



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET
POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la
Recherche Scientifique
Ecole Nationale Polytechnique
Département de Génie de l'Environnement

Thèse de Doctorat

En Biotechnologie et Environnement

Optimisation de la production du bio-hydrogène par *Spirulina sp* via un photo-bioréacteur électrochimique (EPBR) Application au traitement des eaux de lac de Réghaia

Présentée et soutenue le (16/09/2021) par :
M^{me} Selma HASNAOUI

Sous la direction de M. Nabil MAMERI Professeur ENP

Composition du Jury :

Président de Jury	Madani	Darouiche	Professeur	ENP
Examinateur	Rabah	Bakour	Professeur	USTHB
Examinatrice	Ouiza	Kitous	Professeur	ENP
Examinatrice	Radia	Chemlal	MCA	USTHB
Examinateur	mohammed Salah	Benhabiles	MCA	UMMTO



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET
POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la
Recherche Scientifique

Ecole Nationale Polytechnique

Département de Génie de l'Environnement

Thèse de Doctorat

En Biotechnologie et Environnement

Optimisation de la production du bio-hydrogène par *Spirulina sp* via un photo-bioréacteur électrochimique (EPBR) Application au traitement des eaux de lac de Réghaia

Présentée et soutenue le (16/09/2021) par :
M^{me} Selma HASNAOUI

Sous la direction de M. Nabil MAMERI Professeur ENP

Composition du Jury :

Président de Jury	Madani	Darouiche	Professeur	ENP
Examinateur	Rabah	Bakour	Professeur	USTHB
Examinatrice	Ouiza	Kitous	Professeur	ENP
Examinatrice	Radia	Chemlal	MCA	USTHB
Examinateur	mohammed Salah	Benhabiles	MCA	UMMTO

المخلص

الإنتاج البيولوجي لغاز الهيدروجين من قبل الطحالب المجهرية يعتبر عملية ذو فوائد عديدة. لكن بالرغم من ذلك فإن عائداته تعتبر محدودة أحياناً. لتجاوز هذا الحد، تمت دراسة تحسين توليد غاز الهيدروجين من قبل السبيرولينا من خلال استعمال المفاعل الضوئي البيولوجي الكهروكيميائي. هذا المفاعل سمح أدى إلى معدلات إنتاج الهيدروجين تصل إلى 27.49 و 14.49 مول هيدروجين . يوم⁻¹.م³ في الغرفة الأنودية و الكاثودية على التوالي، باستعمال الجهد الكهربائي 0.3 فولط و كثافة التيار ~2.5 مللي أمبير. هذه النتائج تمثل 6 أضعاف معدل إنتاج الهيدروجين المتحصل عليه من دون تطبيق الجهد الكهربائي. وترتبط هذه الزيادة في إنتاج تمديد إنتاج الهيدروجين في المفاعل الدفع المتسلسل الكهروكيميائي NADPH. الهيدروجين الحيوي مع انخفاض في تركيز ذو الغرفة الواحدة قدم إنتاج إجمالي أكثر إثارة للاهتمام 2.65 م³.م³.يوم⁻¹، مقارنة مع المفاعل (EPBR) و المفاعل (ESRB) ذو الغرفتين، الذي أعطى 1.93 م³.م³.يوم⁻¹. تظهر النتائج، و لأول مرة، تأثير تحفيز الجهد الكهربائي على عملية إنتاج EPBR الهيدروجين بواسطة سلالة سبيرولينا.

الكلمات الرئيسية: الإنتاج البيولوجي للهيدروجين، سبيرولينا، المفاعل الضوئي البيولوجي الكهروكيميائي، الجهد الكهربائي.

Abstract

The biological production of hydrogen by microalgae is considered as an advantageous process. However, its yields are sometimes limited. To go beyond this limit, the improvement of the H₂ generation rate by *Spirulina sp* was studied via an electrochemical photo-bioreactor (EPBR). This EPBR led to hydrogen evolution rates of up to 27.49 and 14.49 mol of H₂.d⁻¹.m⁻³ for the anode and cathode chambers, respectively, under 0.3V voltage and ~2.5mA current. These results represent about a 6-fold increase compared to the H₂ production rate recorded without the application of a voltage. This increase in bio-hydrogen production is correlated with a drop in the concentration of NADPH. The extending of the hydrogen production in the Electrochemical Sequential Batch Reactor (ESRB) and the mono-chamber EPBR provided a more interesting total productivity which was 2.65m³.m⁻³.d⁻¹, compared to the two chambers EPBR in batch mode, which gave 1.93m³.m⁻³.d⁻¹. These results show, for the first time, the boosting effect of the voltage on the metabolism of H₂ production by the *Spirulina* strain.

Keywords: biological hydrogen production, *Spirulina sp*, electrochemical photo-bioreactor, voltage.

Résumé

La bio-production de l'hydrogène par les micro-algues est considéré comme étant un processus avantageux. Cependant, ses rendements sont parfois limités. Afin de surpasser cette limite, l'amélioration des taux de génération d'H₂ par *Spirulina sp* a été étudiée via un photo-bioréacteur électrochimique (EPBR). Ce nouveau réacteur permet d'obtenir des taux d'H₂ jusqu'à 27.49 et 14.49 mole .j⁻¹.m⁻³ pour les chambres anodiques et cathodiques, respectivement, sous un voltage de 0.3V et une densité de courant de ~2.5 mA. Ces résultats représentent environ 6 fois plus par rapport au taux enregistré sans l'application du voltage (témoin). Cette augmentation de la production du bio-hydrogène est en corrélation avec une chute dans les concentrations des NADPH. La prolongation de la production d'hydrogène dans le Réacteur Electrochimique Séquentiel en Batch (ESRB) et le EPBR mono-chambre en mode batch offre des productivités total plus intéressants de 2.65 m³.m⁻³.j⁻¹, comparés au EPBR bi-compartimenté en mode Batch qui a donné 1.93 m³.m⁻³.j⁻¹. Ces résultats montrent, pour la première fois, l'effet « booster » du voltage sur le métabolisme de production d'H₂ par la souche de *Spirulina sp*.

Mots clés: Production biologique d'Hydrogène, *Spirulina sp*, Photo-bioréacteur électrochimique, voltage.

Dédicace

Je dédis ce travail à mes parents, mon Oxygène, mon plus grand amour, qui m'ont très soutenu pas seulement au cours de la préparation de ma thèse; mais durant toute ma vie.

Aussi à mes grands parents qui nous ont malheureusement quittés avant l'achèvement de mon Doctorat...ainsi qu'à toute la famille Hasnaoui.

Je dédis également ce travail à mes amis qui m'ont soutenu notamment sur le plan psychique surtout en cette période difficile où je vis loin de ma famille et mes proches,
Surtout à ma Sœur Soukaina Afakhsi

Remerciement

Sans lui je ne serais pas là
Sans lui je ne serais pas arrivé jusque là
Merci Mon Bon Dieu
(الحمد لله)

Je remercie infiniment mon Directeur de thèse
Professeur Nabil Mameri; que je considère littéralement
comme un deuxième père; pour tout son soutien, ses
encouragements, ses orientations, et surtout pour l'aide qui
m'avait apporté sur tous les plans dans le but d'avancer dans
mon projet doctorale et atteindre mes objectifs.

Sans oublier toute l'équipe de mon laboratoire BIOGEP
De l'Ecole Nationale Polytechnique d'Alger.

J'aimerais également remercier Professeur André Pauss, pour
son soutien et son aide durant mon long séjour scientifique à
l'Université de Technologie de Compiègne,
J'aimerais rajouter que Professeur Pauss mérite vraiment le
titre de Codirecteur de ma thèse pour sa grande contribution
dans ce travail.

Un grand merci à toute l'aimable équipe de recherche du
laboratoire TIMR; pour leur accueil, aide et sympathie.

Table des Matières

Table des figures

Table des tableaux

Liste des abréviations

Chapitre 1. Introduction Générale.....	12
Chapitre 2. Partie Bibliographique.....	16
II.1. État de l'art des systèmes électrochimiques à des fins énergétiques	16
II.1.1. Les piles à combustible.....	16
II.1.2. Les biopiles.....	17
II. 1.2.1. Les biopiles enzymatiques	18
II. 1.2.2. Les biopiles microbiennes : Microbial Fuel Cells (MFCs).....	19
II.1.3. Les Cellules d'Electrolyse Microbiennes (MECs).....	22
II. 1.3.1. Mécanisme de fonctionnement des MECs.....	23
II. 1.3.2. Différents mécanismes de transfert d'électrons.....	24
II. 1.3.3. Différents types des MECs.....	28
II. 1.3.3.1. MECs bi-compartmentées.....	28
II. 1.3.3.2. MECs à chambre unique.....	30
II.2. La Spiruline.....	30
II. 2.1. Habitat naturel.....	31
II. 2.2. Taxonomie.....	31
II. 2.3. Ultra-structure.....	32
II. 2.4. Conditions physico-chimiques de croissance.....	33
II. 3. Phycoremédiation : Bioremédiation par les microalgues.....	33
II. 3.1. Bioremédiation des métaux lourds par les microalgues.....	33
II. 3.2. Bioremédiation des composés pétroliers.....	36
II. 3.3. Bioremédiation des pesticides.....	37
II. 3.4. Bioremédiation de la radioactivité.....	38
Chapitre 3. Matériel et Méthodes.....	41
III.1. Cyanobactéries <i>Spirulina sp.</i>	41
III.2. Milieux aqueux utilisé durant la production d'hydrogène	41
III. 2.1. Milieu synthétique : Zarrouk modifié L-N.....	41
III. 2.2. Milieu naturel : eaux du lac de Réghaia	41
III. 2.2.1. Prétraitement des eaux du lac de Réghaia pour la production d'H ₂	43
III. 2.2.2. Caractérisation des eaux de lac de Réghaia.....	44
III.3. Photos-bioréacteurs électrochimiques (EPBR).....	44
III.3.1. EPBR bi-compartmenté.....	44
III.3.2. EPBR mono-compartmenté	47
III.4. Méthodologie expérimental.....	49
III.4.1. Optimisation des cultures des cyanobactéries et production d'hydrogène en des eaux du Lac de Réghaia.....	49
III. 4.1.1. Etude de l'effet de l'âge de la souche sur la production d'hydrogène et sa capacité phyco-remédiate.....	49
III. 4.1.2. Optimisation des conditions de production d'hydrogène en batch dans l'eau naturelle du lac de Réghaia: effet de la concentration de cyanobactérie et de la durée de la phase obscure.....	50
III. 4.2. Production d'hydrogène dans les Photo Bioréacteurs Electrochimiques.....	51
III.4.2.1. Optimisation de la production d'hydrogène par <i>Spirulina sp</i> dans l'EPBR en batch.....	51

