourrait être liée à la modification des voies métaboliques [227,228]. Ginkel et al [229]

ont observé une évolution similaire entre la concentration en substrat et le taux de production de l'hydrogène.

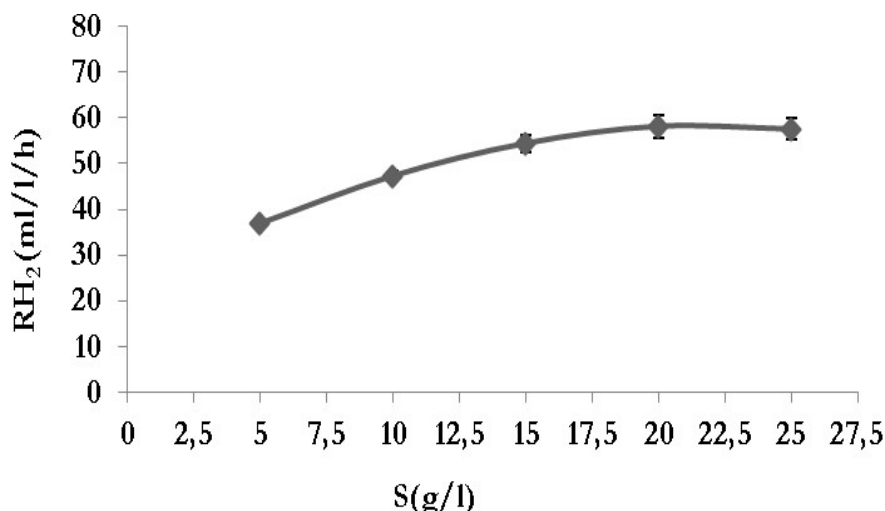


Fig. 6.3. Evolution du taux de production de l'hydrogène à différentes concentrations initiales en glucose (Température de 35°C, un pH de 6,5, milieu M9)

En effet, au cours de la large gamme de concentration de glucose testée, le taux de production de l'hydrogène le plus élevé est de l'ordre de $56,84 \pm 1,28 \text{ ml L}^{-1}\text{h}^{-1}$, en utilisant la souche *E. coli* ATCC 8739, obtenue à une concentration en glucose de 20 g/L. Cette valeur ne diffère pas significativement des taux maximaux des autres souches de la même espèce : $52,0 \text{ ml L}^{-1}\text{h}^{-1}$ avec HD701 à 30°C et un pH de 6,8 [60], qui sont plus élevés que l'activité du BW545, qui présente un taux de production de $16,33 \text{ ml L}^{-1}\text{h}^{-1}$ [135].

Ce travail montre que les différents paramètres étudiés à savoir le pH, la température et la concentration en substrat ont eu une influence significative sur le taux de production de l'hydrogène. Les valeurs du pH, de la température et de la concentration en substrat les plus appropriées pour augmenter la performance de la production de l'hydrogène par la souche *E. coli* ATCC 8739 seraient pH 6,5, 35°C et 20 g/L, respectivement.

Différentes souches d'*E. coli* ont été comparées pour leur capacité à produire de l'hydrogène dans des conditions anaérobies. Les données expérimentales ont révélé que la souche *E. coli* ATCC 8739 est une bactérie prometteuse pour la production de l'hydrogène.

6.3. L'optimisation du taux de production de l'hydrogène par *E. coli* ATCC8739 en utilisant la méthodologie de surface de réponse « RSM »

6.3.1. Les buts d'utilisation du plan factoriel 3K Box-Behken

L'optimisation des conditions de transformation est l'une des étapes les plus critiques dans le développement d'un bioprocédé efficace et économique. Les méthodologies statistiques impliquées utilisent des modèles mathématiques pour la conception des procédés de fermentation et de l'analyse des résultats du processus. La Méthodologie de Surface de Réponse (RSM), est à l'origine décrite par Box et Wilson (1951), c'est une collection des techniques mathématiques et statistiques qui sont utiles pour la conception des expériences, construire des modèles, et analyser les effets de plusieurs facteurs indépendants [235].

Pour la RSM, le plan factoriel 3K Box-Behken a été utilisé comme modèle expérimental de conception pour évaluer l'influence des trois variables indépendantes sur la production de biohydrogène, c'est la méthode la plus appropriée pour ces objectifs car :

- Elle est robuste,
- Elle utilise un minimum d'essais,
- Elle peut être appliquée lorsque les valeurs situées aux extrémités sont inintéressantes [236] et si la variance de la réponse prédite à n'importe quel point x ne dépend que de la distance de x à partir du point du centre de conception [237].
- Elle permet d'obtenir une équation multivariable basée sur la modélisation statistique, en utilisant les données expérimentales quantitatives, qui permet d'évaluer les effets individuels et les interactifs entre un ensemble de facteurs expérimentaux indépendants identifiés et les réponses observées [235].
- Elle estime la relation entre une réponse et ces facteurs clés au voisinage de l'optimum, permettant ainsi de rechercher les conditions optimales sur la base d'un modèle statistique polynomial du second ordre [238], en simulant les paramètres les plus importants qui influent sur la production du biohydrogène afin de maximiser le taux de production de l'hydrogène et de faciliter la caractérisation du bioprocédé.
- Elle permet également d'estimer l'efficacité du polynôme de second degré et obtient la combinaison des valeurs qui optimise la réponse dans la zone d'observation tridimensionnelle [239].

Par conséquent, l'objectif de cette étude serait d'évaluer les effets individuels et interactifs entre les paramètres physico-chimiques (X_1 : la concentration du glucose, X_2 : température et X_3 : pH) sur le taux de production du biohydrogène par *E. coli* ATCC 8739 statistiquement en utilisant une approche RSM « Box Behnken », pour optimiser les paramètres du procédé afin de maximiser le taux de production en hydrogène. Auparavant, seules quelques études ont examiné simultanément les effets de la concentration du substrat, de la température et du pH sur le rendement de production de l'hydrogène [240-244].

6.3.2. Le plan d'expérience et le domaine d'étude

Le plan d'expérience peut être représenté par deux matrices, la matrice d'expérimentation (unités normales) et la matrice d'expériences (unités codées). Il y a trois facteurs à étudier. Les niveaux bas (codés -1) et hauts (codés +1) de chaque facteur ont été définis à partir des expériences préliminaires (optimisation classique).

La figure 6.4 montre le profil cubique de la réponse bactérienne, exprimée en taux de production de l'hydrogène, aux limites du domaine d'étude des trois variables (la fourchette expérimentale). On constate que les fortes productivités sont du côté des fortes concentrations en glucose. Pour affiner la compréhension des résultats, il faut modéliser les phénomènes. On commence par calculer les effets des facteurs et leurs interactions.

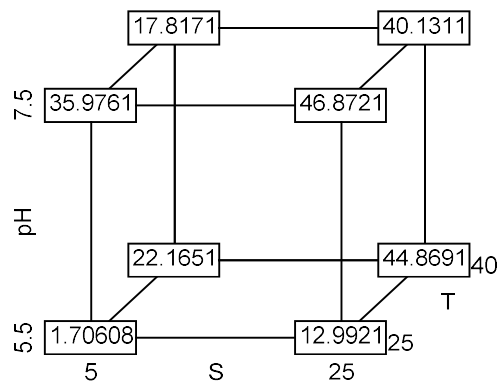


Fig. 6.4. Valeurs du taux de production de l'hydrogène aux sommets du domaine d'étude

6.3.3. Les résultats expérimentaux de la conception de Box Behnken

Un total de quinze essais expérimentaux, dont l'essai expérimental du centre du domaine d'étude a été répété trois fois pour estimer l'erreur expérimentale, a été décidé par la conception 3K Box-Behnken et effectué. Ces essais permettent d'évaluer les effets du pH, de la température et de la concentration en glucose sur le taux de production de l'hydrogène. Les essais expérimentaux et les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 6.1.

Tableau. 6.1. La conception expérimentale de Box Behnken pour l'optimisation du taux de production de l'hydrogène par *E. coli* ATCC 8739

Facteurs Essai	X1 : La concentration du Glucose		X2: pH		X3: Température		Taux de production de l'hydrogène (ml/l/h)	
	S (g/l)	Code	pH	Code	T (°C)	Code	Expérimental	Prédit
1	15	0	7.5	+	25	–	48.004	49.604
2*	15	0	6.5	0	32.5	0	52.386	51.5013
3	5	–	6.5	0	25	–	30.877	30.42
4*	15	0	6.5	0	32.5	0	48.85	51.5013
5	15	0	5.5	–	40	+	43.297	41.697
6	5	–	5.5	–	32.5	0	17.879	15.862
7	25	+	6.5	0	25	–	45.128	41.511
8	15	0	5.5	–	25	–	13.055	15.529
9	5	–	7.5	+	32.5	0	31.966	30.823
10	5	–	6.5	0	40	+	27.953	31.57
11*	15	0	6.5	0	32.5	0	53.268	51.5013
12	25	+	6.5	0	40	+	53.622	54.079
13	25	+	7.5	+	32.5	0	45.411	47.428
14	15	0	7.5	+	40	+	39.628	37.154
15	25	+	5.5	–	32.5	0	31.714	32.857

* Essais expérimental central

3.3.1. Evaluation de l'incertitude (coefficients de détermination)

L'évaluation de l'incertitude est attachée à deux sources d'erreurs, qui sont exprimées par les coefficients de détermination, R^2 dit coefficient de l'efficacité de corrélation et $R^2_{\text{ajusté}}$ dit coefficients de l'efficacité d'ajustement multiples. Cependant, les deux sources d'erreurs sur la détermination des coefficients des trois variables du modèle sont:

1. L'erreur commise sur chaque réponse, c'est l'erreur expérimentale. Quand on réalise plusieurs fois la même expérience dans les mêmes conditions opératoires et que l'on mesure les réponses, on trouve des valeurs qui sont proches les unes des autres mais qui sont différentes de l'une à l'autre. Il y a une dispersion des mesures. Cette dispersion traduit le fait que les réponses sont des grandeurs aléatoires. Il y a une erreur expérimentale attachée à chaque détermination d'une réponse. Cette erreur expérimentale se transmet aux coefficients « R^2 ». Une valeur proche de 1, indique un bon pouvoir prédictif.
2. La seconde est le modèle mathématique lui-même qui n'est qu'une représentation plus ou moins bonne du phénomène étudié, c'est le manque d'ajustement « $R^2_{\text{ajusté}}$ ». Il représente

la différence entre le modèle postulé par l'expérimentateur et le modèle réel. Une valeur proche de 1, indique une bonne modélisation.

Ce sont ces deux types d'erreurs, l'erreur expérimentale et l'erreur d'ajustement, qui serviront pour évaluer l'importance des coefficients. Dans ce présent travail, ces deux sources d'erreurs ont été évaluées.

- Le coefficient de l'efficacité de corrélation R^2 obtenu est très important de 97%, c'est à dire, que le modèle a été incapable d'expliquer seulement 3% des variations totales, ce qui indique un bon accord entre les valeurs expérimentales et les valeurs prédites des taux de production de l'hydrogène obtenus (Tableau 6.1, et Fig. 6.5). Cette statistique est le rapport de la somme des carrés des réponses calculées (corrigées de la moyenne) à la somme des carrés des réponses mesurées (corrigées de la moyenne) :

$$R^2 = \frac{\text{Somme des carrés des réponses calculées corrigées de la moyenne (Modèle)}}{\text{Somme des carrés des réponses mesurées corrigées de la moyenne (total C)}} \cdot 100 \quad (IV.1)$$

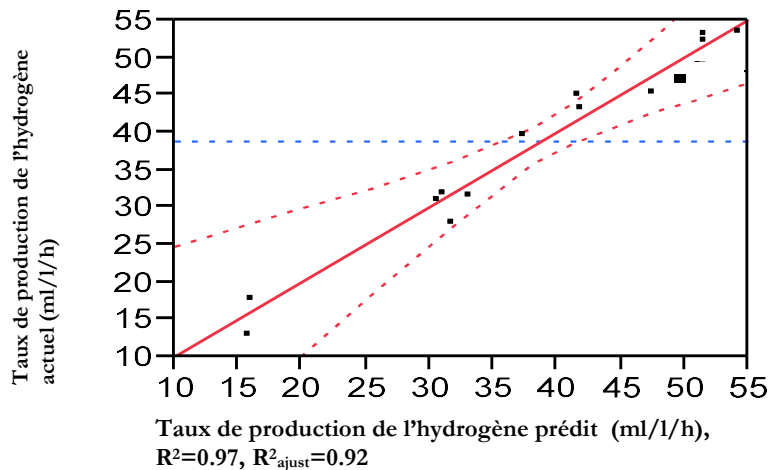


Fig. 6.5. Un plot des valeurs actuelles en fonction des valeurs prédites

Ce coefficient est attribué aux variables indépendantes, il mesure la quantité de variation autour de la moyenne expliquée par le modèle.

- Concernant, le coefficient de l'efficacité d'ajustement multiple obtenu (R^2 ajusté), qui mesure la qualité de l'ajustement du modèle pour les valeurs de RH_2 , il est important de 92%, ce qui indique l'adéquation et la fiabilité du modèle quadratique ajusté et la bonne prédiction de la réponse maximale recherchée. Cette statistique est calculée ainsi :

$$R^2_{Adj} = 1 - \frac{\text{Somme des carrés des erreurs} / (n - p - 1)}{\text{Somme des carrés des réponses mesurées corrigées de la moyenne} / (n - 1)} \cdot 100 \quad (IV.2)$$

Avec : n est le nombre d'observations et p est le nombre des coefficients estimés dans le modèle. C'est la meilleure statistique à utiliser lors de la comparaison des modèles avec différents nombres de coefficients.

3.3.2. Analyse statistique (Test ANOVA)

La matrice de calcul, des conditions expérimentales avec leurs valeurs RH_2 (ml/l/h) correspondantes, a été soumise à une régression analytique. Cependant, pour mener à bien cette étude, il faut connaître les bases statistiques qui sont utilisées pour faire les calculs et appliquer les raisonnements corrects. Le résumé de l'analyse de variance (ANOVA) sur les résultats de l'ajustement du modèle quadratique est présenté dans le Tableau 6.2.

Tableau 6.2: Test ANOVA pour le taux de production de l'hydrogène par *E. coli* ATCC 8739

Source de variation	Etude statistique				
	Somme des carrés	Degré de liberté	Carrés moyens	Valeur de F	Prob > F
Modèle	2216.1082	9	246.234	18.7601	0.0024**
S(5,25)	564.48000	1	564.48000	43.0065	0.0012**
pH(5.5,7.5)	436.06951	1	436.06951	33.2232	0.0022**
T(25,40)	94.09176	1	94.09176	7.1687	0.0440*
S*pH	0.03803	1	0.03803	0.0029	0.9592
S*T	32.59268	1	32.59268	2.4832	0.1759
pH*T	372.83748	1	372.83748	28.4057	0.0031**
S*S	186.73663	1	186.73663	14.2271	0.0130*
pH*pH	472.33876	1	472.33876	35.9865	0.0018**
T*T	56.92338	1	56.92338	4.3369	0.0918●
Manque d'ajust	54.693904	3	18.2313	3.3350	0.2392
Erreur pure	10.933315	2	5.4667		
Erreur Residuelle	65.6272	5	13.125		
Total Corrigé	2281.7354	14			

^a Coefficient de détermination $R^2=0.971$, ^b Coefficient de détermination maximal $R^2_{max}=0.9952$.

Le Test ANOVA est indispensable pour tester l'importance et la pertinence du modèle. Le tableau d'analyse de la variance comporte 6 colonnes (source de variation, somme des carrés, degrés de liberté, carré moyen, statistique de Fisher et la probabilité). La première colonne indique les sources de variation. On y trouve le modèle, les résidus et les réponses mesurées. La deuxième colonne donne les sommes des carrés des écarts à la moyenne. On remarque que la somme des carrés des réponses mesurées (corrigées de la moyenne) est égale à la somme des deux autres sommes de carrés. La troisième colonne indique les degrés de liberté (ddl) de chaque somme de carrés. On remarque également que la somme des ddl du modèle et des résidus est égale aux ddl des réponses mesurées. Les carrés moyens de la quatrième colonne sont les sommes des carrés divisées par les degrés de liberté (ddl).

On notera que la racine carrée du carré moyen des résidus sert à calculer l'étalon permettant de tester les coefficients. C'est donc une statistique très importante. La cinquième colonne indique le F de Fisher qui est le rapport du carré moyen du modèle à celui des résidus. Ce rapport permet de calculer la probabilité que ces deux carrés ne soient pas égaux.

En d'autres termes, si le F de Fisher est élevé (faible probabilité que le modèle soit celui de la moyenne), les variations des réponses mesurées sont bien dues aux variations des facteurs. Si le F de Fisher est proche de 1 (forte probabilité que le modèle soit celui de la moyenne), les variations des réponses mesurées sont comparables à celles des résidus. La valeur de " *P-value* " inférieure à 0,05 indique que les termes du modèle sont importants. Creighton et Goupy [245] et Kumar et al. [246] reportent que les valeurs de «Prob> F » inférieur à 0,05, indique que les coefficients de la régression sont considérés comme significatifs, alors que les valeurs supérieures à 0,1 sont considérées comme insignifiantes.

La valeur "F" du modèle obtenue est de 18.76, c'est une valeur élevée ce qui implique que le modèle est significatif. Il y a seulement une chance de 0,24% que la valeur "F" du modèle pourrait se produire en raison du bruit, en plus de la confiance élevée de 97%.

Le manque de mesures d'ajustement de la variation des données autour du modèle ajusté est déterminé par la 'valeur F ' du « Manque d'ajustement » qui compare la variance du manque d'ajustement avec la variance de l'erreur pure. Si le modèle ne correspond pas bien aux données, cette valeur sera importante, si les écarts sont près de la même valeur, le rapport sera proche de 1 et il est moins probable que le manque d'ajustement est significatif. La valeur F de l'absence d'ajustement calculée est de 3.335 implique que le manque d'ajustement n'est pas significatif par rapport à la pure erreur. Le modèle est bien ajusté aux données, avec une valeur p de 0.2392, il ya une chance de 23.92% que " la valeur F du Manque d'ajustement " pourrait survenir. Les données du test ANOVA sont :

- Un coefficient de détermination : $R^2=97\%$,
- Un coefficient de l'efficacité d'ajustement multiples R^2 ajusté =92%,
- Une Probabilité de la valeur de F inférieur à 0.05
- Une probabilité du manque d'ajustement supérieur à 0.05 ;

Ces résultats indiquent que le modèle quadratique prédit décrit très bien l'effet de la concentration du glucose, du pH et de la température sur le taux de production de l'hydrogène.

3.3.3. Effet de la concentration du glucose, du pH et de la température sur RH₂

L'influence des facteurs et de leurs interactions est évaluée par l'intermédiaire de la valeur de la probabilité (p_value). Les valeurs de p pour les termes linéaires, interactifs et quadratiques sont présentées par ordre croissant dans le Tableau .6.3.

Tableau. 6.3. Les valeurs de la probabilité « p »

Paramètres étudiées	Prob> t
S(5,25)	0.0012**
pHxpH	0.0017**
pH(5.5,7.5)	0.0022**
pHxT	0.0031**
SxS	0.0074**
T(25,40)	0.0440*
TxT	0.0918●
SxT	0.1759
SxpH	0.9592

* Significatif

Dans notre étude, les coefficients linéaires des trois variables X1 : S, X2 : pH, X3 : T, quadratiques pH*pH et S*S et interactifs pH*T, sont des termes importants du modèle avec un niveau de confiance de 95% (p inférieur à 0.05), le coefficient quadratique T*T est un terme important du modèle avec un niveau de confiance de 90% (p inférieur à 0.1). Ces résultats montrent que l'impact de ces variables sur le taux de production de l'hydrogène est significatif. L'interaction significative entre le pH et la température sur le taux de production de l'hydrogène indique que la souche *E. coli* ATCC 8739 favorise la production de l'hydrogène à différents pH initiaux du milieu de culture quant elle est mise en croissance fermentaire aux différentes températures adéquates au pH choisi. Par contre, les coefficients « p » pour les effets quadratiques T* T et interactifs S* T et S*pH étaient très élevés, ce qui explique que ces termes ont un faible impact sur le taux de production de l'hydrogène. Cependant, nous ne pouvions pas annuler leur effet sur la production du biohydrogène à partir du glucose en raison de l'effet des trois variables sur le taux de production de l'hydrogène. Ces résultats sont comparables aux résultats des recherches précédentes en utilisant des cultures anaérobiques [240] et *Enterobacter aerogenes* [247].

Le niveau optimal de chaque variable et l'effet de leurs interactions sur la production de l'hydrogène ont été étudiés en traçant des surfaces de réponse en trois dimensions (Fig.6.6) et des lignes des contours bidimensionnels (Fig. 6.7).

Les Figures. 6. (6a, 6b et 6c) illustrent les surfaces de la méthodologie de réponse en trois dimensions, en maintenant constante une grandeur à son point central, et en laissant les deux autres variables à l'intérieur de la gamme expérimentale, dans une relation empirique entre le taux de production de l'hydrogène et des variables influant sur le processus.

Il apparaît qu'à chaque point du domaine d'étude correspond une réponse. À l'ensemble de tous les points du domaine d'étude correspond un ensemble de réponses qui se localise sur une surface appelée surface de réponse. Dans la limite de la conception, chaque tracé de la surface de réponse à un pic clair et le tracé de contours correspondant aurait un maximum clair, ce qui signifie que le rendement maximal de l'hydrogène peut être réalisé à l'intérieur des limites de conception.

La surface de réponse de RH_2 (Fig. 6.6.) a montré un point optimum clair qui est tombé à l'intérieur de la fourchette des limites du domaine d'étude. Le taux de production de l'hydrogène augmente avec l'élévation de la température, du pH initial et de la concentration du glucose jusqu'à leurs valeurs optimales, puis il diminue avec l'augmentation de ces paramètres au delà de leurs niveaux optimaux.

Des résultats similaires ont déjà été obtenus dans des études d'optimisation avec des cultures mixtes [241-243]. Cependant la température de fermentation, le pH et la concentration du glucose affectent l'activité de l'hydrogénase. La température affecte la croissance cellulaire, le taux d'utilisation maximale spécifique du substrat et la voie métabolique des micro-organismes, il en résulte ainsi un déplacement des compositions des sous-produits [82,219, 229]. Les températures élevées sont favorables pour le fonctionnement des différentes enzymes [248]. L'effet du pH à l'échelle enzymatique, est dû à la variation de l'état d'ionisation des composants dans des réactions enzymatiques [227]. L'activité du système enzymatique, formate hydrogène lyase à des pH allant d'un pH neutre à un pH basique est plus faible que celle obtenue à un pH acide [128]. A l'échelle biologique ou cellulaire, le pH optimal initial est probablement la somme résultante d'un certain nombre de facteurs. Comme est indiqué dans la Figure.6.6, le taux de production de l'hydrogène est autant plus élevé à des $pH > 6$ qu'à des valeurs de pH acides. Lee et al. [249] rapportent que le pH doit être dans une plage qui à la fois n'inhibe pas la croissance cellulaire donc l'améliore et permet l'expression à haut niveau des voies de fermentation requises. Nous en déduisons qu'une valeur du pH initiale plus élevée contribuerait à retarder l'inhibition par l'acide. La concentration initiale en glucose joue également un rôle important sur le taux de production de l'hydrogène. Une faible concentration initiale en glucose résulte en un faible taux de production de l'hydrogène par fermentation, ce taux augmente avec l'augmentation de la concentration du substrat.

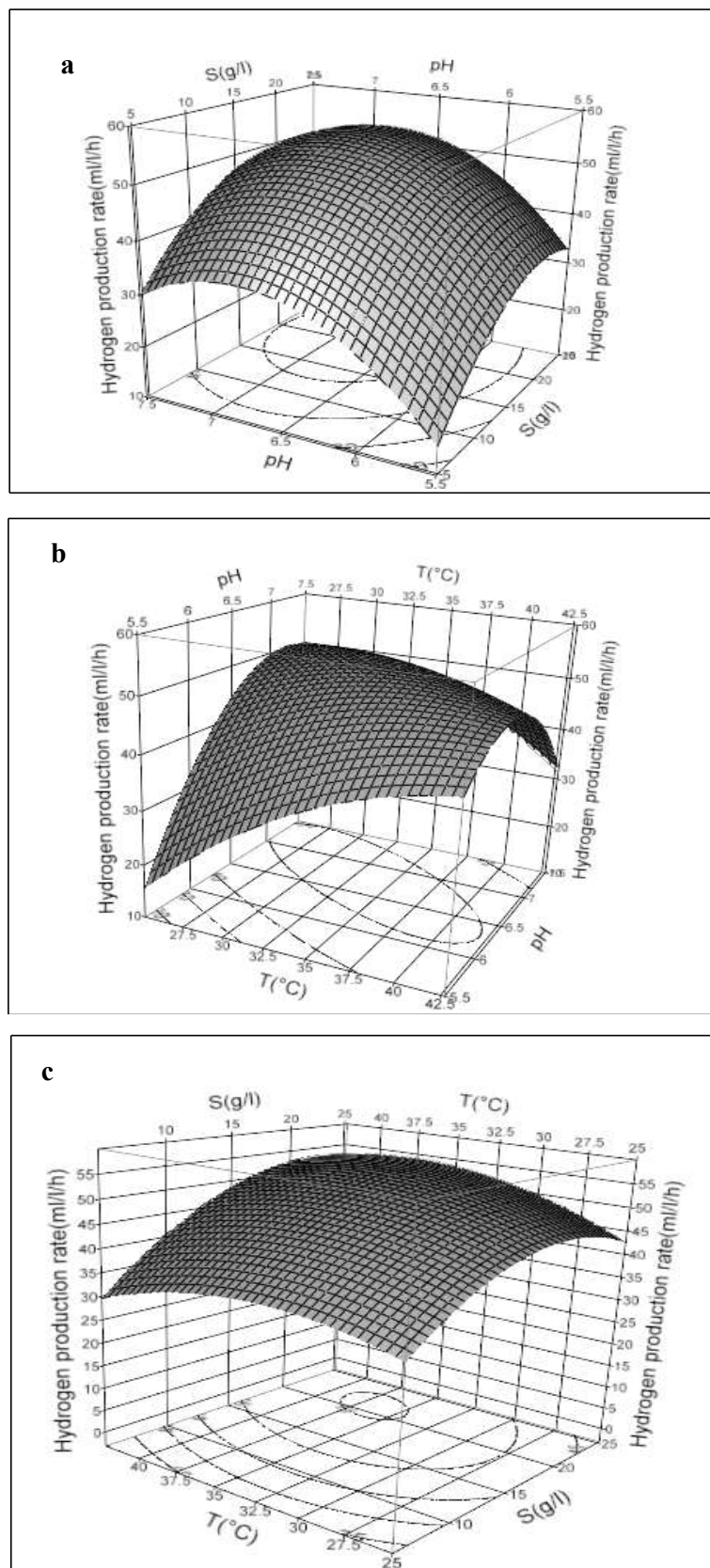


Fig. 6.6. Les surfaces de la méthodologie de réponse en trois dimensions pour RH_2

Les Figures.6. (7a, 7b, 7c) montrent respectivement le profil des contours correspondants en deux dimensions en maintenant un paramètre constant à son niveau optimal et en variant les deux autres variables à l'intérieur de la limite de la fourchette expérimentale.

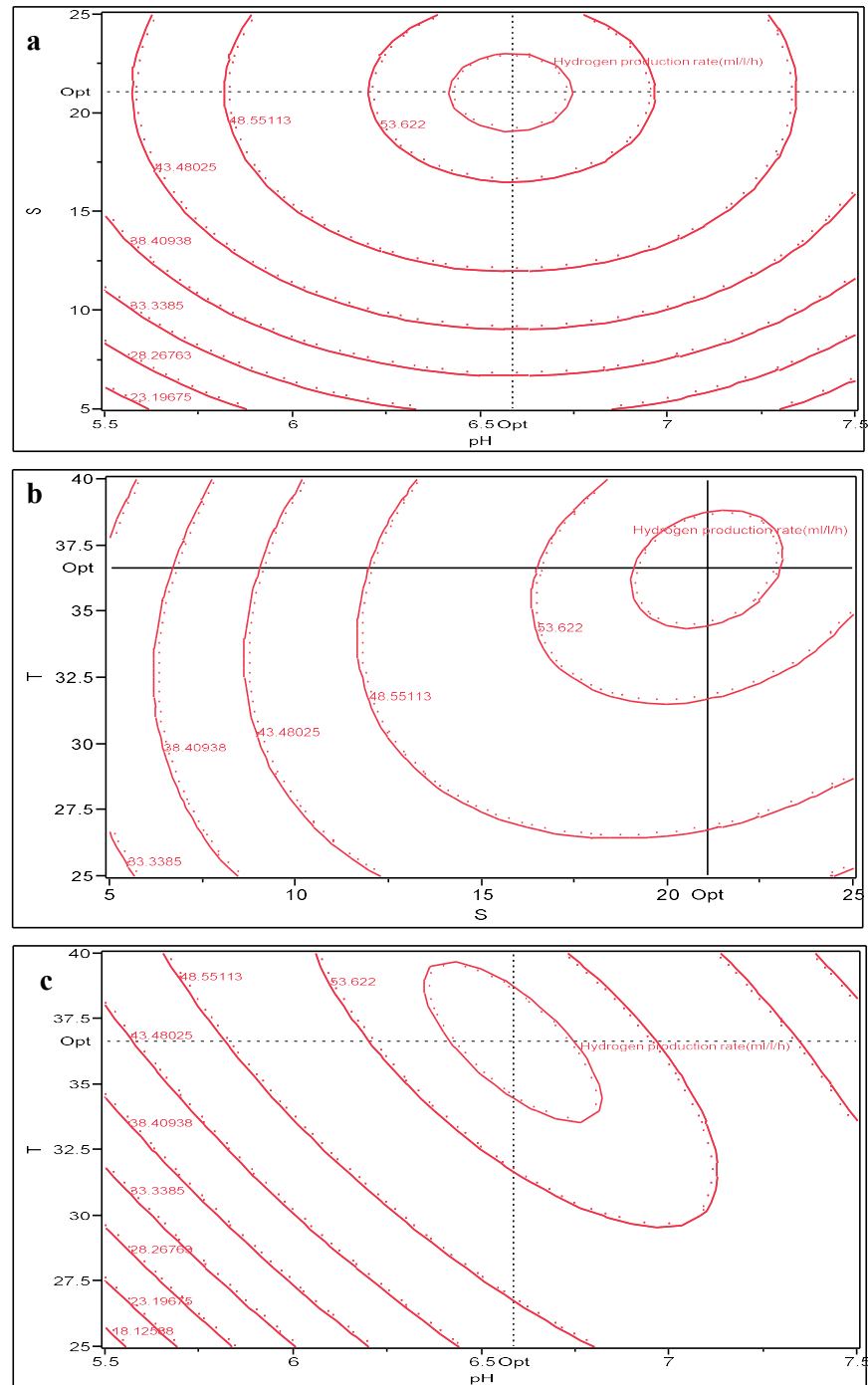


Fig. 6.7. Courbes d'isoréponses dans les plans, pH-substrat pour une température optimale (a), température-substrat pour un pH optimal (b) et température-pH pour une concentration optimale (c).

Le tracé des contours permet d'étudier les courbes des iso-réponses (courbes de niveaux) d'une surface de réponse. Le tracé des contours de Y par rapport à la concentration du glucose et au pH (Fig. 6.7.a) présente une forme circulaire, ce qui suggère que la concentration du glucose et le pH sont que très légèrement interdépendants, et que leurs effets interactifs ne sont pas significatifs.

De même le tracé des contours de Y par rapport à la concentration du glucose et de la température (Fig. 6.7.b) présente une forme ronde, ce qui suggère que la concentration du glucose et la température sont que légèrement interdépendants, et que leurs effets interactifs ne sont pas significatifs. Par contre de tracé des contours de Y par rapport au pH et à la température (Fig. 6.7.c) sont elliptiques, il présente un allongement en diagonale dans les deux sens, ce qui suggère que le pH et la température sont très interdépendants, et que leurs effets interactifs sont significatifs. Cela est confirmé par le résultat de variance, avec la valeur de « p » inférieure à 0,05.

3.3.4. Optimisation du taux de production de l'hydrogène

Le modèle mathématique, analogue à l'équation. (6.3), montrant le taux de production de l'hydrogène (Y) en fonction des variables indépendantes X1 (glucose), X2 (pH) et X3 (température), est donné par l'équation de régression quadratique suivante :

$$Y = 51.50133 + 8.4 S + 7.383 \text{ pH} + 3.4295 T - 0.0975 S \text{ pH} + 2.8545 S T - 9.6545 \text{ pH} T - 8.179 S^2 - 11.5789 \text{ pH}^2 - 3.926 T^2 \quad (6.3)$$

L'équation polynomiale quadratique a été équipée pour corrélérer les relations entre les variables et la réponse (Y). Cependant, pour prédire l'état optimal, les valeurs d'entrées X1, X2 et X3 correspondantes à la valeur maximale de Y ont été résolues en définissant les dérivées partielles de la fonction à zéro. Le taux de production de l'hydrogène maximal estimé à partir de l'équation est de 55.32 ± 4.998 ml/l/h, obtenu à une concentration de glucose de 21.09 g/l, à un pH de 6.58 et à une température de 36.62°C. La figure. 6.8 représente le profil d'optimisation du taux de production de l'hydrogène.

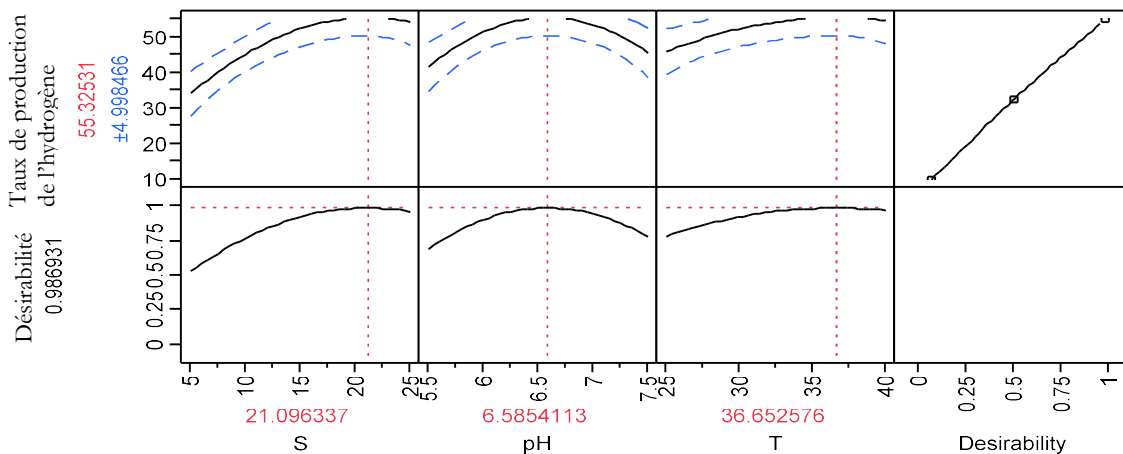


Fig. 6.8. Profil d'optimisation du taux de production de l'hydrogène

Nous avons vérifié la validité du modèle prédit, en exécutant statiquement des conditions opératoires de (S :20, T :35 et pH : 6.5) appartenant au domaine d'étude en deux répétitions (optimisation classique), nous avons obtenu un taux de production de 56.84 ± 1.28 ml/l/h presque similaire au taux prédit de 54.839 ± 4.984 ml/l/h, ([55.56 à 58.12 ml/l/h] \subset [49.855 - 59.823 ml/l/h]), avec une erreurs absolue ($< 5\%$), ce qui indique un excellent accord entre la valeur expérimentale et la valeur prédite par le modèle validé (Fig. 6.9).

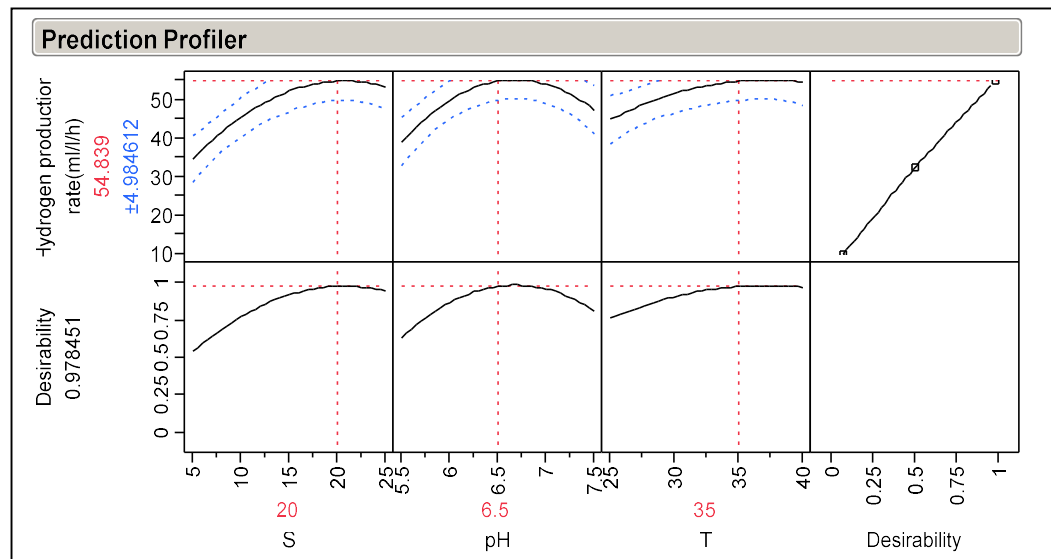


Fig. 6.9. Profile du taux de production de l'hydrogène par le modèle validé

Cette étude a confirmé que cette approche (la RSM) est très appropriée pour l'optimisation de la production de l'hydrogène à partir du glucose par *E. coli* ATCC8739.