Table des Matières

III.4.2.1.1. Effet de l'application de voltage sur la production d'hydrogène.....	51
III.4.2.1.2. Production prolongée d'hydrogène sous les conditions optimales en mode Batch et séquentiel.....	52
III.4.2.1.3. Impact de la nature du milieu de production sur les taux d'hydrogène sous les conditions optimales en mode batch.....	53
III.4.2.1.4. Comparaison des matériaux des électrodes sur de la production d'hydrogène les conditions optimales: EPBR mono-chambre.....	53
III.4.3. Mesure de la production d'hydrogène	53
III.4.4. Dosage des NADPH et NADP ⁺ durant la production du bio-hydrogène EPBR mono-chambre.....	54
Chapitre 4. Résultats et Discussion.....	57
IV.1. Optimisation des cultures des cyanobactéries et production d'hydrogène en présence des eaux du Lac de Réghaia sous les conditions optimales en batch.....	57
IV.1.1. Caractérisation de l'eau de lac de Réghaia.....	57
IV.1.2. Effet de l'âge de la souche sur la production d'hydrogène et sur sa capacité en phycoremédiation.....	57
IV.1.3. Optimisation des conditions de production d'hydrogène en batch dans l'eau naturelle du lac de Réghaia : concentration de la biomasse et de la durée de la phase obscure.....	64
IV.2. Optimisation de la production d'hydrogène avec le système photo-bioréacteur électrochimique EPBR.....	67
IV.2.1. Effet de l'application d'un faible voltage sur la production d'hydrogène en mode batch.....	67
IV.2.1.1. EPBR à double compartiment.....	67
IV.2.1.2. EPBR à chambre unique.....	69
IV.2.2. Production prolongée d'hydrogène sous les conditions optimales en mode batch et séquentiel.....	71
IV.2.2.1. Réacteur bicompartimenté.....	71
IV.2.2.2. Réacteur monocompartimenté.....	74
IV.2.2.3. Comparaison des taux de production d'hydrogène des trois types de réacteurs.....	76
IV.2.2.4. Comparaison des taux d'hydrogène dans le milieu synthétique L-N et l'eau naturelle du lac de Réghaia.....	80
IV.2.2.5. Impact du matériau des électrodes sur les taux d'hydrogène sous les conditions optimales en batch : EPBR monocompartimenté.....	83
IV.3. Capacité phyco-remédiate de la spiruline sous les conditions optimales.....	85
IV.3.1. Biosorption des éléments chimiques.....	85
IV.3.2. Demande chimique en oxygène (DCO).....	87
IV.3.3. Hydrocarbures totaux.....	88
IV.4. Dosage des équivalents réducteurs NADPH/NADP ⁺	89
Chapitre 5. Conclusions générales et perspectives.....	94
Références bibliographiques.....	98
Annexe.....	114

Liste des figures

Figure.II.1. Pile à combustible type hydrogène-oxygène.....	16
Figure.II.2. Représentation schématique d'une biopile enzymatique pour le dosage in vivo du glucose dans le sang.....	19
Figure.II.3. Représentation schématique d'une bio-pile (MFC).....	21
Figure.II.4. Schéma d'une MEC bi-compartmentée typique et principe de fonctionnement.	22
Figure.II.5. Illustration du DET via des cytochromes liés à la membrane.....	25
Figure.II.6. Illustration schématique de MET via des métabolites secondaires microbiens..	26
Figure.II.7. Illustration schématique simplifiée de MET via des métabolites primaires microbiens.....	28
Figure. II.8. Colonies de Trichomes de la Spiruline de forme (a) droite et (b) spiralée.....	30
Figure.III.9. Le lac de Réghaia (a) Photo satellitaire et (b) représentation schématique.....	42
Figure.III.10. Représentation Schématique du mode opératoire du Photo Bio-Réacteur Electrochimique (EPBR).....	45
Figure.III.11. Photo- Bioréacteur Electrochimique bi-compartmenté en Pyrex (a) Appareillage expérimental. (b) Représentation schématique du EPBR.....	46
Figure.III.12. Photo- Bioréacteur Electrochimique mono-compartmenté en Pyrex (a) Appareillage expérimental. (b) Représentation schématique du EPBR.....	48
Figure.III.13. Présentation schématique de la technologie du kit NADP/NADPH-Glo™.....	55
Figure.IV.14. Taux de production d'hydrogène et les DCO correspondantes en fonction de l'âge de la spiruline dans les eaux du lac de Réghaia.....	58
Figure.IV.15. Composition minérale des eaux du lac traitées lors de la production d'hydrogène par des cultures de spiruline de différents âges.....	60
Figure.IV.16. Réponses observées en fonction des valeurs prévues.....	66
Figure.IV.17. Profil de prévision pour PFC.....	66
Figure.IV.18. Effet du voltage appliqué sur le taux de production d'hydrogène par la spiruline dans le réacteur EBPR bicompartimenté.....	68
Figure.IV.19. Effet du voltage appliqué sur le taux de production d'hydrogène par la spiruline dans le réacteur EBPR monochambre.....	70
Figure.IV.20. Production d'hydrogène à 0.3 V durant les 3 cycles en (a) mode EPBR batch et (b) Réacteur Séquentiel Electrochimique en mode Batch (ESBR).....	71
Figure.IV.21. Production d'hydrogène à 0,2 V durant 3 cycles en batch via le EPBR monochambre.....	75

Figure.IV.22. Comparaison entre le mode EPBR batch et ESRB en termes de productivité totale en hydrogène.....	76
Figure.IV.23. Comparaison de la productivité des trois types de réacteurs.....	78
Figure.IV.24. Impact de la nature du milieu de production sur les taux d'hydrogène dans le EBPR à double compartiments.....	81
Figure.IV.25. Impact du matériau des électrodes sur les taux de production d'hydrogène..	83
Figure. IV. 26. Evolution des valeurs de DCO dans les eaux de lac de Réghaia durant la production de H ₂ par la spiruline.....	87
Figure.IV.27. Production d'hydrogène en fonction des taux d'abattement des HCT dans les eaux du lac de Réghaia durant la production d'hydrogène par la spiruline dans le EPBR monochambre en mode batch.....	88
Figure.IV.28. Cinétiques des concentrations intracellulaires des équivalents réducteurs de spiruline durant la production d'hydrogène dans le réacteur EPBR bicompartimenté (a) [NADPH] (b) [NADP ⁺].....	90
Figure.IV.29. L'évolution des concentrations des NADPH et des taux d'hydrogène durant le processus de production d'hydrogène à 0.3 V.....	91

Liste de tableaux

Tableau.II.1. Dégradation des composés pétroliers par différents groupes de micro-organismes.....	37
Tableau.II.2. Microalgues en bioaccumulation et biotransformation des pesticides.....	38
Tableau.III.3. Facteurs et domaines d'étude considérée pour le PFC.....	51
Tableau.IV. 4. Taux d'abattement des éléments présents dans les eaux du lac par la spiruline.....	62
Tableau.IV.5. Capacité de biosorption des différents éléments présents dans les eaux du lac par la spiruline.....	63
Tableau.IV.6. Estimation des différents coefficients par le PFC.....	65
Tableau.IV.7. Taux de production volumétrique d'hydrogène de quelques travaux sur les MECs.....	74
Tableau.IV.8. Comparaison des taux volumétrique d'hydrogène produits par les MECs monochambre.....	75
Tableau.IV.9. Élimination des métaux des eaux de lac Réghaia traitées par la spiruline durant la production d'hydrogène à 0,2 V dans le EPBR monochambre.....	85

Liste des abréviations

AEM: Anions Exchange Membrane.

ATP: Adénosine triphosphate

BEC: Bio-catalyzed electrolysis cell.

BPEC: Bio-photo-electrochemical.

CEM: Cations Exchange Membrane.

CMM: Charge Mosaic Membrane.

DET: Direct electronic Transfer.

EPBR: Electro Photo-Bio-Reactor.

ESRB: Electrochemical Sequential Batch Reactor.

MEC: Microbial Electrolysis Cell.

MET: Mediator Electron Transfer.

MFC: Microbial Fuel Cell.

NADH: Nicotinamide Adenine Dinucleotide.

NADPH: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate.

NPP: Nombre le Plus Probable.

PEM: Protons Exchange Membrane.

PFC: Plan Factoriel Complet.

PSM : Poste de Sécurité Microbiologique.

Introduction

I. Introduction Générale

De nos jours, on admet que l'hydrogène est le carburant le plus propre et le plus respectueux de l'environnement, dont les produits d'émissions ne sont constitués que de l'eau. L'hydrogène est particulièrement attirant du fait qu'il peut être produit uniquement à partir des sources naturelles renouvelables disponibles localement. Il est également incolore et inodore et il constitue le gaz non toxique le plus léger (**Contreras A. et al, 1997 ; Demirbaş A., 2005**). En outre, il constitue également le carburant le plus efficace avec le contenu énergétique spécifique le plus élevé, comparé à tous les carburants conventionnels. En effet, l'énergie de combustion thermique de l'hydrogène est égale à 3 et 5 fois celle du méthane et du charbon, respectivement (**Gurz M. et al, 2017**). Toutes ces propriétés donnent à l'hydrogène le privilège d'être le vecteur énergétique préféré pour le domaine du transport, afin de protéger le monde de l'approche de la calamité environnementale des combustibles fossiles, en particulier leur grave impact négatif sur la santé humaine, ainsi que les impacts environnementaux des gaz à effet de serre, y compris les catastrophes naturelles et le réchauffement climatique (**Barnes C. S. et al, 2013**). De plus, l'hydrogène peut fonctionner avec des piles à combustible et, ensemble, elles peuvent servir à contribuer à un approvisionnement énergétique durable (**Zeng K. et al, 2010 ; Fayaz H. et al, 2012**). Ainsi, l'hydrogène est considéré comme un vecteur énergétique alternatif d'excellence, et en raison de la croissance mondiale rapide de la demande énergétique, de nombreuses études sont menées pour créer de nouvelles technologies durables de génération d'hydrogène basées sur des ressources renouvelables.

La production biologique de l'hydrogène est une alternative intéressante aux autres moyens conventionnels de sa production. La fermentation bactérienne obscure peut être utilisée pour produire de l'hydrogène à partir de différents types de déchets organiques renouvelables ou de biomasse (**Sivagurunathan P. et al, 2018 ; Kumar G. et al, 2016**), ce qui donne naissance à un procédé avec un double intérêt; produire de l'hydrogène et traiter les déchets parallèlement. Bien qu'intéressant, le gaz produit par cette méthode contient non seulement de l'hydrogène, mais également du méthane, du dioxyde de carbone et de l'hydrogène sulfuré, c'est pourquoi le gaz doit être traité pour réduire son impact environnemental (**Bolatkhan K. et al, 2019**).