6.3.4. Conclusion

L'utilisation de la conception de Box Behnken nous a permis non seulement de prédire les conditions optimales, mais également d'utiliser le modèle mathématique pour prédire les productivités et les paramètres à utiliser si pour une raison quelconque l'application expérimentale de l'un des paramètres de fonctionnement présente une contrainte, et donc sa valeur sera sous-optimale.

6.4. Etude comparative des deux modes d'optimisation

Le changement d'un facteur à un temps est un mode d'optimisation qui repose sur des processus qui, d'une part, prennent du temps et sont incapables d'atteindre le vrai optimum puisque les interactions possibles entre les variables de processus sont ignorées, surtout lorsque les interactions entre les différents facteurs sont significatives. D'autre part, il comporte un assez grand nombre d'expériences, ce qui rend les expériences laborieuses et de longue haleine pour

pouvoir les mener à bien, en particulier lorsque le nombre de facteurs est grand [250]. Par exemple, dans notre cas, nous avons étudié, respectivement, les effets du pH initial du milieu, de la température et de la concentration du substrat sur le taux de production de l'hydrogène en utilisant une conception d'un facteur-à-la-fois, avec plus de 30 séries d'expériences menées.

Pour la méthodologie de surface de réponse, un modèle polynômiale de deuxième ordre basé sur la modélisation statistique des données expérimentales est proposé pour décrire et évaluer les interactions entre un ensemble des facteurs indépendants expérimentaux et les réponses observées résultantes d'une conception Box-Behnken, et ainsi de réduire le nombre d'expériences nécessaires à la détermination des conditions optimales.

6.5. Etude comparative des différents taux de production de l'hydrogène entre différentes souches d'*E. coli*

Le tableau .6.4 résume les taux maximaux de production de l'hydrogène obtenus à partir de notre travail et de plusieurs autres études. Nos résultats montrent des quantités d'hydrogène produit légèrement plus élevé que celles obtenues dans d'autres études. Ce qui indique que les bactéries *E. coli* ATCC 8739 avaient une plus grande capacité de production de l'hydrogène par fermentation.

Tableau. 6.4. Taux maximaux de production de l'hydrogène par les différentes souches d' *E. coli*

Souche	Culture et Substrat	RH ₂	Références
<i>E. coli</i> HD 701	Batch / Glucose	52 ml/l/h	[60]
<i>E. coli</i> W3110 (K-12)	Batch / Glucose et formate	0.3 ± 0.1 mmol/h/g cellules sèches	[230]
<i>E. coli</i> K-12	Batch / Glucose et formate	45.8 ± 4.1 mmol/h/g cellules sèches	[231]
<i>E. coli</i> (XL1-BLUE)	Batch / formate	17.75 ml/l/h	[232]
<i>E. coli</i> BL21	Batch / Glucose	12.5 ml/l/h	[233]
<i>E. coli</i> S3	Batch / Glucose	16.07±0.53 ml/l/h	[234]
<i>E. coli</i> ATCC 8739	Batch / Glucose	56.84 ± 1.28 ml/l/h 55.32±4.998 ml/l/h	Nos résultats

Chapitre 7.

Effet du Fe^{2+} sur la croissance et l'efficacité de la bioproduction de l'hydrogène par *E. coli* ATCC 8739

Sommaire

7. 1. Introduction.....	134
7.2. Effet de Fe^{2+} sur l'efficacité de production de l'hydrogène	135
2. 1. Effet de Fe^{2+} sur l'évolution de la production de l'hydrogène.....	135
2.2. Effet de Fe^{2+} sur le taux et le rendement de la production de l'hydrogène.....	137
2.2.1. Effet de Fe^{2+} sur le taux de production de l'hydrogène.....	137
2.2.2. Effet de Fe^{2+} sur le rendement de production de l'hydrogène.....	139
2.2.3. Les proportionnalités d'augmentation de la cinétique de production de l'hydrogène en présence du fer.....	140
2.2.4. Effet du Fe sur l'efficacité de production de l'hydrogène par <i>E coli</i> ATCC 8739.....	142
7.3. Effet de Fe^{2+} sur la croissance cellulaire	142
3.1. Effet de Fe^{2+} sur l'évolution de la croissance cellulaire.....	142
3.2. Effet de Fe^{2+} sur le taux et le rendement de la croissance bactérienne	143
3.3. Etude de la relation entre les cinétiques de croissance et de production de l'hydrogène.....	145
7.4. Effet de Fe^{2+} sur l'efficacité de consommation de substrat.....	146
7.5. Effet de Fe^{2+} sur le changement du pH.....	148
7.6. Etude comparative entre la réponse des bactéries productrices de l'hydrogène aux différentes concentrations en Fe^{2+}	150
7.7. Conclusion.....	152

7. 1. Introduction

Il est bien connu que le fer est nécessaire pour l'activation et le fonctionnement de nombreuses enzymes liées au métabolisme énergétique et il est également essentiel pour la croissance cellulaire de la plupart des micro-organismes [251].

Les hydrogénases ont des sites actifs très spécifiques et sont classées en plusieurs groupes selon la composition métallique de leurs sites actifs: [Fe], [Ni-Fe] hydrogénases [251,252]. Certains micro-organismes ont deux ou plusieurs hydrogénases dans leurs différents compartiments cellulaires [252].

Les [Ni-Fe] hydrogénases jouent un rôle important dans le métabolisme de l'énergie de la plupart des bactéries en ayant la capacité de catalyser à la fois la production et l'oxydation de l'hydrogène. Seule l'hydrogénase [Fe] présente une activité orientée vers la production de l'hydrogène [253-256].

En outre, la synthèse des hydrogénases exige la présence du nickel et du fer, qui pourraient être impliqués dans la régulation et l'expression des hydrogénases. Ainsi le fer est un élément fondamental de la ferrédoxine qui compose le site actif de l'hydrogénase.

Par conséquent, le fer joue un rôle crucial dans le transport des électrons et dans le processus de production de l'hydrogène, son addition dans le milieu de culture peut devenir un élément critique pour la croissance cellulaire et l'efficacité de la production de l'hydrogène par la promotion de l'activité enzymatique.

Bien que dans la littérature [257-259] l'effet, des ions métalliques Fe^{2+} sur la fermentation anaérobie, durant le processus de production sombre de l'hydrogène, a été peu étudié [257-259], très peu d'informations ont été rapportées sur les effets de Fe^{2+} sur la production sombre de l'hydrogène par *E. coli*. Les effets de Fe^{2+} sur l'efficacité de conversion de substrat et sur le changement du pH sont encore méconnus.

Etant donné que l'effet du Fe sur la production de l'hydrogène par *E. coli* n'a pas été étudié en profondeur, il nous a semblé intéressant d'évaluer son effet sur l'activité de l'enzyme productrice de l'hydrogène « l'hydrogénase Ni-Fe » et ce, à différentes teneurs de Fe^{2+} afin de bio-augmenter la productivité de l'hydrogène. Nous rappelons que pour les besoins de cette étude, nous avons opté pour la souche examinée *E. coli ATCC 8739*.

En effet, la détermination des performances d'une culture de production de l'hydrogène consiste à calculer sa productivité et/ou ses rendements dans les différentes conditions opératoires pour déterminer la concentration appropriée à la production de l'hydrogène. La

productivité (taux) est exprimée en litre ou en mole de l'hydrogène produit par litre de culture et par unité de temps. Généralement, on utilise l'unité de $\text{ml H}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Suivant le type de substrat, les rendements sont exprimés en mole de l'hydrogène par mole d'hexose consommé ou introduit, ou en litre de l'hydrogène par kg de substrat introduit.

La croissance cellulaire des bactéries, l'efficacité de conversion de substrat, le changement du pH et les performances de la production de l'hydrogène ont été examinés dans plusieurs lots contenant différentes concentrations en ions Fe^{2+} , allant de 0- 1500 mg/L.

7.2. Effet de Fe^{2+} sur l'efficacité de production de l'hydrogène

Dans ce chapitre, nous présentons les résultats des expériences que nous avons réalisées selon le protocole expérimental dans une très large gamme de teneurs en Fe^{2+} , ce spectre varie selon la souche étudiée. Pour cela, des concentrations de Fe^{2+} allant de (0- 1500 mg/L) ont été ajoutées dans les cultures bactériennes qui nous permettent d'étudier l'évolution et l'efficacité de la production de l'hydrogène par *E. coli* ATCC 8739.

2. 1. Effet de Fe^{2+} sur la cinétique de la production de l'hydrogène

L'effet des différentes concentrations de Fe^{2+} sur la production de l'hydrogène par *E. coli* ATCC 8739 est indiqué dans la Figure VII1. Comme le montre les résultats, la production fermentaire de l'hydrogène cesse dans les 25,5h d'incubation. Nous avons jugé bon de suivre la fermentation des différents lots durant les 25,5h d'incubation ce qui nous permet d'obtenir des informations sur l'efficacité de la production de l'hydrogène sans atteindre la fin de la phase stationnaire de production.

D'après les résultats obtenus, la production de l'hydrogène débute, sans ajout du fer, après un temps de retard de 7h, c'est une phase sans production de l'hydrogène. En présence du Fe^{2+} , les résultats ont montré une diminution du temps de latence de 30 mn. Ce temps de retard de la production de l'hydrogène dans tous les tests de lots est presque le même. Un volume de $209 \pm 18 \text{ ml/l}$ et un taux de production de $29.85 \pm 2.57 \text{ ml H}_2/\text{l/h}$ ont été atteints au bout de 7h d'incubation alors qu'aucune production de l'hydrogène au contrôle n'est observée.

Dans la littérature [257,260, 261], la phase de latence de production de l'hydrogène dure environ 6h dans les essais des cultures mixtes en présence du fer comme rapporté par Wang et al [260], il est de même pour des cultures de *E. coli* W3110 comme rapporté par Fan et al [261], Pour Yang et al. [257] le temps de latence de la production de l'hydrogène minimal dure 15 heures [257].

Dans cette présente étude, nous montrons que l'apport du fer au milieu de culture est favorable au fonctionnement des bactéries pour produire d'avantage de l'hydrogène par fermentation.

Les pentes des courbes présentées dans la Figure 7.1 augmentent avec l'augmentation des concentrations de Fe^{2+} de 0 à 600 mg/L au bout des premières 5h de production de l'hydrogène, mais lorsque les concentrations de Fe^{2+} sont plus élevées que l'optimum (600mg/L), les pentes des courbes ont tendance à diminuer. Ceux-ci indiquent que dans certaine gamme de

concentrations, les ions Fe^{2+} ont pu augmenter la vitesse de production de l'hydrogène par *E. coli*, tandis que les concentrations en Fe^{2+} beaucoup plus faibles ou plus élevées que l'optimum ne sont pas favorables à augmenter le taux de production de l'hydrogène efficacement.

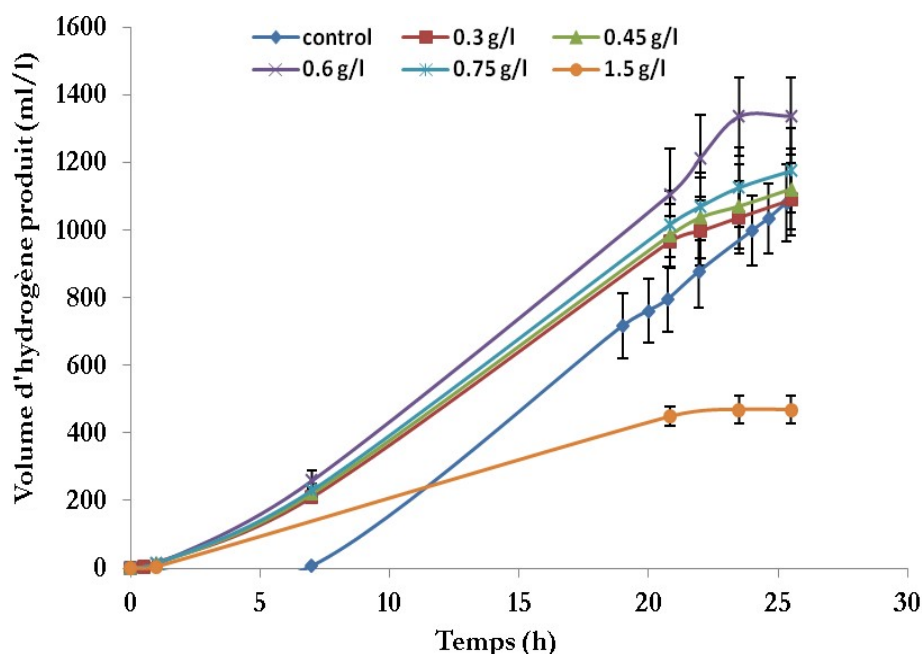


Fig.7.1. Effet de Fe^{2+} (g/l) sur l'évolution de la production de l'hydrogène
($T^\circ=36,6^\circ\text{C}$, [Glucose]=21,1g/L, pH=6,6)

Ces résultats indiquent que, l'ajout du fer améliore la production fermentaire de l'hydrogène par *E. coli ATCC8739* en réduisant la phase de retard et en augmentant le taux de production. Les ions ferreux Fe^{2+} soient nécessaires pour l'activation et le fonctionnement de l'hydrogénase Fe-Ni à produire davantage de l'hydrogène.

La figure 7.2 illustre l'effet des différentes concentrations de Fe^{2+} sur la production cumulée de l'hydrogène. L'augmentation de la concentration de Fe^{2+} de (0 à 0.6 g/l) dans le milieu de culture conduit à une augmentation du volume total de l'hydrogène produit alors qu'une augmentation de la concentration du Fe^{2+} (>à 0.6 g/l), contribue à diminuer progressivement le volume cumulé.

Le volume total moyen de l'hydrogène produit lors des différents essais effectués, en présence du Fe^{2+} à une concentration de 0.3 g/l, sont presque similaires à celui obtenu pour l'essai « contrôle ». A une teneur de 0.45 g/l de Fe^{2+} , une augmentation de 03.65% est observée. La quantité maximale de l'hydrogène cumulé par *E. coli ATCC 8739*, obtenue à une concentration en Fe^{2+} de 600 mg/L, est de 1336,97 mL/L, soit une amélioration de 23,8% par rapport au volume obtenu durant l'essai « contrôle ». A des teneurs supérieures, exemple, à une concentration de Fe^{2+} de 0.75 g/l, le volume total de l'hydrogène produit diminue de 15 % (par rapport à la valeur optimale).

Ces résultats indiquent que, dans le domaine expérimental, la concentration de Fe^{2+} affecte la production de l'hydrogène par *E. coli ATCC 8739*, et que les conditions optimales ont été obtenues en termes de volume total de l'hydrogène produit à une concentration de 600 mg/l. Une augmentation de la concentration du Fe^{2+} (> 0.6 g/l) entraîne une diminution du volume cumulé jusqu'à inhibition observée à une concentration de Fe^{2+} de 1500mg/l.

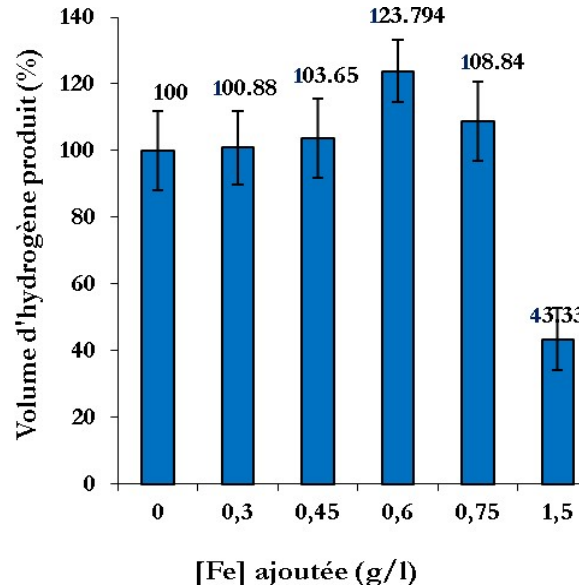


Fig.7.2 Effet de Fe^{2+} sur la production cumulé de l'hydrogène

2.2. Effet de Fe^{2+} sur le taux et le rendement de la production de l'hydrogène

La cinétique de production est déterminée par le calcul des taux maximaux ($\text{RH}_{2\text{max}}$); des productivités totales ou taux totaux ($\text{RH}_{2\text{t}}$) et des rendements de production de l'hydrogène (YH_2). C'est une mesure de la performance globale d'une opération microbiologique, telle qu'une production de l'hydrogène.

2.2.1. Effet de Fe^{2+} sur le taux de production de l'hydrogène

Le taux de production de l'hydrogène $\text{RH}_{2\text{t}}$ (la productivité "Pr") exprimant la quantité de métabolite synthétisé par unité de temps et par unité de volume de bioréacteur est régi par la loi suivante [34,212] :

$$\text{Pr} = \text{RH}_{2\text{t}} = (\text{dp}/\text{dt})_{\text{t}} \quad (7.1)$$

Le taux maximal de la production de l'hydrogène est régi par la loi suivante [151]. Les valeurs de P1 et P2, sont des concentrations distinctes de la phase exponentielle de la production, respectivement [61].

$$\text{RH}_{2\text{m}} = (\text{dp}/\text{dt})_{\text{max}} \quad (7.2)$$

La figure 7.3, montre l'effet de la concentration de Fe^{2+} sur les taux de production totaux et maximaux de l'hydrogène dans les différents essais.

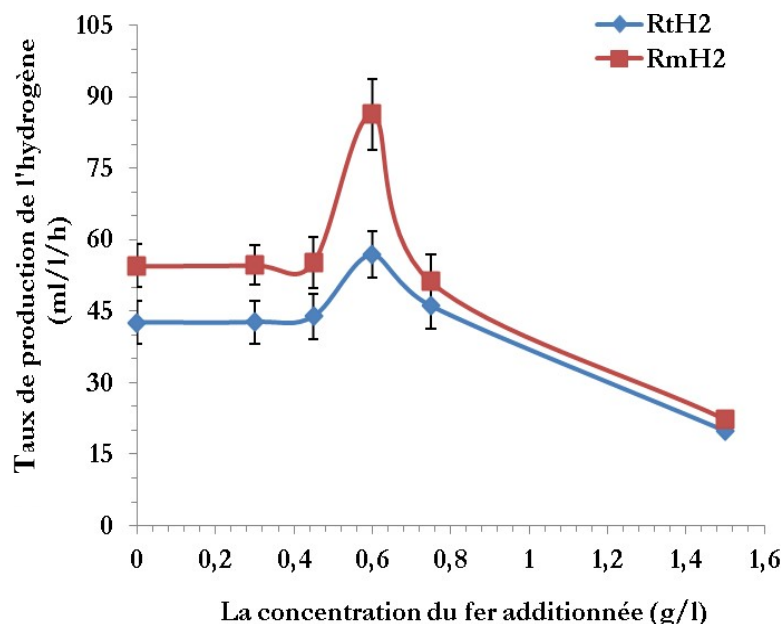


Fig.7.3. Effet de Fe^{2+} sur les taux de la production de l'hydrogène

Les résultats, illustrés dans la Figure 7.3., montrent que durant toute la production fermentaire de l'hydrogène lorsque la durée de la culture est de 25.5h, une légère augmentation du taux de production de l'hydrogène a été observée lors de l'augmentation de la concentration de Fe^{2+} de 0 à 0.450 g/l. Avec une concentration de Fe^{2+} de 0.600 g/l, le taux de production de l'hydrogène obtenus ($\text{RtH}_2 = 56.8 \text{ ml H}_2/\text{l/h}$ et $\text{RmH}_2 = 86.2 \text{ ml H}_2/\text{l/h}$), sont plus élevés que ceux des autres essais. Cela montre que, seulement à une concentration donnée, les ions Fe^{2+} peuvent augmenter l'activité d'expression des enzymes liés à la production fermentaire de l'hydrogène.

En termes de taux de production de l'hydrogène par *E. coli ATCC 8739*, le fer est essentiel à la production fermentaire de l'hydrogène, il faciliterait donc la biosynthèse des hydrogénases et l'amélioration de l'activité des hydrogénases. Cependant, la réduction des protons catalysés par les hydrogénases dépend des centres catalytiques enzymatiques, des ferrédoxines porteuses des électrons et ainsi de la teneur en métal de ces enzymes.

Pour des concentrations en Fe^{2+} beaucoup plus élevées que l'optimum, une diminution du taux de la production de l'hydrogène est observée, jusqu'à inhibition (Figure 7.3). De ces résultats on peut déduire que les concentrations élevées en Fe^{2+} ne sont pas favorables pour augmenter le taux de production de l'hydrogène et peuvent également inhiber la production de l'hydrogène par *E. coli ATCC 8739*. Yang et al. (2006) [258] et Ferchichi et al. (2005) [262] ont rapporté que

l'ajout du fer à des concentrations plus élevées que la concentration appropriée accélère la production de l'hydrogène, sans aucun effet inhibiteur. Alors que Liu et al [263] et Li et al [82] et Zhang et al [257] ont rapporté que l'ajout du fer et des ions métalliques à des concentrations plus élevées que la concentration optimale peut inhiber l'activité de la production de l'hydrogène, un niveau de trace en ions métalliques est nécessaire pour la production de l'hydrogène par fermentation.

2.2.2. Effet de Fe^{2+} sur le rendement de production de l'hydrogène

Le rendement en hydrogène $Y_{\text{H}_2/\text{S}}$ (mol /mol) est défini comme étant le nombre de mol de l'hydrogène total produit (mol) par le nombre de mol du glucose consommé (mol).

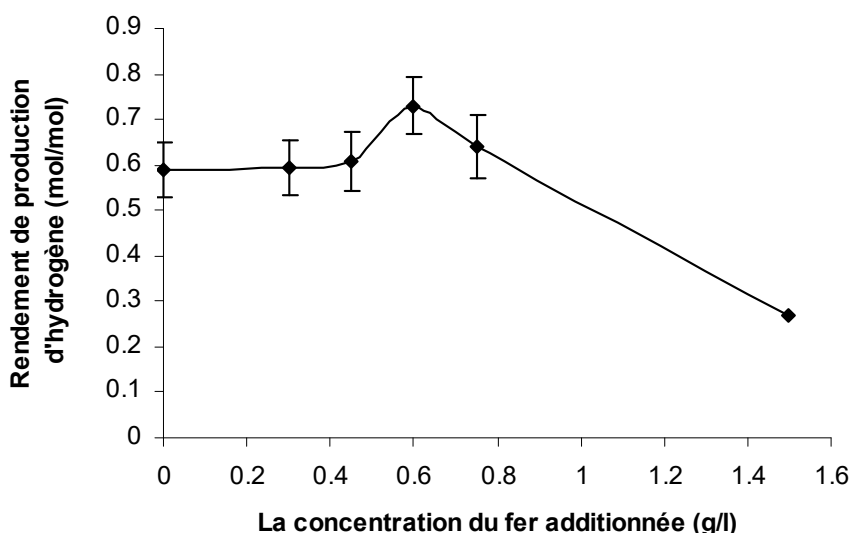


Fig.7.4. Effet de Fe^{2+} sur le rendement de la production de l'hydrogène

La figure (7.4.) montre l'effet de la concentration de Fe^{2+} sur les rendements en hydrogène. Les résultats ont montré que durant toute la production fermentaire de l'hydrogène lorsque la durée de la culture est de 25.5h, une légère augmentation du rendement de production de l'hydrogène a été obtenue suite à l'augmentation de la concentration de Fe^{2+} de 0 à 0.450 g/l. Avec une concentration de Fe^{2+} de 0.600 g/l, le rendement ($Y_{\text{H}}=0.73$ mol/mol) de production de l'hydrogène, est plus élevé que ceux des autres essais. Ces résultats indiquent que le fer augmente l'efficacité de conversion du substrat en hydrogène. Une légère diminution du rendement de production de l'hydrogène est observée avec l'augmentation de la concentration du Fe^{2+} (0.6 à 0.750 g/l).

A des concentrations de Fe^{2+} beaucoup plus élevées (0.750 à 1.50 g/l), une importante diminution du rendement de production de l'hydrogène est observée. De ces résultats on peut

déduire qu'une concentration appropriée de Fe^{2+} peut jouer un rôle important dans le métabolisme de l'énergie des bactéries et dans l'activité des hydrogénases, ce qui améliore efficacement la conversion du glucose en hydrogène par *E. coli* ATCC8739 (rendement de production de l'hydrogène), alors qu'à des concentrations de Fe^{2+} beaucoup plus faibles ou beaucoup plus élevées que la concentration optimale, l'activité des enzymes et des hydrogénases diminue ce qui diminue l'efficacité de conversion du glucose en hydrogène. Des résultats similaires ont été également enregistrés par certains chercheurs [258, 260, 264].

Dans la littérature, il existe des différences dans les résultats concernant la concentration optimale en Fe^{2+} pour la production de l'hydrogène par voie fermentaire. La concentration optimale en Fe^{2+} (600 mg/L), à laquelle le rendement de production de l'hydrogène par *E. coli* ATCC 8739 est maximal, est très différente de celles des autres études rapportées par [265, 262, 258, 264, 266]. Les raisons éventuelles de cette différence sont probablement liées aux différentes cultures bactériennes utilisées, aux multiples substrats utilisés et aux diverses conditions opératoires suivies. Par contre, malgré que les conditions expérimentales de notre étude diffère beaucoup de celles de l'étude de Zhang et al [267], la concentration optimale en Fe^{2+} (600 mg/L) obtenue dans ce présent travail serait semblable à celle de l'étude de Zhang et al (589,5 mg/L). Ces auteurs ont étudié l'effet du fer sur la production de l'hydrogène par des cultures mixtes à partir du sucrose. De ces résultats, on peut déduire que la concentration optimale en Fe^{2+} est spécifique pour chaque essai et donc au cours d'une production fermentaire de l'hydrogène, il est préférable de déterminer la concentration optimale en Fe^{2+} selon les conditions expérimentales de chaque culture.

Il est intéressant de noter également que dans cette étude le rendement en hydrogène maximal est beaucoup plus élevé que celui des autres études utilisant d'autres souches d'*E. coli*. Redwood et al [60] ont obtenu un rendement maximum en hydrogène de 0.376 mol/mol de glucose avec *E. coli* HD 701. Pour Bakonyi et al [268] le rendement maximum en hydrogène est de 0.42 mol/mol de formate avec la souche *E. coli* (XL1-BLUE) et pour Fan et al [88] un rendement maximum en hydrogène de 0.54 ± 0.04 mol/mol de glucose est obtenu avec la souche *E. coli* W3110. Cela démontre que les conditions opératoires utilisées dans cette étude s'avèrent plus favorables à la production de l'hydrogène par fermentation et que la souche utilisée *E. coli* ATCC 8739 convertit efficacement le glucose en hydrogène par rapport aux autres souches de la même espèce.

2.2.3. Les proportionnalités d'augmentation de la cinétique de production de l'hydrogène en présence du fer

Les figures (7.5.a) et (7.5.b) montrent, respectivement, les proportionnalités d'augmentation des taux de production (totaux et maximaux) et du rendement en hydrogène en présence du Fe^{2+} , par rapport au contrôle. Les résultats montrent que les valeurs les plus élevées en termes du taux total (RH_{2t}), du taux maximal ($\text{RH}_{2\text{max}}$) et du rendement de production de l'hydrogène (YH_2) sont

obtenus à une concentration de 0.600g/l. Ces valeurs augmentent de 33.31%, 58,26% et de 24.03%, respectivement, par rapport au témoin (Figure. 7.5.a et Figure. 7.5.b). A des concentrations en ions Fe^{2+} supérieures à 0.750g/l, le taux et le rendement de production de l'hydrogène diminuent progressivement jusqu'à inhibition. Par conséquent, on peut déduire que le fer augmente l'activité de l'hydrogénase, cela en oxydant la ferrédoxine réduite, à produire davantage d'hydrogène. Egalement, il augmente l'efficacité de conversion du glucose en hydrogène (YH_2), cela en améliorant les fonctions des enzymes qui seront ensuite déplacées vers la voie métabolique de production de l'hydrogène et améliore l'efficacité du métabolisme énergétique.

Bahl et al. [269] et Peguin & Soucaille [270] ont rapporté que l'ajout en fer faciliterait la biosynthèse des hydrogénases et le dégagement de l'hydrogène, tandis que la privation de fer pourrait gravement affecter la biosynthèse et la fonction de l'enzyme qui serait ensuite déplacée vers la voie métabolique de la production d'alcool.

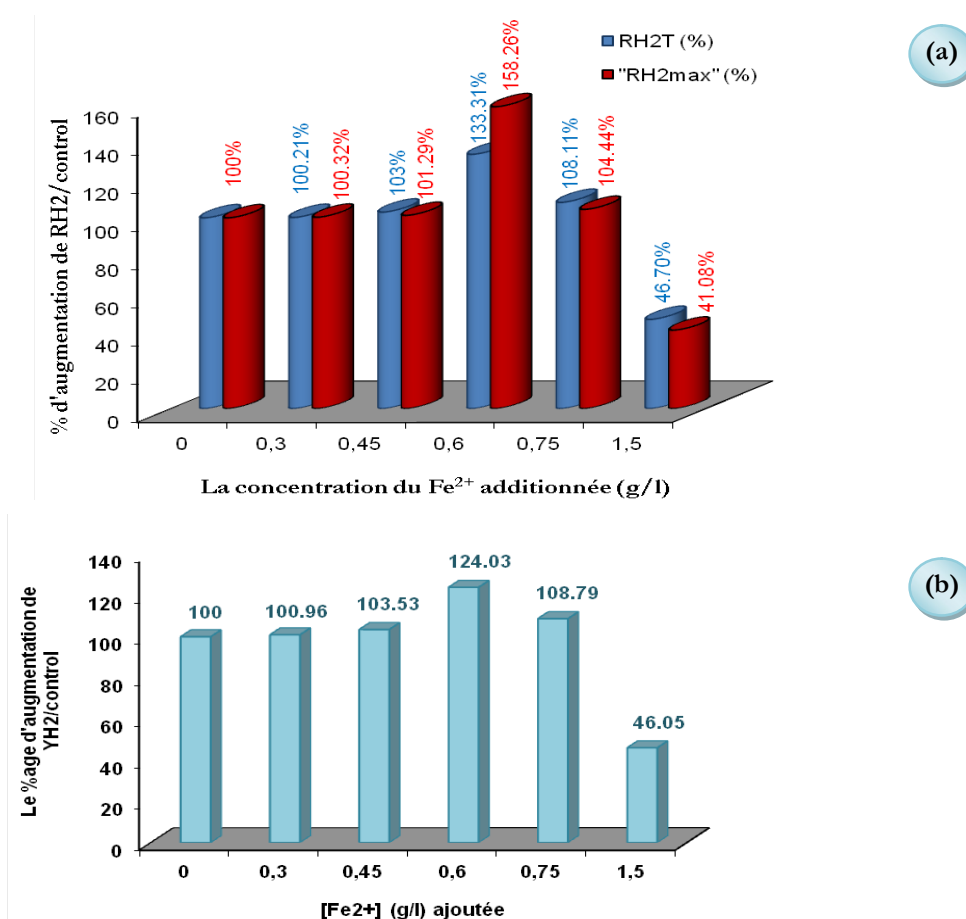


Fig.7.5. Effet de Fe^{2+} (g/l) sur le pourcentage d'augmentation (%) des taux de production (a) et du rendement de la production de l'hydrogène (b)

7.2.4. Effet du Fe sur l'efficacité de production de l'hydrogène par *E. coli* ATCC 8739

Nous avons montré que le fer stimule la production du biohydrogène par *E. coli* en réduisant la phase de retard et en augmentant le taux et le rendement de production de l'hydrogène. Un taux de production maximale de 86.25 ml/l/h, un taux de production totale de 56.841 ml/l/h, un rendement maximal de 0.73 mol H_2 /mol glucose et un volume cumulé de 1337 ml/l représentent les valeurs les plus élevées obtenues à une concentration de Fe^{2+} de 600mg/l.

Cela a démontré qu'à certaines gammes de concentrations, l'ion Fe^{2+} est capable d'améliorer significativement l'efficacité de production de l'hydrogène par *E. coli* ATCC 8739, contrairement aux autres concentrations où on note une amélioration non significative.

Le fer est une composante fondamentale de l'hydrogénase, de certains transporteurs d'électrons et de certains complexes protéiques essentiels au métabolisme des microorganismes [258]. Il joue donc un rôle important dans la production fermentaire de l'hydrogène.

7.3. Effet de Fe^{2+} sur la croissance cellulaire

3. 1. Effet de Fe^{2+} sur l'évolution de la croissance cellulaire

La Figure 7.6., montre l'effet de la concentration des ions ferreux libres sur la croissance cellulaire de *E. coli* ATCC 8739 en mode fermentaire.

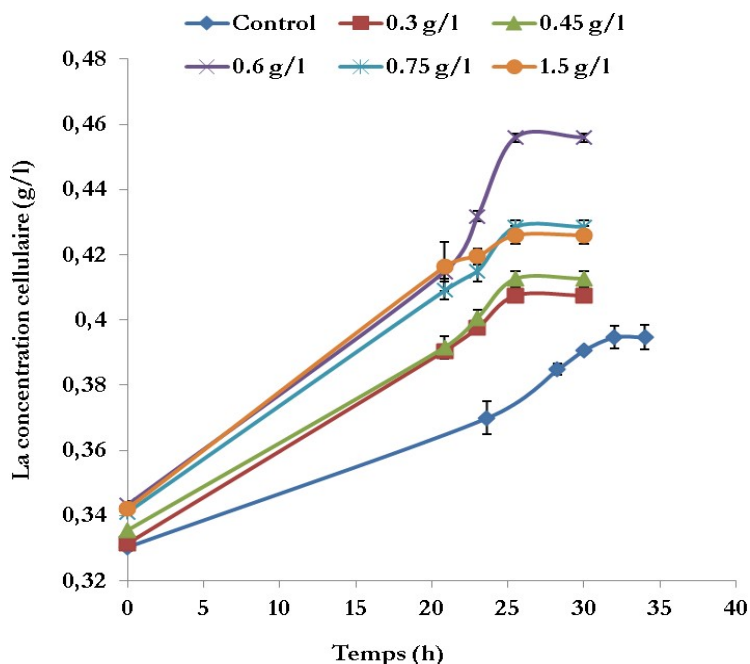


Fig.7.6. Effet de Fe^{2+} (g/l) sur l'évolution de la croissance cellulaire

D'après ces résultats, on constate que la cinétique de la croissance cellulaire varie en fonction de la concentration des ions ferreux libres. Une importante augmentation de la vitesse de la croissance cellulaire a été obtenue lors de l'augmentation de la concentration de Fe^{2+} de 0 à 0.450 g/l. Avec une concentration de Fe^{2+} de (0.6 g/l), la croissance cellulaire atteint la plus grande valeur du taux de croissance et de la concentration en biomasse (0.45 g de biomasse/l). Une légère diminution de la croissance cellulaire est observée avec l'augmentation de la concentration du Fe^{2+} (0.75 à 1.50 g/l).

Sous les différentes concentrations de Fe^{2+} (0.3 à 1.50 g/l), les cultures bactériennes atteignent la concentration maximale, X_{max} , après un temps d'incubation de 25h ce qui correspond au début de la phase stationnaire de croissance. Tandis que pour l'essai contrôle, cette concentration est atteinte après un temps d'incubation de 32 heures. On constate qu'avec l'augmentation de la concentration de Fe^{2+} (0.3 à 1.50 g/l), le temps de fermentation $t_d = (t_m - t_0)$ reste constant ; il y a donc réduction du temps de dédoublement bactérien, calculé par la loi suivante :

$$t_d = (1 / \mu_{\text{max}}) \cdot \text{Ln } 2 \quad (7.3)$$

Avec :

μ_{max} ; le taux spécifique de croissance maximal (h⁻¹) ;

t_m ; Temps pour le quelle la concentration en biomasse cellulaire est maximale(h) ;

t_0 ; Temps de début de croissance(h) ;

t_d ; temps de dédoublement bactérien(h).

Le temps de dédoublement bactérien, varie d'un microorganisme à un autre et dépend aussi des conditions environnementales, du pH et de la température [212]. Dans notre cas, il semblerait qu'il dépend également de la concentration de Fe^{2+} présente dans le milieu de culture. Les ions ferreux sont donc une source de micronutriments nécessaires au développement des bactéries.