Les méthodes de photo-fermentation et de fermentation obscure utilisant des microalgues (**Burgess S. J., 2011**) semblent être des méthodes de production d'hydrogène biologique les plus respectueuses de l'environnement (**Bolatkhan K. et al, 2019**). Cependant, le rendement de ces bioprocédés est limité en raison de la faible efficacité de conversion du métabolisme algal, qui n'est pas en mesure de convertir les produits de fermentation finale en hydrogène. Cette limitation de bioproduction d'hydrogène par rapport à une batterie solaire, par exemple, pourrait être compensée par ses besoins énergétiques inférieurs et les investissements initiaux inférieurs. Néanmoins, la photobioproduction d'hydrogène pourrait être une source d'énergie potentiellement acceptable sur le plan environnemental, car le biohydrogène gazeux résultant est pur et sa production est moins polluante. La production biologique d'hydrogène constitue, de ce fait, un procédé avantageux notamment pour son

I. Introduction Générale

respect de l'environnement et son coût faible, malgré le fait que ces rendements restent toutefois limités à cause de l'épuisement du potentiel chimique interne des cellules bactériennes représentant l'essentiel précurseur d'hydrogène pour ces dernières. Il a été déjà démontré par plusieurs travaux de recherche que cette barrière thermodynamique des systèmes biologiques microbiens peut être franchie en utilisant un autre type de bioréacteur (**Logan B. E., 2008**), et il a été démontré que la meilleure approche pour maximiser la génération du bio-hydrogène est de combiner le processus traditionnel « le photo-bioréacteur » avec un processus électrochimique : MECs (**Azwar M. Y. et al, 2014**).

A l'opposé de la production d'hydrogène par électrolyse conventionnelle qui utilise des tensions de l'ordre de 1,8 V et des densités de courant élevées, imposant ainsi un coût énergétique important ; l'intérêt des MECs réside dans leur très faible besoin en énergie, leur grande capacité de minéralisation complète de la plupart des substrats en dioxyde de carbone, contrairement à la majorité des systèmes d'électrolyse chimique analogues. L'utilisation d'un substrat tel que l'acétate est intéressante, car elle offre un coût d'exploitation plus faible en termes d'énergie et présente un intérêt considérable pour le traitement des déchets. Cependant, d'autres substrats plus énergétiques pourraient fournir des taux de production d'hydrogène plus élevés avec des coûts en capital inférieurs par m³ d'hydrogène. En outre, la préférence des MECs par rapport aux bio-piles (MFCs) peut être justifiée par des raisons techniques convaincantes. En effet, l'ingénierie des cellules destinées à la production des gaz est plus simple et donc moins coûteuse que les cellules de réduction d'oxygène qui doivent surmonter les limitations de transfert de matière au niveau des électrodes, de diffusion de gaz ainsi que les limitations cinétiques et catalytiques.

Ces dernières années, beaucoup d'études ont démontré que l'ajout d'un faible voltage à des bio-piles (MFCs) entraîne la conversion des protons en provenance de la biodégradation des matières organiques en hydrogène gazeux. En fait, la production d'hydrogène dans ce type de réacteurs est rendue possible grâce à la libération d'électrons par les bactéries exo-électrogène, en se combinant aux protons dans la chambre cathodique, donnant naissance à l'hydrogène au lieu de l'électricité. Par conséquent, les réacteurs utilisés pour mener ce processus devraient porter la dénomination de « Cellules d'Electrolyse Microbienne » (MECs), mais ils ont été désignés en fonction de la nature du processus, par exemple, cellule d'électrolyse biocatalysée (BEC), car il s'agit d'un processus dépendant de l'électrolyse biocatalysée de la matière organique (**Chae K. J. et al, 2008 ; Rozendal R. A. et al, 2008**); Réacteur Microbien Bio-Electrochimiquement Assisté (BEAMR) (**Logan B. E., 2008 ; Logan B. E. et al, 2010 ; Ditzig J. et al, 2007**); ou bien Cellule Bio Photo-Electrochimique (BPEC) où l'hydrogène est produit grâce à une photocathode lorsqu'elle est exposée à la lumière visible (**Wan L. L. et al, 2015**).

Nous avons tenté de dépasser la barrière métabolique de la spiruline qui limite la production d'hydrogène, à travers l'utilisation d'un photo-bioréacteur auquel on a appliqué un intervalle de faibles voltages et ce suivant deux modes de fonctionnement : en Batch (EPBR) et en mode

I. Introduction Générale

Séquentiel (ESRB). Le but principal de ce travail étant dans un premier temps d'investiguer l'amélioration de la génération de l'hydrogène par la Spiruline en jouant sur certains paramètres en l'occurrence la valeur du voltage appliqué, ensuite le mode opératoire le plus favorable au métabolisme de production d'hydrogène, la nature de matériau constituant les électrodes ainsi que le type de solution aqueuse servant comme milieu de production de l'hydrogène. Cette étude est menée principalement dans le but d'investiguer la faisabilité de ce nouveau procédé hybride en utilisant des moyens simples et peu onéreux.

D'un autre côté, nous avons testé le couplage de la capacité photo-électrochimique à produire l'hydrogène de notre souche et sa capacité dans le domaine de phycoremédiation afin de développer un nouveau procédé présentant un double intérêt ; la génération de l'hydrogène et la bioremédiation des milieux naturels peu pollués.

Partie bibliographique

II. Partie bibliographique

2.3 État de l'art des systèmes électrochimiques à des fins énergétiques.

2..1. Les piles à combustible.

Les piles à combustible ont été introduites pour la première fois par William Grove en 1839, en utilisant de l'hydrogène produit par voie électrochimique, de l'oxygène un électrolyte acide, et une électrode de platine comme catalyseur (EG&G Technical Services, 2004).

Une pile à combustible est définie comme étant un dispositif électrochimique qui convertit directement l'énergie chimique intrinsèque de certaines substances en une énergie électrique. Il s'agit donc d'un générateur de courant qui produit de l'électricité par une combustion électrochimique contrôlée : l'oxydation d'un combustible réducteur sur une électrode simultanément à la réduction d'un oxydant (par exemple, l'oxygène) sur l'autre électrode. La réaction d'oxydation de l'hydrogène est catalysée par un métal de transition et l'énergie produite par cette réaction est ensuite transformée en courant électrique de façon continue (Sébastien T., 2013). Une représentation schématique d'une pile à combustible type H_2/O_2 est présenté dans la Figure 1.

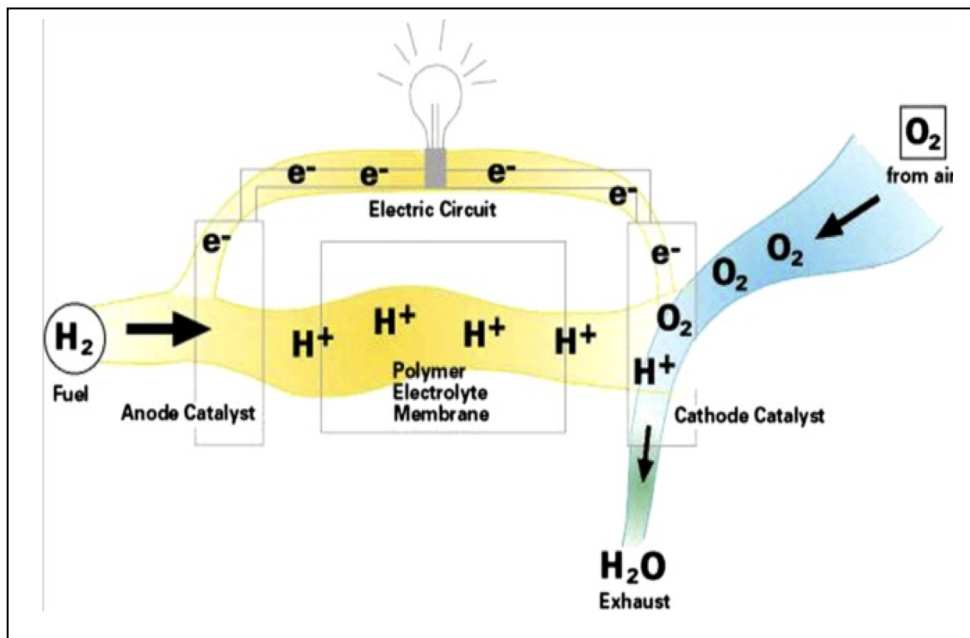
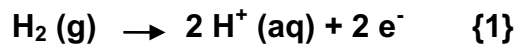


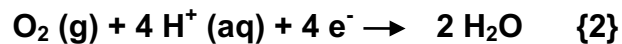
Fig 1. Pile à combustible type hydrogène-oxygène (I.P. Jain et al, 2009).

II. Partie bibliographique

À l'anode, pôle **néga**tif de la pile, le combustible utilisé est l'**hydrogène** du couple $\text{H}^+ (\text{aq}) / (\text{g})$, selon la demi-équation électronique :



À la cathode, pôle **positif** de la pile, le combustible mis en jeu est l'**oxygène du couple** $\text{O}_2 (\text{g}) / \text{O}$, selon la demi-équation électronique :



En théorie, n'importe quel réducteur pouvant être fourni continuellement peut constituer un carburant au niveau de l'anode d'une pile à combustible. De la même manière, l'oxydant peut être n'importe quel fluide pouvant être réduit à un taux suffisant. Pour des raisons pratiques, l'oxydant le plus communément utilisé est l'oxygène gazeux en raison de sa présence abondante dans l'air. De plus, les limitations cinétiques des catalyseurs pour l'oxydation du carburant font que celui-ci est typiquement une molécule simple comme : l'hydrogène, le méthane et le méthanol. Ce sont les limitations cinétiques des piles à combustible chimiques classiques qui ont stimulé les scientifiques à porter une grande importance aux biopiles qui utilisent une gamme plus large de combustibles (**Duteanu N., 2008 ; Scott K et al. 2012**).

2..2. Les biopiles

Les piles à combustible biologiques ou biopiles, d'où leur dénomination, utilisent des catalyseurs biologiques afin de convertir l'énergie chimique en énergie électrique selon le même principe de fonctionnement des piles à combustible conventionnelles. Contrairement à ces dernières qui utilisent typiquement l'hydrogène comme carburant et requièrent parfois des conditions opératoires extrêmes de pH et de température, les biopiles sont considérées potentiellement plus respectueuses à l'environnement, car elles utilisent de la matière organique produite par les processus métaboliques ou bien les donneurs d'électrons organiques comme carburant pour la génération de l'énergie. De plus, les biopiles fonctionnent à température ambiante et à pH neutre (**EG&G Technical Services, 2004**).