7.2. Effet de Fe^{2+} sur le taux et le rendement de la croissance bactérienne

La cinétique de croissance est déterminée par le calcul des productivités totales (R_x) et des rendements de croissance (Y_x). La productivité ou le taux de croissance " R_x ", exprimant la quantité de biomasse produite par unité de temps et par unité de volume de bioréacteur, est régit par la loi suivante [34,212] :

$$R_x = (dx/dt)_t \quad (7.4)$$

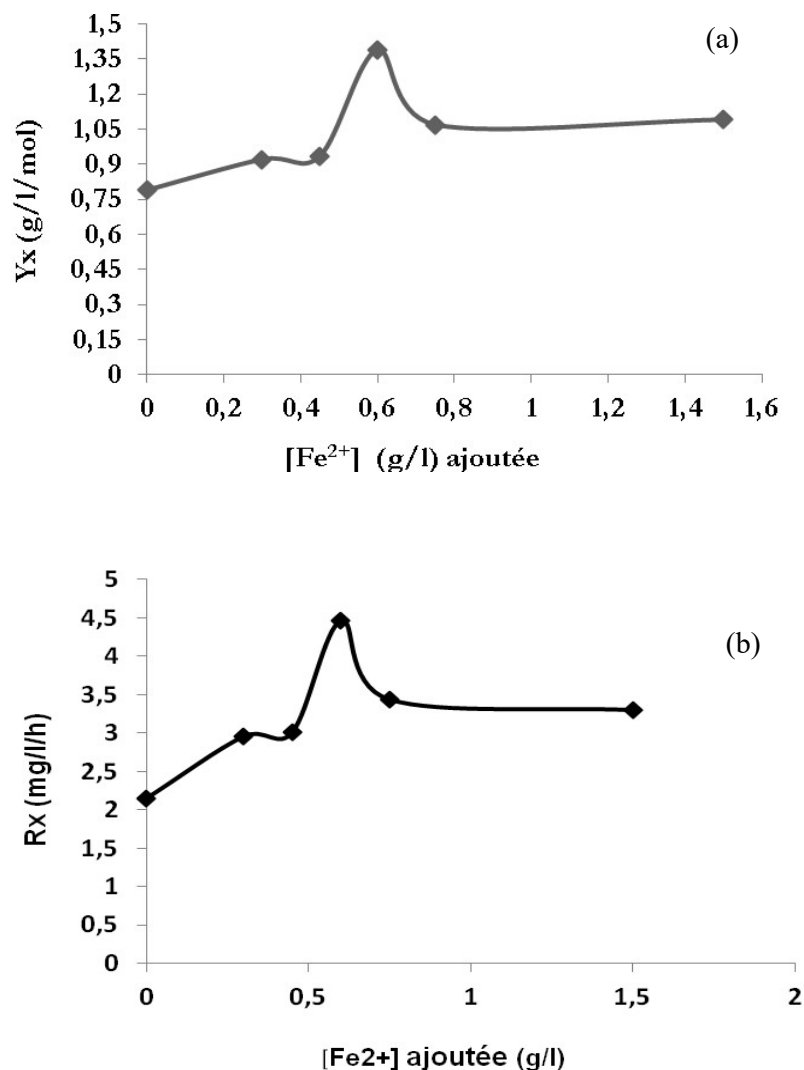


Fig.7.7. Effet de Fe^{2+} sur le rendement (a) et le taux (b) de la production en biomasse

Les figures (7.7.a, b) et (7.8) montrent, respectivement, l'effet de Fe^{2+} sur le taux de la croissance cellulaire, le rendement de la production en biomasse cellulaire et sur les taux d'augmentation de production et du rendement en biomasse par rapport au contrôle.

Les résultats ont montré que dans les différents essais, le taux et le rendement de production en biomasse augmentent avec l'augmentation de la concentration en Fe^{2+} de 0 à 1500 mg /l.

La concentration en Fe^{2+} pour la quelle la production en biomasse est maximale, est évaluée à environ à 0.6 g /l, correspondant à un taux de production en biomasse de 0.0044 g/ l /h et un rendement de production en biomasse de 1.390 g/l/mol de glucose. Ce qui correspond à une amélioration de 107.87% et de 76.47%, respectivement (Figure 7.8). Avec l'augmentation des concentrations en Fe^{2+} (> à 600 mg /l), les rendements de production en biomasse diminuent

légèrement et restent équilibrées. De ces résultats, il devient clair qu'une quantité suffisante de fer ionique doit être accessible aux microorganismes pour améliorer efficacement leur croissance. Dans la gamme expérimentale étudiée, une quantité plus grande en fer ionique entraînerait une amélioration de la croissance cellulaire sans inhibition. Effectivement, le fer étant cofacteur de plusieurs enzymes et molécules essentielles à la survie des microorganismes, il n'est pas donc étonnant qu'une quantité limitante en fer nuise la fermentation.

Dabrock et al. [271] ont rapporté qu'une concentration de fer, allant jusqu'à 10 mmol/l, a été un facteur limitant de la croissance de *Clostridium pasteurianum*, et que la limitation de fer n'a pas causé une diminution de la production de biohydrogène. Zhang et al [257] rapportent également que lorsque les concentrations Fe^{2+} étaient plus élevées que l'optimum, la concentration cellulaire est maintenue équilibrée sans aucun effet inhibiteur.

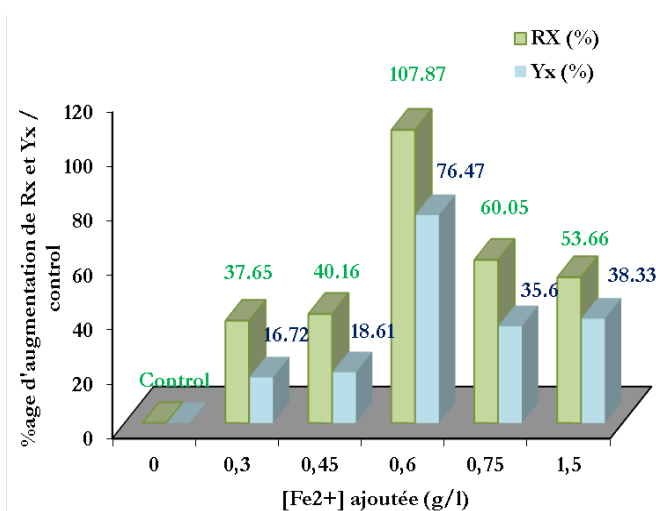


Fig.7.8. Effet de Fe^{2+} sur le pourcentage d'augmentation (%) du taux (Rx) et du rendement (Yx) de production en biomasse

3.3. Etude de la relation entre les cinétiques de croissance et de production de l'hydrogène

Pour étudier la relation entre les cinétiques de croissance et de production de l'hydrogène, il est intéressant de comparer, dans les mêmes conditions opératoires, l'évolution de la croissance bactérienne (Figure 7.6) et de la production de l'hydrogène (Figure 7.1) en fonction du temps.

Les résultats obtenus montrent que sous les différentes concentrations de Fe^{2+} , la production et la croissance évoluent simultanément en fonction du temps. Cependant, les ions Fe^{2+} n'influencent pas sur le type du métabolisme de production de l'hydrogène (Type du métabolite de l'hydrogène). L'hydrogène est considéré comme un métabolite primaire associé à la croissance, la production de l'hydrogène est concomitante avec la croissance cellulaire.

7.4. Effet de Fe^{2+} sur l'efficacité de consommation de substrat

Dans ce présent travail l'efficacité de consommation du substrat (ECS) sera étudiée de deux façons, en suivant la consommation du glucose durant toute la fermentation et en évaluant l'efficacité de consommation finale de chaque essai.

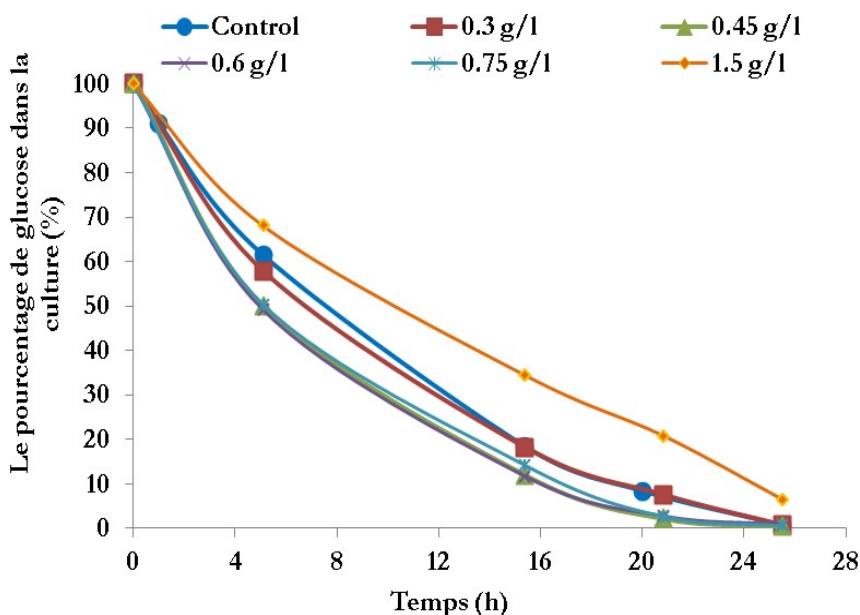


Fig.7.9. Effet de Fe^{2+} (g/l) sur la consommation du glucose par *E. coli* ATCC 8739 en mode fermentaire

La Figure 7.9., illustre l'évolution de la teneur de glucose dans les cultures de *E. coli* ATCC 8739 contenant des ions ferreux Fe^{2+} (de 0 – 1500 mg/l). La consommation du glucose a été fortement influencée par les ions Fe^{2+} dans la gamme expérimentale des concentrations de Fe^{2+} étudiée. L'efficacité de la dégradation du glucose, au cours des premières heures de la fermentation, a eu tendance à augmenter avec l'augmentation de la concentration de Fe^{2+} de 0-600 mg/l.

Une légère diminution de l'efficacité de consommation du substrat est observée à 750 mg/l. Ces résultats indiquent qu'au cours de la production fermentaire de l'hydrogène et en présence du fer, que l'ajout d'une très faible concentration de Fe^{2+} (300 mg/l) a peu d'effet sur l'efficacité des cultures de *E. coli* ATCC 8739 à dégrader le glucose. A cette concentration, le taux et le rendement de production de l'hydrogène sont légèrement élevés par rapport au control. Alors qu'à des concentrations de 450-750 mg/l, les bactéries consomment efficacement le glucose par rapport aux autres essais, ce qui explique l'amélioration des taux et des rendements de la production de l'hydrogène par *E. coli* ATCC 8739 à ces concentrations.

L'ECS à une teneur de 600 mg/l de Fe^{2+} est relativement plus élevée. A une teneur correspondante de 1500 mg/l en Fe^{2+} , l'ECS diminue par rapport aux autres essais, ce qui a induit la diminution du taux et du rendement de production de l'hydrogène tandis que pour la croissance cellulaire aucune inhibition n'est observée, la croissance cellulaire a été meilleure par rapport à celle du control. Une raison possible de ce phénomène est qu'à des concentrations en Fe^{2+} beaucoup plus élevées le glucose serait utilisé par les bactéries pour assurer la croissance cellulaire et serait dirigé vers d'autres voies métaboliques autres que celle de la production de l'hydrogène.

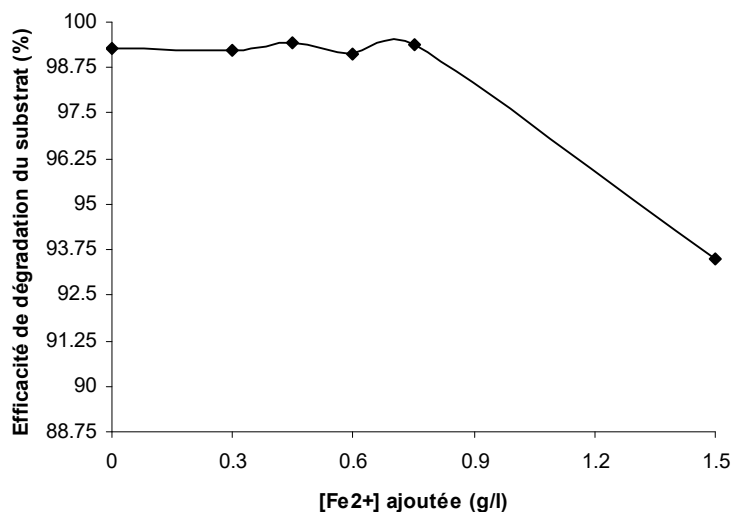


Fig.7.10. Effet de Fe^{2+} sur l'efficacité finale de consommation du glucose par *E. coli* ATCC 8739

A la fin de la fermentation, l'ECS par *E. coli* ATCC 8739 est relativement élevée et se situe entre 99,29 et 99,44%. Elle reste inchangée avec l'augmentation des concentrations Fe^{2+} allant de 0-750 mg/l, (Figure 7.10). L'ECS est estimée en divisant la quantité de glucose consommée par la quantité initiale de glucose.

Dans la gamme expérimentale étudiée, lorsque les concentrations en Fe^{2+} sont supérieures à (750 mg/L), une diminution cruciale de l'efficacité de la dégradation du glucose a été observée (93,47%).

Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Wang et al. [260], qui ont rapporté qu'à la fin de la fermentation, l'efficacité de dégradation du glucose est relativement élevée et reste inchangée, se situe entre 96,25 et 98,78%, à des concentrations de Fe^{2+} (allant de 0-350 mg/L), mais lorsque les concentrations de Fe^{2+} deviennent supérieures à l'optimum, le rendement de dégradation du glucose devient faible (92,40%). Toutefois, les taux de dégradation du glucose obtenus dans cette étude sont beaucoup plus élevés que ceux observés par Wang et al. [260].

7.5. Effet de Fe^{2+} sur le changement du pH

Dans ce présent travail, l'évolution du pH, au cours de la fermentation, dans les différents essais contenant des concentrations de Fe^{2+} allant de 0 – 1500 mg/l, est suivie et illustrée dans la Figure 7.11. Les résultats montrent que, le pH diminue différemment dans les cultures d'*E. coli* ATCC 8739 en fonction du temps. Cette diminution est en relation avec les activités métaboliques des micro-organismes (la fermentation du glucose) qui produit plus de l'hydrogène, des acides organiques. On parle d'une fermentation acide mixte.

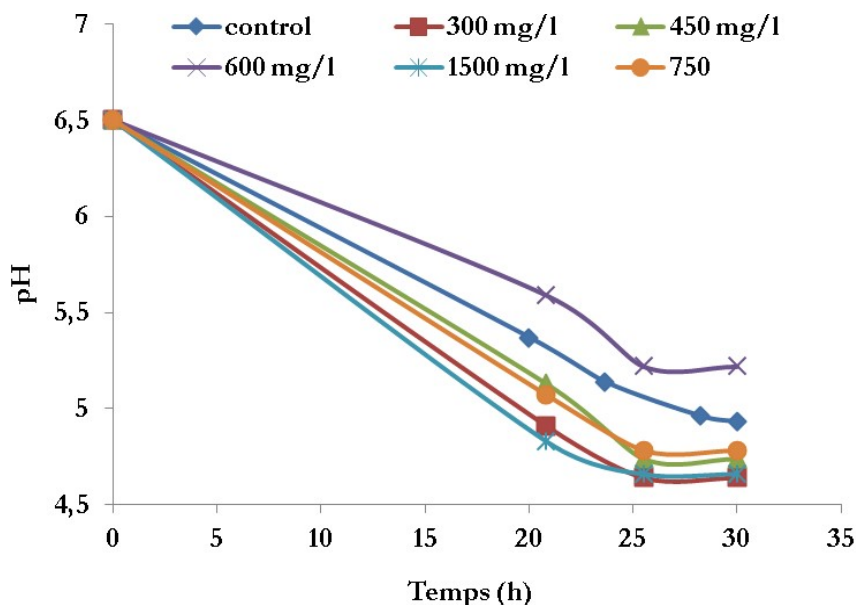


Fig.7.11. Effet de Fe^{2+} (g/l) sur l'évolution du pH au cours de la fermentation

La figure 7.12, illustre l'évolution de la valeur finale du pH en fonction des différentes concentrations de Fe^{2+} . Les résultats montrent que la valeur finale du pH a tendance à diminuer ($< \text{pH } 4,93$) avec l'augmentation de la concentration de Fe^{2+} de 0 à 450 mg/L. A une concentration de Fe^{2+} de 600 mg/L, le pH final est relativement élevé. Avec l'augmentation de la concentration de Fe^{2+} jusqu'à 1500 mg/L, une diminution du pH final est observée. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Wang et al. [259] qui rapportent que la valeur finale du pH a tendance à diminuer avec l'augmentation des concentrations de Fe^{2+} . Une légère augmentation de pH est observée à la concentration optimale de Fe^{2+} de 300 mg/l.

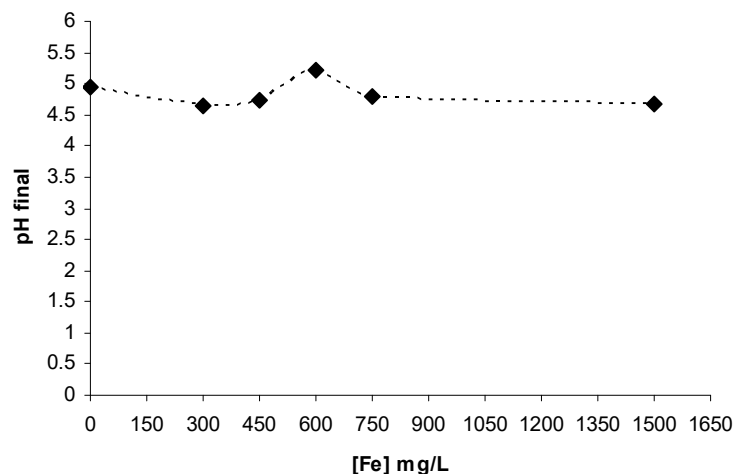


Fig.7.12. Evolution de la valeur final du pH en fonction des différentes concentrations de Fe^{2+}

Les figures (7.11 et 7.12) montrent que des faibles valeurs du pH (< 4.93) sont constatées (à 300, 450, 750 et 1500 mg/l) par rapport à celles du « control », ce qui peut être lié simultanément à l'évolution de la croissance fermentaire des bactéries et à la production de l'hydrogène. D'après les résultats obtenus, le fer est nécessaire pour la croissance des bactéries, son ajout n'a pas provoqué un effet inhibiteur sur la croissance cellulaire, par contre, il a amélioré efficacement les conditions de leur croissance et donc de leur métabolisme fermentaire, en produisant d'avantage d'acides organiques, provoquant ainsi une diminution du pH par rapport au contrôle.

Les valeurs finales du pH les plus basses (4.65 ± 0.1) ont été acquises à une concentration de Fe^{2+} de 1500 mg/L. Il est à noter qu'à cette concentration, le rendement en hydrogène et l'efficacité de dégradation du glucose ont eu tendance à diminuer alors que le taux et le rendement de production de biomasse cellulaire sont très élevés, il semblerait que les très faibles valeurs de pH ne sont pas favorables pour la dégradation du glucose et pour la production de l'hydrogène par *E. coli ATCC8739*. Zhang et al [267] et Yang et Shen [258] rapportent également que le pH diminue légèrement avec l'accroissement de la concentration de Fe^{2+} de 0 à 3200 mg/l, et de 0 à 1473,7 mg/l jusqu'à un pH 4.65 et à un pH de 5.3 respectivement.

Par ailleurs, l'ajout des ions Fe^{2+} à une concentration de 600 mg/l, améliore la production de l'hydrogène de façon significative par rapport aux autres essais, il apparaît que l'hydrogénase réduit d'avantage les ions H^+ en hydrogène moléculaire à 600 mg/l de Fe^{2+} par rapport aux autres essais, il en résulte une diminution des échanges des ions H^+ vers le milieu extracellulaire par, et qui explique les valeurs élevées du pH obtenues à la concentration optimale de Fe^{2+} de 600 mg/L.

Cette élévation du pH peut également être liée aux proportionnalités entre les acides volatiles et les alcools produits au cours de la fermentation à différentes concentrations de Fe^{2+} , Wang et al [10] rapportent que les rendements maximaux en éthanol et en hydrogène sont obtenus à la concentration optimale de Fe^{2+} de 300 mg/L. Dans cette étude, la valeur finale du pH la plus élevée est de 5.22 à la concentration optimale de Fe^{2+} . À cette concentration, le rendement en hydrogène, l'efficacité de dégradation du glucose ainsi que le taux et le rendement de production en biomasse cellulaire sont très élevés, ce qui montre que les valeurs de pH comprises entre le pH initial et un pH de 5.22 sont favorables pour la dégradation du glucose et pour la production de biomasse et de l'hydrogène par *E. coli ATCC8739*.

Ces résultats sont similaires à ceux de Li et Fang [82], les auteurs ont montré que, le pH favorable pour la production fermentaire de l'hydrogène par les cultures mixtes se situe entre 5,2 et 7,0, tandis que des valeurs de pH beaucoup inférieures ou bien supérieures au pH favorable diminuent la production de l'hydrogène.

Il est à noter que dans la littérature [258, 267], les auteurs rapportent que le pH final diminue différemment sous les différentes concentrations de Fe^{2+} en raison de la fermentation, mais ne donnent aucune explication concernant l'évolution du pH final. De même, ils ont présenté l'évolution du pH final sous les différentes concentrations de Fe^{2+} , mais non pas l'évolution du pH, au cours de la fermentation sous les différentes concentrations de Fe^{2+} .

7.6. Etude comparative entre la réponse des bactéries productrices de l'hydrogène aux différentes concentrations en Fe^{2+}

Dans la littérature [257, 258, 264, 266, 267, 272] quelques études rapportent l'effet du fer sur la production fermentaire de l'hydrogène (fermentation sombre et photofermentation). Les résultats indiquent que l'activité des bactéries fermentaires productrices de l'hydrogène a été améliorée par l'addition d'une concentration appropriée en Fe^{2+} dans le milieu. Les raisons possibles pour lesquelles les résultats de ces recherches ont été différents sont considérablement liées à la souche étudiée, à la nature et à la concentration du substrat utilisé ainsi qu'à la température et à la valeur initiale du pH.

Dans la littérature, l'effet du fer sur la production fermentaire de l'hydrogène par *E. coli* n'a pas été rapporté. Dans cette étude, nous avons comparé la réponse de cette souche par rapport aux autres bactéries productrices de l'hydrogène. La croissance bactérienne et la production de l'hydrogène par *E. coli ATCC 8739* est grandement influencé par les différentes concentrations en Fe^{2+} . La concentration optimale en ions Fe^{2+} pour la production de l'hydrogène obtenue (0.6 g/l) est supérieure à celle rapporté par Chong et al [272] qui ont travaillé avec la souche *C. butyricum EB6* (0.39 g/l) et inférieure à celle rapporté par Zhang et al. [257] (4g/l) qui ont utilisé les cultures mixtes. Notre résultat est presque similaire à celui obtenue par Zhang et al (0.589 g/l) [267]. Ainsi, l'ajout du fer à des concentrations supérieures à 1500 mg/l, induit une inhibition du taux et

du rendement de production de l'hydrogène. Pour la croissance bactérienne, l'ajout du fer diminue le taux et le rendement de production de la biomasse mais améliore efficacement les conditions de la croissance par rapport au témoin. Zhang et al. [257] ont suggéré que, l'ajout d'ions dans le cas des cultures mixtes, n'améliore pas la production de biohydrogène de façon significative, mais toutefois le fer demeure essentielle pour la survie des bactéries.

Par exemple, Ding et al [264] ont étudié l'effet de la concentration en Fe^{2+} allant de 0 à 1473.7mg/L sur la production de l'hydrogène par des cultures mixtes à partir de glucose (5 g/l) à 35°C et un pH initial de 4,7. Le rendement maximal en hydrogène (143,7 ml/g de glucose) est obtenu à une concentration de Fe^{2+} de 200 mg/L. Yang et al. [258] ont étudié l'effet de la concentration en fer ferreux allant de 0 à 1473,7 mg/L sur la production anaérobie du biohydrogène en utilisant comme substrat de l'amidon soluble (10 g/L) par des cultures mixtes à 35°C et à un pH 7.0. Ils ont observé que le rendement augmente lorsque la concentration en fer augmente de 0 à 0,2 g/L. Le rendement maximum en hydrogène (296,2 ml/g d'amidon) est obtenu à une concentration de 55,3 mg/L de Fe^{2+} . Ils ont également rapporté que l'augmentation de la concentration de FeSO_4 de 0,2 g/L à 4 g/L accélère la production du biohydrogène, sans aucun effet inhibiteur. Lee et al. [266] ont étudié l'effet de la concentration en Fe^{2+} allant de 0 à 1763.8mg/L sur la production de l'hydrogène par fermentation à partir de saccharose (10 g / L) dans des essais de traitement par lots en cultures mixtes à 37°C et à un pH 6,0. Ils ont rapporté que la production du biohydrogène augmente avec l'augmentation de la concentration en fer. Les valeurs maximales du rendement (131.9 ml/g de saccharose) et du taux de production de l'hydrogène spécifique ont été obtenu à une concentration de 352.8 mg/L et de 4 g / L de FeCl_2 , respectivement. Wang et al [260] ont également étudié l'effet de la concentration en Fe^{2+} sur la production de l'hydrogène par fermentation à partir de glucose dans des essais de traitement par lots en cultures mixtes. Le volume cumulatif maximal de l'hydrogène produit (302.3 ml) et le rendement maximal (311.2 ml/g de glucose), ont été obtenus à des teneurs de 300 et 350 mg/L de Fe^{2+} respectivement.

Chong et al. [272] ont également montré en utilisant une analyse statistique que le fer influence significativement la production du biohydrogène par *C. butyricum EB6*, la concentration optimale obtenue est de 0,39 g / L.

Egalement, la production de l'hydrogène par les bactéries photofermentaires est grandement influencée par les différentes concentrations en Fe^{2+} . Chez *Rhodobacter sphaeroides* [174] et *R. faecalis RLD-53* [257] les concentrations optimales en Fe^{2+} obtenues sont de 2.4 mg/L et de 22.23 mg/L, respectivement.

7.7. Conclusion

L'effet des concentrations de Fe^{2+} allant de 0 à 1500 mg /L sur la production fermentaire de l'hydrogène à partir du glucose a été étudié en utilisant la souche *E. coli* ATCC 8739. Les résultats expérimentaux ont montré que dans certaines gammes de concentration, le Fe^{2+} a contribué à augmenter le taux de production de l'hydrogène, le volume cumulatif de l'hydrogène, le rendement en hydrogène, l'efficacité de dégradation du glucose et à améliorer les caractéristiques de la croissance des cultures bactériennes. Un volume maximal cumulatif de l'hydrogène de 1337 ± 114.6 ml, un taux moyen de 56.84 ± 4.92 ml/l/h, un taux maximal de 86.25 ± 7.38 ml/l/h et un rendement en hydrogène au maximum de 0,73 mol/mol de glucose ont été obtenus à une concentration de Fe^{2+} de 600 mg/L. L'efficacité de la dégradation du glucose au cours de la fermentation a tendance à augmenter avec l'augmentation de la concentration de Fe^{2+} 0-600 mg/L, mais à la fin de la fermentation, l'efficacité de la dégradation du glucose était relativement élevé et constante entre 99.29 et 99.44%, avec l'augmentation des concentrations de Fe^{2+} 0-750 mg/l. A des concentrations de Fe^{2+} plus élevées que l'optimum, l'efficacité de la dégradation du glucose diminue considérablement. Dans certaine gamme de concentration, le Fe^{2+} est en mesure d'améliorer le rendement de production en biomasse. Les taux et rendement de production en biomasse les plus élevées sont de 4.46 mg/l/h et de 1.39 g/l/ mol de glucose, respectivement, obtenus pour la concentration de Fe^{2+} de 600 mg/L. La valeur finale de pH a tendance à diminuer avec l'augmentation de la concentration de Fe^{2+} de 0 à 450 mg/L, mais lorsque les concentrations de Fe^{2+} sont supérieures à 450 mg/L, le pH final est relativement élevé. Pour des concentrations de Fe^{2+} de 750 -1500 mg/L, une diminution du pH final est observée. La valeur finale du pH est de 5.58 à la concentration optimale de Fe^{2+} de 600 mg/L.

La composition du milieu présente une grande importance pour les bactéries productrices de l'hydrogène. L'ajout d'une concentration appropriée en ions Fe^{2+} dans le milieu est donc primordial car il s'agit d'un constituant essentiel du site actif des hydrogénases. La quantité nécessaire d'ions Fe^{2+} varie en fonction des conditions de culture, de la souche et du substrat utilisé. La concentration optimale en ions Fe^{2+} de l'ordre de 600 mg/l, favoriserait les voies métaboliques bactériennes qui mènent à la production de l'hydrogène.

Chapitre 8.

Effet du Ni^{2+} sur la croissance et l'efficacité de la bioproduction de l'hydrogène par *E. coli* ATCC 8739

Sommaire

8.1. Introduction.....	154
8.2. Effet de Ni^{2+} sur l'efficacité de production de l'hydrogène	155
2. 1. Effet de Ni^{2+} sur l'évolution de la production de l'hydrogène.....	155
2.2. Effet de Ni^{2+} sur le taux et le rendement de la production de l'hydrogène.....	157
2.2.1. Effet de Ni^{2+} sur le taux de production de l'hydrogène.....	157
2.2.2. Effet de Ni^{2+} sur le rendement de production de l'hydrogène	158
8.3. Effet de Ni^{2+} sur la croissance cellulaire	160
3.1. Effet de Ni^{2+} sur l'évolution de la croissance cellulaire.....	160
3.2. Effet de Ni^{2+} sur le taux et le rendement de la croissance	161
3.3. Etude de la relation entre les cinétiques de croissance et de production de l'hydrogène.....	162
8.4. Effet de Ni^{2+} sur l'efficacité de consommation de substrat.....	163
8.5. Effet de Ni^{2+} sur le changement du pH.....	164
8.6. Etude comparative entre la réponse des bactéries productrices de l'hydrogène aux différentes concentrations en Ni^{2+}	167
8.7. Conclusion.....	167

8. 1. Introduction

La pollution due aux métaux lourds (tels que le cuivre, le zinc, le plomb, le mercure, le chrome, le cadmium, le nickel et le cobalt), est rencontrée généralement dans des flux de déchets de nombreuses industries, telles que les installations de métallisation, l'exploitation minière, les unités de fabrication de batteries d'accumulateurs, les unités de fabrication de la céramique et du verre, et les tanneries [273-275].

Les métaux lourds peuvent être stimulants, inhibiteurs, voire toxiques dans les réactions biochimiques en fonction de leurs concentrations [276]. Des faibles teneurs en métaux lourds, à l'état de traces sont suffisantes pour l'activation et ou le fonctionnement de nombreuses biotransformations.

Le nickel est un élément central composant les hydrogénases qui sont capables de catalyser l'oxydation de l'hydrogène ou la réduction des protons. Ces enzymes sont classées en deux grandes familles: les [Ni-Fe] hydrogénases et les [Fe-Fe] hydrogénases, en fonction de la teneur en métal en leur sites actifs [277].

Les [Ni-Fe] hydrogénases sont présentes chez la plupart des bactéries, alors que les [Fe-Fe] hydrogénases sont limitées à quelques bactéries. Les [Ni-Fe] hydrogénases se composent essentiellement de deux sous-unités, une grande et une petite sous-unité, et qui contiennent 1 atome de nickel et en général environ 12 atomes de fer par molécule [278].

Toutefois, l'absence du nickel dans le milieu peut atténuer la synthèse de ces enzymes pouvant influencer ainsi sur la production de l'hydrogène par fermentation en agissant sur l'activité des [Ni-Fe] hydrogénases.

Dans la littérature, peu de travaux rapportent l'influence du nickel sur la production de l'hydrogène par fermentation [279-283]. De plus, on en sait peu sur l'effet de Ni^{2+} sur la croissance, la production fermentaire de l'hydrogène, l'efficacité de dégradation du substrat par *E. coli*.

Par conséquent, l'objectif de la présente étude visait à évaluer la stimulation, l'inhibition, voire la toxicité du nickel sur l'activité de production de l'hydrogène, sur l'efficacité de consommation du substrat, sur l'évolution, sur l'effet du pH et sur la croissance cellulaire de la souche *E. coli* ATCC 8739.

8.2. Effet de Ni^{2+} sur l'efficacité de production de l'hydrogène

Dans ce travail, une série d'expériences en bioréacteurs contenant des teneurs en Ni^{2+} (allant de 0 à 6 mg/l) ont été menées pour étudier l'effet du Ni^{2+} sur l'efficacité de production de l'hydrogène par *E. coli* ATCC 8739 en utilisant le glucose comme substrat.

8.2. 1. Effet de Ni^{2+} sur l'évolution de la production de l'hydrogène

Dans la figure.8.1, nous présentons l'effet de la variation de la concentration en Ni^{2+} sur la production de l'hydrogène et ce dans des cultures de *E. coli* ATCC 8739.

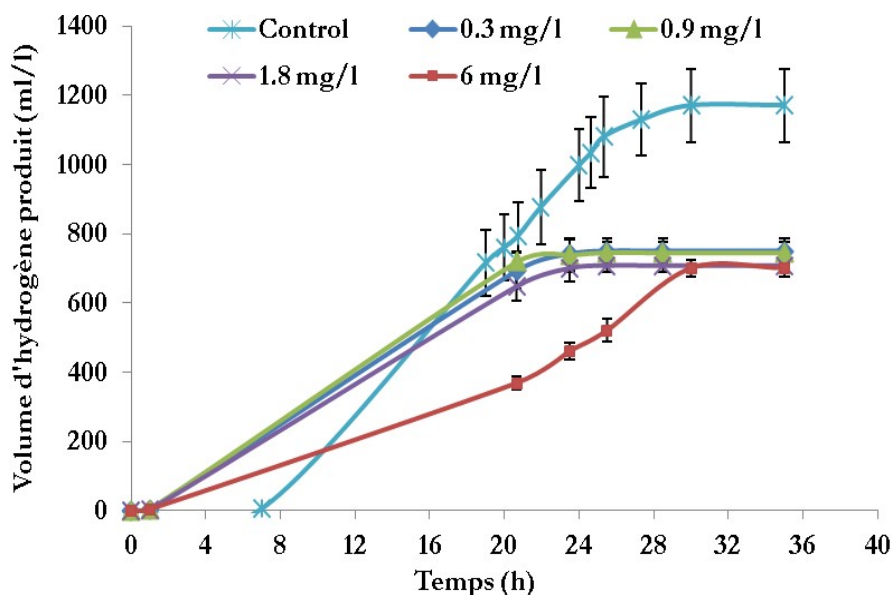


Fig.8.1. Effet de Ni^{2+} (mg/l) sur l'évolution de la production de l'hydrogène

Les résultats montrent que dans le cas de culture sans ajout du nickel, la durée de la production fermentaire de l'hydrogène est de 30 heures. Cette durée se trouve écourtée (20 à 25.5 heures) et affectée à des concentrations croissantes en Ni^{2+} allant de 0.3 à 1.8 mg/l.

Toutefois nous observons qu'à une concentration en Ni^{2+} de 6 mg/l, la durée de la production de l'hydrogène par fermentation redevient 30 heures. Nous avons constaté pareillement que le temps de latence diminue avec l'augmentation de la concentration de Ni^{2+} i.e il est de 6 heures pour l'essai «contrôle» mais de 1 heure en présence du Ni^{2+} . Cela laisse suggérer qu'une gamme appropriée de Ni^{2+} pourrait réduire le temps de latence et la durée de production d'hydrogène.

L'augmentation des doses de Ni^{2+} (de 0.3 à 6 mg/l) affecte à la fois les pentes des courbes de production de l'hydrogène (Fig.8.1) et le volume de l'hydrogène produit (Fig.8.2.a).

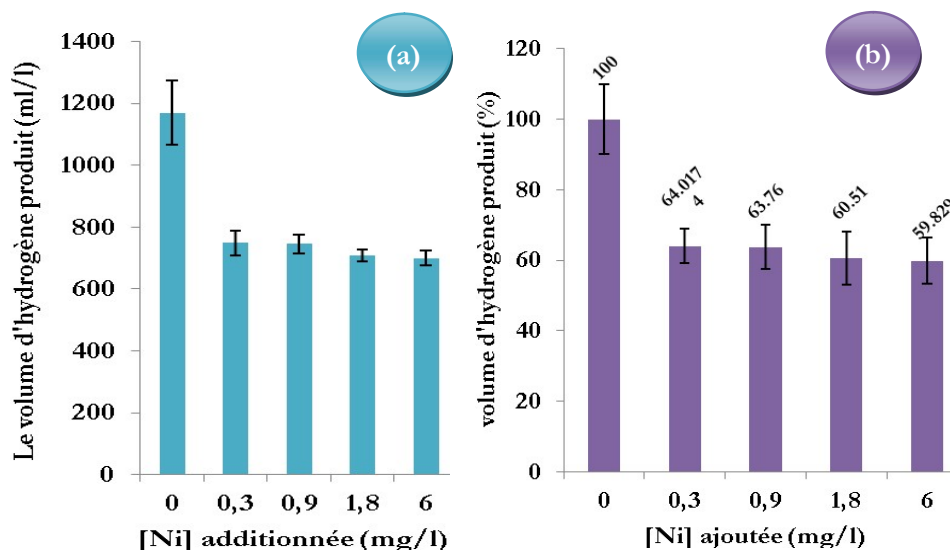


Fig.8.2. Effet de Ni^{2+} sur la production cumulée de l'hydrogène

Les variations du potentiel de production de l'hydrogène par rapport aux contrôles sont illustrées dans la Figure.8.2.b.

Nos résultats corroborent avec ceux rapportés par Wang et al [259], ces auteurs ont étudié l'effet du nickel à des teneurs allant de 0 à 50mg/l sur la production de l'hydrogène par les cultures mixtes. Sans nickel, le temps de latence de la production d'hydrogène par les cultures mixtes se situe à 18 h, avec l'augmentation de la concentration de Ni^{2+} de 0 à 0,02 mg/l, ce temps diminue il est de 6h. Il atteint 12 h avec une concentration croissante de Ni^{2+} de 0,5 à 10 mg/l et 24 h avec des teneurs élevées en Ni^{2+} de 20 à 50 mg /l.

Par contre, ils sont en désaccord avec les résultats rapportés par Chenlin et al [284] qui ont étudié l'effet du nickel à des charges très élevées (0-5000 mg/l de Ni^{2+}) sur la production de l'hydrogène par les cultures mixtes. Les auteurs rapportent que le temps de latence augmenterait avec la concentration en métaux lourds. Leurs conclusions n'ont pas été confirmées par d'autres auteurs.

Liu et al [263] ont rapporté que les différentes concentrations de Ni^{2+} (0-10 mmol/l) n'ont pas un impact sur le temps de latence de la production d'hydrogène par *R. faecalis* RLD-53.