II. Partie bibliographique

Dans une biopile il doit y avoir un apport constant de substrat au niveau de l'anode où ce dernier est oxydé sous l'action de microorganismes (biocatalyseurs). Le substrat est typiquement un composé hydrocarboné tel que le glucose. Un oxydant tel que l'oxygène doit être apporté en continu dans la cathode. La réaction électrochimique résultante crée un courant par le passage des électrons à travers un circuit électrique externe (**Zhang X.-R. et al, 2010 ; Fischer M., 1986**).

Selon la nature des biocatalyseurs on peut distinguer deux types de biopiles:

2..2.1. Les biopiles enzymatiques.

Les enzymes sont connues pour leurs activités catalytiques extrêmement spécifiques pour les bioréactions. Les biopiles enzymatiques ont été étudiées depuis 1960 (**Yahiro A.T. et al, 1964**). Cependant leur développement reste à son début, par comparaison aux piles à combustible conventionnelles, à cause de leur faible stabilité et productivité. Dans le but d'améliorer leurs performances, des études ont été réalisées sur la compréhension des mécanismes réactionnels des enzymes catalytique (**Rusling J.F., 1991 ; Gallaway J.W. et al, 2008**), le développement de nouveaux matériaux (**Katz E. et al, 2004 ; Nishizawa K. et al, 2008**), sur la modification (**Zhu Z. et al, 2007, 2006**), l'immobilisation des enzymes (**Gooding J.J. et al, 2006 ; Moehlenbrock M.J. et al, 2008**), les structures des électrodes enzymatiques (**Cooney M.J. et al, 2008**).

Il a été proposé d'utiliser cette technologie sous forme de biosenseur pour surveiller les variations des concentrations de substances physiologiques, l'exemple type de cette application est la bioélectrode destinée au dosage du glucose pour les patients atteints de diabète (**Rigla M. et al, 2008 ; Heller A. et al, 1999**). In vivo, cette biopile implantable s'autoalimentera et produira sa propre énergie (**Calabrese Barton S. et al, 2004 ; Itamar W. et al, 2009**). La figure 2 illustre un diagramme schématique d'une électrode électrochimique de dosage du glucose fonctionnant dans un vaisseau sanguin en utilisant le glucose et l'oxygène dissous comme substrat et oxydant respectivement.

II. Partie bibliographique

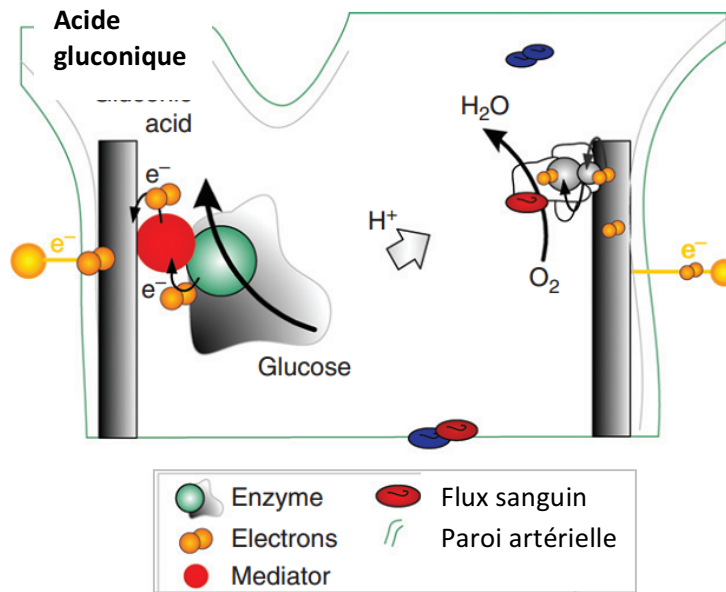


Fig 2. Représentation schématique d'une biopile enzymatique pour le dosage in vivo du glucose dans le sang (EG&G Technical Services, 2004).

Par ailleurs, il existe de nombreuses autres applications des biopiles enzymatiques. Les bioélectrodes à usage environnemental pour le dosage de certains polluants spécifiques tels que les pesticides de la famille des carbamates (Suwansa-Ard S. et al, 2005) et les sulfures (Liu L.J. et al, 2008). L'alimentation d'appareils électroniques mobiles (laptops, téléphones portables, lecteurs mp3...etc.) constitue également un nouveau champ de recherche (Liu Y. et al, 2007 ; Ramanavicius A. et al, 2005).

2..2.2. Les biopiles microbiennes (Microbial Fuel Cells : MFCs).

Au tournant du XIXe siècle, l'idée d'utiliser des biopiles microbiennes pour produire de l'électricité a été envisagée pour la première fois par Potter (Potter M.C., 1911), qui a essayé de générer de l'électricité par *E. coli*. Au début des années quatre-vingt, Bennetto étudia ces systèmes plus en détail et il a conçu une biopile microbienne pouvant constituer un moyen de génération d'électricité pour les pays en voie de développement (Bennetto H.P. et al., 1983). Depuis, un grand nombre d'études ont examiné différents aspects des MFCs notamment les matériaux, l'électrochimie et la nature des microorganismes. Tanisho et al étudièrent une MFC avec *Enterobacter aerogenes* et une anode en acier inoxydable plaqué avec du platine noir, dont le

II. Partie bibliographique

principal combustible était l'hydrogène produit par les bactéries par voie biochimique à partir du glucose (**Tanisho S. et al, 1989**).

Les MFCs peuvent utiliser une large gamme de sources de combustible, en effet l'électricité produite par ces systèmes peut être générée à partir de n'importe quelle matière biodégradable, en allant des composés purs, tels que l'acétate et le glucose, aux mixtures complexes, comme le mélange glucose, acétate et butyrate (**Zhang T. et al, 2008**), cystéine (**Logan B.E. et al, 2005**), protéines (**Heilmann J. et al, 2005**), et lignocellulose (**Rismani-Yazdi H. et al, 2007**).

De nombreux effluents sont fortement chargés en matière organique biodégradable qui peut constituer une source d'énergie (**Potter M.C., 1911**). Il a été démontré que les MFCs pouvaient générer de l'électricité directement à partir de ces effluents et de nombreux travaux ont été réalisés en utilisant des effluents : de l'industrie alimentaire (**Oh S. et al, 2005 ; Wang X. et al, 2008**), brasseries (**Wang X. et al, 2008**), domestique (**Min B. et al, 2004 ; Ghangrekar M.M. et al, 2006**), chimique (**Venkata Mohan S. et al, 2008**), amidon (**Lu N. et al, 2008'**), eaux usées de la boucherie (**Heilmann J et al, 2006**), déchets de fumier (**Scott K. et al, 2007**), lixiviat (**You S.J. et al, 2006**), et les eaux usées (**Jung R.K et al, 2008**). Une des applications les plus prometteuses des MFCs est le traitement de ces effluents et la production simultanée d'électricité (**Duteanu N.M. et al, 2010**).

Les microorganismes offrent des avantages majeurs par rapport aux enzymes, notamment leur plus grand pouvoir catalytique dans l'oxydation de plusieurs types de substrats, et leur résistance et conservation de leur activité sous les conditions opératoires normales (**EG&G Technical Services, 2004**). Le mécanisme par lequel l'électricité peut être générée directement à partir de la dégradation de la matière organique dans une MFC n'est toujours pas complètement compris. Les bactéries hétérotrophes libèrent l'énergie par l'oxydation de la matière organique, par un processus appelé catabolisme. En effet, les MFCs exploitent l'activité catabolique des biocatalyseurs bactériens, afin de convertir l'énergie chimique en électricité (**McKinlay J.B. et al, 1989**). En absence d'oxygène dans une MFC, ces bactéries dégradent le substrat organique (exemple : glucose) et produisent du dioxyde de carbone, des protons et des électrons suivant les réactions (**Duteanu N., 2008 ; Scott K., 2012**).

II. Partie bibliographique

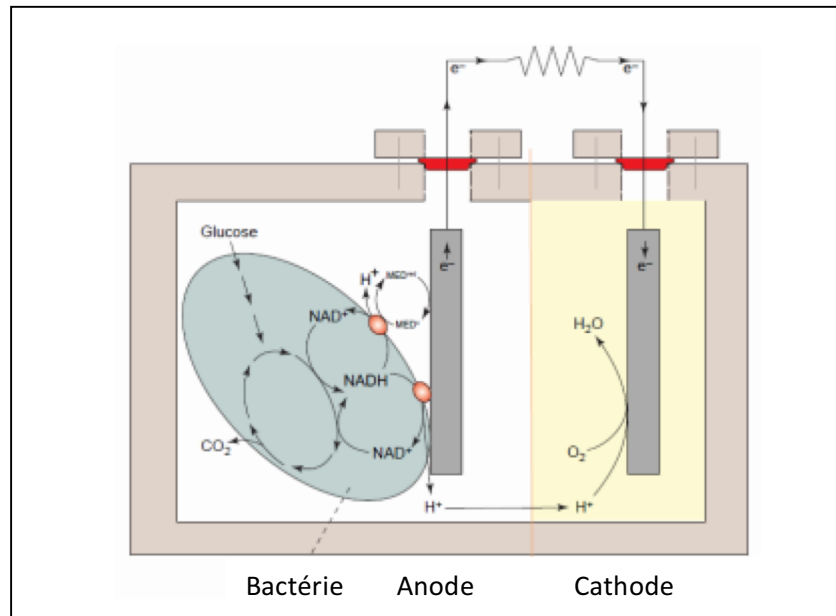
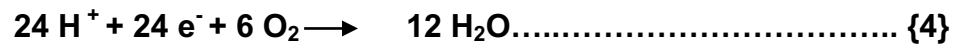
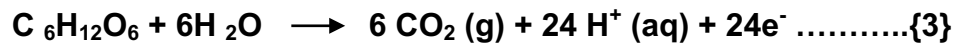


Fig 3. Représentation schématique d'une bio-pile (MFC)
d'après Rabaey et Verstraete (2005).

Le mode de fonctionnement d'une MFC est représenté sur la **Figure 3**. Les deux compartiments anodique et cathodique sont remplis par des solutions aqueuses, et ils sont séparés par une membrane échangeuse de protons. La génération du courant est due au transfert des électrons issus de l'oxydation de la matière organique par les bactéries du biofilm qui se forme dans l'anode, produisant des protons et des électrons. Ces derniers sont transférés dans la cathode à travers le circuit externe, les protons par contre migrent à travers la membrane. Les protons et les électrons réagissent au niveau de la cathode réduisant ainsi l'oxygène en eau (**EG&G Technical Services, 2004**).

II. Partie bibliographique

2.3. Les cellules d'électrolyse microbienne (Microbial Electrolysis Cells : MECs)

Les cellules d'électrolyse microbienne constituent une nouvelle approche permettant la production d'hydrogène à partir de la matière organique, y compris les eaux usées et d'autres ressources renouvelables (Call D. et al, 2008 ; Rozendal R.A. et al, 2007). Les MECs ont été découvertes en 2005 par deux équipes de recherche indépendantes, appartenant à l'Université de Pennsylvanie aux USA et l'Université de Wageningen au Pays-Bas (Selembo P.A. et al, 2009 ; Rozendal R.A. et al, 2006). Dans ces systèmes, les bactéries **électro-chimiquement activées** oxydent la matière organique et génèrent du dioxyde de carbone, des électrons et des protons. Les bactéries transfèrent les électrons à l'anode et les protons sont libérés dans la solution. Les électrons se déplacent donc à travers le fil électrique vers la cathode et se combinent avec les protons libres qui se trouvent dans la solution. Cependant, ce processus de production de l'hydrogène au niveau de la cathode par la combinaison de ces protons et électrons ne se fait pas spontanément. En effet, les MECs doivent être supplémentés d'un petit voltage via une source d'énergie externe (≥ 0.2 V) sous les conditions standards : pH=7, T=30 C, P=1 atm, afin de permettre cette combinaison (Selembo P.A. et al, 2009). Un diagramme schématique d'une MEC bi-compartimentée est représenté dans la figure :

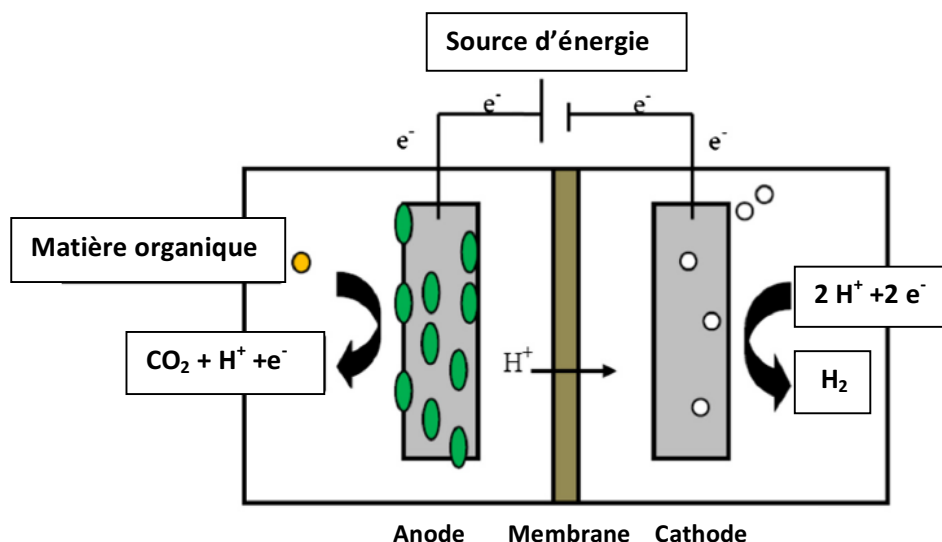


Fig 4. Schéma d'une MEC bi-compartimentée typique et principe de fonctionnement (Abudukeremu K. et al, 2016).

II. Partie bibliographique

Il est important de noter que la production d'hydrogène par des cellules d'électrolyse microbienne (MECs) est une retombée importante des recherches qui ont été menées sur les MFCs. Les MECs sont particulièrement intéressants en raison de l'effort international considérable consacré à l'utilisation de l'hydrogène comme vecteur énergétique du futur. L'électrolyse microbienne est effectivement un analogue biologique à l'électrolyse chimique de la même manière qu'une MFC est analogue à une pile à combustible chimique. Dans les MECs, un substrat organique est oxydé par les microorganismes pour générer des protons qui seront réduits en hydrogène gazeux au niveau de la cathode.

2..3.1. Mécanisme de fonctionnement des MECs.

Dans une MEC l'évolution de l'hydrogène dans la cathode se fait de la même manière que dans celle de l'électrolyse traditionnelle:



Cependant, au niveau de l'anode, l'oxydation de l'eau est remplacée par l'oxydation des composés organiques, comme par exemple l'acétate, qui est converti en bicarbonate :



Il faut noter que les MECs nécessitent un supplément d'énergie relativement faible par rapport à l'électrolyse typique de l'eau qui varie entre 1,23 et 1.8 V (**Abudukeremu K. et al, 2016**). En effet, la comparaison entre l'équilibre thermodynamique de ce système qui est de 0,236 V à pH 7, à celui requis pour l'électrolyse de l'eau qui équivaut au moins à 1,23 V, indique un potentiel prometteur pour la technologie des MECs. Cette dernière s'est développée en seulement quelques années, offrant des taux de production d'hydrogène considérables (**Logan B.E. et al, 2008, 2006**). La quantité d'hydrogène produite est liée au courant injecté, puisque les électrons qui sont transférés vers la cathode sont convertis en hydrogène. L'utilisation d'anodes ayant des surfaces élevées, une faible distance entre les deux électrodes, différents matériaux membranaires, et des designs améliorés ont fait leurs preuves dans l'augmentation rapide des taux de production d'hydrogène (**Call D. et al, 2008**) (**Rozendal R.A. et al, 2007**).

II. Partie bibliographique

2.3.2. Différents mécanismes de transfère d'électron

Une variété de mécanismes a été proposée pour expliquer la manière par laquelle le transfert d'électrons entre les bactéries et l'anode s'effectue dans piles à combustible MFCs ; les prédécesseurs des cellules d'électrolyse microbiennes MECs:

a- Transfert électronique directe (DET)

Parmi les mécanismes suggérés pour décrire le transfert direct d'électron est basé sur l'intervention de certaines protéines de transport membranaire, type cytochromes C, de la membrane externe de bactéries dégradant le substrat en question. Ces protéines jouent un rôle clé dans le transfert d'électrons par contact physique direct entre la membrane de la cellule bactérienne et la surface solide réceptrice d'électrons, avec pour conséquence que seules les bactéries de la première monocouche au niveau de la surface anodique soient électrochimiquement actives (**Bond D.R. et al, 2003 ; Schröder U., 2007**).

Les cytochromes de type c, les protéines multihèmes en particulier, sont retrouvés chez les microorganismes réducteurs de métaux habitant les sédiments, tels que *Geobacter*, *Rhodoferax* et *Shewanella* qui, dans leur environnement naturel, doivent souvent compter sur des accepteurs d'électrons terminaux solides comme les oxydes de fer (III).

Cependant, il existe également une autre hypothèse du DET, qui suggère que les bactéries sont capables de former des prolongements cellulaires qui entrent en contact avec l'électrode, à travers lesquels les électrons sont transférés (**Reguera G. et al, 2005**). En effet, Récemment, il a été démontré que certaines souches de *Geobacter* et de *Shewanella* peuvent posséder des pili conducteurs électroniques (nanofils) qui permettent aux microorganismes d'atteindre et d'utiliser des accepteurs d'électrons solides plus éloignés. Ces pili permettent également aux organismes d'utiliser une électrode qui n'est pas en contact direct avec les cellules comme son seul accepteur d'électrons (**Schröder U., 2007**).

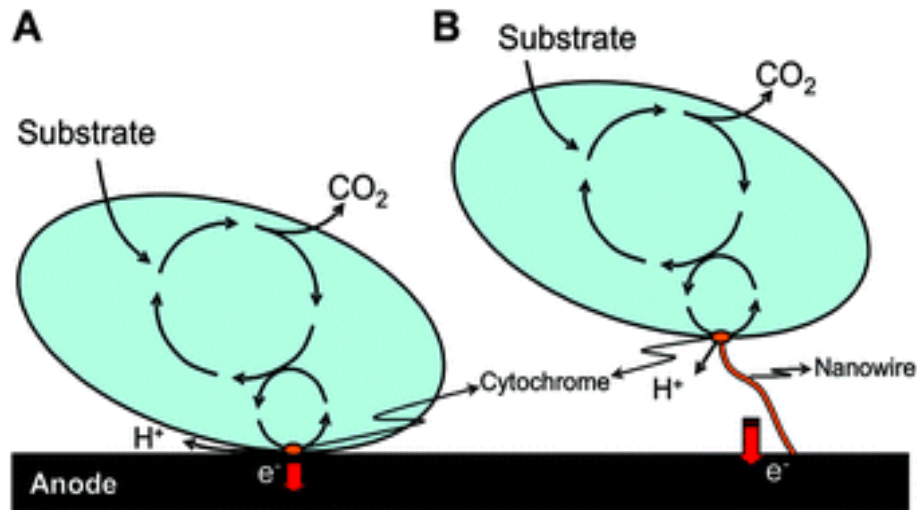


Fig 5. Illustration du DET via des cytochromes liés (A) directement à la membrane, (B) Nano-pili conducteurs d'électron (Schröder U., 2007).

b- Transfert d'électrons *via* un médiateur (MET)

Jusqu'à présent, les performances, en termes de densités de courant et de puissance, des systèmes DET purs ont souvent été de plusieurs ordres de grandeur inférieurs à celles des systèmes impliquant ou bien basés sur un transfert d'électrons avec médiateurs.

En effet, les mécanismes MET peuvent représenter un moyen efficace de liaison du métabolisme microbien à une anode de pile à combustible. Des approches très différentes ont été proposées, et elles peuvent être classées par la nature de l'espèce redox médiatrice.

- MET via des médiateurs redox exogènes (artificiels)

Un grand nombre de composés peuvent être utilisés comme médiateurs exogènes. La majorité est à base de phénazines (ex : Rouge neutre, Safranine, Phénazine éthosulfate), phénothiazines (ex : bleu de méthylène, Toluidine Blue O, Thionine), phénoxazines (ex. : Resorufin, Gallocyanine) et quinones (ex. : 2-Hydroxy-1,4-naphthoquinone, Anthraquinone-2,6-disulfonate).

II. Partie bibliographique

Ces molécules ont été étudiées pour leur aptitude et leur comportement en tant que médiateurs des MFC. Le plus grand inconvénient de l'utilisation de médiateurs redox exogènes est la nécessité d'un ajout régulier du composé exogène, qui est technologiquement irréalisable et écologiquement discutable.