Les Figures 8.1 à 2 illustrent, respectivement que les taux et potentiel de production de l'hydrogène diminuent avec l'augmentation de la concentration du Ni^{2+} . Le nickel semble donc être inhibiteur pour la production de l'hydrogène par *E. coli* malgré qu'il ait diminué le temps de

latence. La Figure. 8.2.b, montre qu'à une teneur en Ni^{2+} de 6 mg/l, le volume d'hydrogène produit, diminue de 59.8 % par rapport à celui obtenue lors de l'essai « contrôle ». L'effet inhibiteur du métal peut être exprimé par la CI 50, la concentration à laquelle la production de l'hydrogène est à 50% par rapport au témoin [285-287]. La valeur de CI 50 dans cette présente étude est de 6 mg/l. A cette concentration l'activité, des bactéries productrices d'hydrogène, est réprimée.

Il est à noter que l'effet inhibiteur et le degré de toxicité varient considérablement en fonction du type des métaux lourds utilisés, du substrat utilisé [284] et de la souche étudiée. Les résultats de cette présente étude sont similaires à ceux évoqués dans l'étude de Li et Fang [284] qui ont montré que le volume de production de l'hydrogène diminue avec l'augmentation des concentrations de Ni^{2+} de 0 à 50 mg/l. Alors que Wang et al [259] ont rapporté que le potentiel de production de l'hydrogène augmente dans une certaine gamme expérimentale et diminue avec l'augmentation des concentrations de Ni^{2+} .

8.2.2. Effet de Ni^{2+} sur les taux et les rendements de la production de l'hydrogène

8.2.2.1. Effet de Ni^{2+} sur les taux de production de l'hydrogène

Les figures 8.3 à 4 montrent, respectivement l'effet de Ni^{2+} sur les taux de production de l'hydrogène (RH_2) et les proportionnalités des taux de production totaux et maximaux, des différents essais contenant du Ni^{2+} , par rapport au contrôle

Les résultats illustrés sur la figure 8.3 montrent, que le taux de production de l'hydrogène est grandement affecté par les concentrations de Ni^{2+} . Le taux de production de l'hydrogène diminue avec l'augmentation de la teneur de Ni^{2+} de 0.3 à 6 mg/l. Ceci indique que les ions Ni^{2+} inhibent la production de l'hydrogène par *E. coli ATCC8739*. Nos résultats sont similaires à ceux rapportés par Wang et al [259] et par Li et Fang [284], bien que les degrés d'inhibition différents de ceux indiqués dans ce présent travail.

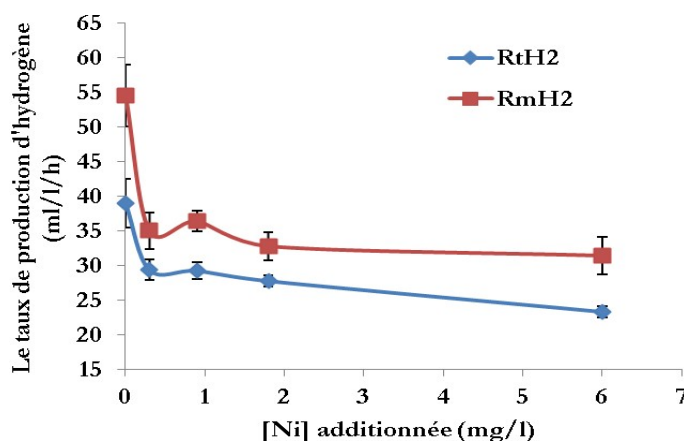


Fig.8.3. Effet de Ni^{2+} sur les taux de la production de l'hydrogène

A une faible dose de Ni^{2+} (0.9 mg/l), le taux maximal de la production de l'hydrogène augmente légèrement par rapport aux autres essais (figure. 8.4), mais reste toujours inférieur à celui du contrôle. Ceci indique que les ions Ni^{2+} pourraient stimuler ou inhiber le taux de la production de l'hydrogène en fonction de leur concentration. Les raisons éventuels de cette élévation peuvent être liées à la croissance cellulaire qui est maximale à cette concentration (cet aspect est traité plus longuement dans le paragraphe 8.3.2) et à l'insertion des ions Ni^{2+} dans le site actif de la $[\text{Ni-Fe}]$ -hydrogénase en influençant l'activité enzymatique. L'hydrogène est un métabolite primaire qui suit la croissance cellulaire provoquant ainsi une légère augmentation du taux maximal de la production de l'hydrogène mais qui reste inférieur à celle du contrôle.

Des quantités excessives en Ni^{2+} peuvent toutefois conduire à une inhibition ou à une toxicité. Cela est principalement dû à la liaison chimique des métaux lourds dans les enzymes, entraînant l'interruption de la structure et de l'activité enzymatique [288].

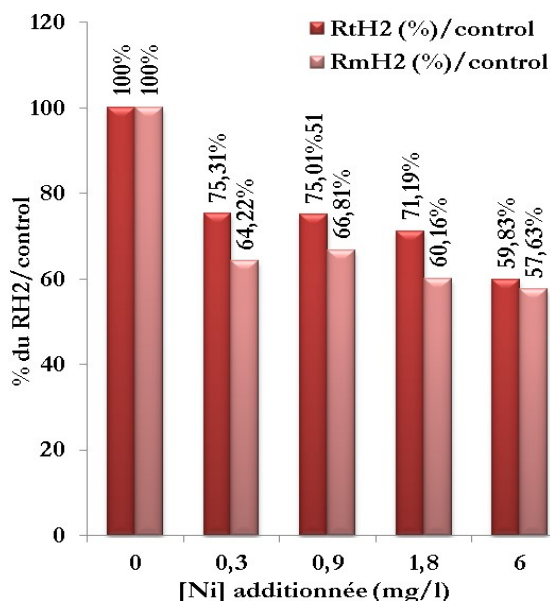


Fig.8.4 Effet de Ni^{2+} sur le pourcentage d'augmentation (%) du taux de production de l'hydrogène

8.2.2.2. Effet de Ni^{2+} sur le rendement de production de l'hydrogène

Les figures 8.5 et 6 montrent l'effet de Ni^{2+} sur les rendements (YH_2) exprimés en hydrogène produit par moles de glucose consommées et en pourcentage (%) par rapport au contrôle. Les résultats obtenus indiquent que le rendement (YH_2) diminue avec l'augmentation de la teneur en Ni^{2+} de 0 à 6 mg/l. En présence du nickel, le rendement d'hydrogène a peu changé avec l'augmentation de la concentration de Ni^{2+} de 0.3 à 1.8mg/l.

A une teneur en Ni^{2+} de 6 mg/l, une légère re-augmentation du rendement est observée. Ces résultats sont probablement la somme résultante d'un certain nombre de facteurs comme

l'efficacité de consommation de substrat, le pH et la croissance cellulaire. Cependant, le glucose consommé par les bactéries serait utilisé pour assurer la croissance et pour être dirigé vers diverses voies métaboliques. Il est à noter que le rendement en hydrogène maximal de 639.42 mmol/mol de glucose est obtenu dans l'essai témoin (contrôle).

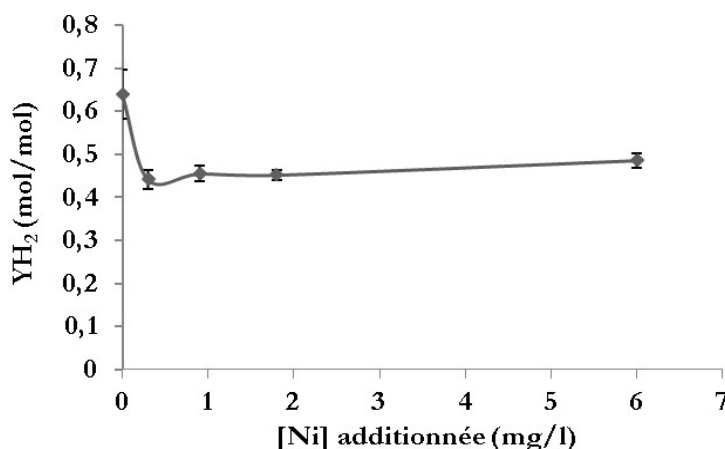


Fig.8.5. Effet de Ni^{2+} sur le rendement de la production de l'hydrogène

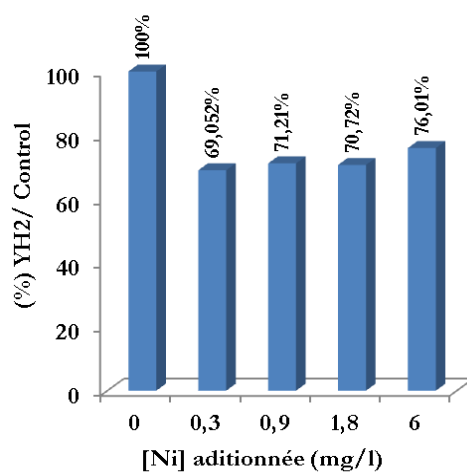


Fig.8.6. Effet de Ni^{2+} sur le pourcentage d'augmentation (%) d' Y_{H_2}

La concentration en glucose joue, donc, un rôle important sur le rendement et le taux de production de l'hydrogène [227]. Une faible concentration initiale en glucose résulte en un faible taux de production, et en un rendement élevé en hydrogène [244].

Wang et Wan [259] et Lin et Lay [289] ont montré que dans une gamme appropriée le Ni^{2+} augmente la capacité des cultures mixtes à produire de l'hydrogène mais à une concentration de Ni^{2+} beaucoup plus élevée, la production de l'hydrogène diminue [284].

8.3. Effet de Ni^{2+} sur la croissance cellulaire

8.3. 1. Effet de Ni^{2+} sur l'évolution de la croissance cellulaire

La figure 8.7 présente l'effet de la concentration des ions Ni^{2+} sur la croissance cellulaire d'*E. coli* ATCC 8739 en mode fermentaire. D'après les résultats obtenus, on constate que la cinétique de la croissance cellulaire varie en fonction de la concentration d'ions Ni^{2+} . Avec un accroissement de la concentration de Ni^{2+} de 0 à 1.8 mg/l, le taux de production cellulaire augmente. Une concentration maximale en biomasse est obtenue à une concentration de Ni^{2+} correspondante de 0.9 mg/l.

On peut constater que le nickel améliore la croissance cellulaire de la souche *E. coli* ATCC8739. Tandis qu'une teneur de Ni^{2+} de 6mg/l, et durant les premières 24h d'incubation, les cultures présentent une cinétique comparable à celle du témoin. Au delà, la vitesse et la concentration maximale en biomasse cellulaire diminue par rapport à celle du contrôle.

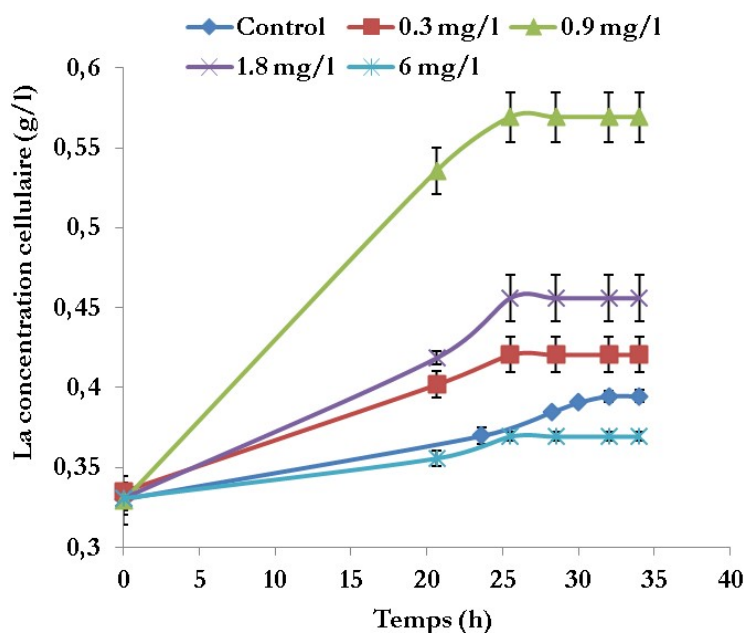


Fig.8.7. Effet de Ni^{2+} (mg/l) sur l'évolution de la croissance cellulaire

On peut également remarquer que la biomasse, formée dans les cultures avec nickel, atteint le palier de croissance, durant les 26 heures d'incubation, alors que la biomasse de la culture sans métal continue à croître au fil des heures jusqu'à la phase stationnaire. La présence de nickel, à des concentrations supérieures ou égales à 6 mg/l, agirait donc comme un inhibiteur de la croissance bactérienne.

8.3.2. Effet de Ni^{2+} sur le taux et le rendement de la croissance

Le rendement de production de biomasse est estimé en divisant la quantité de biomasse cellulaire produite par la quantité de glucose consommée. Les figures (8.8.a, b et c) illustrent, respectivement, l'effet de Ni^{2+} sur le taux de la croissance cellulaire, sur le rendement de la production en biomasse cellulaire et sur les proportionnalités d'augmentation des taux de production et du rendement en biomasse par rapport au contrôle.

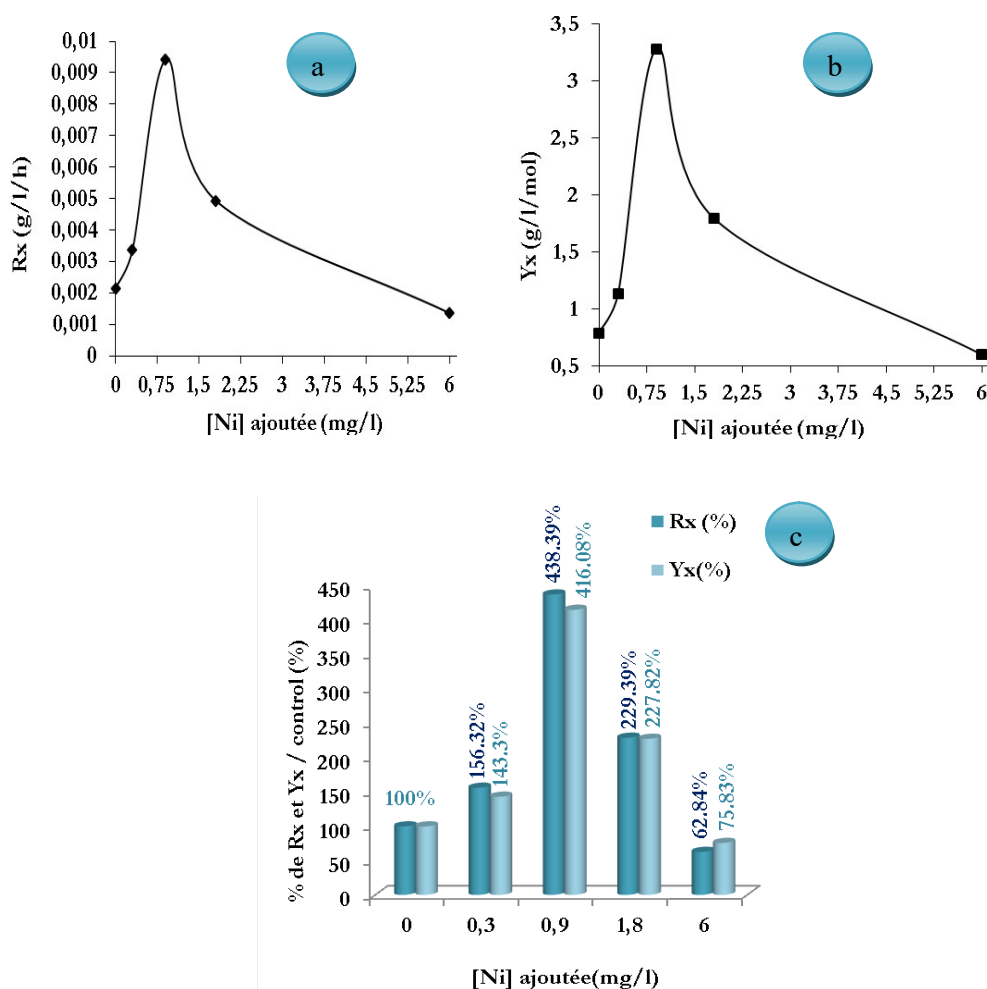


Fig.8.8. Effet de Ni^{2+} sur le rendement (a) et le taux (b) de la production en biomasse & sur le pourcentage d'augmentation (%) du taux (Rx) et du rendement (Yx) de production en biomasse (c)

Les résultats montrent que les taux et les rendements de production en biomasse augmentent avec l'élévation de la concentration de Ni^{2+} de 0 à 0.9 mg/l, ensuite ils diminuent jusqu'à inhibition de la croissance fermentaire de *E. coli ATCC 8739* à une teneur de Ni^{2+} (de 6 mg/l). Cela suggère que dans une gamme appropriée, le Ni^{2+} pourrait améliorer la croissance des bactéries productrices de l'hydrogène, mais à des concentrations beaucoup plus élevées, le Ni^{2+} réprimerait leur croissance. Les taux et les rendements de la croissance cellulaire les plus élevés sont obtenus à une concentration correspondante en Ni^{2+} de 0.9 mg/l. Il est à noter que, les valeurs du taux maximal (9,4 mg/l/h) et du rendement maximal de la croissance cellulaire (3.28 g/mol de glucose) obtenues dans cette étude, sont supérieures à celles rapportées dans la littérature. Egalement, la gamme de concentration en Ni^{2+} choisie dans cette étude est beaucoup plus faible que celles choisies par d'autres chercheurs.

En effet, à l'état de traces, le nickel est un élément nutritionnel indispensable pour la croissance des microorganismes [290]. Par contre, à des concentrations élevées, le nickel devient toxique et inhibe la croissance cellulaire [291]. Le nickel fait partie des métaux de transition, qui ont la capacité de générer des ions super-oxydés. Ces ions très réactifs ont un effet toxique qui se traduit par l'arrêt de la croissance cellulaire, via les peroxydes. Du fait des effets toxiques du nickel, les cellules contrôlent l'entrée du nickel, elles fixent le nickel intracellulaire avant de l'incorporer définitivement dans l'enzyme [292].

Contrairement à la croissance cellulaire, le nickel a un effet inhibiteur à la production de l'hydrogène. Ceci indique que les ions Ni^{2+} augmentent l'activité enzymatique de la $[\text{Ni-Fe}]$ hydrogénase 1 et 2 et non pas la $[\text{Ni-Fe}]$ hydrogénase 3. Nous rappelons que le taux maximal de la production de l'hydrogène obtenu à la concentration de Ni^{2+} de 0,9 mg/l est légèrement élevé par rapport aux autres essais contenant le nickel, mais qui reste toujours inférieur à celui du contrôle. Les raisons plausibles de cette élévation peuvent être liées à la croissance cellulaire qui serait maximale à cette concentration et à l'insertion des ions Ni^{2+} dans le site actif de la $[\text{Ni-Fe}]$ -hydrogénase 3 en influençant l'activité enzymatique.

8.3.3. Etude de la relation entre les cinétiques de croissance et de production de l'hydrogène

Pour étudier la relation entre les cinétiques de croissance et de production de l'hydrogène, nous comparons, sous les mêmes conditions opératoires, l'évolution de la croissance bactérienne (Fig. 8.7) et de la production de l'hydrogène (Fig.8.1) en fonction du temps.

Les résultats obtenus montrent que sous les différentes concentrations de Ni^{2+} , la production et la croissance évoluent simultanément en fonction du temps. Cependant, les ions Ni^{2+} n'influent pas sur le type du métabolisme de production de l'hydrogène (Type du métabolite de

l'hydrogène). L'hydrogène est donc un métabolite primaire associé à la croissance, la production de l'hydrogène est concomitante avec la croissance cellulaire.

8.4. Effet de Ni^{2+} sur l'efficacité de consommation de substrat

Dans ce présent travail, l'efficacité de consommation du substrat sera étudiée de deux façons, en suivant la consommation du glucose durant toute la fermentation et en évaluant l'efficacité de consommation finale de chaque essai.

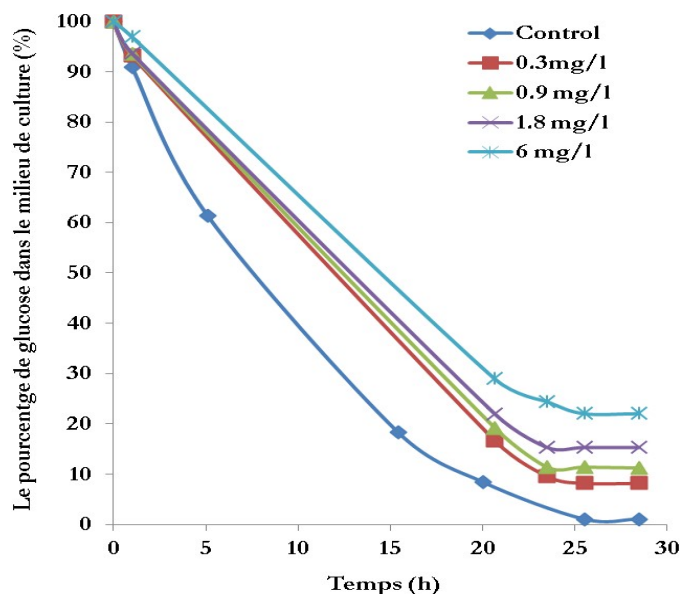


Fig.8.9. Effet de Ni^{2+} sur la consommation du glucose par *E. coli* ATCC 8739 en mode fermentaire

La Figure.8.9, illustre l'évolution du pourcentage de glucose dans les cultures d'*E. coli* ATCC 8739 contenant des concentrations de Ni^{2+} allant de 0–6 mg/l. Dans la gamme expérimentale étudiée, la consommation du glucose est fortement influencée par les ions Ni^{2+} . En absence du nickel, les bactéries consomment efficacement le glucose. L'efficacité de la dégradation du glucose au cours des premières heures de la fermentation diminue avec l'augmentation de la concentration de Ni^{2+} de 0-6 mg/l. Ces résultats indiquent qu'au cours de la production fermentaire de l'hydrogène et en présence du nickel, l'ajout d'une très faible concentration de Ni^{2+} a un grand effet sur l'efficacité des cultures de *E. coli* ATCC 8739 à consommer le glucose, ce qui explique la diminution des taux et des rendements de la production de l'hydrogène. Les métaux lourds inhibent l'activité de dégradation du glucose.

A la fin de la fermentation, le glucose est complètement dégradé en l'absence de métaux lourds (99%). A des faibles concentrations de Ni^{2+} allant de 0.3- 0.9 mg/l, l'efficacité de

consommation du glucose par *E. coli* ATCC 8739 est relativement élevé, elle se situe entre 91,79 et 88,81% (Fig.8.10). A de fortes concentrations des métaux, la dégradation de glucose est trop affectée par la présence du nickel dans le milieu de culture, elle correspond à 77,93%. Il apparait que le degré d'inhibition de l'efficacité de consommation du glucose par le nickel augmente avec l'élévation de la concentration en métaux lourds.

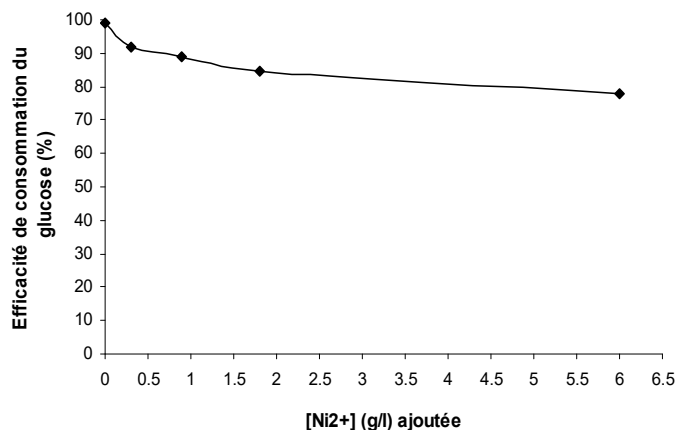


Fig.8.10. Effet de Ni^{2+} sur l'efficacité de consommation du glucose par *E. coli* ATCC 8739

Malgré que les bactéries consomment peu de glucose et que leur croissance cellulaire est beaucoup plus faible à une concentration de 6mg/l de Ni^{2+} , leur rendement en hydrogène est presque stable, cela indique que les bactéries conservent leur activité métabolique. Par ailleurs, une faible concentration en glucose consommé conduit à un rendement élevé en hydrogène.

Nos résultats sont similaires à ceux obtenus par Chenlin et al [284], et Li et Fang [284], qui rapportent que l'efficacité de dégradation du substrat diminue avec l'augmentation de la concentration en Ni^{2+} de 0 à 50 mg/l. Ces résultats sont en contradiction avec de ceux trouvés par Wang et Wan [259] qui rapportent que le Ni^{2+} (0-50 mg/l) a peu d'effets sur la dégradation du substrat.

L'efficacité de la dégradation du substrat obtenu dans cette étude est plus élevée que celle obtenue par Junyapoon et al [234], qui utilisent la souche *E. coli* S3 (83.33%). Cela suggère que la souche *E. coli* ATCC8739, utilisée dans cette étude, présente une forte capacité à dégrader le substrat. Pour Wang et Wan [259], une efficacité de la dégradation du substrat de 98,0% est obtenue par les cultures mixtes, qui reste stable avec une augmentation des concentrations de Ni^{2+} de 0 à 50 mg/l.

8.5. Effet de Ni^{2+} sur le changement du pH

Dans ce présent travail, l'évolution du pH, au cours de la fermentation, à des concentrations de Ni^{2+} allant de 0 – 6 mg/l est suivie et illustrée dans la Figure.8.11. Les résultats montrent que, le pH final de tous les essais est inférieur au pH initial, et se situe entre 4,93 et 4.54.

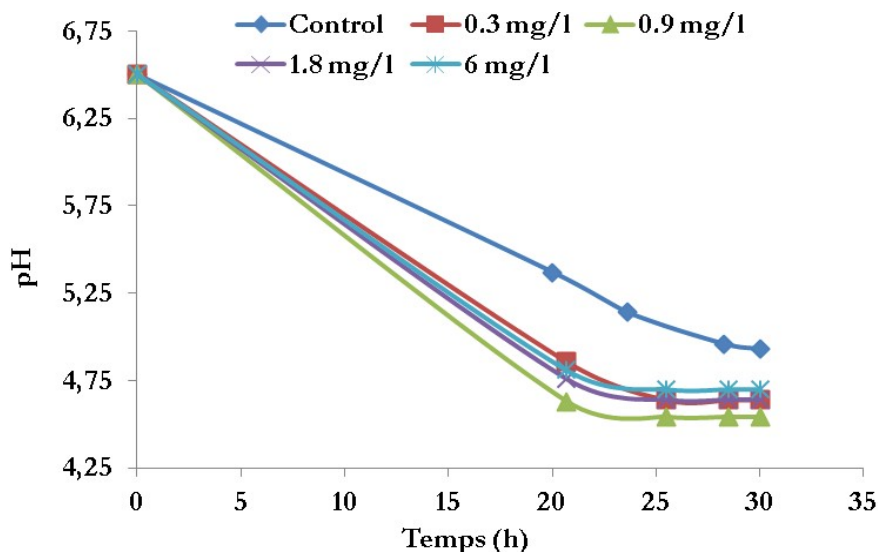


Fig.8.11. Effet de Ni^{2+} (mg/l) sur l'évolution du pH au cours de la fermentation

La Figure.8.12, illustre l'évolution de la valeur du pH final en fonction des différentes concentrations de Ni^{2+} . Les résultats montrent que la valeur du pH final a tendance à diminuer (d'un pH de 4,93 à un pH de 4,54), pour des concentrations de Ni^{2+} allant de 0- 0,9 mg/l. Une élévation progressive de la valeur finale du pH à 4,7 est ensuite observée pour des concentrations de Ni^{2+} de 0,9-6 mg/l. Il est à noter que cette valeur du pH et qui reste toujours inférieure à celle du contrôle. L'évolution de la valeur finale du pH est liée simultanément à l'évolution de la cinétique de croissance bactérienne et à la production de l'hydrogène.

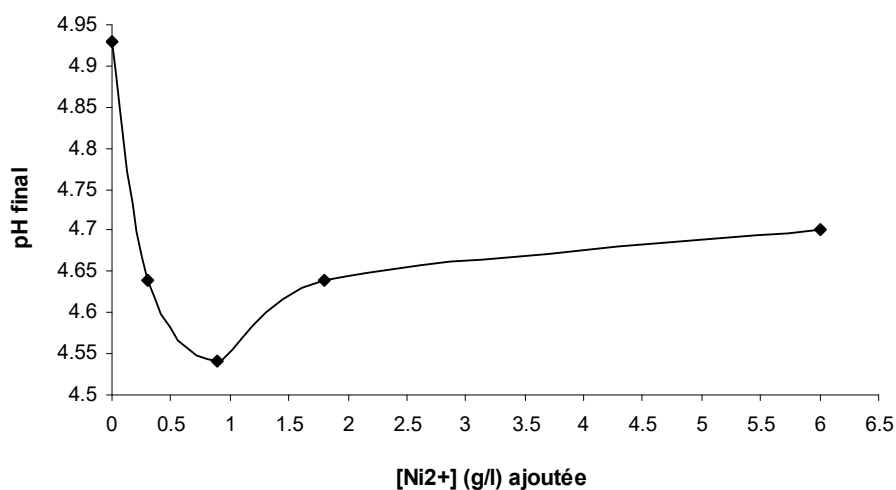


Fig8.12. Evolution de la valeur final du pH en fonction des différentes concentrations de Ni^{2+}

D'après nos résultats, si nous nous intéressons à l'évolution de la cinétique de croissance il apparaît que le nickel, dans une gamme appropriée, est nécessaire pour la croissance des bactéries. Il n'induit pas une inhibition de la croissance cellulaire, mais, il améliore efficacement les conditions de croissance et donc le métabolisme fermentaire des microorganismes, en produisant des acides organiques, qui contribuait ainsi à diminuer le pH. La valeur la plus faible du pH final est de 4.54, obtenu à une concentration de 0.9 mg/l, c'est celle qui correspond au pH final de la culture donnant le plus grand taux et rendement de croissance. A cette concentration, les voies métaboliques sont dirigées vers la croissance cellulaire et la production des sous produits de fermentation, autres que l'hydrogène.

De la même manière, si nous nous intéressons à l'évolution de la cinétique de la production de l'hydrogène dans les différents essais. Les résultats montre que :

- (i) Le taux et le rendement en hydrogène à différentes concentrations de Ni^{2+} sont plus faibles que les valeurs obtenues pour le témoin, suite aux valeurs du pH final de l'ordre de 4.54 à 4.7. De telles valeurs du pH obtenues pouvaient réprimer l'activité des bactéries à produire de l'hydrogène,
- (ii) A une concentration de Ni^{2+} de 6 mg/l, le potentiel en hydrogène produit est presque stable et le rendement en hydrogène obtenu est légèrement élevé, par rapport aux autres essais contenant le nickel et ce malgré que, les bactéries consomment peu de glucose et que leurs croissance cellulaire est beaucoup plus faible. A cette concentration de Ni^{2+} (6 mg/l), la valeur du pH final est la plus élevée (de 4.7) par rapport aux autres essais contenant le nickel, ce qui a provoqué une légère élévation du rendement en hydrogène et une stabilité du potentiel de production de l'hydrogène.

Le pH favorable pour la production fermentaire d'hydrogène est situé entre 5,2 et 7,0. Un pH inférieur ou bien supérieur aux valeurs favorables peut réduire l'activité des bactéries productrices de l'hydrogène. Ces résultats sont similaires à ceux rapportés par Li et Fan [82].

La valeur du pH final obtenue dans cette étude (4.54 à 4.7) est supérieure à celle obtenue par Morimoto et al. (pH= 4) [293]. Il est inférieur à la valeur obtenue par Wang et Wan [259] et Junyapoon et al [234] de 4,6 à 6,1 et de 5.05, respectivement. Ce résultat indique que, le Ni^{2+} présente un grand impact sur le pH final en fonction des conditions de culture et de la souche étudiée.

8.6. Etude comparative entre la réponse des bactéries productrices de l'hydrogène aux différentes concentrations en Ni^{2+}

Peu d'études rapportent l'effet du nickel sur la production fermentaire de l'hydrogène (fermentation sombre et photofermentation). Les résultats obtenus indiquent que la croissance bactérienne et la production de l'hydrogène par *E. coli ATCC 8739* sont grandement influencées par les différentes concentrations en Ni^{2+} . La croissance des bactéries fermentaires productrices de l'hydrogène est améliorée par l'addition du Ni^{2+} en traces. L'ajout du Ni^{2+} à des concentrations plus ou moins faibles conduit à une inhibition de la production de l'hydrogène. Il est à noter que les résultats attendus dépendent de la souche étudiée, de la nature et de la concentration du substrat utilisé ainsi que des conditions opératoires suivies.

8.7. Conclusion

Dans ce présent travail, l'effet de la concentration de Ni^{2+} allant de 0 à 6 mg/l sur la production fermentaire de l'hydrogène par *E. coli ATCC8739* a été étudié. Les résultats ont montré que, le Ni^{2+} réduit le taux, le potentiel de production de l'hydrogène et le rendement de l'hydrogène avec l'augmentation de la concentration de Ni^{2+} . La valeur de CI 50, est de 6 mg/l. A cette concentration, le volume cumulatif diminue de 50% par rapport au contrôle. Le Ni^{2+} affaiblit l'efficacité de dégradation du substrat.

L'augmentation de la concentration de Ni^{2+} de 0 à 0,9 mg/l améliore le rendement de production de biomasse. Un taux maximal de 9,4 mg/l/h et un rendement maximal de production de biomasse bactérienne de 3.28 g/mol de glucose ont été obtenus. Dans tous les essais, le pH final constaté est inférieur au pH initial, sa valeur affecte substantiellement l'efficacité de production de l'hydrogène.

Chapitre 9.

Production de l'hydrogène par

R. sphaeroides CIP 60.6

Sommaire

9.1. Préactivation de la culture pour la production d'hydrogène	169
1. 1. Choix du milieu de base pour la production de l'hydrogène.....	169
1.2. Choix de l'âge de la culture.....	170
9. 2. Effet de l'intensité de la lumière sur les caractéristiques de croissance et sur la production de l'hydrogène.....	171
9. 3. Etude de la faisabilité de l'utilisation du modèle Luedeking-Piret" LP" pour la détermination du type de l'activité métabolique de la production de l'hydrogène	173
9 .4. Cinétique de croissance et de production de l'hydrogène.....	176
9. 5. L'accélération du taux de production de l'hydrogène.....	178
9.6. Le modèle de Gompertz modifié (La régression non linéaire des données expérimentales).....	179
9.7. Effet du pH sur la production d'hydrogène au cours de photofermentation.....	183
9.8. Effet de la pression partielle de l'hydrogène et de l'agitation	184
9.9. Etude comparative des données sur la production de l'hydrogène avec les différentes souches de <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	186
9.10. Conclusion.....	186

Le potentiel de production de l'hydrogène par la souche *R. sphaeroides* CIP 60.6 n'a pas été rapporté dans la littérature. Par conséquent, ce travail est effectué pour étudier l'effet des propriétés physico- chimiques sur les caractéristiques de la croissance et de la production de l'hydrogène par cette souche bactérienne photofermentaire et d'évaluer sa capacité de production par rapport aux autres souches de *R. sphaeroides*.

9.1. Préactivation de la culture pour la production d'hydrogène

9.1.1. Choix du milieu de base pour la production de l'hydrogène

Certains composants du milieu de base ont un effet sur la production de l'hydrogène. Pour choisir entre les deux milieux de base asy et Sistrome A, une étude de la cinétique de croissance bactérienne est obligatoire. Les taux spécifiques de croissance de *Rhodobacter sphaeroides* cultivées dans le milieu Sistrom A et dans le milieu asy, sous une intensité de 1500 Lux, sont représentés dans la Figure 9.1. Il apparaît que le milieu asy confère aux bactéries une cinétique de croissance avec un taux spécifique de croissance μ_{\max} de 0.007 h^{-1} , supérieur à celui obtenu avec le milieu Sistrom A de 0.004 h^{-1} .

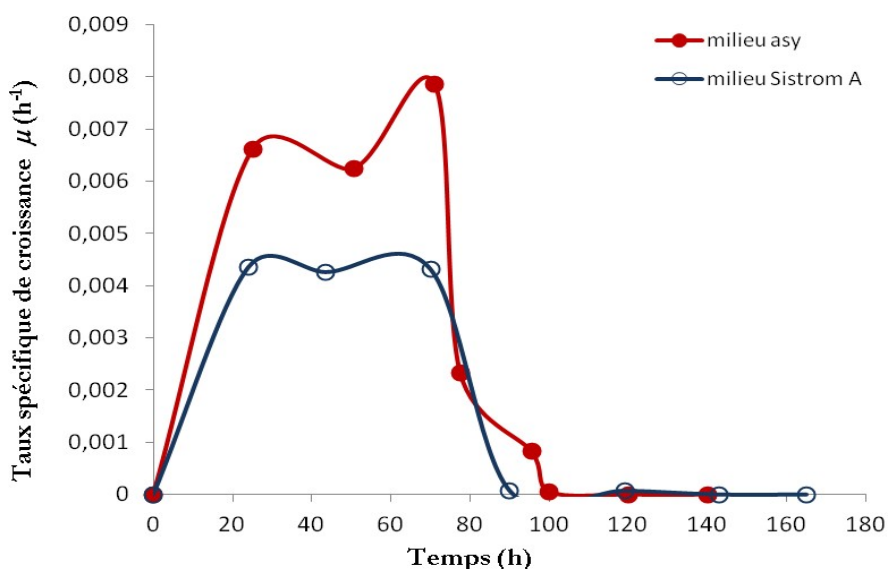


Fig. 9.1. Taux spécifique de croissance bactérienne dans le milieu basal

Le milieu Asy est plus riche en molybdène, en solution tampon KH_2PO_4 et K_2HPO_4 par rapport au milieu Sistrom A. Ces éléments sont, respectivement, nécessaires pour activer la nitrogénase, et pour maintenir le pH du milieu à une valeur constante (Tableau 4.2.1. et Tableau 4.2.4). Par ailleurs, ce milieu contient presque la même quantité à une différence près d'EDTA qui est connu comme inhibiteur de l'activité de l'hydrogénase. Il contient aussi moins de vitamines à savoir, la biotine, la thiamine et la nicotine, par rapport au milieu Sistrom A.