- MET via des métabolites secondaires

Dans les biofilms épais, où la diffusion de l'oxygène dans la profondeur du film est limitée et la cellule n'est pas en contact direct avec un accepteur d'électrons solide, les microorganismes peuvent soit utiliser des médiateurs (exogènes) initialement présents dans le milieu comme les acides humiques ou les chélates métalliques, soit produire eux-mêmes des composés de faible poids moléculaire via des voies métaboliques secondaires qui serviront de médiateurs. Exemples de ces métabolites secondaires, qui sont impliqués dans les processus de transfert d'électrons extracellulaires, sont des phénazines bactériennes comme la pyocyanine et la 2-amino-3-carboxy-1,4-naphtoquinone, ACNQ.

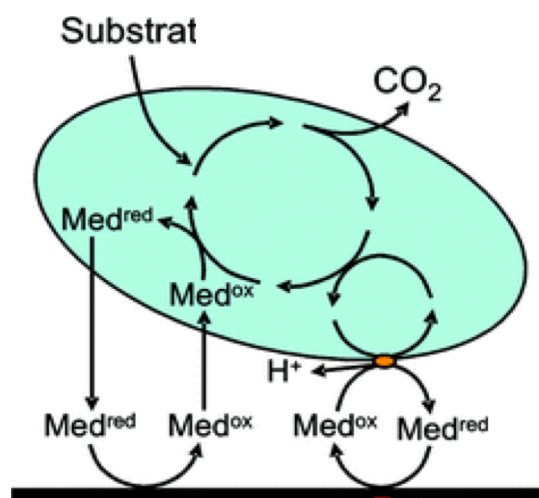


Fig 6. Illustration schématique de MET via des métabolites secondaires microbiens. Deux mécanismes redox possibles ont été proposés : la navette *via* des cytochromes de la membrane cellulaire externe et *via* des couples redox périplasmiques ou cytoplasmiques (Schröder U., 2007)

II. Partie bibliographique

Pour les applications dans les piles à combustible, les métabolites secondaires (médiauteurs redox endogènes) sont particulièrement intéressants, car leur synthèse rend le transfert d'électrons indépendant de la présence de navettes redox exogènes. Le médiateur sert d'accepteur d'électrons terminal réversible, transférant les électrons de la cellule bactérienne soit à un oxydant solide (l'anode) soit dans des couches aérobies du biofilm, où il se réoxyde et est à nouveau disponible pour les processus redox ultérieurs. Une molécule peut ainsi servir pendant des milliers de cycles redox (Fig. 6). Par conséquent, la production de petites quantités de ces composés (directement dans le biofilm anodique) permet à l'organisme de disposer d'électrons à des taux suffisamment élevés. Surtout dans les cultures discontinues. Ces médiauteurs redox facilitent efficacement le transfert d'électrons et augmentent l'efficacité de la génération de courant.

- MET via des métabolites primaires

Contrairement aux métabolites secondaires, la production de métabolites primaires réduits est étroitement associée à la dégradation oxydative du substrat. Naturellement, la quantité totale d'équivalents de réduction produits correspond à la quantité de métabolites oxydés. Pour être utilisable comme réducteur pour l'oxydation anodique, le métabolite doit répondre à certains critères. Son potentiel redox doit être le plus négatif possible (mais dans la limite imposée par le potentiel d'oxydation du substrat) et il doit être accessible pour l'oxydation électrochimique dans les conditions de fonctionnement des MFCs.

En principe, deux voies métaboliques anaérobies majeures peuvent conduire à la formation de métabolites réduits adaptés à l'utilisation des MFC: la respiration anaérobie et la fermentation. **(Voir Fig. 7).**

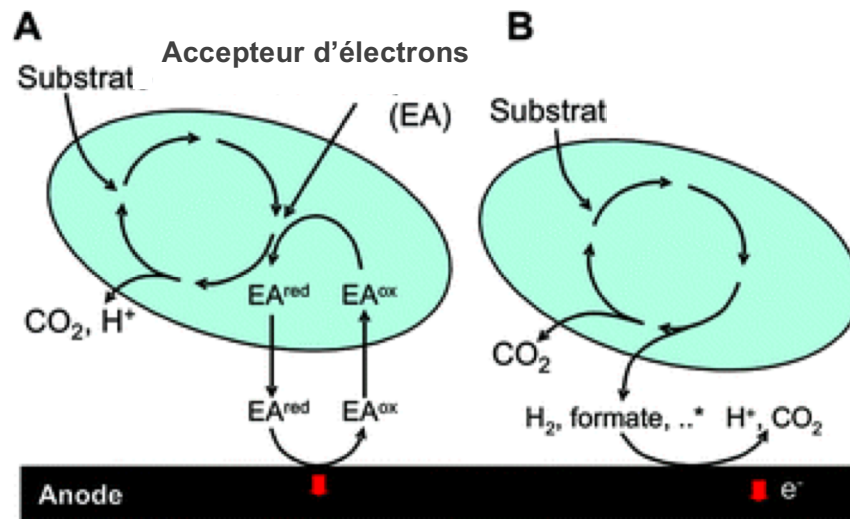


Fig 7. Illustration schématique simplifiée de MET via des métabolites primaires microbiens (A) via des accepteurs d'électrons terminaux réduits (utilisation de la respiration anaérobie), (B) via l'oxydation de produits de fermentation réduite (Schröder U, 2007).

2..3.3. Différents types des MECs.

Selon la conception de la cellule d'électrolyse microbienne on peut distinguer principalement deux grands groupes de MECs : (Voir Annexe 01)

2..3.3.1. MECs à double compartiments

Il s'agit d'un système dans lequel de simples séparateurs sont utilisés pour isoler les compartiments anodiques et cathodiques, plus communément des membranes échangeuses de cations. Une grande variété de membranes ont été utilisées dans les cellules d'électrolyse microbienne, mais les plus utilisées sont les membranes échangeuses de protons (PEM) qui contiennent les groupements fonctionnels $-\text{SO}_3^-$ et ne permettent qu'aux protons (H^+) de les traverser (Selembo P.A. et al, 2009 ; Rozendal R.A. et al, 2006). D'autres types de membranes ont également été testés, y compris les membranes échangeuses d'anions (AEM), comme l'AMI-7001 (Rozendal R.A. et al, 2007) (Cheng S. et al, 2007), ainsi que les membranes bipolaires et les membranes de charge mosaïque (CMM) (Rozendal R.A. et al, 2008).

II. Partie bibliographique

Cependant, dans ce cas de figure on assiste à un transport des espèces cationiques autres que les protons (Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Ca^{2+} , et Mg^{2+}) à travers la membrane, qui sont typiquement 4 à 5 fois plus concentrées que les protons dans les eaux usées à pH neutre. Par conséquent, le phénomène de compétition dans la diffusion membranaire va causer une hausse du pH au niveau de la cathode au lieu de l'électroneutralité qui est favorisée par le transport membranaire des protons dans ce compartiment (**Rozendal R.A et al, 2006 ; Zhao F. et al, 2006 ; Gil G.C. et al, 2003**). Cette hausse de pH affecte négativement la performance du système, selon l'équation de Nernst qui montre que pour chaque différence d'une unité de pH entre l'anode et la cathode, on assiste à une perte supplémentaire du potentiel d'environ 0,06 V au sein du système. Le même effet est observé dans les différentes configurations de systèmes monochambre (**René A. et al, 2005**).

2.3.3.2. MECs à chambre unique.

Ce type de cellule est constitué d'une seule chambre qui est dépourvue de membrane (**Tartakovsky B. et al, 2009**) (**Call D. et al, 2008**), mais leur mode de fonctionnement n'est pas différent de celui des MECs compartimentés. La différence réside dans le fait que les ions n'aient pas besoin de migrer à travers une membrane.

L'élimination de la membrane permet de réduire les pertes de potentiel associé à cette dernière et d'augmenter le rendement de ce procédé.

Les MECs à chambre unique dépourvues de membrane offrent également l'avantage de la simplification de l'architecture et donc une réduction du coût de confection. Cependant, un des problèmes majeurs de ces systèmes est les pertes de l'hydrogène à cause des méthanogènes. En effet, celles-ci rentrent en compétition avec les bactéries électro-chimiquement active productrices d'hydrogène sur le même substrat (CH_3COONa) et le même produit (hydrogène) (EG&G Technical Services. 2004).

II. Partie bibliographique

2.3 La Spiruline

Apparue sur Terre il y a 3,5 milliards d'années, la Spiruline produit le premier oxygène respirable par les organismes. Il s'agit d'une cyanophycée microscopique mobile d'une longueur moyenne d'environ 500 μm , bien que dans certains cas lorsque l'agitation des cultures n'est pas suffisante la longueur des trichomes atteint approximativement 1 mm. Ses filaments sont composés de cellules cylindriques ayant un diamètre de 10 à 12 μm , non ramifiés et enroulés en spirale. L'hélice a généralement en 6 ou 7 spires avec un diamètre de 30-70 μm . Cette forme hélicoïdale lui donnant l'allure d'un minuscule ressort lui a valu son appellation. Cependant les Spirulines présentent différentes formes : on trouve des formes spiralées classiques (A), ondulées (B) et parfois droites (C). Cette particularité est en relation directe avec les conditions écologiques rencontrées dans leur habitat (**Charpy. L, 2008 ; Rakotoarisoa R et al., 2011**).

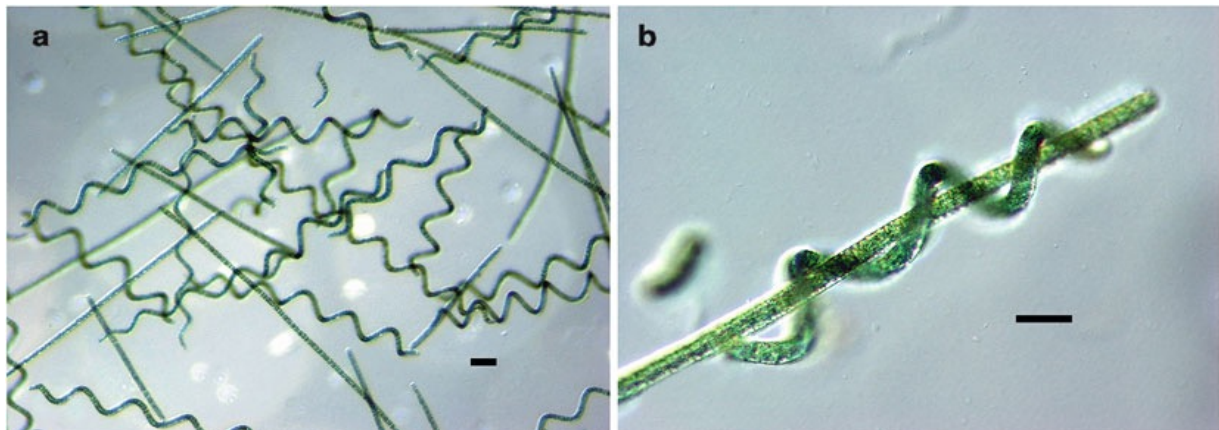


Figure. 8. Colonies de Trichomes de la Spiruline de forme (a) droite et (b) spiralée A = 40 μm , B = 20 μm (Sili C . et al., 2012)

Ce microorganisme se reproduit par la division cellulaire grâce au phénomène de scission binaire, vit de photosynthèse comme les plantes supérieures et prospère naturellement dans les lacs salés et alcalins des régions chaudes du globe. Le système pigmentaire de la Spiruline est constitué de chlorophylle *a*, les phycobilines rouge (phycoérythrine) et bleu (phycocyanine) et de caroténoïdes (β -carotène, cryptoxanthine). Ces pigments sont responsables de la couleur caractéristique de ce microorganisme. Outre son intérêt nutritionnel, la Spiruline présente des propriétés

II. Partie bibliographique

thérapeutiques. Elle renferme plusieurs molécules ayant fait l'objet d'études pour leurs activités biologiques. Les propriétés immunostimulantes et antivirales de la Spiruline présentent notamment un grand intérêt dans la malnutrition, qui affaiblit les défenses immunitaires de l'enfant malnutri. En plus, de point de vue scientifique, la manipulation facile de cette souche sous des conditions contrôlées et la reproductibilité expérimentale a fait d'elle la préférée pour les études biochimiques, photosynthétiques, ainsi que ceux menées sur la physiologie végétative (**Jourdon. J.P, 2006 ; Charpy. L, 2008 ; Christophe. H, 2011**).