Pour toutes ces raisons, nous choisirons d'utiliser le milieu asy pour la préculture des bactéries destinées à la production de l'hydrogène, afin d'accélérer la croissance bactérienne, d'augmenter le taux de production de l'hydrogène et enfin de réduire le coût du milieu. Ce milieu a d'ailleurs été recommandé par plusieurs chercheurs, comme Toshihiko Kondo et al [62], Eijunakada et al [157], Heguang Zue et al [59], Jun Miyake et al [209] et Yasuo Asada et al [185].

9.1.3. Optimisation de l'âge de la culture bactérienne

L'âge de la culture bactérienne est un paramètre critique pour la production d'hydrogène. L'optimisation de ce paramètre augmente la vitesse de production de l'hydrogène et le volume total de l'hydrogène produit [34,294].

Pour cela, nous avons préactivé la culture bactérienne dans le milieu GL, pour induire les bactéries à produire de l'hydrogène. Elles serviront à inoculer les photobioréacteurs [157,295, 296]. Le choix de l'inoculum n'est pas lié à sa densité cellulaire mais à l'âge de cette culture, sachant qu'une très grande concentration initiale diminuerait la production de l'hydrogène [2, 34, 178,295].

Dans ce travail, nous avons prélevé l'inoculum après un temps d'incubation compris entre 28h à 48h. Pendant cette phase, la vitesse de multiplication est constante, les bactéries se multiplient jusqu'à atteindre un taux spécifique de croissance maximal (μ_{max} de 0.019 h^{-1}) observé au bout de 36h d'incubation et qui correspond à la mi- phase exponentielle de croissance (Fig.9.2).

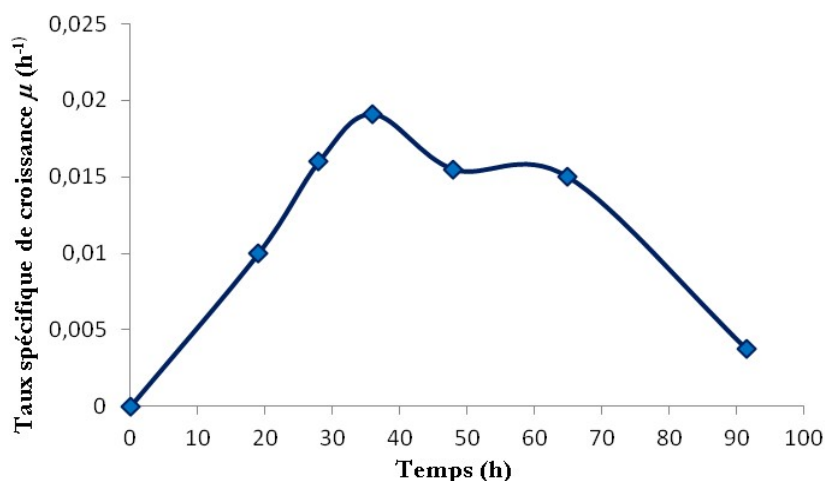


Fig.9.2. Optimisation de l'âge de la culture bactérienne

L'optimisation de l'âge de l'inoculum permet le passage direct vers la phase exponentielle de la croissance bactérienne au sein du réacteur, l'augmentation du taux de production et la réduction du temps de début de production d'hydrogène (temps de retard). Selon Harun Koku et al [34], le prélèvement de l'inoculum en phase exponentielle et en phase stationnaire de la culture d'inoculation abouti à des résultats remarquablement différents en termes de volume totale de l'hydrogène produit, du taux de production et de l'efficacité de conversion du substrat.

9. 2. Effet de l'intensité de la lumière sur les caractéristiques de croissance et sur la production de l'hydrogène

Sous des intensités lumineuses inférieures à 8500 lux, la culture bactérienne présente une couleur brune rouge. Toutefois, lorsque la lumière est excessive, la culture se tournera vers une couleur rouge-rose pour les premières 48 heures d'incubation et progressivement se transforme en une couleur clair brune à 8500 lux, pendant toute la durée d'incubation. Ce phénomène est lié à la diminution de la quantité de pigments synthétisée, car les bactéries deviennent photosensibles.

La perte des bactériochlorophylles chez les différentes souches de *R. sphaeroides*, sous des intensités élevées au cours de la photo-incubation, a été rapportée par de nombreux chercheurs [177,297, 298].

L'effet de l'intensité lumineuse sur la cinétique de croissance cellulaire de *R. sphaeroides* CIP 60.6 est représenté dans la Fig. 9.3. On peut observer que les cellules cultivées sous une intensité lumineuse trop élevée atteignent le plus haut taux de croissance cellulaire. Un résultat similaire a été rapporté par Nakada et al. [157]. Comme on peut le voir sur la figure.9.3, la concentration en biomasse finale de *R. sphaeroides* CIP 60.6 n'est pas proportionnelle avec l'intensité de l'éclairage.

Comme pour la croissance, une intensité lumineuse croissante entraîne une augmentation de la production de l'hydrogène (Fig. 9.4). La lumière est un facteur très important pour la production de l'hydrogène, de sorte qu'il peut devenir un facteur limitant de la croissance. Des résultats similaires ont été rapportés par Ko et Noike [211]. Le volume total de l'hydrogène produit n'est pas proportionnel à l'intensité d'éclairage. Un résultat similaire a été signalé par Uyar et al. [299] en utilisant *R. sphaeroides* O.U.001. La période de photofermentation est réduite de 146 h à 141 ± 1 h, avec l'augmentation de l'intensité lumineuse. A des faibles intensités lumineuses (≤ 1000 lux), le temps de latence est long, il diminue avec l'augmentation du taux de la croissance cellulaire qui augmente avec l'accroissement de l'intensité lumineuse. À 8500 lux, le temps de début de production de l'hydrogène augmente car les bactéries deviennent photosensibles. Dans ce présent travail, le temps de latence varie de 10 à 24 h.

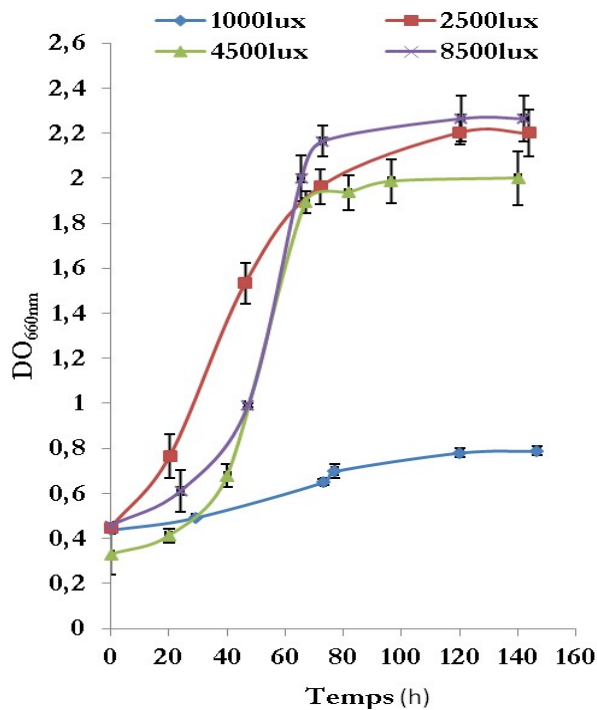


Fig. 9.3. L'effet de l'intensité lumineuse sur la croissance cellulaire.

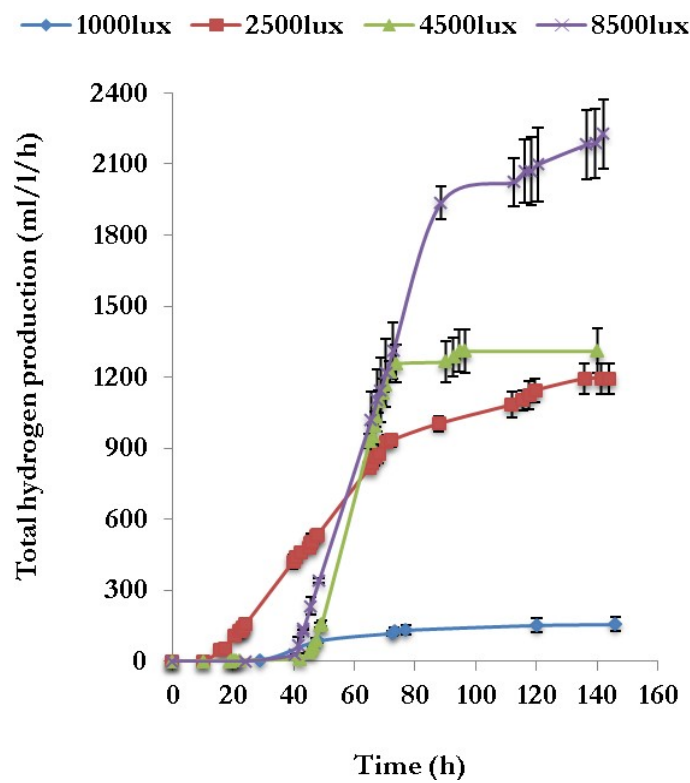


Fig. 9.4. L'effet de l'intensité lumineuse sur la production de l'hydrogène.

9.3. Etude de la faisabilité de l'utilisation du modèle Luedeking-Piret'' LP'' pour la détermination du type de l'activité métabolique de la production de l'hydrogène

Les courbes de la concentration cellulaire et la production de l'hydrogène en fonction du temps, sous diverses intensités lumineuses (1000, 2500, 4500 et 8500 lux) sont illustrées dans les figures. 9.3 et 9.4, respectivement. Ces courbes ont montré que l'hydrogène est un métabolite produit à la fois en phase exponentielle et dans certaines conditions en phase stationnaire. Ceci est lié à l'intensité lumineuse et à l'activité métabolique. Au cours de la phase stationnaire le taux de production de l'hydrogène diminue avec l'arrêt de la croissance cellulaire sous une intensité lumineuse de 2500 lux, elle devient nulle sous un éclairage très faible (1000 lux). Par contre, il reste maximal et linéaire pendant un intervalle de temps avant qu'il diminue sous des intensités supérieures à 2500 lux. En phase stationnaire, la vitesse de production de l'hydrogène devient supérieure à celle obtenue en phase exponentielle, sous des intensités lumineuses excessives. Au cours de la phase stationnaire la croissance cellulaire est presque constante, mais les cellules gardent leur activité métabolique [210]. Par conséquent, les cellules en culture et les cellules au repos peuvent produire de l'hydrogène.

Les résultats expérimentaux obtenus dans le présent travail ont été simulés au modèle de Luedeking-Piret'' LP'' [300, 301] pour déterminer le métabolisme de production de l'hydrogène photofermentative par *R. sphaeroides* CIP 60,6:

$$v = \alpha\mu + \beta \quad (9.1)$$

Avec:

v , le taux spécifique de production (h^{-1});

μ , le taux spécifique de croissance (h^{-1});

α , coefficient associé à la croissance et

β , le coefficient non-associé à la croissance (h^{-1}).

Dans la littérature, le modèle Luedeking-Piret était largement utilisé pour décrire la relation entre le taux de croissance des bactéries fermentaires et le taux de formation des sous produit de la fermentation, tels que les acides organiques et les alcools. Aucun travail n'a rapporté la faisabilité d'utiliser ce modèle pour décrire la relation entre le taux de croissance des bactéries productrices de l'hydrogène et le taux de production de l'hydrogène, ainsi que l'effet de l'intensité lumineuse sur le type de l'activité métabolique de ces bactéries. La méthode de modélisation linéaire « modèle Luedeking-Piret » a été utilisée pour la première fois avec le principal objectif de parvenir à une conduite raisonnée et optimisée des processus microbiens sur la connaissance des métabolismes liés aux interactions entre la population microbienne et les conditions opératoires. Dans ce présent travail, la croissance bactérienne et la production de l'hydrogène ont été

étroitement mesurées pendant toute la photofermentation. La densité bactérienne est exprimée en (x), et la concentration du produit ou de l'hydrogène est exprimée en (p). Le taux de croissance spécifique est calculé comme $(1/x) (dx/dt)$. Le taux spécifique de production d'hydrogène est donnée par le produit $(1/x) (dp/dt)$. Les taux instantanés de croissance et de la formation de l'hydrogène ont été déterminés par différenciation graphique des courbes des valeurs calculées à partir des mesures initiales de la production de l'hydrogène et de la densité optique cellulaire en fonction du temps. On détermine le taux spécifique de la croissance et de la formation de l'hydrogène en divisant les taux instantanés par (x), avec (x) représentant la densité bactérienne à ce moment-là.

Les taux spécifiques de la croissance et de la production de l'hydrogène, sont une mesure de détection de l'activité métabolique des cellules individuelles, si les phases de latence sont ignorées.

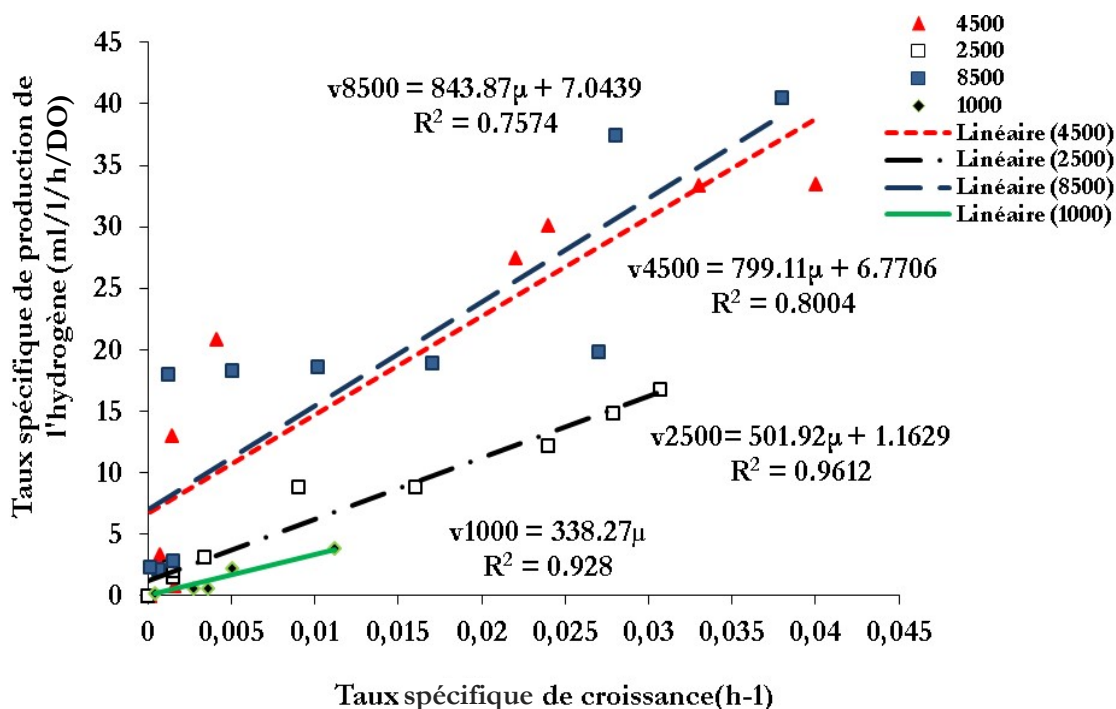


Fig. 9.5. Le modèle de Leudeking pour les cinétiques de production de l'hydrogène par *Rhodobacter sphaeroides* CIP 60.6.

Quand les valeurs expérimentales de (v) sont tracées en fonction de (μ), (Figure 9.5). On remarque que leurs points se situent à proximité d'une ligne droite, ce qui confirme la validité de l'équation (9.1). Les constantes (a) et (β) sont déterminés à partir de la figure. 9.5, où (a) est la pente de la droite et (β) est l'ordonné à l'origine.

Un bon ajustement est évalué en fonction de la valeur supérieure du coefficient de détermination (R^2). Il a été observé que le profil de production de l'hydrogène à 1000 lux et à 2500 lux obtenu à partir du "modèle" LP est en bon accord avec les résultats expérimentaux trouvés. Toutefois, le "modèle LP" pour l'accumulation de l'hydrogène a donné un accord raisonnable entre les résultats théoriques et expérimentaux effectués à 4500 lux, et qui disposent d'une meilleure qualité des données que celle à 8500 lux.

Dans cette étude, l'hydrogène produit par *R. sphaeroides* CIP 60.6 est un métabolite mixte associé et non associé à la croissance, sous une illumination supérieure ou égale à 2500 lux. Bazak et Das [302] ont rapporté que l'hydrogène est un produit mixte de croissance pour les bactéries PNS *R. sphaeroides* OU001.

A notre connaissance, ce travail est une première étude qui révèle qu'à des faibles intensités lumineuses (1000 lux), l'hydrogène est un métabolite associé à la croissance de la souche *R. sphaeroides* CIP 60.6 ($\beta = 0$). Aucune étude similaire n'a signalé l'effet de l'éclairage sur le mode de production de l'hydrogène des autres souches productrices de l'hydrogène.

Le taux de production de l'hydrogène est proportionnel en même temps au taux de croissance et à la concentration cellulaire. Les valeurs (α) et (β) de *R. sphaeroides* CIP 60,6 dépendent des conditions physico-chimiques, et de la manière dans laquelle (α) et (β) varie avec l'intensité lumineuse peut être vu à partir de la Figure 9.6 [301]. Les valeurs des coefficients (α) et (β) augmentent avec l'élévation de l'intensité lumineuse. A une intensité lumineuse égale ou supérieure à 4500 lux, les valeurs de ces deux coefficients restent équilibrées. Dans ces conditions le métabolisme est dit secondaire.

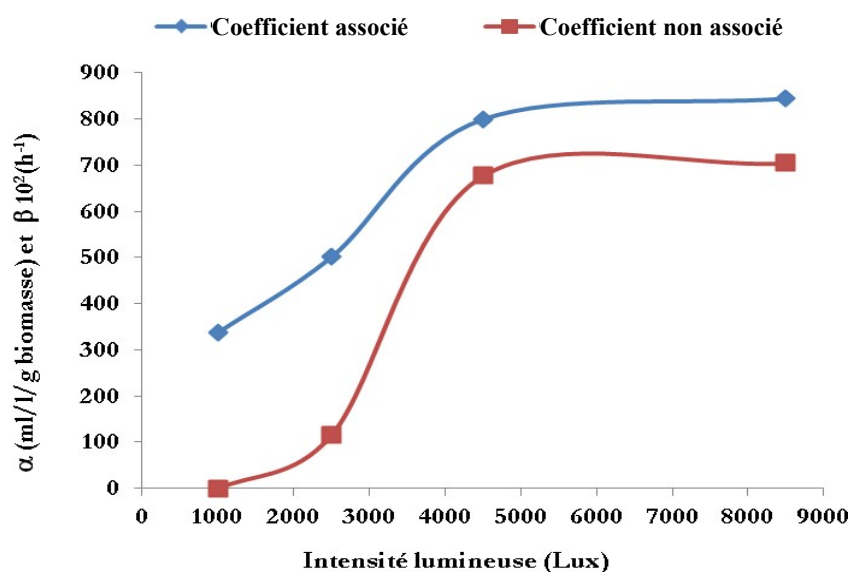


Fig.9.6 La variation de (α) et (β) avec l'intensité lumineuse

9. 4. Cinétique de croissance et de production de l'hydrogène

La performance globale d'une réaction microbiologique, telle la production photobiologique de l'hydrogène a été déterminée par une mesure de la cinétique de croissance et de la production de l'hydrogène, qui a été résolue par le calcul des taux maximaux " $R_{x_{max}}$ ", " $R_{p_{max}}$ ", et des taux moyens (productivité totale) " R_{xt} ", " R_{pt} ", respectivement. La définition des taux moyens " R_{xt} ", " R_{pt} " et des taux maximaux " $R_{x_{max}}$ ", " $R_{p_{max}}$ " sont respectivement indiquées comme suit:

$$R_{x_t} = \frac{\text{Masse cellulaire finale (DO)}}{\text{Temps (h)} \times \text{volume (l)}} \quad (9.2)$$

$$R_{p_t} = \frac{\text{Volume total de l'H}_2 \text{ produit (ml)}}{\text{Temps (h)} \times \text{volume de la culture (l)}} \quad (9.3)$$

$$R_{x_{max}} = \frac{dx_{max}}{dt_{max}} \quad (9.4)$$

$$R_{p_{max}} = \frac{dp_{max}}{dt_{max}} \quad (9.5)$$

Les valeurs de x_1 , x_2 (OD) et p_1 et p_2 (ml / l), sont des concentrations distinctes des cellules bactériennes et de l'hydrogène produit dans la phase exponentielle, respectivement.

La figure 9.7 résume, à la fois la cinétique de croissance et de la production de l'hydrogène (taux maximum et moyen) qui augmentent avec l'amélioration de l'intensité lumineuse, de plus, l'augmentation de l'intensité lumineuse à partir de 4500 lux à 8500 lux, n'a pas montré une différence significative dans le taux de production de l'hydrogène. Dans un réacteur cylindrique, la production optimale de l'hydrogène par *R. sphaeroides* CIP 60,6 est à une intensité lumineuse de 4500 - 8500 lux.

Les intensités lumineuses élevées supérieures à l'optimum (4500 lux) n'ont pas d'effet photo-inhibiteur sur le taux de production de l'hydrogène, mais un effet de saturation observée à des intensités en excès, en raison de l'effet d'ombre qui se présente lorsque la pénétration de la lumière est limitée à l'intérieur du réacteur par les pigments qui apparaissent avec l'augmentation de la concentration cellulaire (Fig.9.7.a). L'effet de saturation a été rapporté par de nombreux auteurs, avec *R. sphaeroides* OU001 [299] et *R. sphaeroides* RV [302] sous des intensités lumineuses de 4000 lux et 8500 lux, respectivement.

Dans cette étude, le taux maximum de la croissance cellulaire de *R. sphaeroides* CIP 60,6 augmente jusqu'à 22% à 8500 lux par rapport à celui à 4500 lux. Cette augmentation obtenue lors de la saturation de la production de l'hydrogène, lorsque la lumière est limitée dans la partie profonde du réacteur, est susceptible d'être liée à la physiologie de la cellule (Fig.9.7.b). Dans ces

conditions, cette souche développe son système photosynthétique pour capter l'énergie lumineuse nécessaire et suffisante pour sa croissance [93]. Contrairement à *R. sphaeroides* CIP 60,6 sous une intensité lumineuse supérieure à l'optimale, une saturation de la croissance en biomasse est observée chez *R. sphaeroides* OU001, [93,304, 301].

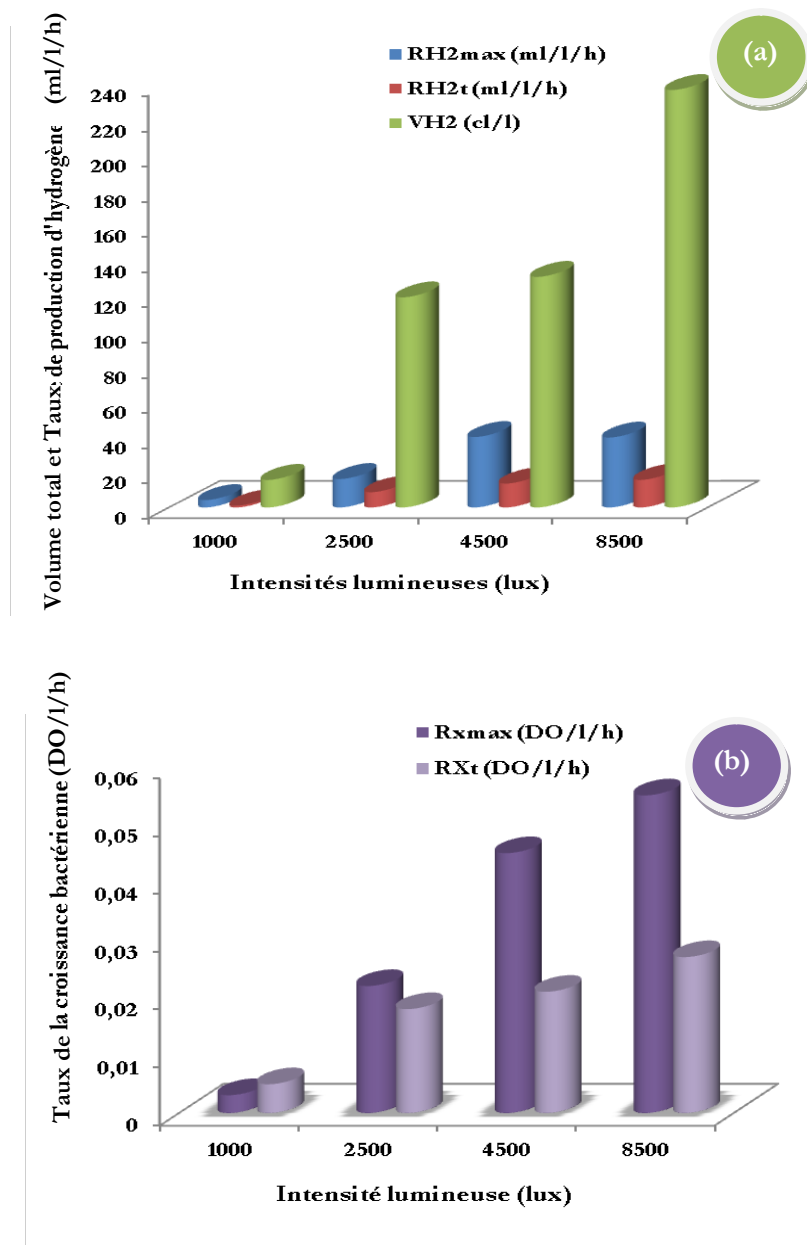


Fig.9.7. Taux de la production d'hydrogène (a) et de la croissance de *R. sphaeroides* CIP 60,6(b)

Contrairement aux cinétiques de croissance et de production de l'hydrogène, le volume total de l'hydrogène produit n'est pas proportionnel à l'intensité de l'éclairage (Fig.9.7.a). Dans la

littérature plusieurs travaux rapportent les mêmes observations mais aucune interprétation n'a été donnée. Ces auteurs choisissent une l'intensité optimale de 4000-4500 Lux, car les même taux de production seront obtenus à des intensités excessives (8500Lux), « effet de saturation » [93,299, 301, 302, 304].

9. 5. L'accroissement du taux de production de l'hydrogène

Nous avons cherché à comprendre d'une part pourquoi chez *R. sphaeroides* CIP 60,6 le volume de l'hydrogène produit à 4500 lux augmente seulement de presque 9% alors que son taux de production de l'hydrogène est maximal et augmente jusqu'à 203% par rapport à celui à 2500 lux, et d'autre part à identifier le (ou les) facteur(s) responsable(s) de la réponse bactérienne de cette souche durant ces conditions physico-chimiques. Il est possible que sous ces conditions expérimentales la photoproduction de l'hydrogène par la nitrogénase soit affectée. Pour cela nous avons étudié l'évolution dans le temps du taux de production de l'hydrogène au cours de la photofermentation à différentes intensités lumineuses.

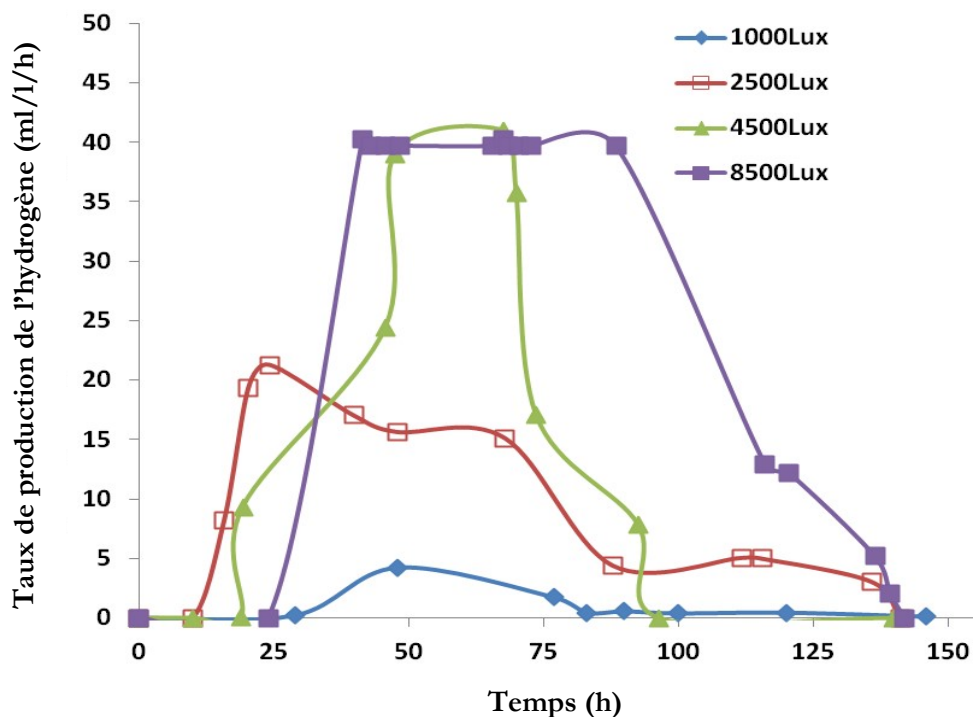


Fig.9.8. Évolution dans le temps du taux de production d'hydrogène au cours de photofermentation à différentes intensités lumineuses.

Cette étude, nous a permis de mieux comprendre le comportement et l'activité productrice de cette souche afin de trouver les causes de cette modification. Les courbes des taux de production

de l'hydrogène en fonction du temps sont illustrées sur la Figure 9.8. Ces courbes montrent que le taux de production de l'hydrogène est important dans la phase logarithmique, et il devient supérieur en phase stationnaire avec l'augmentation de l'intensité lumineuse. Par ailleurs, les taux de production de l'hydrogène baissent, rapidement à 1000 lux et progressivement à 2500 lux, après avoir atteint un pic correspondant à un taux de production de l'hydrogène élevé. Cependant, à 8500 lux, le taux de production d'hydrogène reste très élevé pendant une longue période, par rapport à celui à 4500 lux, où une baisse drastique a été observée, jusqu'à la fin de la photofermentation. Elle est susceptible d'être provoquée par l'intensité lumineuse qui fournit plus d'ATP et de forces réductrices produites par les pigments synthétisés en excès, à 4500 lux, affecte l'activité enzymatique de la nitrogénase. Par ailleurs, Kondo et al. [62] ont rapporté que la saturation en lumière aurait pu se produire lorsque les pigments produisent en excès l'ATP et Fd_{red} par rapport à la capacité de la nitrogénase [301]. En conséquence, la compréhension du mécanisme de production de l'hydrogène par *R. sphaeroides CIP 60,6* serait importante dans l'optique d'utiliser ces souches pour la production du biohydrogène. L'intensité d'éclairage recommandée doit être comprise au sein d'un intervalle de 4500 - 8500 lux.

9.6. Le modèle de Gompertz modifié (La régression non linéaire des données expérimentales)

Les données expérimentales de formation de l'hydrogène, à différentes intensités de la lumière, par *R. sphaeroides CIP 60,6* représenté à la (Fig. 9.4), ont été corrélées avec une équation de Gompertz modifiée [304]. Les constantes de l'équation de Gompertz modifiés (H , P , R_m et λ), qui figurent dans le (tableau 9.1), ont été déterminés par l'analyse de la régression non linéaire afin de vérifier l'exactitude et l'accord des prédictions du modèle (Équation (9.6)) avec les résultats expérimentaux (hydrogène totale produit et R_{pmax} calculée à l'aide de l'équation (9.5)). L'Équation modifiée de Gompertz a la forme suivante.

$$H = P \exp \left\{ - \exp \left[\frac{R_m \cdot e}{P} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (9.6)$$

Avec :

H , représente la production d'hydrogène cumulé (ml);

P , le volume maximum de formation de l'hydrogène (ml);

R_m , taux maximum de la formation de l'hydrogène ($ml\ h^{-1}$) et

λ , la durée du temps de retard (h).

En comparant les données expérimentales avec les valeurs prédites, résumées dans le (tableau 9.1), il a été constaté que l'écart était à l'intérieur d'une gamme de 0,7-1,6% et de 13 à 33,7% pour l'hydrogène totale produit et la vitesse maximale de production de l'hydrogène, respectivement, ce

qui indique relativement un bon accord entre les résultats expérimentaux et les prédictions du modèle.

Tableau.9.1. Les constantes de l'équation de Gompertz Modifié et les valeurs expérimentales pour les différentes intensités.

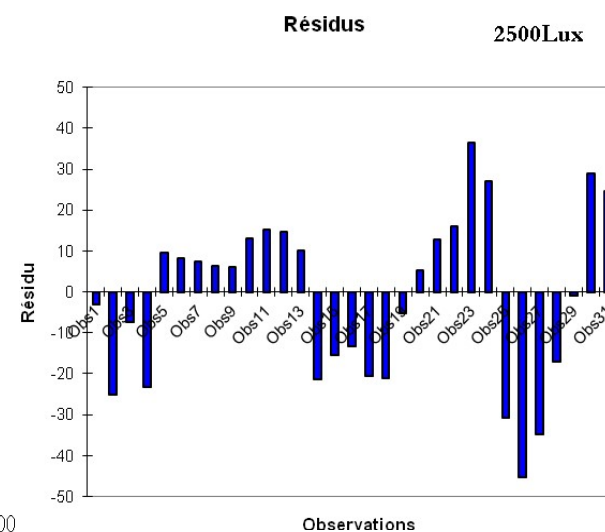
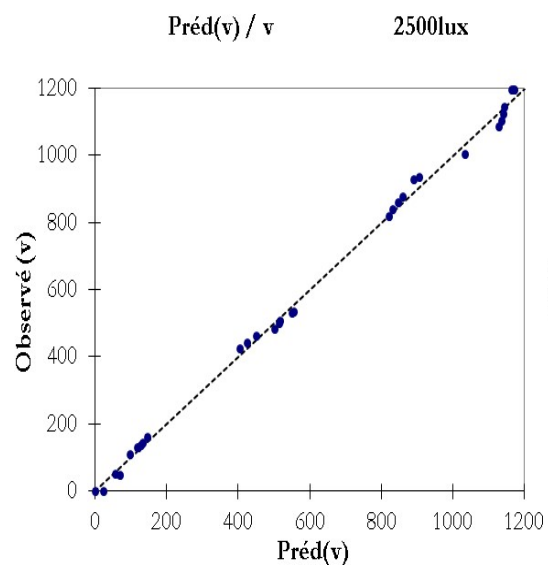
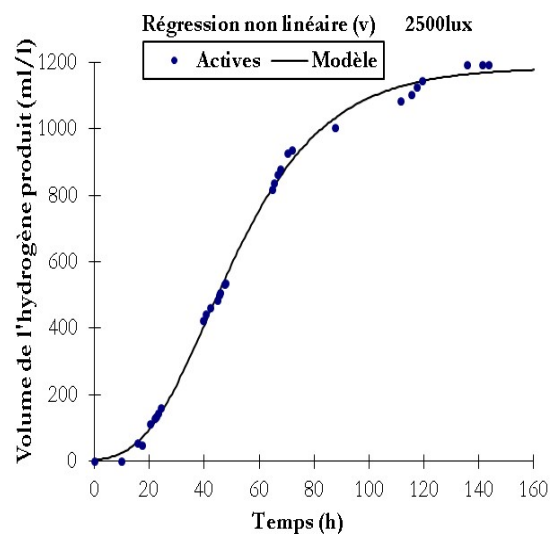
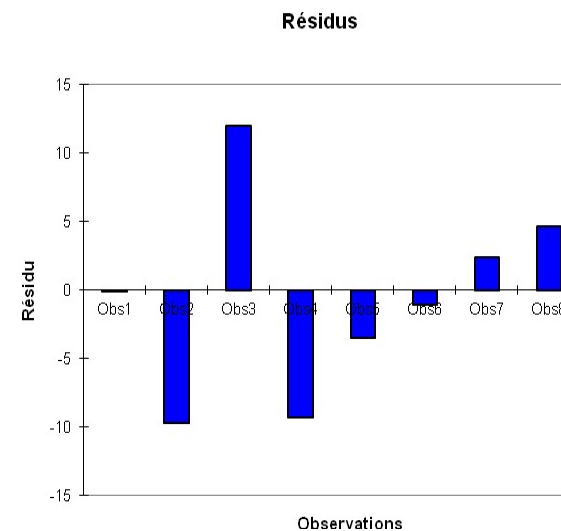
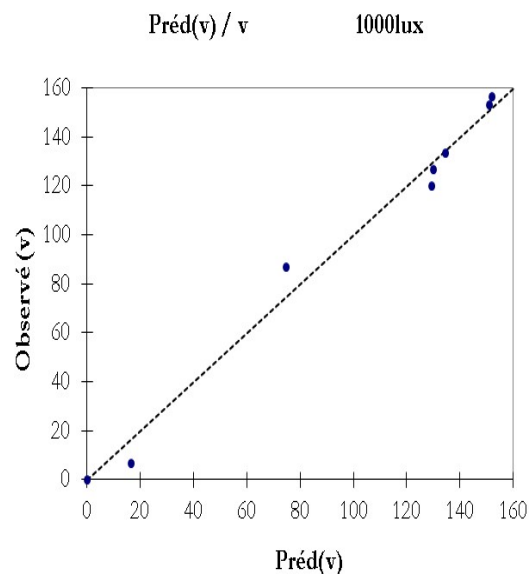
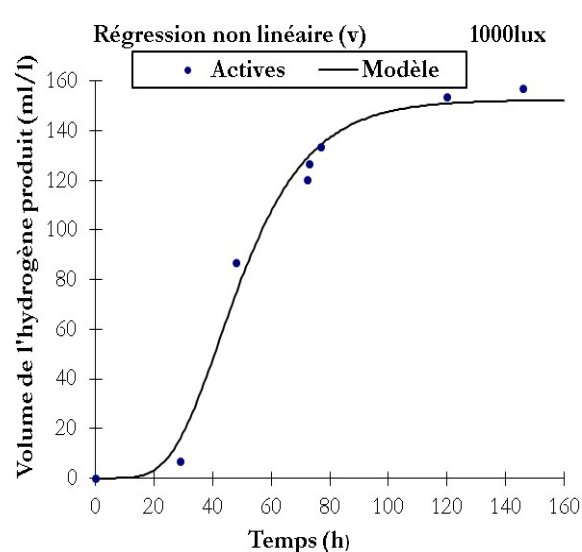
Intensité lumineuse (lux)	Valeurs Expérimentales		Valeurs Prédites			
	Volume Total de l'hydrogène produit (ml)	$R_{p_{max}}$ (ml/l/h)	P (ml)	R_m (ml h ⁻¹)	λ (h)	R^2
1000	0156.66	04.21	0152.356	03.361	25.688	0.987
2500	1193.96	16.17	1185.269	18.744	18.134	0.998
4500	1310.50	40.02	1321.012	60.397	47.277	0.998
8500	2226.50	39.74	2190.350	47.067	43.598	0.997

Cependant, l'écart peut résulter des erreurs de mesure de la vitesse maximale de production de l'hydrogène qui ont été nettement supérieure à celle du taux moyen de la production de l'hydrogène et de l'hydrogène total produit. C'est probablement dû à l'intervalle de temps d'échantillonnage. À 4500 lux, l'ajustement donne une valeur (R_m) supérieure à la valeur expérimentale (R_{pmax}), ce qui donne plus l'écart type que pour les autres intensités.