1. Habitat naturel

La Spiruline se développe préférentiellement dans des eaux chaudes, alcalines et riches en nutriments azotés et phosphorés. Plus communément, elle s'observe dans les eaux saumâtres, ainsi que dans les lacs salins de régions tropicales et semi-tropicales (**Castenholz. R. W et al., 2001**). Son caractère thermophile et ses besoins importants en lumière limitent son aire de répartition à une bande intertropicale située environ entre 35° de latitude Nord et 35° de latitude Sud.

Sa forte plasticité écologique permet de la retrouver à l'état naturel à la fois dans les lacs alcalins en Afrique (Tchad, Ethiopie, Tunisie), en Amérique latine (Mexique, Pérou), en Asie du Sud (Inde, Sri Lanka, Thaïlande). Ce microorganisme est dit ubiquiste. Il est cependant beaucoup moins abondant en Amérique du Nord et en Europe (**Charpy. L, 2008**).

2. Taxonomie

La Spiruline, longtemps considérée comme une algue, est en réalité une cyanobactérie (**Rakotoarisoa. R et al., 2011**). La position systématique des cyanobactéries a constitué un sujet de discussion, mais en 1969 après la distinction des eucaryotes par la particularité de présence d'enveloppes délimitant leurs organites cellulaires ; **Stanier** et **Van Neil** incorporèrent la Spiruline dans le royaume des procaryotes et proposèrent de les appeler les cyanobactéries (**Guglielm. G et al., 1993**). Les noms de cyanobactéries et d'algue bleue-vertes (*Cyanophyceae*) sont considérés comme étant des termes compatibles.

II. Partie bibliographique

Selon la classification du manuel de Bergey de Détermination Bactériologique, la Spiruline appartient aux bactéries aérobies photosynthétiques, qui sont reliées phylogénétiquement par la séquence de la sous-unité 16S de leur ARN_r, dont la fonction et celle de la sous-unité 5S constituent le critère de classification de ces microorganismes procaryotes parmi le groupe des eubactéries.

Gomont (1892) attribuât la forme aseptale au genre *Spirulina* et la forme septale au genre *Arthrospira*. Ces deux genres se différencient morphologiquement par le type d'hélice, la distribution des pores sur la paroi cellulaire, la visibilité des septums sous microscopes photoniques ainsi que le diamètre et le type de fragmentation des trichomes. Cette classification a été confirmée par Castenholz et Waterbury en 1989 et elle est actuellement acceptée (**Vonshak. A , 2000**).

Le genre *Arthrospira spp* est maintenant devenu universel par les taxonomistes, pour désigner ces microorganismes utilisés dans les opérations de culture en masse. Cependant, Komárek et Anagnostidis (2005) and Komárek et Hauer (2011) ont récemment recommandé sur la nécessité du remplacement du nom commercial *Spirulina (Arthrospira) platensis* par le nom taxonomique correcte de *A. fusiformis* (**Sili C . et al., 2012**).

3. Ultra-structure

L'observation de la *Spiruline* sous microscope électronique à transmission (MET) a permis de révéler son ultra-organisation, sa capsule à structure fibrillaire couvrant et protégeant chaque filament, ses parois cellulaires pluristratifiées, le système lamellaire photosynthétique et thylacoïdale, les ribosomes et les fibrilles d'ADN, etc.

La paroi cellulaire de la Spiruline est formée de quatre couches. Partant de l'intérieur, elles sont dites : LI, LII, LIII et LIV. Toutes ces couches sont fines sauf la LII qui est constituée de peptidoglycane qui donne à cette paroi sa rigidité. Chez ces microorganismes la chlorophylle a, les carotènes et les phycobilisomes sont localisées dans les thylakoïdes ou lamelles photosynthétiques. L'espace inter-thylacoïdales est limité à cause de la présence des protéines de vacuoles à gaz électriquement transparentes avec une forme cylindrique ; et c'est grâce à ce système que la Spiruline possède sa capacité de flottaison (**Ciferri. O , 1983**).

II. Partie bibliographique

Les ribosomes et les fibrilles d'AND sont généralement localisés au centre. La Spiruline contient plusieurs caractéristiques périphériques très importantes associées aux thylakoïdes : les granules peptidiques de réserve qui sont, les corps poly-hydrique ou carboxysomes contenant principalement l'enzyme ribulose 1,5-diphosphate carboxylase permettant la fixation du CO₂, les granules polyglucanique contenant du glycogène. Les granules lipidiques constituées de poly-β-hydroxybutyrate (PHB) qui joue le rôle d'une source d'énergie et de carbone (**Vincenzini. M et al., 1990**).

4. Conditions physique et chimiques de croissance :

Pour se développer, la Spiruline a besoin d'éléments simples tels que l'eau, les sels minéraux, le CO₂ et l'O₂. Elle les puise directement de son milieu tout en utilisant la lumière solaire comme source d'énergie, et ce grâce à son système pigmentaire. Ce mode de synthèse de biomasse est appelé la photo- autotrophie.

La Spiruline croît dans des milieux naturels caractérisés par des eaux saumâtres, chaudes, alcalines (8 < pH < 11,5) et natronées c'est-à-dire fortement concentrées en carbonates et bicarbonates. En règle générale les phosphates, les carbonates, les nitrates et le fer sont les éléments limitant de la production phytoplanctonique dans les milieux aquatiques. En milieu naturel, ces éléments sont apportés naturellement par les bassins versants. Lorsque les conditions sont optimales, les Spirulines peuvent se développer en grande quantité et entrent alors en compétition avec d'autres microorganismes. Heureusement que lors des efflorescences, on assiste à une augmentation de la consommation des carbonates et bicarbonates entraînant une élévation du pH limitant ainsi la croissance des autres microorganismes (**Charpy. L, 2008**).

La Spiruline se développe dans les eaux chaudes (28 à 40°C) et bénéficie d'une intensité lumineuse élevée (**Charpy.L, 2008**). Il est à noter que la température idéale de sa culture est de l'ordre de 37°C. Au-dessus de cette température, c'est trop chaud. En dessous, la vitesse de multiplication baisse drastiquement et tend vers zéro aux alentours de 20°C (**Jourdon. J.P, 2006**).

II. Partie bibliographique

2.3 Phycoremédiation : Bioremédiation par les microalgues

Les microalgues habitent les eaux douces et les océans qui représentent 70 % de la surface terrestre ; où ils jouent un rôle très important pour l'écologie de la terre, car ils assurent au moins 32 % de la photosynthèse globale sur terre. Durant leurs 500 millions d'années d'évolution dans ce milieu très compétitif, les microalgues ont développé une multitude de polymères capable de capter différentes molécules dans leur environnement, dont la plupart sont cruciales pour leur développement et interviennent dans leur métabolisme. D'un autre côté, ce processus contribue à la régulation de la distribution des ions dans les eaux des écosystèmes aquatiques.

L'aptitude en bioremédiation des microalgues est supérieure à celle des autres organismes grâce à la large gamme de produits toxiques et autres déchets qu'elles peuvent traiter, en plus du fait qu'elles soient non pathogènes contrairement à certaines espèces bactériennes. Le risque d'évacuation accidentelle de polluants dans l'atmosphère causant un éventuel problème de sécurité sanitaire ou environnemental est évité lorsque les microalgues sont employées dans la remédiation, car elles utilisent les déchets comme sources nutritionnelles en dégradant ces polluants par voie enzymatique. Les xénobiotiques et les métaux lourds sont connus pour être détoxifiés/transformés et volatilisés par le métabolisme des microalgues. En effet, elles ont la capacité de capter différents types des nutriments comme l'azote et le phosphore (**Ayse BY et al., 2005**).

2..1. Bioremédiation des métaux lourds par les microalgues

La présence de métaux lourds dans l'environnement est un problème majeur dans beaucoup de pays développés, car ils affectent la production agricole et présentent un risque pour la santé humaine, et une toxicité vis-à-vis de la faune et la flore. L'augmentation de la charge de ces métaux en milieux naturels donne naissance à des écosystèmes aquatiques déséquilibrés, des sols agricoles contaminés, et des biotes développés dans de tels habitats accumulant des taux élevés de métaux lourds qui à leur tour, vont être assimilés et transférés au sein de la chaîne alimentaire par le processus d'accumulation (**Pergent C et al., 1999**). La contamination par les métaux lourds est devenue par conséquent l'un des majeurs problèmes pour l'environnement

II. Partie bibliographique

et la santé humaine dans plusieurs pays développés dans le monde. De ce fait, plusieurs techniques existent actuellement afin de les éliminer dans les eaux contaminées comme par exemple : osmose inverse, électrodialyse, ultrafiltration, échange ionique, précipitation chimique, phytoremédiation...etc. par contre, toutes ces méthodes présentent des inconvénients comme l'élimination incomplète des métaux, le grande consommation de réactifs et d'énergie, le dégagement d'effluents toxiques ou d'autres déchets nécessitants à leur tour une méthode d'élimination prudente **(Ahalya N et al. 2003)**.