Le modèle de Gompertz modifié décrit significativement, à différentes intensités de lumière, le déroulement de la production de l'hydrogène, $R^2 > 0.98$. En outre, l'ajustement à l'aide d'une analyse de régression non linéaire donne les mesures à proximité de celles observées, (Figure 9.9).

Dans ce présent travail, nous avons démontré que dans l'équation modifié de Gompertz, le temps de latence (λ) représente le temps pour lequel la production de l'hydrogène devient maximale (début de la phase exponentielle de la courbe de production de l'hydrogène, Fig. 9.4 ou Fig. 9.7) non pas l'heure de début de la production de l'hydrogène. Nous avons donc corrigé cette erreur de nomination. En outre, aucune étude comparative entre les données expérimentales et les valeurs prédites obtenus lors des études similaires n'a été signalée avec d'autres souches de *R. sphaeroides* productrices d'hydrogène. Il est à noter que, ce temps de latence diminue avec l'élévation de l'intensité lumineuse, puis il augmente lorsque les bactéries deviennent photosensibles à des intensités excessives.

Le modèle modifié de Gompertz fournit une vue prévue de la production, en outre, son utilisation nous permet d'obtenir des constantes qui ont des significations biologiques, ce qui peut être d'une grande importance pour une meilleure compréhension de la production photofermentative de l'hydrogène [301].



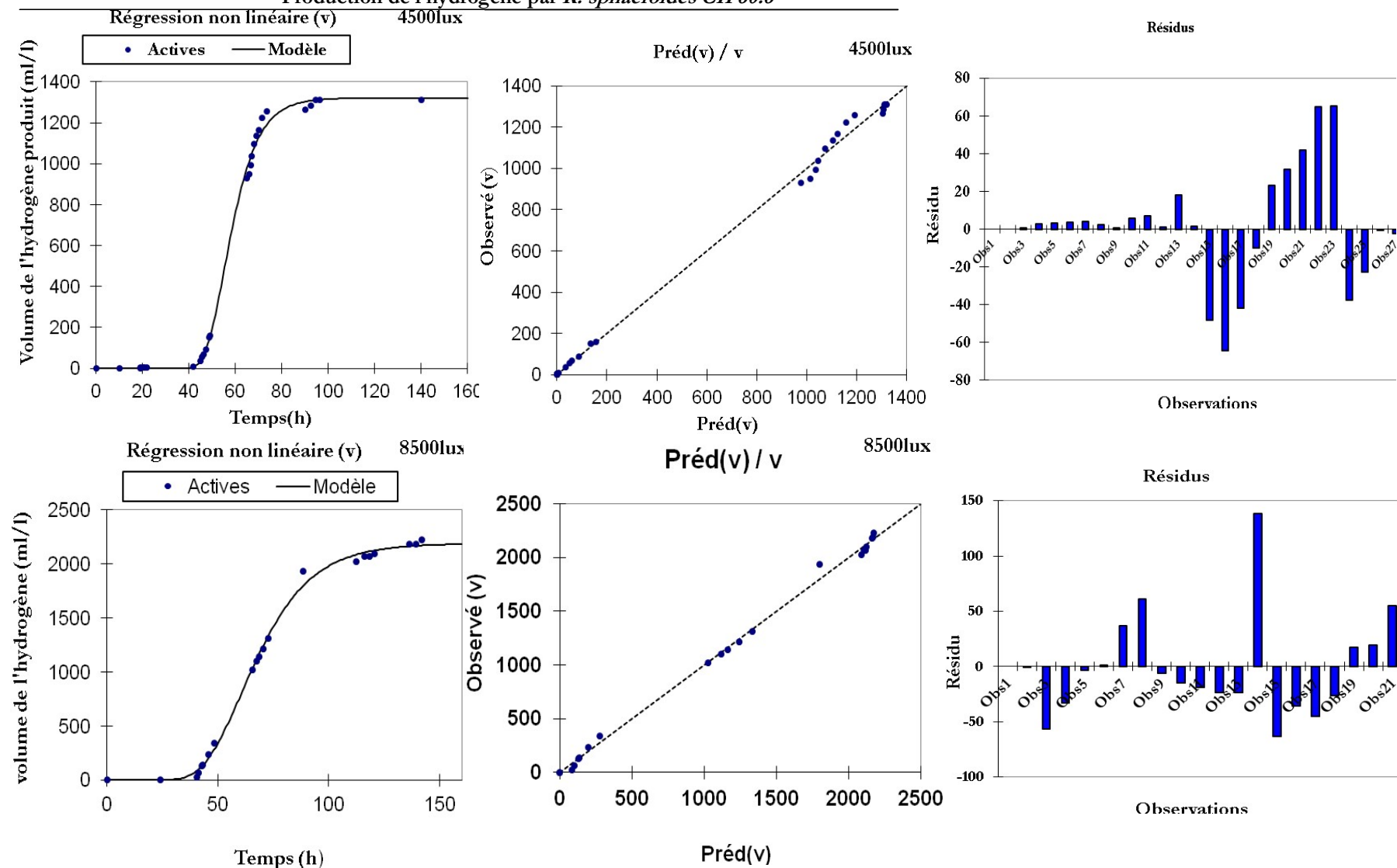


Fig.9.9. Modélisation non linéaire de la cinétique de production de l'hydrogène et plot des valeurs actuelles en fonction des valeurs prédites

X.7. Effet du pH sur la production d'hydrogène au cours de photofermentation

Le couplage entre l'environnement physique (pH) et le métabolisme des micro-organismes va permettre de renforcer l'étude de la réponse biologique. Un pH initial de $7,0 \pm 0,2$ a été suggéré dans plusieurs études en tant que valeur idéale pour la croissance cellulaire et la production de l'hydrogène par les différentes souches de *R. sphaeroides* [2,84,305]. La Figure 9.8 montre que le pH initial augmente sous les différentes intensités lumineuses à $7,9 \pm 0,1$ pendant les 70 ± 3 h d'incubation de la culture, puis diminue à $7,68 \pm 0,12$.

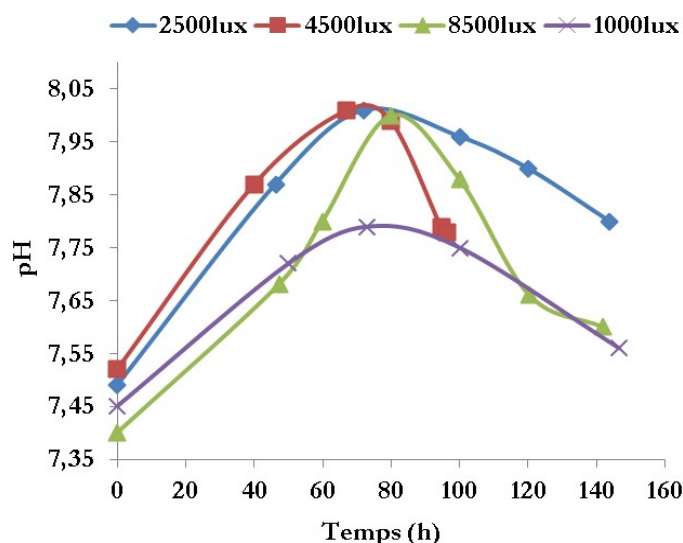


Fig.9.10. Effet de l'intensité lumineuse sur l'évolution pH.

Selon ces résultats, le pH évolue de la même manière que la croissance des cellules. Le pH augmente bien avant le début de la production de l'hydrogène et diminue au cours de cette production lorsque la croissance bactérienne a été arrêtée. Kim et al. [84] ont également signalé que le pH augmente au cours de la croissance des cellules de *R. sphaeroides KD131* et diminue lors de l'arrêt de la production de l'hydrogène et de la croissance des cellules. Ces observations, cependant, diffèrent avec des résultats montrant qu'une élévation du pH correspond au début de la production d'hydrogène par *R. sphaeroides O.U.001* [305].

L'évolution du pH a un effet sur la cinétique de la production de l'hydrogène. Les figures 9.4 et 9.10 montrent que, la production de l'hydrogène par *R. sphaeroides CIP 60,6* commence au cours de la photofermentation à une gamme de pH de $7,5 \pm 0,1$ [93]. Ces observations sont en accord avec les résultats montrant que la production de l'hydrogène par *R. sphaeroides OU001* commence à pH 7,5-7,6 [24] et qui sont, cependant, des valeurs de pH inférieures à ceux déclarées en utilisant la souche *R. sphaeroides KD131* [84].

Dans cette étude, un pH alcalin de $7,9 \pm 0,1$ diminue la production de l'hydrogène. Cependant, le pH alcalin est défavorable à l'activité de la nitrogénase, l'enzyme qui catalyse la production de l'hydrogène, alors qu'il est favorable pour l'activité de l'hydrogenase [93,2], l'enzyme qui consomme l'hydrogène et produit des protons, ce qui explique la diminution du pH [301].

9.8. Effet de la pression partielle de l'hydrogène P_{H_2}

Les voies biologiques de production de biohydrogène sont très sensibles à la pression partielle de l'hydrogène (P_{H_2}), qui représente un facteur clé de limitation de vitesse de cette production.

Dans ce présent travail, les conditions de faible P_{H_2} ont été réalisées par l'agitation des cultures à une vitesse adéquate, afin de minimiser l'accumulation de l' H_2 dans le bouillon. Les conditions de haute P_{H_2} ont été établies par l'agitation des cultures à une très faible vitesse [307] voir même l'arrêt de l'agitation, afin de saturer le système avec de l' H_2 . Nous avons étudié l'évolution dans le temps du taux de production de l'hydrogène au cours de la photofermentation afin de mieux voir le comportement et l'activité productrice de cette souche.

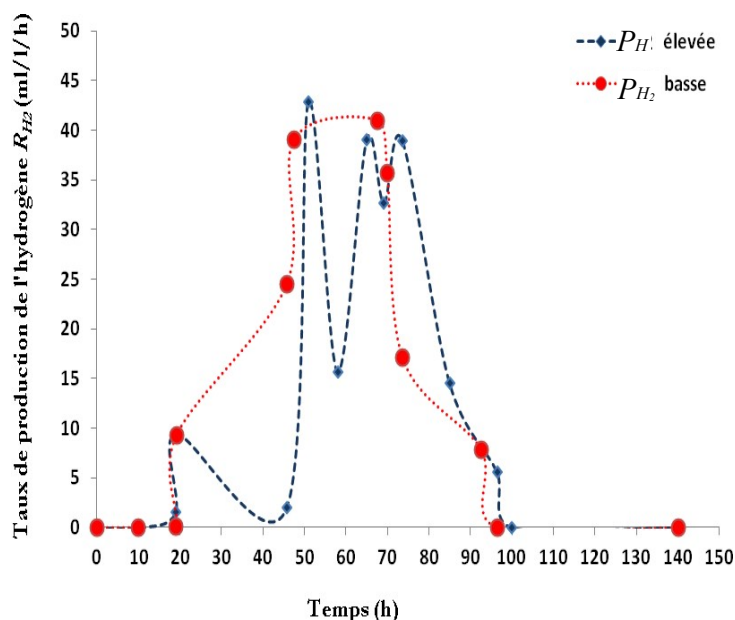


Fig.9.11. Effet de l'agitation et de la P_{H_2} sur la production du biohydrogène

Nous avons observé que l'arrêt de l'agitation, lors de la phase exponentielle (51h d'incubation), entraîne une réduction du taux maximal de la production de l'hydrogène, de 62%, suite à l'augmentation de la pression partielle dans le réacteur. Avec la reprise de l'agitation (à

60h), la pression partielle de l'hydrogène au sein du réacteur diminue ce qui fait retourner le taux de production à presque sa valeur initiale avec une instabilité de production (Figure. 9.11).

Lorsque le niveau de l'hydrogène dissous dans le milieu de production et le volume de l'hydrogène dans le volume libre du réacteur augmentent, une augmentation de la P_{H_2} entraîne une diminution de l'activité de l'enzyme productrice de l'hydrogène en raison de la rétro-inhibition et de l'oxydation de l'hydrogène dissous. Dans ces conditions, la réduction de Fdox est plus favorable que l'oxydation de Fdred, provoquant ainsi l'oxydation de l'hydrogène dissous par l'hydrogénase [308, 309]. De même, l'augmentation de la P_{H_2} entraîne des modifications dans les voies métaboliques de photofermentation et dans l'adaptation de l'appareil photosynthétique. [310]. Ce qui explique le non retour des bactéries à leur vitesse initiale de production, l'hydrogène produit commence à être consommé par l'hydrogénase. Dans ce type de bioprocédé, une agitation en continue est recommandée [301].

9.9. Etude comparative des données sur la production de l'hydrogène avec les différentes souches de *Rhodobacter sphaeroides*

Le tableau 9.2 fournit une comparaison des rendements et des productivités à partir d'un certain nombre d'études, où le taux de production est donné en " unités de volume de produit par volume de culture au fil du temps " ($\text{ml H}_2 \text{ l}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

Pour comparer ce travail avec d'autres études, plusieurs paramètres ont été énumérés par exemple, les taux de production d'hydrogène maximaux et moyens, les différents substrats utilisés, le rapport molaire de la source de carbone à la source d'azote, les conditions d'expérimentation et les diverses souches de *R. sphaeroides* utilisées y compris la souche CIP 60,6, utilisée dans le cadre de ce travail pour la production de l'hydrogène. La souche *R. sphaeroides* CIP 60.6 peut être l'une des meilleures souches pour produire de l'hydrogène, à différents niveaux de l'intensité lumineuse.

Tableau . 9.2. La production de l'hydrogène par des différentes souches de *Rhodobacter sphaeroides* (*R. sp.*).

Souches	C/N(mM/mM)	Intensité lumineuse	T (°C)	Taux Maximum " $R_{p_{max}}$ " (l/l/h)	Taux total " R_{p_t} " (l/l/h)	References
<i>R. sp</i> RV	Lactate, 50-100/4.7 ^a	10000 lux, Tungsten	30	0.0366	n/a ^d	[34]
<i>R. sp</i> KD131	Malate, 30/8	32 w/m ² , Halogen	30	n/a ^d	0.026±0.0047	[177]
<i>R. sp</i> (Berkeley collection)	Glucose, 20/13 ^b	8000 lux, Incand	27	0.01260	n/a ^d	[34]
<i>R. sp</i> O.U.001	Malate, 15/2	15± 1.1 W/m ²	32±2	n/a ^d	0.0065±0.0001	[298]
<i>R. sp</i> O.U.001	Malate, Lactate, 30/10	2400 lux	30	0.01680	n/a ^d	[34]
<i>R. sp</i> O.U.001	Malate	4000 lux	30	0.03500	0.01300	[303]
<i>R. sp</i> O.U.001	Malate, 15/2 Acetate, 30/2	940μE/m ² /s 940μE/m ² /s	30 30	n/a ^d	2.42 ^c 0.25 ^c	[306]
<i>R. sp</i> S10	Mélange de Glu, Xyl, Acétate	7.3 W/m ²		0.0505 ± 0.0052	1.33 ± 0.05	[311]
<i>R. sp</i> CIP 60.6	Lactate, 50/10	4500 lux, Tungsten	30	0.04002	0.01359	Nos résultats [301]
<i>R. sp</i> CIP 60.6	Lactate 50/10	2500 lux, Tungsten	30	0.01617	0.00871	

^a La source du nitrate utilise est l'extrait de levure.^b 0.2% (p/v)=13 mM extrait de levure sont ajouté au glutamate.^c l H₂/l.n/a^d non disponible.

9. 10. Conclusion

Dans ce présent travail la souche *Rhodobacter sphaeroides* CIP 60.6 a été nouvellement utilisée pour la production de biohydrogène par voie photofermentaire. Un certain nombre de paramètres physico-chimiques ont été examinés pour leur effet sur la croissance cellulaire et le taux de production de l'hydrogène par la souche *R. sphaeroides* CIP 60,6 en photobioréacteur cylindrique parfaitement agité dans des conditions d'anaérobies et en présence de lumière.

Le modèle Luedeking-Piret a été utilisé pour déterminer le mode de production de l'hydrogène et la relation entre la croissance cellulaire et la production de l'hydrogène. Les résultats montrent que, les cellules bactériennes peuvent produire de l'hydrogène à une intensité lumineuse supérieure ou égale à 2500 lux, au cours de leurs croissance et au repos (L'hydrogène peut être produit à la fois dans la phase logarithmique et la phase stationnaire de croissance). Cependant, à

de faibles intensités l'hydrogène est un métabolite associé à la croissance. Le taux de croissance cellulaire et le taux de production de l'hydrogène augmentent avec l'augmentation de l'intensité lumineuse. De plus, le taux de production d'hydrogène est devenu plus élevée dans la phase stationnaire que dans la phase logarithmique, avec l'élévation de l'intensité lumineuse.

L'équation modifiée de Gompertz a été appliquée pour les données expérimentales pour vérifier l'exactitude et l'accord du modèle avec les résultats expérimentaux. Nous avons mis en évidence que, dans ce modèle, le temps de retard représente le temps pour lequel la production d'hydrogène devient maximale, et non pas le moment du début de la production de l'hydrogène. Le temps de latence diminue avec l'augmentation de la croissance des cellules, et augmente avec l'élévation de l'intensité lumineuse, puis il augmente lorsque les bactéries deviennent photosensibles à des intensités excessives. La durée de la production de l'hydrogène diminue avec l'augmentation de l'intensité lumineuse.

La capacité des bactéries à produire efficacement l'hydrogène diminue à une intensité de 4500lux. Les pigments synthétisent en excès l'ATP, se fixe sur les sites catalytiques et allostériques de la nitrogénase, ce qui diminue l'affinité de l'enzyme au substrat et induit une inhibition enzymatique. L'intensité d'éclairage recommandée doit être supérieure à 4500 lux et comprise au sein d'un intervalle de 4500 - 8500 lux.

Lorsque le niveau de l'hydrogène dissous dans le milieu de production et le volume de l'hydrogène dans le volume libre du réacteur augmentent, ils entraînent une augmentation de la PH_2 ce qui crée une production instable de l'hydrogène et réduit le taux maximal de production de l'hydrogène de 62% suite à une diminution de l'activité de l'enzyme productrice de l'hydrogène et ce, en raison de la rétro-inhibition et de l'oxydation de l'hydrogène dissous. En conséquence, l'homogénéisation permet un bon transfert du biohydrogène produit de la phase liquide et biotique à la phase gazeuse ce qui réduit la PH_2 au sein du bioprocédé et améliore la production de l' H_2 .

Le pH augmente au cours de la croissance cellulaire et diminue au cours de la production de l'hydrogène, lorsque la croissance cellulaire s'arrête. A des pH alcalins $7,9 \pm 0,1$, la production diminue et peut même s'arrêter.

Le taux de production de l'hydrogène maximal obtenue est de $39,88 \pm 0,14$ ml / l / h, dans les conditions optimales suivantes: une illumination de 8500 lux, un pH de $7,5 \pm 0,1$, un âge de la culture de l'inoculum de 36h et une bonne agitation. La souche *R. sphaeroides* CIP 60.6 peut être l'une des meilleures souches pour produire de l'hydrogène. L'utilisation de la photobioproduction de l'hydrogène à grande échelle semble plus avantageuse sur le plan environnemental.

Conclusion générale

L'hydrogène est considéré comme un vecteur énergétique idéal de l'avenir, il peut être produit en utilisant une variété de techniques. Comparativement aux processus de génération d'hydrogène physique et chimique, la production de l'hydrogène par des microorganismes fermentaires et photofermentaires est une approche biotechnologique et environnementale très prometteuse, car elle est recyclable, environnementalement bénigne, à faible coût et inépuisable. Ces microorganismes anaérobies utilisent des substrats organiques pour leur croissance tout en générant de l'hydrogène en tant que sous-produit de fermentation par l'interaction de plusieurs voies métaboliques.

Ce travail a, pour objectif, la bioproduction de l'hydrogène par des microorganismes. Deux souches bactériennes nouvellement utilisées pour la production du biohydrogène, la souche *E. coli* ATCC 8739 (une bactérie fermentaire) et la souche *Rhodobacter sphaeroides* CIP60.6 (une bactérie photofermentaire), ont été caractérisées et étudiées de façon approfondie.

Des bioréacteurs « sombres » et des photobioréacteurs, ont été conçus et réalisés par nos soins, dans l'optique de déterminer les conditions de culture optimales en vue d'améliorer les productivités et les rendements de production de biohydrogène et de bien comprendre la réponse d'une culture bactérienne à la modification volontaire des conditions environnementales menant à cette production. L'ensemble des résultats expérimentaux acquis ont permis d'aborder l'aspect modélisation des phénomènes afin d'aller vers des modèles mathématiques permettant de décrire directement la production de biohydrogène et d'optimiser par simulation les conditions de production. Les expérimentations ont permis également de comparer les productivités des souches bactériennes.

Les travaux réalisés ont permis d'avancer dans la connaissance des facteurs impliqués dans la production d'hydrogène par les deux souches utilisées afin de développer des bioprocédés plus pratiques et efficaces. Les principaux apports scientifiques de ce travail sont présentés, ci-dessous.

Concernant la souche *E. coli* ATCC 8739, deux mode d'optimisation ont été utilisés un « classique » qui permet d'optimiser et d'étudier l'effet des 'facteurs individuels' sur la réponse étudiée et l'autre « statistique » qui utilise la méthodologie de surface de réponse (RSM) « Box Behnken » qui permet d'optimiser et d'étudier l'effet des 'facteurs individuels et interactifs' sur la production de l'hydrogène. Ces travaux ont montré que le pH, la température et la concentration en substrat ont eu une influence significative sur le taux de production de l'hydrogène. En mode d'optimisation classique, les valeurs du pH, de la température et de la concentration en substrat

les plus appropriée pour augmenter la performance de la production de l'hydrogène par la souche *E coli ATCC 8739* ($56,84 \pm 1.28 \text{ ml l}^{-1} \text{ h}^{-1}$) ont été : $\text{pH } 6.5$, 35°C et 20 g/l , respectivement.

L'utilisation de la RSM « Box Behnken », nous a permis de montrer que les effets de la température et le pH sont interdépendants et il y a eu un impact interactif important sur le taux de production de l'hydrogène. D'autre part, l'effet interactif de la concentration de glucose et le pH, et l'effet interactif de la concentration en glucose et la température sont négligeables. La prédiction de la valeur maximale de la réponse expérimentale et la variance constante des résidus ont indiqués que le modèle quadratique décrit convenablement la surface de réponse à l'intérieur de la région expérimentale étudiée. L'utilisation de la méthode ANOVA a montré que le modèle est hautement significatif et en bonne adéquation avec les résultats expérimentaux. Le taux de production de l'hydrogène maximal de $55.32 \pm 4.9 \text{ ml/l/h}$ a été obtenu à une concentration de glucose de 21.09 g/l , un pH de 6.58 et une température de 36.6°C .

L'application de la RSM a permis d'évaluer d'une manière correcte les effets des différents facteurs sur les performances du bioprocédé, elle a aussi permis l'identification des interactions et l'optimisation des paramètres, en utilisant un minimum d'essais.

La quantité d'hydrogène produit dans cette étude est légèrement plus élevée que dans la majorité des autres études. Ce qui indique que les bactéries *E coli ATCC 8739* produisent efficacement l'hydrogène par fermentation.

Nous avons montré que le fer est un élément essentiel au processus de la production d'hydrogène et à la croissance cellulaire de la souche *E. coli ATCC8739*. Un volume maximal cumulé de l'hydrogène de $1337 \pm 114.6 \text{ ml}$, un taux moyen de $56.84 \pm 4.9 \text{ ml/l/h}$, un taux maximal de $86.25 \pm 7.3 \text{ ml/l/h}$, un rendement en hydrogène au maximum de $23.62 \pm 0.062 \text{ mol/mol}$ de glucose, un taux et un rendement de production en biomasse les plus élevés sont de 4.462 mg/l/h et de 1.39 g/l/mol de glucose et une efficacité de consommation du glucose entre 99.29% et 99.44% ont été obtenus à une concentration de Fe^{2+} de 600 mg/L . Nous avons observé qu'une augmentation de la concentration du Fe^{2+} ($> 0.75 \text{ g/l}$) entraîne une inhibition de la production de l'hydrogène mais pas de la croissance cellulaire.

La consommation du glucose est fortement influencée par les ions Fe^{2+} . L'efficacité de la dégradation du substrat (ECS), au cours de la fermentation, augmente avec l'augmentation de la concentration de Fe^{2+} de $0\text{-}600 \text{ mg/l}$. A une teneur de 1500 mg/l , l'efficacité de consommation du substrat diminue énormément (93.4%) et ce par rapport aux autres essais ($99,29$ et $99,44\%$) ce qui a induit la diminution du taux et du rendement de production de l'hydrogène. Pour la croissance cellulaire aucune inhibition n'a été mise en évidence, la croissance cellulaire observée est meilleure par rapport à celle du « contrôle ». L'explication de ce phénomène serait qu'à des concentrations en Fe^{2+} beaucoup plus élevée, le glucose est utilisé par les bactéries pour assurer

leur croissance et dirigé vers d'autres voies métaboliques autres que celle de la production de l'hydrogène.

Le pH diminue différemment dans les différentes cultures de *E. coli* ATCC 8739 sous les différentes teneurs de Fe^{2+} . La valeur finale du pH la plus élevée est de 5.2 observée à la concentration optimale de Fe^{2+} . À cette concentration, le rendement en hydrogène, l'efficacité de dégradation du glucose ainsi que le taux et le rendement de production en biomasse cellulaire sont très élevés, ce qui montre que les valeurs de pH comprises entre le pH initial 6.5 et un pH de 5.22 sont favorables pour la dégradation du glucose et pour la production de biomasse et de l'hydrogène par *E. coli* ATCC8739.

D'autres résultats importants nous ont permis d'évaluer la stimulation, l'inhibition, voire la toxicité du nickel sur l'activité de production de l'hydrogène, l'efficacité de consommation du substrat, l'évolution du pH et sur la croissance cellulaire de la souche *E. coli* ATCC8739. Le nickel semble être un inhibiteur pour la production de l'hydrogène par la souche *E. coli* ATCC8739 et ce malgré qu'il diminue le temps de latence et la durée de production d'hydrogène.

La valeur de CI_{50} relevées est de 6 mg/l, car à cette concentration de Ni^{2+} l'activité des bactéries productrices d'hydrogène est réprimée. Des quantités excessives peuvent toutefois conduire à une inhibition ou une toxicité, cela est principalement dû à la liaison chimique des métaux lourds dans les enzymes, entraînant l'arrêt de l'activité enzymatique.

Nous avons mis en évidence que, le Ni^{2+} améliore le rendement de production de la biomasse cellulaire avec une augmentation de la teneur de Ni^{2+} de 0 à 0,9mg/l. Ce résultat, n'a été révélé par aucune référence bibliographique connue et constitue de ce fait, une primeur. Un taux maximal de 0.0094 g/l/h et un rendement maximal de production de biomasse bactérienne de 3.28 g/mol de glucose ont été obtenus à une concentration respective de Ni^{2+} de 0,9mg/l. Ceci indique que les ions Ni^{2+} augmentent l'activité enzymatique de la [Ni-Fe] hydrogénase 1 et 2 et non pas la [Ni-Fe] hydrogénase 3. A des concentrations beaucoup supérieures (6mg/l), le Ni^{2+} devient toxique et inhibe la croissance cellulaire. Il est à noter que, le taux maximal (0.0094 g/l/h) et le rendement maximal de la croissance cellulaire (3.28 g/mol de glucose) obtenues dans cette étude sont supérieurs à ceux rapportées dans la littérature. De même, la gamme de concentration en Ni^{2+} choisie dans cette étude est beaucoup plus restreinte, que celle étudiée par d'autres chercheurs.

Le taux maximal de la production de l'hydrogène augmente légèrement à une teneur en Ni^{2+} de 0.9mg/l, par rapport aux autres essais, mais qui reste toujours inférieur à celui du contrôle. Ceci indique que les ions Ni^{2+} pourraient stimuler ou inhiber le taux de la production de l'hydrogène en fonction de leurs concentrations. Les raisons possibles de cette élévation peuvent être liées à la croissance cellulaire qui était maximale à cette concentration et à l'insertion des ions Ni^{2+} dans le site actif de la [Ni-Fe]-hydrogénase en influençant l'activité enzymatique.

L'efficacité des cultures de *E. coli* ATCC 8739 à dégrader le glucose diminue avec l'augmentation de la concentration de Ni^{2+} de 0-6mg/l. Les métaux lourds inhibent l'activité de consommation du glucose. En outre, l'efficacité de la dégradation du substrat obtenu dans cette étude est plus élevée que celles rapportées dans la littérature. Cela montre que les cultures bactériennes de *E. coli* ATCC8739 ont une forte capacité à dégrader le substrat.

Le *pH* favorable pour la production fermentaire d'hydrogène est entre le *pH* initial 6.5 et un *pH* de 5,2. Au cours de notre travail, le *pH* final de tous les tests était inférieur au *pH* initial 6.5, et variait de 4,93 (contrôle) à 4.54. De telles valeurs du *pH* assez faible de sorte qu'elles pourraient réprimer l'activité des bactéries productrices de l'hydrogène. A une concentration de Ni^{2+} de 6mg/l, la valeur du *pH* final la plus élevée (*pH* 4,7), par rapport aux autres essais contenant le Ni^{2+} , ce qui a conduit à une légère élévation du rendement en hydrogène et à une stabilité du potentiel de production de l'hydrogène. Le rendement en hydrogène est beaucoup plus affecté par le *pH* du milieu que par le taux de la croissance cellulaire et l'ECS. La valeur la plus basse du *pH* final obtenue à une concentration de 0.9mg/l en Ni^{2+} est de 4.54. A cette concentration, les voies métaboliques sont dirigées vers la croissance cellulaire et la production des sous produits de fermentation, autres que l'hydrogène. Le *pH* présente un grand impact sur l'efficacité de production de l'hydrogène par *E. coli* ATCC8739.

Ces résultats seront nécessaires pour lever les inhibitions physiologiques responsables de l'arrêt de la production de l'hydrogène. Différentes souches de *E. coli* ont été comparées pour leur capacité à produire de l'hydrogène. Les données expérimentales ont révélé que la souche *E. coli* ATCC 8739 est une bactérie prometteuse pour la production de l'hydrogène.

Concernant la souche *Rhodobacter sphaeroides* CIP 60 nous avons déterminé, auparavant, que la cinétique de la croissance bactérienne et de la production de l'hydrogène sont proportionnelles à l'intensité d'éclairage. Ces cinétiques augmentent avec l'amélioration de l'intensité lumineuse. De plus, l'augmentation de l'intensité lumineuse à partir de 4500 lux à 8500 lux, n'a pas montré une différence significative dans le taux de production de l'hydrogène. Donc, dans un photobioréacteur cylindrique, la production optimale de l'hydrogène ($39,88 \pm 0,14$ ml / l / h) par *R. sphaeroides* CIP 60,6 est obtenue à une intensité lumineuse de 4500 - 8500 lux, un *pH* de $7,5 \pm 0,1$, un âge de la culture de l'inoculum de 36-48 h et sous une bonne agitation.

Contrairement aux cinétiques, le potentiel total de l'hydrogène produit n'est pas proportionnel à l'intensité de l'éclairage. Dans la littérature, plusieurs travaux rapportent les mêmes observations mais aucune interprétation n'a été donnée. Dans ce présent travail, nous nous sommes proposés d'apporter de nouvelles connaissances scientifiques requises pour la mise en place des bioprocédés et d'étudier l'effet de l'environnement physico-chimique sur l'activité métabolique de la production biologique de l'hydrogène et sur la caractérisation cinétique de la souche. Nous avons cherché à comprendre pourquoi chez *R. sphaeroides* CIP 60,6 le volume de l'hydrogène produit à 4500 lux augmente seulement de presque 9% alors que son taux de production de

l'hydrogène augmente jusqu'à 203% par rapport à celui à 2500 Lux. Nous avons également cherché à identifier le (ou les) facteur(s) responsable(s) de la réponse bactérienne de cette souche sous ces conditions physico-chimiques. Nous avons de ce fait étudié l'évolution du taux de production de l'hydrogène au cours de la photofermentation à différentes intensités lumineuses. Cette étude, nous a permis de mieux apprécier le comportement et l'activité productrice de cette souche. A 4500 lux, le taux de production d'hydrogène reste très élevé pendant une période assez courte où une baisse drastique est observée. Les raisons plausibles, de cette chute rapide, du taux optimal constatée, qui a affecté le potentiel total de l'hydrogène produit, sont susceptibles d'être provoquées par l'intensité lumineuse qui alimente plus d'ATP et de force réductrice par les pigments synthétisés en excès à 4500 lux par rapport à la capacité de la nitrogénase. En conséquence, la compréhension du mécanisme de production de l'hydrogène par *R. sphaeroides CIP 60,6* serait importante dans l'optique d'utiliser ces souches pour la production du biohydrogène. L'intensité d'éclairage recommandée doit être comprise au sein d'un intervalle de 4500 - 8500 lux.

Le modèle Luedeking-Piret a été largement utilisé dans la littérature, pour décrire la relation entre le taux de croissance des bactéries fermentaires et le taux de formation des sous-produits de la fermentation en suspension, tels que les acides organiques et les alcools. Aucun travail n'a rapporté la faisabilité d'utiliser ce modèle pour décrire la relation entre le taux de croissance des bactéries productrices de l'hydrogène et le taux de production de l'hydrogène et ainsi de décrire l'effet de l'intensité lumineuse sur le type de l'activité métabolique de ces bactéries. Dans ce présent travail, la méthode de modélisation linéaire « modèle Luedeking-Piret » a été utilisée pour la première fois avec comme principal objectif de parvenir à une conduite raisonnée et optimisée des processus microbiens sur la connaissance des métabolismes liés aux interactions entre la population microbienne et les conditions opératoires, en lien avec un développement des bioprocédés adaptés permettant de lever certains freins métaboliques. Pour cela, les taux spécifiques de la croissance (μ) et de la production de l'hydrogène (ν), qui sont une mesure de détection de l'activité métabolique des cellules individuelles, ont été étroitement mesurés pendant toute la photofermentation. Les coefficients de détermination élevés ont confirmé la validité du modèle Luedeking-Piret dans ce type d'étude. A notre connaissance, ce travail est la première étude qui a révélé, également, qu'à des faibles intensités lumineuses (1000 lux), l'hydrogène est un métabolite associé à la croissance de la souche *R. sphaeroides CIP 60,6*. Aucune étude similaire n'a signalée l'effet de l'éclairage sur le mode de production de l'hydrogène des autres souches productrices de l'hydrogène.

L'étude des recommandations techniques de gestion de tels bioprocédé nécessite donc d'améliorer fortement l'état des connaissances dans le domaine de ces réseaux d'interactions métaboliques complexes et, plus particulièrement, dans le cadre spécifique d'une production optimale et durable de biohydrogène pour développer et maintenir cette filière bioénergétique.

Pour atteindre un taux global et maximal de production adéquat, afin de décrire et fournir des informations utiles concernant l'effet et le fonctionnement de plusieurs facteurs sur les processus de production et afin de décrire la progression de la cinétique de production de l'hydrogène dans une culture discontinue une modélisation non linéaire, en utilisant le modèle modifié de Gompertz, a été utilisée pour expliquer le déroulement de la production de l'hydrogène par lots, et simuler le profil de l'évolution de l'hydrogène produit en fonction du temps et déterminer le volume maximal de l'hydrogène produit (H_{\max}), le taux maximal de production d'hydrogène (R_{\max}), et le temps de retard.

Nous avons démontré, que dans l'équation modifiée de Gompertz, le temps de latence (λ) représentait le temps pour lequel la production de l'hydrogène devient maximale (correspondant au début de la phase exponentielle de la courbe de production de l'hydrogène), et non à l'heure de début de la production de l'hydrogène comme il est communément nommé dans la littérature.

En outre, aucune étude comparative entre les données expérimentales et les valeurs prédites obtenus lors des études similaires n'a été signalée avec d'autres souches de *R. sphaeroides* productrices d'hydrogène. Il est à noter que, ce temps de latence diminue avec l'élévation de l'intensité lumineuse, puis il augmente lorsque les bactéries deviennent photosensibles à des intensités excessives. L'utilisation de ce modèle peut nous fournir une prévision de la production, et il nous permettrait d'obtenir des constantes biologiques significatives, ceci pourrait être d'une importance conséquente pour une meilleure compréhension de la production photofermentaire.

Lorsque le niveau de l'hydrogène dissous dans le milieu de production et le volume de l'hydrogène dans le volume libre du réacteur augmentent, ceci entraînerait une augmentation de la P_{H_2} qui provoquerait une production instable de l'hydrogène et réduisant ainsi le taux maximal de production de l'hydrogène de 62% conséquemment à la diminution de l'activité de l'enzyme productrice de l'hydrogène en raison de la rétro-inhibition et de l'oxydation de l'hydrogène dissous.

Des études comparatives entre les productivités des différentes souches de la même espèce ont été faites. La souche *R. sphaeroides* CIP 60.6 peut être l'une des meilleures souches pour produire de l'hydrogène, à différents niveaux de l'intensité lumineuse.

Au cours de notre travail, des variations significatives des productivités ont été enregistrées que se soit pour les bactéries fermentaires ou phototrophes, même pour des souches de la même espèce (jusqu'à 20 % de variation). Les productivités les plus élevées, ont été atteintes par les souches pures. De ces résultats, on a pu déduire que les conditions physico-chimiques optimales sont spécifiques à chaque essai. Donc, au cours d'une production fermentaire et photofermentaire de l'hydrogène, il est préférable de déterminer l'effet et la concentration optimale de chaque facteur selon les conditions expérimentales de chaque culture. Cependant, la

production phototrophe de l'hydrogène confronte plusieurs obstacles: (1) la faible efficacité de conversion de l'énergie solaire (2) le ralentissement de la vitesse de la réaction, et (3) un faible taux de pénétration de la lumière due à la formation du biofilm sur la paroi du réacteur.

Contrairement aux bactéries photofermentaires, les bactéries fermentaires anaérobies n'ont pas besoin d'illumination pour produire du biohydrogène. Une production de biohydrogène se basant sur cette voie métabolique, aussi appelée « Dark Fermentation », peut fonctionner à capacité maximale toute la journée et toute la nuit, ce qui n'est pas le cas des productions liées à une voie phototrophe. D'autre part, la production fermentaire sombre d'hydrogène, offre de nombreux avantages tels qu'une vitesse rapide de réaction, une forte dégradation des substrats organiques solides, une simplicité technique. Cette production fermentaire peut être inhibée par les effluents produits au cours de la fermentation, et c'est là où la production de l'hydrogène par photofermentation prend place pour réduire la quantité de matières biodégradables et produire de l'énergie.

La production du biohydrogène constitue une voie durable d'avenir. Le développement à grande échelle d'une telle filière « biohydrogène » dépendra fortement de la mise en œuvre de technologies robustes et fiables, tels que les recherches biotechnologiques, qui connaissent depuis quelques années un grand intérêt.

Références

- [1] U.S. Energy Information Administration, *The Annual Energy Outlook 2015 with projection to 2020*, copyright Office of Integrated and International Energy Analysis DOE/EIA- 0383 , U.S. Department of Energy Washington, DC 20585, April 2015.
- [2] *Énergies du XXI^e siècle Des énergies décarbonées pour un futur durable* © Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives, 2010, ISSN 1637-5408.
- [3] Multon. B, Seigneurbieux. J, Ruellan. M, Ben Ahmed. H. *Energie et développement durable*. Document rédigé pour le bulletin des anciens élèves. L'ENSET/ENS de Cachan, février 2006, n°228.
- [4] Clerici, A.; Assayag M, Brasileiro P.S.A. *World Energy Resources Survey*, Copyright © 2013 World Energy Council London W1B 5LT United Kingdom, ISBN: 9780946121298.
- [5] Swanny. F, Pruvost. J, Legrand. J. *Étude des voies métaboliques de production d'hydrogène chez la microalgue et transposition en photobioréacteur*. École Polytechnique de l'Université de Nantes, N° ED 0367-224, 2006.
- [6] Mellish. M, Kearney. D, Kette. S. International Energy Outlook 2008. In *Energy Information Administration*. Office of Integrated Analysis and Forecasting, U.S. Department of Energy, Washington, DC, Energy Information Administration "OIAF-EIA-DOE", 2008.
- [7] *Le futur du pétrole*. Cahier technologique N°1. La recherche, N°407, Avril 2007.
- [8] Daniel Verwaerde , Bernard Bigot, *Energie nucléaire et renouvelable*, Copyright Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives, 2015. ISSN 1637-5408.
- [9] *British Petroleum*, BP Statistical Review, 2013.
- [10] AGIR: Défis du XXI^e siècle : Convertir l'énergie et économiser les ressources www.culturesciences.chimie.ens.fr.
- [11] Akroum-Amrouche. D, Abdi. N, Lounici. H, Mameri. N. Dark fermentative hydrogen production rate from glucose using facultative anaerobe bacteria E coli. *Proceedings Engineering & Technology* . 7:117-119, 2014. Copyright IPCO-2014. ISSN 2356-5608.
- [12] Das. D, Veziroglu. T. N. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2001; 26: 13-28.
- [13] *Cap sur l'hydrogène d'origine renouvelable*. Bulletin des énergies renouvelables 2006/ 2007; N°9, Edition: Centre du développement des énergies renouvelables CDER, Alger.
- [14] Wyman. O. *Trilemme Énergétique Mondial*, Conseil mondial de l'énergie, 2013
- [15] Luzzi, A. William, A. *Produire de l'hydrogène par photolyse de l'eau*, La filière hydrogène. Direction des sciences du vivant, Hivers 2004-2005, CLEFS-CEA-N° 50/51.
- [16] Dr Badwal. S.P.S, Ms Mishaël. J. *Australian hydrogen activity*, Energy in transition. Commonwealth of Australia, 2004 ; 177.
- [17] Laurinavichene T, Tsygankov A, Hydrogen photoproduction by co-culture Clostridium butyricum and Rhodobacter sphaeroides, *International Journal of Hydrogen Energy* (2015)1-8, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.08.086>
- [18] Allakhverdiev. P.S.I, Kreslavski. V. D, Thavasi. V, Zharmukhamedov. S .K, Klimov. V. V, Ramakrishna. S, Nishihara. H, Mimuro. M, Carpentier. R, Nagata. T. *Photosynthetic Energy Conversion: Hydrogen Photoproduction by Natural and Systems, Biomimetics Learning from Nature*, edited by Amitava mukerjee Chap,3 March 2010 ISBN 978-953-307-025-4.
- [19] Koku. H, Eroglu. I, Gunduz. U, Yucel. M, Turker. L. Kinetics of biological hydrogen production by the photosynthetic bacterium Rhodobacter sphaeroides O.U. 001. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2003; 28: 381 – 388.
- [20] *International Energy Agency*, Agreement on the Production and Utilization of Hydrogen. End-of-Term Report: 1999-2004 And Plans: 2004-2009.
- [21] Pandey. A, Gupta. K, Pandey. A. Effect of nanosized TiO2 on photofermentation by Rhodobacter sphaeroides NMBL-02. *biomass and bioenergy*, 2015; 72: 273-279.
- [22] Shima, S., Pilak, O., Vogt, S., Schick, M., Stagni, M.S., Meyer-Klaucke, W., Warkentin, E., Thauer, R.K., Ermler, U. The crystal structure of [Fe]-hydrogenase reveals the geometry of the active site. *Science* 321 5888: 572–575, 2008.
- [23] Koku. H, Eroglu. I, Gunduz. U, Yucel. M, Turker. L. Aspects of the metabolism of hydrogen production by Rhodobacter sphaeroides. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27: 1315 – 1329, 2002.

- [24] Zabut. B, El-Kahlout. K, Yücel. M, Gündüz. U, Türker. L, Eroglu. I. Hydrogen gas production by combined systems of *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 and *Halobacterium salinarum* in a photobioreactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31: 1553 – 1562, 2006.
- [25] Laniecki. M. *Generation of hydrogen with photobacteria. Solar & Alternative Energy*. 2006 SPIE-The International Society for Optical Engineering. Mickiewicz University in Poznan, Poland.
- [26] Azwar. M.Y., Hussain. M.A., Abdul-Wahab A.K. Development of biohydrogen production by photobiological, fermentation and electrochemical processes: A review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 31 158-173, 2014.
- [27] Pelmont. J. *Adaptations physiologiques*. Bactérie et environnement. Presse universitaire de gronoble, 2, 1994.
- [28] Hädicke. O, Grammel. H, Klamt. S. Metabolic network modeling of redox balancing and biohydrogen production in purple nonsulfur bacteria *BMC Systems Biology*, 5:150, 2011.
- [29] Huia. C. J, Prihastyantib. M N U, Brotosudarmo. T H P. Preliminary Evaluation of the Pigments Content from *Rhodobacter sphaeroides* at Stages during Photosynthetic Growth. *Procedia Chemistry* 14: 101 – 107, 2015.
- [30] Eroglu. E, Gunduz. U, Yucel. M, Turker. L, Eroglu. I. Photobiological hydrogen production by using olive mill wastewater as a sole substrate source. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29: 163 – 171, 2004.
- [31] Liu. S, Zhang. G, Li. X, Wu. P, Zhang. J. Enhancement of *Rhodobacter sphaeroides* growth and carotenoid production through biostimulation. *Journal of Environmental Sciences*, 33: 21 – 28, 2015.
- [32] Dasgupta. C. N, Gilbert. J. J, Lindblad. P, Heidorn. T, Borgvang. S. A., Skjanes. K, Das. D. Recent trends on the development of photobiological processes and photobioreactors for the improvement of hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35, Issue 19, 10218-10238, 2010.
- [33] Zagrodnik . K, Seifert. M, Stodolny. M. Laniecki Continuous photofermentative production of hydrogen by immobilized *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 R. *international journal of hydrogen energy* 40: 5062 - 5073; 2015.
- [34] Keskin. T, Abo-Hashesh. M, Hallenbeck. P.C. Photofermentative hydrogen production from wastes. *Bioresource Technology*, 102, Issue 18, 8557-8568, 2011.
- [35] Guevara-Lopez E, Buitron. G, Evaluation of different support materials used with a photo-fermentative consortium for hydrogen production, *International Journal of Hydrogen Energy* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.08.057>
- [36] Kim. D-H, Kim. M-S. Hydrogenases for biological hydrogen production. *Bioresource Technology*, 102, Issue 18, 8423-8431, 2011.
- [37] Hassana. S H.A., Morsy. F. M. Feasibility of installing and maintaining anaerobiosis using *Escherichia coli* HD701 as a facultative anaerobe for hydrogen production by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 from various carbohydrates. *Enzyme and Microbial Technology*. 81: 56–62, 2015.
- [38] Seppä. J., Puhakka. J. A., Yli-Harja. O., Karp. M. T., Santala. V. Fermentative hydrogen production by *Clostridium butyricum* and *Escherichia coli* in pure and cocultures Jenni J. *International journal of hydrogen energy* 36: 10701 -10708, 2011.
- [39] Morsy. F.M. Hydrogen production by *Escherichia coli* without nitrogen sparging and subsequent use of the waste culture for fast mass scale one-pot green synthesis of silver nanoparticles. *International journal of hydrogen energy* 39:11902 -11912, 2014.
- [40] Foucaud-Scheunemann. C, Helinck. S. *Les micro-organismes au coeur des biotechnologies*, Concepts, équipements et réglementations des biotechnologies in Bioprocédés, Procédés chimie - bio – agro, Bio550, Éditions Techniques de l'Ingénieur, 2013.
- [41] Vermaas. W. *An Introduction to Photosynthesis and Its Applications*. The World & I, March 1998, 158-165.
- [42] Whitmarsh. J, Govindjee. *The photosynthetic process*. In: "Concepts in Photobiology: Photosynthesis and Photomorphogenesis". Published by PurLife Health & Research Company, 2004, 11-51.
- [43] Hallenbeck. P. C., Benemann. J. R. Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2002; 27: 1185 – 1193.
- [44] Hahn. J. J. P, Jacoby. W. A, Bajpai. R. K, Daskocil. E. J, Yu. Q. *Hydrogen production from biomass*. The Faculty of the Graduate School at the University of Missouri-Columbia, In Partial Fulfilment of the Requirements for the Degree Doctor, December 2006.
- [45] Ferreira. K. N, Iverson, T. M, Maghlaoui, K. B. J, and Iwata. S. Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center. *Science*, 303:1831-1838, 2004.
- [46] Stroebel. D, Y. Choquet. J. L. P, and Picot. D. An atypical haem in the cytochrome b6f complex. *Nature* 426:413-418, 2003.
- [47] Ben-Shem. A, Frolov. F, Nelson. N. Crystal structure of plant Photosystem I. *Nature*, 426:630-635, 2003.

- [48] Calvin. M. The path of carbon in photosynthesis. *Science*, 135:879-889, 1962.
- [49] Patrick. C. Hallenbeck, and Ghosh, D. Biophotolyse directe [Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward? *Trends in Biotechnology*, 27(5), 2009.
- [50] Legrand, J. *Production d'hydrogène par des énergies renouvelables*. Rapport final du programme de recherche intégrée 4.1. Programme énergie, université de Nantes, 2004-2005.
- [51] Dutta. D, De. D, Chaudhuri. S, Bhattacharya. S. K. Hydrogen production by Cyanobacteria, *Microbial Cell Factories, Review. Licensee BioMed Central*, 4:(36), 2005.
- [52] Reith. J.H, Wijffels. R.H, Barten. H. Status and perspectives of biological methane and hydrogen production, *Bio-methane & Bio-hydrogen*. Dutch Biological Hydrogen Foundation, 2003.
- [53] Melis. T. *Integrated Biological Hydrogen Production*, International Hydrogen Energy Congress and Exhibition IHEC, 2005, Istanbul, Turkey.
- [54] Esper. B, Badura. A, Rogner. M. Photosynthesis as a power supply for (bio-) hydrogen production, *Trends in Plant Science Review*, 11:(11), 2006.
- [55] Kok. B. *Photosynthesis*, In Gibbs. M, Hollaender. M.A, Kok. B, Krampitz. L.O, San Pietro. A, Bio Solar Hydrogen Conversion, 1973, Bethesda, MD.
- [56] Melis. A. *Maximizing Light Utilization Efficiency and Hydrogen Production in Microalgal Cultures*, 2006, 117-119. In U. S. D. o. Energy (ed.)
- [57] Gosse, J. L, Engel. J. B, Rey. F. E, Harwood. C. S, Scriven. L. E, Flickinger. M. C. Hydrogen Production by Photoreactive Nanoporous Latex Coatings of Nongrowing *Rhodospseudomonas palustris* CGA009. *Biotechnol Prog* 23:124-130, 2007.
- [58] Johnston. J. A, Brown. A. H. The effect of light on the oxygen metabolism of the photosynthetic bacterium, *Rhodospirillum rubrum*. *Plant Physiology*, 29:177-182, 1954.
- [59] Zhu. H, Wakayama. T, Suzuki. T, Asada. Y and Miyake. J. Enhancement of *Rhodobacter sphaeroides* RV in cationic polymer/agar gels of hydrogen production in the presence of NH_4^+ . *Journal of biosciences and bioengineering*, 88 (5): 507-512, 1999, Japan.
- [60] Redwood. M. D, Macaskie. L. E. A two-stage, two-organism process for biohydrogen from glucose. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31: 1514 – 1521, 2006.
- [61] He. D, Bultel. Y, Magnin. J-P, Willison. J. C. Kinetic analysis of photosynthetic growth and photohydrogen production of two strains of *Rhodobacter Capsulatus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 8: 253–259, 2006.
- [62] Kondo. T, Arakawa. M, Hirai. T, Wakayama. T, Haka. M and Miyake. J. Enhancement of hydrogen production by a photosynthetic bacteria mutant with reduced pigment. *Journal of bioscience and bioengineering*; 93 (2): 145-150, 2002 Japan.
- [63] Kim. M-S, Baek. J-S, Lee. J. K. Comparison of H_2 accumulation by *Rhodobacter sphaeroides* KD131 and its uptake hydrogenase and PHB synthase deficient mutant. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31: 121 – 127, 2006.
- [64] Erolu. E, Tabanolu. A, Gündüz. U, Yücel. M, Türker. L and Erolu. I. *The relationship between growth kinetics and hydrogen production by Rhodobacter sphaeroides*. Press of Middle East Technical University, Ankara, Turkey, 2005.
- [65] Richardson. D.J. Bacterial respiration: a flexible process for a changing environment, *Microbiology*. 146: (3) 551-571, 2000.
- [66] Dyer. J. K., Anderson. A. W. Isolation and Role of Nonheme Iron Protein in *Clostridium botulinum*. *Appl Microbiol* 16:207-211, 1968.
- [67] Tanisho. S, Kamiya. , Wakao. N. Hydrogen evolution of *Enterobacter aerogenes* depending on culture pH: mechanism of hydrogen evolution from NADH by means of membrane-bound hydrogenase. *Biochem Biophys Acta* 973:1-6, 1989.
- [68] Zhou. P, Wang. Y, Gao. R, Tong. J, Yang. Z, Transferring [NiFe] hydrogenase gene from *Rhodospseudomonas palustris* into *E. coli* BL21(DE3) for improving hydrogen production, *International Journal of Hydrogen Energy*, 40(12): 4329-4336, 2015.
- [69] Vignais. PM. Hydrogenases and h[p]-reduction in primary energy conservation. *Results Probl Cell Differ* 45:223–52, 2008.
- [70] Hedderich. R, Forzi. L. Energy-converting [NiFe] hydrogenases: more than just H_2 activation. *J Mol Microbiol Biotechnol* 10:92–104, 2005.
- [71] Sapra. R, Verhagen. M, Adams. M.W.W. Purification and characterization of a membrane-bound hydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J Bacteriol* 182:3423–8, 2000.
- [72] Silva. P.J, van den Ban. E.C, Wassink .H, Haaker. H, De Castro. B, Robb. F.T, al. Enzymes of hydrogen metabolism in *Pyrococcus furiosus*. *Eur J Biochem* 267:6541–51, 2000.

- [73] Soboh. B, Linder. D, Hedderich. R. A multisubunit membranebound [NiFe] hydrogenase and an NADH-dependent Fe-only hydrogenase in the fermenting bacterium *Thermoanaerobacter tengcongensis*. *Microbiology* 150: 2451–63, 2004.
- [74] Gottschalk. G. *Bacterial metabolism*. 2nd ed. Springer; 1986.
- [75] McInerney. M.J, Rohlin. L, Mouttaki. H, Kim. M, Rebecca. S, Krupp. R.S, et al. The genome of *Syntrophus aciditrophicus*: life at the thermodynamic limit of microbial growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:7600–605, 2007.
- [76] Nath. K, Kumar. A, Das. D. Hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* strain O.U.001 using spent media of *Enterobacter cloacae* strain DM11. *Appl Microbiol Biotechnol*, Springer-Verlag, 68: 533–541, 2005.
- [77] Rodriguez. J, Kleerebezem. R, Lema. J.M. et al. Modeling product formation in anaerobic mixed culture fermentations. *Biotechnol. Bioeng.*, 93 : 592-606, 2006.
- [78] Basak. N, D. Das. The prospect of purple non-sulfur (PNS) photosynthetic bacteria for hydrogen production: the present state of the art. *World J Microbiol Biotechnol*, 23: 31–42, 2007.
- [79] Zhang. Z-P, Show. K-Y, Tay. J-H, Liang. D.T, Lee. D.J. Biohydrogen production with anaerobic fluidized bed reactors comparison of biofilm-based and granule-based systems. *Int J Hydrogen Energy* 33(5):1559–64, 2008.
- [80] Wu. S.Y, Hung. C.H, Lin. C.Y, Lin. P.J, Lee. K.S, Lin.C.N, et al. HRTdependent hydrogen production and bacterial community structure of mixed anaerobic microflora in suspended, granular and immobilized sludge systems using glucose as the carbon substrate. *Int J Hydrogen Energy*, 33:1542–1549, 2008.
- [81] Bhaskar. Y.V, Mohan. S.V, Sarma. P.N. Effect of substrate loading rate of chemical wastewater on fermentative biohydrogen production in biofilm configured sequencing batch reactor. *Bioresour Technol* 99:6941–8, 2008.
- [82] Li. C.L, Fang. H.H.P. Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures. *Crit Rev Env Sci Technol* 37:1–39, 2007.
- [83] Hoekema. S, Bijmans. M, Janssen. M, Tramper. J, Wijffels. R. H. A pneumatically agitated &at-panel photobioreactor with gas re-circulation: anaerobic photoheterotrophic cultivation of a purple non-sulfur bacterium. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27: 1331 – 1338, 2002.
- [84] Wu. S, Li. X, Yu. J, Wang. Q. Increased hydrogen production in co-culture of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Bradyrhizobium japonicum*, *Bioresour Technology*, 123: 184-188, 2012.
- [85] Yoshida. A, Nishimura. T, Kawaguchi. H, Inui. M, Yukawa. H. Enhanced hydrogen production from glucose using ldh- and frd-inactivated *Escherichia coli* strains. *Appl Microbiol Biotechnol* 73:67–72, 2006.
- [86] Maeda. T, Sanchez-Torres. V, Wood. T.K. Metabolic engineering to enhance bacterial hydrogen production. *Mol Biotechnol* 1:30–9, 2007.
- [87] D.Akroum-Amrouche, N.Abdi, H. Lounici ; N.Mameri, Biohydrogen production by dark and photo-fermentation processes, *IEEE Xplore*, Digital Library, ©IEEE2013.
- [88] Asada. Y and Miyake. J. Review, Photobiological Hydrogen Production. *Journal of bioscience and bioengineering*, 88 (1): 1-6, 1999.
- [89] *Interstate Technology & Regulatory Council, Characterization, Design, Construction, and Monitoring of Bioreactor Landfills*, February 2006.
- [90] Wolfrum. E. J and Watt. A. Bioreactor Design Studies for a Hydrogen-Producing Bacterium. *Applied Biochemistry and Biotechnology, Humana*, 98–100, 2002.
- [91] Wakayama. T, Nakada. J. E, Asada. Y and Miyake. J. Effect of light/ dark cycle on bacterial hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* RV. *Applied Biochemistry and Biotechnology. Humana Press*, 48-86, 2000.
- [92] Pilon. L. *Photobiological Hydrogen Production*. University of California Los Angeles, Mechanical and Aerospace Engineering Department, UCLA. www.seas.ucla.edu
- [93] D. Akroum-Amrouche, Photobioproduction de l'hydrogène par *Rhodobacter sphaeroides* CIP 60.6, Thèse de magistère, 2008, Ecole Nationale Polytechnique, Alger.
- [94] Taob. Y, Chen. Y, Wu. Y, He. Y, Zhou. Z. High hydrogen yield from a two-step process of dark- and photo-fermentation of sucrose. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32: 200-206, 2007.
- [95] Buckley. M and Wall. J. *Microbial energy conversion*. American Academy of Microbiology, San Francisco, 2006. California.
- [96] Grimont, P. Taxonomie des *Escherichia* . *Méd Mal Infect* 1987, 6-10.
- [97] Pilet. C., Bourdon. J.L., Toma. B., Marchal. N., Balbastre. C., *Les entérobactéries Bactériologie médicale et vétérinaire : systématique bactérienne* Doins, Paris, 2e ed 1979: 109-187.

- [98] Le Minor. L., Popoff. M.Y. et Bockemuhl. J. Supplement 1989 to the Kauffmann-White scheme. *Res Microbiol* 141: 1173-1177, 1990.
- [99] Levine. 1987 : *Escherichia coli* that cause diarrhea : enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *Journal of infectious Diseases* 155:377-389, 1987 In Pohl, P. *Les souches pathogènes d'Escherichia coli, histoire et classification*. Annales de médecine vétérinaire, 1993, 137:325-333.
- [100] Roth,S., Jung,K., Jung,H., Hommel,R.K. and Kleber,H.P. Crotonobetaine reductase from *Escherichia coli* a new inducible enzyme of anaerobic metabolism of L(-)-carnitine. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1994, 65 (1):63-69.
- [101] Meyer. A, Deiana. J, Bern. A, *Cours de microbiologie générale: avec problèmes et exercices corrigés*, In Biosciences et techniques, 2eme edition Doin, 2004.
- [102] *Démarrage de la première usine commerciale d'acide succinique d'origine végétale* ; art. de Biofutur, mars 2010, p 21.
- [103] Résumé des caractéristiques du produit, RCP du Prévenar13® <http://www.ema.europa.eu>.
- [104] US DOE Joint Genome Institute (JGI-PGF), <http://jgi.doe.gov>.
- [105] Gennis. R.B. and Stewart. V. Respiration. In *Escherichia coli* and *Salmonella* . Neidhardt F.C. (eds). Washington : ASM Press, 1996, 217-261.
- [106] Cotter. P.A. and Gunsalus. R.P. Contribution of the *fnr* and *arcA* gene products in coordinate regulation of cytochrome o and d oxidase (*cyoABCDE* and *cydAB*) genes in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol.Lett.* 70:31-36, 1992.
- [107] Gunsalus. R, and Schröder. I. *The Escherichia coli Student Portal* .International Peter Karp and coworkers. 2011.
- [108] Uden. G, Bongaerts. J. Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetic and transcriptional regulation in response to electron acceptors, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1320: 217–234, 1997.
- [109] Wissenbach. U., Ternes. D., and Uden. G. An *Escherichia coli* mutant containing only demethylmenaquinone, but no menaquinone: effects on fumarate, dimethylsulfoxide, trimethylamine N-oxide and nitrate respiration. *Arch Microbiol* . 158 :68-73, 1992.
- [110] Berks. B.C., Ferguson. S.J., Moir. J.W., Richardson. D.J. Enzymes and associated electrontransport systems that catalyse the respiratory reduction of nitrogen oxides and oxyanions. *Biochim.Biophys.Acta*, 1232:97-173, 1995.
- [111] Fox. A, Camberlein. E. Nutrition, *Croissance et Métabolisme Energétique*, Bctériologie, édition 6, Chapitre 3, © 2013 University of South Carolina.
- [112] Graphic © E Schmid- 2004, <http://classroom.sdmesa.edu/eschmid/Lecture5-Microbio.htm>.
- [113] Albert. G, Moat. J. W. Foster and Michael P. *Microbial Physiology*. Spector, Copyright 2002 by Wiley-Liss, Inc.
- [114] Ballantine. S. P, et Boxer. D. H. Nickel-containing hydrogenase isoenzymes from anaerobically grown *Escherichia coli* K-12 J. *Bacteriol.*, 163:454-459, 1985.
- [115] Callister. S. J, Nicolra. C. D, Zeng. X, Roh. J. H, Dominguez M. A, Tavano C. L, Monroe. M. E, Kaplan. S, Donohue T. J, Smith R. D, Lipton. M. Comparison of aerobic and photosynthetic *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. proteomes. *Journal of Microbiologie Methods*, 67: 424-436, 2006.
- [116] Ballantine. S. P., et Boxer. D. H. Isolation and characterisation of a soluble active fragment of hydrogenase isoenzyme 2 from the membranes of anaerobically grown *Escherichia coli*, *Eur. J. Biochem.*, 156:277-284, 1986.
- [117] Sawers. R. G., Ballantine. S. P. et Boxer. D. H. Differential expression of hydrogenase isoenzymes in *Escherichia coli* K-12: evidence for a third isoenzyme, *J. Bacteriol.*, 164:1324-1331, 1985.
- [118] Bronsted. L., et Atlung. T. Anaerobic regulation of the hydrogenase 1 (*hya*) operon of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 176:5423-5428, 1994.
- [119] Rodrigue. A. « Biosynthèse de L'hydrogénase chez *Escherichia coli*: Incorporation du nickel, maturation et translocationtransmembranaire de l'hydrogénase », D.E.A. de Biochimie, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, 1997.
- [120] Stoker. K., Oltmann. L. F. et Stouthammer. A. H. Partial characterization of a electrophoretically labile hydrogenase activity of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 170 :1220-1226, 1988.
- [121] Vignais. P.M, Billoud. B, Meyer. J. Classification and phylogeny of hydrogenases. *FEMS Microbiol Rev.*,25(4):455-501, 2001.
- [122] Pecher. A, Zinoni. F, Jatisatienr. C, Wirth. R, Hennecke. H, Böck. A. On the redox control of synthesis of anaerobically induced enzymes in enterobacteriaceae. *Arch. Microbiol.*, 136(2):131-6, 1983.
- [123] Peck. H. D. J., et Gest. H. Formic dehydrogenase and the hydrogen lyase enzyme complex in coliaerogenes bacteria. *J. Bacteriol.*, 73:706-721. 1957.

- [124] Boyington. J.C, Gladyshev. V.N, Khangulov. S.V, Stadtman. T.C, Sun. P.D. Crystal structure of formate dehydrogenase H: catalysis involving Mo, molybdopterin, selenocysteine, and an Fe₄S₄ cluster. *Science*, 275(5304):1305-8, 1997.
- [125] Birkmann. A, Zinoni. F, Sawers. G, Böck. A. Factors affecting transcriptional regulation of the formate-hydrogen-lyase pathway of Escherichia coli. *Arch Microbiol.*, 148(1):44-51, 1987.
- [126] Cole. J. A. Microbial gas metabolism. *Adv. Microb. Physiol.*, 14:1-92, 1976.
- [127] Sawers. G. The hydrogenases and formate dehydrogenases of Escherichia coli. *Antonie Van Leeuwenhoek. Pub Med*, 66(1-3):57-88, 1994.
- [128] Bagramyan. K, Mnatsakanyan. N, Poladian. A, Vassilian. A, Trchounian. A. The roles of hydrogenases 3 and 4, and the F₀F₁-ATPase, in H₂ production by Escherichia coli at alkaline and acidic pH. *FEBS Lett.* 516(1-3):172-8, 2002.
- [129] Böhm. R, Sauter. M, Böck. A. Nucleotide sequence and expression of an operon in Escherichia coli coding for formate hydrogenlyase components. *Mol Microbiol.* 4(2):231-43, 1990.
- [130] Sauter. M, Böhm. R, Böck. A. Mutational analysis of the operon (hyc) determining hydrogenase 3 formation in Escherichia coli. *Mol Microbiol.* 6(11):1523-32, 1992.
- [131] Yoshida. A, Nishimura. T, Kawaguchi. H, Inui. M, Yukawa. H. Enhanced hydrogen production from formic acid by formate hydrogen lyase-overexpressing Escherichia coli strains. *Appl Environ Microbiol.* 71(11):6762-8, 2005.
- [132] Khanna. N, Ghosh. A.K, Huntemann. M, Deshpande. S, Han. J, Chen. A, Kyrpides. N, Mavrommatis. K, Szeto. E, Markowitz. V, Ivanova. N, Pagani. I, Pati. A, Pitluck. S, Nolan. M, Woyke. T, Teshima. H, Chertkov. O, Daligault. H, Davenport. K, Gu. W, Munk. C, Zhang. X, Bruce. D, Detter. C, Xu. Y, Quintana. B, Reitenga. K, Kunde. Y, Green. L, Erkkila. T, Han. C, Brambilla. E.M, Lang. E, Klenk. H.P, Goodwin. L, Chain. P, Das. D. Complete genome sequence of Enterobacter sp. IIT-BT 08: A potential microbial strain for high rate hydrogen production, *Stand. Genomic Sci.*, Khanna, 9(2), 2013.
- [133] Leonhartsberger. S, Korsä. I, Böck. A. A Review The molecular biology of formate metabolism in enterobacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol* 4:269-276, 2002.
- [134] Seppälä. J.J, Puhakka. J. A, Yli-Harja. O, Karp. M. T, Santala. V. Fermentative hydrogen production by Clostridium butyricum and Escherichia coli in pure and cocultures, *Int J Hydrogen Energy*, 36:10701-10708, 2011.
- [135] Bisaillon. A, Turcot. J, Hallenbeck. P.C. The effect of nutrient limitation on hydrogen production by batch cultures of Escherichia coli. *Int J Hydrogen Energy*, 31:1504-8, 2006.
- [136] Turcot. J, Bisaillon. A, Hallenbeck. P.C. Hydrogen production by continuous cultures of Escherichia coli under different nutrient regimes. *Int J Hydrogen Energy* 33:1465-70, 2008.
- [137] Kleerebezem. R, van Loosdrecht. M.C.M. Mixed culture biotechnology for bioenergy production. *Curr Opin Biotechnol*, 18:207-12, 2007.
- [138] Kapdan. I.K, Kargi. F. Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme Microb Technol*, 38:569-82, 2006.
- [139] Lin. C.Y, Lay. C.H. Carbon/nitrogen-ratio effect on fermentative hydrogen production by mixed microflora. *Int J Hydrogen Energy*, 29(1):41-5, 2004.
- [140] Argun. H, Kargi. F, Kapdan. I.K, Oztekin. R. Biohydrogen production by dark fermentation of wheat powder solution: effects of C/N and C/P ratio on hydrogen yield and formation rate. *Int J Hydrogen Energy* 33(7):1813-9, 2008.
- [141] Chou. C.H, Wang. C.W, Huang. C.C, Lay. J.J. Pilot study of the influence of stirring and pH on anaerobes converting highsolid organic wastes to hydrogen. *Int J Hydrogen Energy* 33:1550-8, 2008.
- [142] Redwood. M.D, Mikheenko. I.P, Sargent. F, Macaskie. L.E. Dissecting the roles of Escherichia coli hydrogenases in biohydrogen production. *FEMS Microbiol Lett*, 278:48-55, 2008.
- [143] Penfold. D.W, Forster. C.F, Macaskie. L.E. Increased hydrogen production by Escherichia coli strain HD701 in comparison with the wild-type parent strain MC4100. *Enzyme Microb Technol*, 33:185-9, 2003.
- [144] Maeda. T, Sanchez-Torres. V, Wood. T.K. Enhanced hydrogen production from glucose by metabolically engineered Escherichia coli. *Appl Microbiol Biotechnol*, 77(4):879-90, 2007.
- [145] Ishikawa. M, Yamamura. S, Ikeda. R, Takamura. Y, Sode. K, Tamiya. E, et al. Development of a compact stacked flatbed reactor with immobilized high-density bacteria for hydrogen production. *Int J Hydrogen Energy*, 33:1593-7, 2008.
- [146] Makenzi. C, Choudhary. M, Larimer. F. W, Predki. P. F. The home stretch, a first analysis of the nearly completed genome of Rhodobacter sphaeroides 2.4.1. *Photosynthetic Research*, Kluwer Academic Publishers, 70: 19-41, 2001.

- [147] Madera. M, Vogel. C, Kummerfeld. S.K, Chothia. C and Gough. J. The Superfamily database in: additions and improvements. *Nucl. Acids Res*, 32: D235-D239, 2004.
- [148] Packer. H. L, and Armitage. J. Behavioural Responses of Rhodobacter sphaeroides to Linear Gradients of the Nutrients Succinate and Acetate. *Applied and environmental microbiology*, 66 (12): 5186–5191, 2000.
- [149] Paustian. T. D, and Kurtz. R. S. *Transposon Mutagenesis of Rhodobacter sphaeroides*. Proceedings of the 15th Workshop/Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE), University of Wisconsin–Madiso, 1994; 15 (608): 263-4921.
- [150] Darcy. D LeClair. B.S. *Optimisation and characterization of the growth of the photosynthetic bacterium Blastochloris viridis and a brief survey of its potential as a premeditative tool*, Graduate School of the University of Notre Dame Indiana in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Doctor of Philosophy, April 2006
- [151] Kiley. P. J., Varga. A., Kaplan. S., Physiological and Structural Analysis of Light-Harvesting Mutants of Rhodobacter sphaeroides, , *Journal of Biotechnology*, Vol. 170, No. 3 p. 1103-1115, Mar. 1988.
- [152] Leveau. J. Y, et Bouix. M. *Microbiologie industrielle. Les microorganismes d'intérêt industriel*. Collection science et techniques agroalimentaires. Lavoisier, Tec et Doc apria, 1993.
- [153] Larpent. J. P, et Gourdaud. M. L. *Memonto technique de microbiologie*. Lavoisier, Tec et Doc, troisième édition, 1997.
- [154] Hilton. J. C, Temple C. A, and Rajagopalan K. V. Re-design of Rhodobacter sphaeroides Dimethyl Sulfoxide Reductase. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.*, 274 (13): 8428–8436, 1999.
- [155] Hickman. J. W, Mackenzie. C, Choudhary. M, Donohue. T, Kaplan. S and Zhou. D. S, Kvikstad. E, Kile. A, Severin. J, Forrest. D, Runnheim. R, Churas. C, Schwartz. C. Whole-Genome Shotgun Optical Mapping of Rhodobacter Sequence Assembly sphaeroides strain 2.4.1 and Its Use for Whole-Genome Shotgun. *Genome Research*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 13: 2142-2151, 2003.
- [156] Brandner. J. P, McEwan A. G, Kaplan. S and Donohue T. J. Expression of the Rhodobacter sphaeroides Cytochrome c2 Structural Gene. *Journal of Bacteriology, American Society for Microbiology*, 171 (1): 360-368, 1989.
- [157] Nakada. E, Asada. Y, Arai. T and Miyake. J. Light penetration into cell suspension of photosynthetic bacteria ant relation to hydrogen production. *Journal of fermentation and bioengineering*, 80 (1): 53-57, 1995, Japan.
- [158] Bahatyroya. S. The native architecture of a photosynthetic membrane. *Nature*, 430: 1058-1062, 2004.
- [159] Scheuring. S. A. *Habilitation à Diriger des Recherches*, Université Pierre & Marie Curie, Août 2005.
- [160] Hu. X, and Schulten. K. Model for the Light-Harvesting Complex I (B875) of Rhodobacter sphaeroides, *Biophysical Journal*, August 1998; 75: 683–694.
- [161] Kiley. P. J, and Kaplan. S. Molecular genetics of photosynthetic membrane biosynthesis in Rhodobacter sphaeroides. *Microbiological reviews*, 50-69, 1988.
- [162] Christopher. J, Law. A, Aleksander. W, Roszak. A, June Southall A, Alastair. T, Gardiner. A, Neil. W, Isaacs. A, Richard. J, Cogdell. A. The structure and function of bacterial light-harvesting complexes (Review). *Molecular Membrane Biology*, 21 (3): 183 – 191, 2004.
- [163] Sheuring. S, Levy. D, Rigaud. J. L. Watching the components of photosynthetic bacteria Membranes and there is situ organisation by atomic force microscopy. *Biochemical and biophysical act*, Review Elsevier, 1712: 109-127, 2005.
- [164] Das. D. R, Kiley. P. J, Segal. M, Norville. J, Yu. A. A, Wang. L, Trammell. S. A, Reddick. L. E, Kumar. R, Stellacci. F, Lebedev. N, Schnur. J, Bruce. B. D, Zhang. S and Baldo. M. Integration of Photosynthetic Protein Molecular Complexes in Solid-State Electronic. *American Chemical Society*, 4 (6): 1079-1083, 2004.
- [165] Lancaster. C.R.D, Michel. H. Three-dimensional structures of photosynthetic reaction centers. *Photosynthesis Research* 48: 65-74, 1996.
- [166] Ma. C, Guo . L, Yang. H. Improved photo – Hydrogen production by transposon mutant of Rhodobacter capsulatus with reduced pigment, *Int J Hydrogen Energy*, 37 (17): 12229–12233, 2012.
- [167] Donahue. Function and control of the Rhodobacter sphaeroides photosynthetic apparatus. BACTER Workshop, 2006.
- [168] Nomataa. J, Kitashimab. M, Inoueb. K and Fujitaa. Y. Nitrogenase Fe protein-like Fe–S cluster is conserved in L-protein (BchL) of dark-operative protochlorophyllide reductase from Rhodobacter capsulatus. *Federation of European Biochemical Societies FEBS Letters*, 580: 6151–6154, 2006.
- [169] Hillmer. P, and Gest. H. H2 metabolism in photosynthetic bacterium Rhodopseudomonas capsulatus: H2 production by growing cultures. *J Bacteriol* 129:724-731, 1977.
- [170] Fang. H., Liu. H, and Zhang. T. Phototrophic hydrogen production from acetate and butyrate in wastewater. *Int J Hydrogen Energy* 30:785-793, 2005.

- [171] Shi X.Y., and Yu. H. Q. Response surface analysis on the effect of cell concentration and light intensity on hydrogen production by *Rhodospseudomonas capsulatus*. *Process Biochem* **40**:2475-2481, 2005.
- [172] Ooshima. H., Takakuwa. S, Katsuda. T, Okuda. M, Shirasawa. T, Azuma. M, and Kato. J. Production of Hydrogen by a Hydrogenase deficient mutant of *Rhodobacter capsulatus*. *J. Fermentation Bioeng* **85**:470–475, 1998.
- [173] Eroglu. I., Aslan. K, Gunduz. U, Yucel. M, and Turker. L. Substrate consumption rates for hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* in a column photobioreactor. *J Biotechnol* **70**:103-113, 1999.
- [174] Zhu. H., Fang. H. H. P, Zhang. T, and Beaudette. L. A. Effect of ferrous ion on photo heterotrophic hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides*. *Int J Hydrogen Energy*. **32**:4112–8, 2007.
- [175] Ludden. P., and Robert. G. *The biochemistry and genetics of nitrogen fixation by photosynthetic bacteria*, 1995. p. 929-947. In B. Blankenship, M. Madigan, and C. Bauer (ed.), *Anoxygenic photosynthetic bacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- [176] Kars. G., Gunduz. U. Towards a super H₂ producer: improvements in photofermentative biohydrogène production by genetic manipulations. *Int. J. Hydrogen Energy* **35**, 6646–6746, 2010.
- [177] Kim. E.J, Kim. J.S, Kim. M.S, Lee. J. K. Effect of changes in the level of light harvesting complexes of *Rhodobacter sphaeroides* on the photoheterotrophic production of hydrogen. *International Journal of Hydrogen Energy*, **31**: 531 – 538, 2006.
- [178] Yetis. M, Gunduz. U, Eroglu. I, Yucel. M and Turker. L. Photoproduction of hydrogen from sugar refinery wastewater by *Rhodobacter sphaeroides* OU.001. *International Journal of Hydrogen Energy*, **25**: 1035–1041, 2000.
- [179] Zhu. H, Suzuki. T, Tsygankov. A. A, Miyakez. A. Hydrogen production from tofu wastewater by *Rhodobacter sphaeroides* immobilized in agar gel. *International Journal of Hydrogen Energy*, **24**: 305-310, 1999.
- [180] Eroglu. E, Eroglu. I, Gunduz. U, Turker. L and Yucel. M. Biological hydrogen production from olive mill wastewater with tow-stage process. *International Journal of Hydrogen Energy*, **31**: 1527 – 1535, 2006.
- [181] Laurinavichene. T.V., Belokopytov. B.F., Laurinavichius. K.S., Tekucheva. D.N., Seibert. M., Tsygankov. A.A. Towards the integration of dark and photo-fermentative waste treatment. 3. Potato as substrate for sequential dark fermentation and light driven H₂ production. *Int. J. Hydrogen Energy* **35**, 8536–8543, 2010.
- [182] Fang. H.P, Zhu. H, Zhang. T. Phototrophic hydrogen production from glucose by pure and co-cultures of *Clostridium butyricum* and *Rhodobacter sphaeroides*. *International Journal of Hydrogen Energy*, **31**, 2223 – 2230, 2006.
- [183] Suwan Myung, Joseph Rollin, Chun You, Fangfang Sun, Sanjeev Chandrayan, Michael W.W. Adams, Y.-H. Percival Zhang, In vitro metabolic engineering of hydrogen production at theoretical yield from sucrose, *Metabolic Engineering*, **24**: 70-77, 2014.
- [184] Yokoi. H, Saitsu. A, Uchaida. H, Hirose. J, Hayashi. S and Takasaki. Y. Microbial Hydrogen Production from Sweet Potato Starch Residue. *Journal of bioscience and bioengineering*, **91** (1): 58-63, 2001.
- [185] Asada. Y, Tokumoto. M, Aihara. Y, Oku. M, Ishimi. K, Wakayama. T, Miyake. J, Tomiyama. M, Kohno. H. Hydrogen production by co-cultures of *Lactobacillus* and a photosynthetic bacterium, *Rhodobacter sphaeroides* RV. *International Journal of Hydrogen Energy*, **31**: 1509 – 1513, 2006.
- [186] Ljunggren. M, Wallberg. O, Zacchi. G, Techno-economic comparison of a biological hydrogen process and a 2nd generation ethanol process using barley straw as feedstock, *Bioresource Technology* **102**: 9524–9531, 2011.
- [187] Bertani G. Studies on lysogenesis I. : The Mode of Phage Liberation by Lysogenic *Escherichia coli*1. *J Bacteriol.* **62**(3):293–300, 1951.
- [188] LYFO DISK®, KWIK-STIK™ et KWIK-STIK™ Copyright, Microbiologics Inc.
- [189] Prescott. M. *Microbiologie*. De Buech, Paris, 2003.
- [190] Perry. J. *Microbiologie*. Dunod, Paris, 2004.
- [191] Manafi. M, Fluorogenic and chromogenic enzyme substrates in culture media and identification tests, *International Journal of Food Microbiology*, **31**, 45-58, 1996.
- [192] Le Minor. I., Veron. N. *Bactériologie Médicale*, Flam Med. Science, Paris, 1989 : 333-318 ; 773-823.
- [193] Dellarras. C, Bernard. A. ,Surveillance sanitaire et microbiologie des eaux .Ed.Lavoisier, Paris, p 246, 2003.
- [194] Richard. C. Enterobacteriaceae : genres et espèces. *Annale de Biol. Clin.*, **46** : 781-785, 1988.
- [195] Palleroni. N.J. *Pseudomonas* in Krieg. N.R., Holt J.G., *Bergey's Manual of systematic Bacteriology* Williams and Wilkins, Baltimore, vol. 1, 1984.
- [196] BioMérieux® SA, *Système d'identification des Enterobacteriaceae et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux*, 07584G - Juin 2007.

- [197] Santos. Y, Romalde. J.L, Bandín. I, Magariños. B, Núñez. S, Barja. J.L, Toranzo. A.E, Usefulness of the API-20E system for the identification of bacterial fish pathogens, *Aquaculture*, 116 (2–3): 111-120, 1993.
- [198] Kim. S, Seola. E, Ohb. Y-K, Wangc. G.Y, Park. S, Hydrogen production and metabolic flux analysis of metabolically engineered *Escherichia coli* strains. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34: 7417-7427, 2009.
- [199] Amenaghawon. N. A., Nwaru. K. I., Aisien. F. A., Ogbeide. S. E. and Okieimen. C. O., Application of Box-Behnken Design for the Optimization of Citric Acid Production from Corn Starch Using *Aspergillus niger*, *British Biotechnology Journal*, 3(3): 236-245, 2013.
- [200] Venil. C. K., and Laksh manaperumalsamy. P. Application of statistical design to the optimization of culture medium for prodigiosin production by *Serratia marcescens* SWML08, *Malaysian Journal of Microbiology*, 5(1): 55-61, 2009.
- [201] Burrows. E. H., Chaplen. F.W.R, Ely. R.L. , “ Optimization of media nutrient composition for increased photofermentative hydrogen production by *Synechocystis* sp. PCC 6803,” *International Association for Hydrogen Energy*, 33(21): 6092–6099, 2008.
- [202] Oztekin. R, Kapdan. I. K., Kargi. F, Argun. H,” Optimization of media composition for hydrogen gas production from hydrolyzed wheat starch by dark fermentation,” *International Association for Hydrogen Energy*, 33(15):4083–4090, 2008.
- [203] Vermeulen. N, Kretzer. J, Machalitz. H, Vogel. R. F., Ganzle. M. G, Influence of redox-reactions catalysed by homo- and hetero-fermentative lactobacilli on gluten in wheat sourdoughs, *Journal of Cereal Science*, 43: 137–143, 2006.
- [204] Rossi. M, Corradini. C, Amaretti. A, Nicolini. M, Pompei. A, Zanoni. S, and Matteuzzi. D, “Fermentation of Fructooligosaccharides and Inulin by *Bifidobacteria*: a Comparative Study of Pure and Fecal Cultures,” *Applied and Environmental Microbiology*, 6150–6158, 2005.
- [205] BioSystemsCE, Reagents & Instruments, Glucose Oxydase/Peroxydase, EN ISO 13485 et EN ISO 9001 standards, Costa Brava 30, Barcelona, Spain.
- [206] Informations sur les souches bactériennes du Centre de ressources biologiques de l'institut Pasteur, CRBIP. Pasteur.2004.
- [207] Sistrom. W. R. The kinetics of the synthesis of photopigments in *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *J. Gen. Microbiol.*, 28: 607-616, 1962.
- [208] Makenzi. C. *Rhodobacter sphaeroides*. October 2005.
- [209] Miyake. J, Wakayama. T, Schnackenberg. J, Arai. T and Asada. Y. Simulation of the daily sunlight illumination pattern for bacterial photo- hydrogen production. *Journal of bioscience and bioengineering*, 88 (6): 659-663, 1999, Japan.
- [210] Lecler. H, Gaillard. J. L et Simonet. *Microbiologie générale*. La bactérie et le monde bactérien. 1994.
- [211] In-BeomKo, Noike. T. Use of blue optical filters for suppression of growth of algae in hydrogen producing non-axenic cultures of *Rhodobacter sphaeroides* RV. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27: 1297 – 1302, 2002.
- [212] Scriban. R, Pompidou. A. *Biotechnologie*. Lavoisier Tec et Doc, cinquième édition, 1999.
- [213] Singleton. P, *Bactériologie pour la médecine la biologie et les biotechnologies*, 6^{ème} édition, Dunod, 2005.
- [214] Delachapelle. S, Renaud. M, Vignais. P. Etude de la production d'hydrogène en bioréacteur par une bactérie photosynthétique *Rhodobacter capsulatus*. *Revue des sciences de l'eau*, 4: 38-39, 1991.
- [215] Callister. S. J, Nicolra. C. D, Zeng. X, Roh. J. H, Dominguez M. A, Tavano C. L, Monroe. M. E, Kaplan. S, Donohue T. J, Smith R. D, Lipton. M. Comparison of aerobic and photosynthetic *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. proteomes. *Journal of Microbiologie Methods*, 67: 424-436, 2006.
- [216] Lobaton. E, Bayen. A. *Modeling and Optimization Analysis of Single Flagellum Bacterial Motion*, UC Berkeley Systems Engineering, Civil and Environmental Engineering, Pisa, April 6th, 2007.
- [217] Davila-Vazquez. G, Arriaga. S, Alatrisme-Mondragón. F, De León-Rodríguez. A, Rosales-Colunga. L.M, Razo-Flores. E. Fermentative biohydrogen production: trends and perspectives. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 7 : 27–45, 2008..
- [218] Hallenbeck. P.C. Fundamentals of the fermentative production of hydrogen. *Water Sci. Technol.* 52, 21–29, 2005.
- [219] Lay. J.J. Modeling and optimization of anaerobic digested sludge converting starch to hydrogen. *Biotechnol. Bioeng.* 68, 269–278, 2000.
- [220] Luftig. J.T, Jordan. V.S. *Design of experiments in quality engineering*. NY: McGraw-Hill; 1998.
- [221] Bowles. L.K, Ellefson. W.L. Effects of butanol on *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Environ Microbiol* 50:1165–70, 1985.

- [222] Chittibabu. G, Nath. K, Das. D, Feasibility studies on the fermentative hydrogen production by recombinant *Escherichia coli* BL-21, *Process Biochemistry*, 41:682-688, 2006.
- [223] Rossmann. R, Sawers. G, Bock. A. Mechanism of regulation of the formate-hydrogenlyase pathway by oxygen, nitrate, and pH: definition of the formate regulon. *Mol Microbiol*, 5: 2807–14, 1991.
- [224] Ghosh. D, Hallenbeck. P. C. Fermentative hydrogen yields from different sugars by batch cultures of metabolically engineered *Escherichia coli* DJT135”, *International journal of hydrogen energy*, 34:7979- 7982, 2009.
- [225] Wang. J, Wan. W., Effect of temperature on fermentative hydrogen production by mixed cultures, *International of Hydrogen Energy*, 33: 5392 – 5397, 2008.
- [226] Lee. K.S, Lin. P.J, Chang. J.S., Temperature effects on biohydrogen production in a granular sludge bed induced by activated carbon carriers, *International Journal of Hydrogen Energy*, 31: 465 – 472, 2006.
- [227] Fabiano. B, Perego. P. Thermodynamic study and optimization of hydrogen production by *Enterobacter aerogenes*. *Int J Hydrogen Energy*, 27:149–56, 2002.
- [228] Oh. Y.K, Seol. E.H, Kim. J.R, Park. S. Fermentative biohydrogen production by a new chemoheterotrophic bacterium *Citrobacter* sp. Y19. *Int J Hydrogen Energy*, 28:1353–1359, 2003.
- [229] Van Ginkel. S, Sung. S, Lay. J.J. Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration. *Int. J Hydrogen Energy* 23, 559–563, 2001.
- [230] Yoshida , Nishimura. T, Kawaguchi. H, Inui. M, Yukawa. H., Efficient induction of formate hydrogen lyase of aerobically grown *Escherichia coli* in a three-step biohydrogen production process, *Appl Microbiol Biotechnol* 74:754–760, 2007.
- [231] Seol. E, Kim. S, Raj. S.M., Park. S, Comparison of hydrogen-production capability of four different *Enterobacteriaceae* strains under growing and non-growing conditions, *International Journal of Hydrogen Energy* 33:5169 – 5175, 2008.
- [232] Bakonyi. P, Nemestóthy. N, Lovits. E., K. Be'lafi-Bako, Application of PlacketteBurman experimental design to optimize biohydrogen fermentation by *E. coli* (XL1-BLUE), *International Journal of Hydrogen Energy* 36:13949-13954, 2011.
- [233] Kim. J.Y.H., Jo. B.H, Cho. Y.H., and Cha. H.J. Biohydrogen production in *Escherichiacoli* BL21 using H₂ producing ability of recombinant *E. coli* NiFe-hydrogenase 1, *Journal of Bioscience and Bioengineering* 108, 2009.
- [234] Junyapoon. S, Buala. W, and Phunpruch. S. Hydrogen Production with *Escherichia Coli* Isolated from Municipal Sewage Sludge, *Thammasat Int. J. Sc. Tech.*, 16(1), 2011.
- [235] Quoc. L. P. T., Quang. T. N., Hoai. L. V. N., Duy. T. H., Tram. N. T. B., and Ngoc. N. T. N. Response surface optimization of acid modification on mung bean starch, *International Food Research Journal* 21(2): 479-483, 2014.
- [236] Whittinghill. D.C. A note on the robustness of Box–Behnken designs to the unavailability of data. *Matrika* 48, 49–52, 1998.
- [237] Box. G.E.P., Behnken. D.W. Three level design for the study of quantitative variables. *Technometrics* 2: 455-475, 1960.
- [238] Montgomery. DC. *Design and analysis of experiments*. NY: John Wiley & Sons; 2005.
- [239] Annadurai. G., Balan. S.M., Murugesan. T. Box–Behnken design in the development of optimized complex medium for phenol degradation using *Pseudomonas putida* (NICM 2174). *Bioprocess Eng.* 21: 415–421, 1999.
- [240] Jo. J.H., Lee. D.S., Park. D., Choe. W., Park. J.M. Optimization of key process variables for enhanced hydrogen production by *Enterobacter aerogenes* using statistical methods. *Bioresource Technol.* 99: 2061–2066, 2008.
- [241] Mu. Y., Wang. G., Yu. H.Q. Response surface methodological analysis on biohydrogen production by enriched anaerobic cultures. *Enzyme Microb. Technol.* 38, 905–913, 2006.
- [242] Wang. G., Mu. Y., Yu. H.Q. Response surface analysis to evaluate the influence of pH, temperature and substrate concentration on the acidogenesis of sucrose-rich wastewater. *Biochem. Eng. J.* 23, 175–184, 2005.
- [243] Wang. J., Wan. W. Optimization of fermentative hydrogen production process by response surface methodology. *Int. J Hydrogen Energy* 33, 6976–6984, 2008.
- [244] Ghosh. D, Hallenbeck. P. C. Response surface methodology for process parameter optimization of hydrogen yield by the metabolically engineered strain *Escherichia coli* DJT135, *Bioresource Technology* 101 (6):1820–1825, 2009.
- [245] Creighton. L, Goupy. J., *Introduction aux plans d'expériences*, 3ème édition, 2006, Dunod.

- [246] Kumar. P., Satyanarayana. T. Optimization of culture variables for improving glucoamylase production by alginate-entrapped *Thermomucor indicae-seudaticae* using statistical methods. *Bioresour. Technol.* 98, 1252–12, 2007.
- [247] Mizuno. O, Dinsdale. R, Hawkes. FR, Hawkes. D.L, Noike.T. Enhancement of hydrogen production from glucose by nitrogen gas sparging. *Bioresour Technol* 73: 59–65, 2000.
- [248] De. V.P., Stevens. P., De. L.J. Hydrogen gas production from formate and glucose by different members of Enterobacteriaceae. *Biotechnol. Lett.* 5, 69–74, 1983.
- [249] Lee. Y.J., Miyahara. T., Noike. T. Effect of pH on microbial hydrogen fermentation. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 77, 694–698, 2002.
- [250] Kennedy. M, Krouse. D. Strategies for improving fermentation medium performance: a review. *J Ind Microbiol Biotechnol* 23:456–75, 1999.
- [251] Vignais. P.M, Colbeau. A. Molecular biology of microbial hydrogenases. *Curr Issues Mol Biol* 6:159–88, 2004.
- [252] Darensbourg. M.Y, Lyon. E.J, Smee. J.J. The bio-organometallic chemistry of active site iron in hydrogenases. *Coord Chem Rev* 206–207:533–61, 2000.
- [253] Appel. J, Phunpruch. S, Steinmüller. K, Schulz. R. The bidirectional hydrogenase of *Synechocystis* sp. PCC 6803 works as an electron valve during photosynthesis. *Arch Microbiol* 173:333–338, 2000.
- [254] Pan. G, Menon. A.L, Adams. M.W. Characterization of a [2Fe–2S] protein encoded in the iron-hydrogenase operon of *Thermotoga maritima*. *J Biol Inorg Chem* 8:469–74, 2003.
- [255] Gorwa. M.F, Croux.C, Soucaille. P. Molecular characterization and transcriptional analysis of the putative hydrogenase gene of *Clostridium acetobutylicum*. *J Bacteriol* 178: 2668–75, 1996.
- [256] Asada. Y, Koike. Y, Schnackenberg. J, Miyake. M, Uemura. I, Miyake. J. Heterologous expression of clostridial hydrogenase in the cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942. *Biochim Biophys Acta* 1490:269–78, 2000.
- [257] Zhang. Y.F, Shen. J.Q. Effect of temperature and iron concentration on the growth and hydrogen production of mixed bacteria. *Int J Hydrogen Energy* 31:441–6, 2006.
- [258] Yang. H.J, Shen. J.Q. Effect of ferrous iron concentration on anaerobic bio-hydrogen production from soluble starch. *Int J Hydrogen Energy* 31:2137–46, 2006.
- [259] Wang. J, Wan. W. Influence of Ni^{2+} concentration on biohydrogen production. *Bioresour Technol* 99(18):8864–8868, 2008.
- [260] Wang. J, Wan. W. Effect of Fe^{2+} concentration on fermentative hydrogen production by mixed cultures *Int J Hydrogen Energy* 33: 1215 – 1220, 2008.
- [261] Fan. Z, Yuan. L, Chatterjee. R. Increased Hydrogen Production by Genetic Engineering of *Escherichia coli*,” *PLoS ONE* 4(2): e4432. doi:10.1371/journal.pone.0004432.
- [262] Ferchichi. M, Crabbe. E, Hintz. W, Gil. G.H, and Amer Almadidy, Influence of culture parameters on biological hydrogen production by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* ATCC 27021, *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 21: 855–862, 2005.
- [263] Liu. B.F , Ren. N.Q, Ding. J, Xie. G.J, Guo. W.Q. The effect of Ni^{2+} , Fe^{2+} and Mg^{2+} concentration on photo-hydrogen production by *Rhodospseudomonas faecalis* RLD-53, *Int J Hydrogen Energy* 34(2):721–726, 2009.
- [264] Ding. J, Ren. N.Q, Liu. M, Ding. L. Effect of Fe and Fe^{2+} on hydrogen production capacity with mixed culture. *Environ Sci* 25(4):48–53, 2004.
- [265] Liu. G, Shen. J., Effects of culture and medium conditions on hydrogen production from starch using anaerobic bacteria, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 98(4):251–256, 2004.
- [266] Lee. Y.J., Miyahara. T, Noike. T. Effect of iron concentration on hydrogen fermentation, *Bioresource Technology*, 80(3): 227–231, 2001.
- [267] Zhang. Y, Liu. G, Shen. J. Hydrogen production in batch culture of mixed bacteria with sucrose under different iron concentrations, *International Journal of Hydrogen Energy*, 30(8): 855–860, 2005.
- [268] Bakonyi. P, Nemestóthy. N, Bélafi-Bakó. K. Comparative Study of Various *E. coli* Strains for Biohydrogen Production Applying Response Surface Methodology, *The Scientific World Journal* 2012:1-7, 2012.
- [269] Bahl. H.M., Gottwald. S., Kuhn. V., Andersch. W. Gottschalk. G. Nutritional factors affecting the ratio of solvents produced by *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and Environmental Microbiology* 52:169–172, 1986.
- [270] Peguin. S, Soucaille. P. Modulation of carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum* by iron limitation and methyl viologen addition. *Applied and Environmental Microbiology* 61:403-405, 1995.
- [271] Dabrock. B, Bahl. H, Gottschalk. G. Parameters affecting solvent production by *Clostridium pasteurianum*. *Appl Environ Microbiol* 58:1233-1239, 1992.

- [272] Chong. M.L, Rahman. N.A.A, Yee. P.L, Aziz. S.A., Rahim. R.A., Shirai. Y., Hassan. M.A. Effects of pH, glucose and iron sulfate concentration on the yield of biohydrogen by *Clostridium butyricum* EB6, *International Journal of Hydrogen Energy*, 34: 8859- 8865, 2009.
- [273] Karri. S, Sierra-Alvarez. R, Field. J.A. Toxicity of copper to acetoclastic and hydrogenotrophic activities of methanogens and sulfate reducers in anaerobic sludge, *Chemosphere* 62:121-127, 2006.
- [274] Sarioglu. M, Atay. U.A, Cebeci. Y. Removal of copper from aqueous solutions by phosphate rock, *Desalination* 181: 303–311, 2005.
- [275] Bulut. Y, Baysal. Z. Removal of Pb(II) from wastewater using wheat bran, *J. Environ. Manage.* 78: 107-113, 2006.
- [276] Gikas. P, Romanos. P. Effects of tri-valent (Cr(III)) and hexa-valent (Cr(VI)) chromium on the growth of activated sludge, *J. Hazard. Mater.* B133:212–217, 2006.
- [277] Frey. M. Hydrogenases: hydrogen-activating enzymes. *Chem. Biochem.* 3:153–160, 2002.
- [278] Albracht. S.P.J, Bagley. K.A, Duin. E.C, Happe. R.P, Münck. E, Ravi. N, Roseboom. W, van der Spek. T, Woodruff. W.H. The hydrogen binding site(s) in nickel hydrogenases. *J. Inorg. Biochem.* 59: 635, 1995.
- [279] Idania. V.V, Elvira. R.L, Fernando. E.G, Franco. C, Héctor. M.P.V. Semicontinuous solid substrate anaerobic reactors for H₂ production from organic waste: mesophilic versus thermophilic regime. *Int. J. Hydrogen Energy* 30:1383-1391, 2005.
- [280] Kim. S.H, Han. S.K, Shin. H.S. Effects of substrate concentration on hydrogen production and 16S rDNA-based analysis of the microbial community in a continuous fermenter. *Process Biochem.* 41:199-207, 2006.
- [281] Levin. D.B, Islam. R, Cicek. N, Sparling. R. Hydrogen production by *Clostridium thermocellum* 27405 from cellulosic biomass substrates. *Int. J. Hydrogen Energy* 31:1496–1503, 2006.
- [282] Lin. C.Y, Hung. C.H, Chen. C.H, Chung. W.T, Cheng. L. Effects of initial cultivation pH on fermentative hydrogen production from xylose using natural mixed cultures. *Process Biochem.* 41:1383–1390, 2006.
- [283] Yokoyama. H, Waki. M, Moriya. N, Yasuda. T, Tanaka. Y, Haga. K. Effect of fermentation temperature on hydrogen production from cow waste slurry by using anaerobic microflora within the slurry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74:474-483, 2007.
- [284] Li. C, Fang. H.H.P. Inhibition of heavy metals on fermentative hydrogen production by granular sludge, *Chemosphere* 67:668-673, 2007.
- [285] Lin. C.Y. Effect of heavy metals on volatile fatty acid degradation in anaerobic digestion. *Water Res.* 26: 177-183, 1993.
- [286] Fang, H.H.P. Inhibition of bioactivity of UASB biogranules by electroplating metals. *Pure Appl. Chem.* 69: 2425–2429, 1997.
- [287] Fang. H.H.P, Chan. O.C. Toxicity of electroplating metals on benzoate-degrading granules. *Environ. Technol.* 18: 93–99, 1997.
- [288] Vallee. B.L, Ulmer. D.D. Biochemical effects of mercury, cadmium and lead. *Annu. Rev. Biochem.* 41: 91–128, 1972.
- [289] Lin. C.Y, Lay. C.H. A nutrient formulation for fermentative hydrogen production using anaerobic sewage sludge microflora. *Int. J. Hydrogen Energy* 30:285–292, 2005.
- [290] Thauer. R. K, Diekert. G, Schönheit. P. Biological role of nickel. *Trends Biochem. Sci.*, 11:304-306, 1980.
- [291] Wu. L.F, Navarro. C, DePina. K, Quénard. M, Mandrand. M.A. Antagonistic effect of nickel on the fermentative growth of *Escherichia coli* K-12 and comparison of nickel and cobalt toxicity on the aerobic and anaerobic growth *Environ. Health. Perspect.*, 102:297-300, 1994.
- [292] Navarro. C, Wu. L.F, Mandrand-Berthelot. M.A. The nik operon of *Escherichia coli* encodes a periplasmic binding protein-dependent transport system for nickel homologous to the peptide permease family *Mol. Microbiol.*, 9:1181-1191, 1993.
- [293] Morimoto. M, Atsuko. M, Atif. A.A.Y, Ngan. M.A, Razi. A.F, Iyuke. S.E, Bakir. A.M. Biological production of hydrogen from glucose by natural anaerobic microflora. *Int. J. Hydrogen Energy* 29:709-713, 2004.
- [294] Basak. N, Jana. A.K, Das. D, Photofermentative molecular biohydrogen production by purple-non-sulfure (PNS) bacteria in various modes: The present progress and future perspective. *Int. J. Hydrogen Energy* 39:6853–6871, 2014.
- [295] Argun. H, Kargi. F, Kapdan. I.K. Effects of the substrate and cell concentration on bio-hydrogen production from ground wheat by combined dark and photo-fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy* 34:6181–6188, 2009.

- [296] Wua. T.Y, Haya. J.X.Y, Konga. L.B, Juanb. J.C, Jahim. M.J. Recent advances in reuse of waste material as substrate to produce biohydrogen by purple non-sulfur (PNS) bacteria. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16:3117-3122, 2012.
- [297] Lorrunguang. C, Martthong. J, Kensasaki and Noparatnaraporn. N. Selection of photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* 14F for polyhydroxyalkanoate production with tow stage aerobic dark cultivation. *Journal of bioscience and bioengineering*, 102:128-131, 2006, Japan.
- [298] Wakayama. T, Miyake. J. Light shade bands for the improvement of solar hydrogen production efficiency by *Rhodobacter sphaeroides* RV. *Int J Hydrogen Energy* 27:1495–1500, 2002.
- [299] Uyar. B, Eroglu. I, Yücel. M, Gündüz. U, Türker. L. Effect of light intensity, wavelength and illumination protocol on hydrogen production in photobioreactors. *Int J Hydrogen Energy* 32:4670–4677, 2007.
- [300] Luedeking. R, Piret. E.L. A kinetic study of lactic acid fermentation. *J Biochem Microbiol Technol Eng I*: 393-412, 1959.
- [301] Akroum-Amrouche. D, Abdi. N, Lounici. H, Mameri. N. Effect of physico-chemical parameters on biohydrogen production and growth characteristics by batch culture of *Rhodobacter sphaeroides* CIP 60.6. *Applied Energy*, 88(6): 2130-2135, 2011.
- [302] Basak. N, Das. D. Photofermentative hydrogen production using purple nonsulfur bacteria *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 in annular photobioreactor: a case study. *Biomass Bioenergy* 33:911-919, 2009.
- [303] Zhu. H, Wakayama. T, Suzuki. T, Asada. Y, Miyake. J. Entrapment of *Rhodobacter sphaeroides* RV in cationic polymer/agar gels for hydrogen production in the presence of NH_4^+ . *J Biosci Bioeng* 88:507-512, 1999.
- [304] Sasikala. K, Ramana. C.H.V, Rao. P.R. Environmental regulation for optimal biomass yield and photoproduction of hydrogen by *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001. *Int J Hydrogen Energy* 16:597–601, 1991.
- [305] Luo. G, Xie. L, Zou. Z, Zhou. Q, Wang. J.Y. Fermentative hydrogen production from cassava stillage by mixed anaerobic microflora: effects of temperature and pH. *Appl Energy* 87:3710–3717, 2010.
- [306] Kars. G, Gündüz. U, Yücel. M, Türker. L, Eroglu. I. Hydrogen production and transcriptional analysis of *nifD*, *nifK* and *hupS* genes in *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 grown in media with different concentrations of molybdenum and iron. *Int J Hydrogen Energy* 31:1536-1544, 2006.
- [307] Bielen. A. A.M, Verhaart. M. R.A, VanFossen. A. L, Blumer-Schuette. S. E, Stams. A. J.M, van der Oost. J, Kelly. R. M, Kengen. S.W.M. A thermophile under pressure: Transcriptional analysis of the response of *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* to different H_2 partial pressures *international journal of hydrogen energy* 38: 1837 -1849, 2013.
- [308] Abreu, A.A.; Karakashev, D.; Angelidaki, I.; Sousa, D.Z.; Alves, M.M. Biohydrogen production from arabinose and glucose using extreme thermophilic anaerobic mixed cultures. *Biotechnol. Biofuels*, 5: 6, 2012.
- [309] Venkata Mohan, S.; Chandrasekhar, K.; Chiranjeevi, P.; Babu, P.S. *Biohydrogen production from wastewater*. In *Biohydrogen*; Pandey, A., Chang, J.-S., Hallenbeck, P.C., Larroche, C., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2013; pp. 223–257.
- [310] Kosourov. S. N, Batyrova. K. A, Petushkova. E. P, Tsygankov. A. A, Ghirardi. M. L, Seibert. M. Maximizing the hydrogen photoproduction yields in *Chlamydomonas reinhardtii* cultures: The effect of the H_2 partial pressure. *International journal of hydrogen energy* 37:8850 -8858, 2012.
- [311] Pattanamane. W, Chisti. Yusuf, Choorit. W. Photofermentive hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* S10 using mixed organic carbon: Effects of the mixture composition. *Applied Energy*. 157(1):245–254, 2015.

Annexes

Tableau.IV.1.2. Ensemble des tests biochimiques contenus dans la galerie API 20E et la lecture des résultats [196]

Tests	Composant actif (quantité en mg/cupule)	Phénomène mis-en Evidence/Enzyme	Révélateur utilisé	Résultat négative	Résultat positive
ONPG	2-nitrophényl- β,Dgalactopyranoside (0,223)	Présence de β,D galactopyranosidase (β -galactosidase)	Aucun	Incolore	Jaune
<u>ADH</u>	L-Arginine (1,9)	Présence d'arginine désaminase	Rouge de phénol	Jaune	Rouge/orangé
<u>LDC</u>	L-Lysine (1,9)	Présence de lysine décarboxylase	Rouge de phénol	Jaune	Rouge/orangé
<u>ODC</u>	L-Ornithine (1,9)	Présence d'ornithine décarboxylase	Rouge de phénol	Jaune	Rouge/orangé
<u> CIT </u>	Citrate de trisodium (0,756)	Utilisation du citrate comme source de carbone	Bleu de bromothymol (BBT)	Jaune	Bleu
<u>H₂S</u>	Thiosulfate de sodium (0,075)	Production d'H ₂ S	Fe ³⁺	incolore	Dépôt noir (de Fe ₂ S ₃)
<u>URE</u>	Urée (0,76)	Présence d'urease	Rouge de phénol	Jaune	Rouge/orangé
TDA	L-Tryptophane (0,38)	Présence de tryptophane désaminase	Ajout de FeCl ₃ après incubation	Lecture immédiate	
				Jaune	Marron rougeâtre
IND	L -Tryptophane (0,19)	L-tryptophanase	Réactif de James (4-diméthylamino-2- méthoxybenzaldéhy de)	Lecture immédiate	
				Incolore/ vert pâle / jaune	Rose
<u> VP </u>	Pyruvate de sodium (1,9)	Production d'acétoïne (3-hydroxybutanone)	Ajout de VP1 et VP2 (une goutte 1- Naphthol et une goïtte KOH à 40%) après incubation	Lecture après 10 min	
				Incolore/ rose pale	Rose/rouge
<u> GEL </u>	Gélatine (0,6)	Présence de gélatinase	Ajout d'une solution de particules de charbon	Non diffusion	Diffusion des particules
GLU	D-glucose (1,9)	Fermentation/oxydation du glucose	BBT	Bleu	Jaune/jaune gris
MAN	D-mannitol (1,9)	Fermentation/oxydation du mannitol	BBT	Bleu	Jaune
INO	Inositol (1,9)	Fermentation/oxydation de l'inositol	BBT	Bleu	Jaune
SOR	Sorbitol (1,9)	Fermentation/oxydation du sorbitol	BBT	Bleu	Jaune
RHA	L-Rhaminose (1,9)	Fermentation/oxydation du rhaminose	BBT	Bleu	Jaune
SAC	D-saccharose (1,9)	Fermentation/oxydation du saccharose	BBT	Bleu	Jaune
MEL	D-melibiose (1,9)	Fermentation/oxydation du melibiose	BBT	Bleu	Jaune
AMY	Amygdaline (0,57)	Fermentation/oxydation de l'amygdaline	BBT	Bleu	Jaune
ARA	L-arabinose (1,9)	Fermentation/oxydation de l'arabinose	BBT	Bleu	Jaune

^a Pour les tests dont les noms sont soulignés, l'huile de paraffine est déposée au-dessus de la cupule.

^b Pour les tests dont le nom est encadré la cupule doit être remplie jusqu'en haut du tube.