Les métaux toxiques peuvent généralement être divisés en deux groupes. Un premier groupe comprenant : As, Cr, Co, Cu, Ni, Se, Va et Zn ; qui sont essentiels à état de traces aux besoins nutritionnels pour beaucoup d'organismes, mais ils deviennent toxiques lorsqu'ils excèdent un certain seuil. Cependant le deuxième groupe est constitué des métaux qui n'ont aucun intérêt nutritionnel et qui présentent une très haute toxicité même à de très faibles concentrations, il s'agit du Pb, Hg, Cd, U, Ag et Be **(Inthorn D., 2001)**.

L'augmentation de la conscience environnementale et les restrictions légales imposées sur la décharge des effluents industriels ont suscité un besoin pour des technologies à la fois économiques et efficaces. Dans cette optique, la biomasse microbienne a émergé en tant qu'option afin de développer un procédé aussi économique que respectueux de l'environnement pour le traitement des eaux usées. Les microalgues constituent un bon exemple, car ces microorganismes peuvent être exploités dans le domaine du contrôle de la pollution. En effet, grâce à leur capacité à séquestrer les métaux dans leur milieu naturel, elles ont démontré une grande efficacité dans l'élimination des métaux à partir des effluents liquides contenant ces contaminants **(Priyadarshani I., 2011)**.

La bioadsorption des métaux lourds par les microalgues a suscité une attention considérable durant la dernière décennie, car elle présente de nombreux avantages comparativement aux méthodes traditionnelles. En effet, cette technique utilise des matériaux naturellement abondants, ce qui permet de réduire les coûts associés au traitement **(Davis T., 2000)**.

II. Partie bibliographique

Le rôle dominant de certains polysaccharides algaux tel que le carraghénane dans l'accumulation des métaux a été prouvé chez les microalgues, et il est considéré qu'il existe une corrélation entre la capacité de ces polysaccharides à former un gel et le taux d'élimination des métaux (**Pengfu L et al., 2001**). Les peptides produits par celles-ci agissent comme un complexe organométallique, et ils sont en outre divisés à l'intérieur des vacuoles pour faciliter un contrôle approprié de la concentration cytoplasmique des ions de métaux lourds, empêchant ou neutralisant ainsi leur effet toxique potentiel. À l'opposé du mécanisme utilisé par les eucaryotes, les cellules procaryotes emploient l'ATP en consommant un flux de métaux lourds ou bien par changement enzymatique pour aboutir à une désintoxication. (**Cobbett C & Goldsbrough P, 2002 ; Priyadarshani I, 2011**).

2.2. Bioremédiation des composés pétroliers

La pollution due aux marées noires marines a reçu plus d'attention depuis la moitié du 19^e siècle avec l'intensification de l'utilisation du pétrole, ce qui a conduit à l'augmentation des collisions de pétroliers et une augmentation des quantités rejetées de polluants par les raffineries côtières. Annuellement, 48% de la pollution pétrolière des océans est due aux carburants et 29% au pétrole brut. (**Carpenter A & MacGill S, 2001 ; Wake H., 2005**).

En pratique, plusieurs études ont démontré que les microalgues sont capables de dégrader les produits pétroliers. Le premier à avoir effectué des expériences dans ce domaine fut Walker et al. (**1975**) en utilisant *Prototheca zopfii* qui était capable de dégrader 38-60% des hydrocarbures aliphatiques du pétrole brut ainsi que 12-41% des composants aromatiques dans celui-ci. Tandis que dans l'huile de moteurs, 10-23% des hydrocarbures aliphatiques saturés et 10-26% des composés aromatiques ont été dégradés par cette même microalgue. Praepilas et Pakawadee (**2011**) ont investigué le potentiel de certaines microalgues à utiliser les eaux usées industrielles comme nutriment bon marché pour leur croissance et leur capacité d'accumulation intracellulaire des huiles. Les cultures qui ont donné la teneur en lipides la plus élevée sont celles de *Scenedesmus quadricauda* et *Scenedesmus obliquus* avec des taux 18,58% et 42,86% respectivement (**Priyadarshani I., 2011**).

II. Partie bibliographique

Le tableau (1) comporte quelques exemples de microalgues avec les composants pétroliers dégradés respectivement.

Tableau 1. Dégradation des composés pétroliers par différents groupes de microorganismes (Priyadarshani I., 2011).

Algues	Composé
<i>Selanastrum capricornatum</i>	Benzène, toluène, naphtalène,
Algues bleu-vertes (Cyanobactéries)	Benzène, toluène, naphtalène, phénanthrène, pyrène
<i>Microcystis aeruginosa</i>	Acrylonitrile
Cultures mixtes (levures, champignons, protozoaires, bactéries, boues activées)	
Boues activées	Dibenzanthraceae
Boues d'épuration	Fluoranthène
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Dérivés pétroliers
<i>Pseudomonas putida</i>	Crésols phénoliques
<i>Trichosporon pullulans</i>	Paraffines
<i>Aeromonium sp</i>	Tous les hydrocarbures pétroliers
<i>Mycobacterium sp</i>	n-Undecane

2..3. Bioremédiation des pesticides

Une grande variété de composés organochlorés sont entraînés dans les milieux aquatiques par les eaux usées domestiques, le ruissellement de pesticides à partir des terres agricoles et les effluents industriels. Des études ont indiqué que différentes espèces de microalgues ont apparemment une sensibilité différente aux pesticides (Solomon K.R., 1996).

La biodégradation des pesticides est déterminée par deux groupes de facteurs, le premier concerne le consortium microbien et les conditions optimales de leur survie et de leur activité y compris la présence et le nombre de microorganismes appropriés, le contact entre les microorganismes et le substrat (pesticide), le pH, température, salinité, nutriments, qualité et intensité de la lumière, eau disponible, tension d'oxygène et potentiel redox, liaison de surface, présence de substrats alternatifs et accepteurs d'électrons alternatifs.

II. Partie bibliographique

Le second groupe concerne la structure chimique, le poids moléculaire et les groupes fonctionnels des pesticides, leur concentration, leur toxicité et leur solubilité dans l'eau. Quelques informations sur les interactions entre les pesticides et les algues compilées par Kobayashi et Rittman (1982) montrent que non seulement les microalgues étaient capables d'accumuler les pesticides, mais qu'elles étaient également capables de biotransformer certains de ces polluants (tableau 2).

Tableau 2: Microalgues en bioaccumulation et biotransformation des pesticides.

Microalgue	Bioaccumulation	Biotransformation
<i>Chlamydomonas sp</i>	Mirex	Lindane, naphthalène
<i>Chlorella sp</i>	Toxaphène, méthoxychlore	Lindane, chlordimeforme
<i>Chlorococcum sp</i>	Mirex	
<i>Cylindrotheca sp</i>	DDT	
<i>Dunaliella sp</i>	Mirex	DDT, naphthalène
<i>Euglena gracilis</i>	DDT, paraphions	Phénol
<i>Scenedesmus obliquus</i>	DDT, paraphions	Naphtalène, acide sulfonique
<i>Selenastrum capricornutum</i>	Benzène, toluène, chlorobenzène, 1,2-dichlorobenzène, nitrobenzène naphthalène, 2,6- dinitrotoluène, phénanthrène, di-nbutylphthalate, pyrène	Benzopyrène

2..4. Bioremédiation de la radioactivité

L'uranium est l'un des métaux lourds les plus menaçants en raison de sa forte toxicité et de sa radioactivité. Des quantités excessives d'uranium ont trouvé leur chemin dans l'environnement grâce aux activités associées à l'industrie nucléaire. La contamination par l'uranium présente une menace dans certaines eaux de surface et souterraines (Laul J.C., 1992). Il est donc nécessaire de contrôler les métaux lourds, en particulier les émissions d'uranium dans l'environnement.

II. Partie bibliographique

Les méthodes conventionnelles d'élimination des métaux lourds dans les effluents industriels sont souvent inefficaces et coûteuses lorsqu'ils sont appliqués à des effluents dilués et très dilués (**Aksu Z., 1998**). Il est connu depuis longtemps que les algues marines sont capables de bioadsorber des radionucléides tels que le radium, le thorium et l'uranium. La bioadsorption de l'uranium par *Cystoseira indica*, une biomasse d'algues brunes, a été rapportée par Edgington et al dès les années 70 du siècle passé (**Edgington D.N et al., 1970**).

Materiel et Méthodes

3.1. Cyanobactéries *Spirulina sp*

Une culture de Spiruline a été offerte par la société algérienne Rihi Abdelkader 4X4 de Tamanrasset. Elle a, ensuite, été mise en culture en batch dans le milieu minéral Zarrouk ayant un pH de 9,5 (Zarrouk C., 1966). L'exposition de ces cultures bactériennes à des cycles successifs de lumière/obscurité est mimétique à leur écosystème. Pour ce faire, une lampe de lumière blanche fluorescente de 40 W et d'une intensité de 3 Klux a été utilisée. Une alimentation programmable a permis d'assurer l'alternance de 12 heures d'illumination et 12 heures d'obscurité. Les Erlenmeyer contenant les cultures de Spiruline sont placés dans un incubateur à 35 °C assurant une agitation orbitale à 80 rpm pendant tout le processus de culture. La bonne dispersion des cellules bactériennes dans le milieu de culture est achevée grâce à un barbotage d'air assuré par une pompe d'air.

La concentration des cultures est exprimée en g. L⁻¹, et elle est mesurée à partir de la densité optique à une longueur d'onde $\lambda = 618$ nm. Cela permet de quantifier concrètement l'absorption de la chlorophylle (Spectrophotomètre Shimadzu, 1240 V mini, Japon). La biomasse cellulaire est caractérisée par un équivalent de 5 mg de chlorophylle par gramme de poids sec de biomasse.

3.2. Milieux aqueux utilisés durant la production d'hydrogène.

3.2.1. Milieu synthétique : Zarrouk modifié L-N.

La production d'hydrogène par la spiruline est réalisée dans un premier temps en utilisant un milieu synthétique afin de mieux étudier l'effet du voltage durant ce processus. Dans la continuité des travaux de l'équipe de recherche du laboratoire (Ainas ; 2017), le milieu Zarrouk, d'usage habituel à des fins de culture algale ; est dépourvu d'azote pour permettre d'installer des conditions de stress afin de déclencher le métabolisme de production d'hydrogène par la souche bactérienne. La composition du milieu L-N est détaillée dans l'annexe (02).

3.2.2. Milieu naturel : eaux du lac de Réghaia.

Le territoire de la Réserve Naturelle du Lac de Réghaïa est situé à 30 km à l'est d'Alger, à la limite nord-est de la plaine de la Mitidja dont les coordonnées géographiques sont de 3°19 - 3°21' de longitude Est, 36° 45 - 36°48' de latitude Nord, 4 à 36 m d'altitude) et à 14 km de Boumerdès. Il est bordé au nord par la Mer Méditerranée, au sud par la route nationale 24 reliant Alger à Constantine, à l'est par la ville de Boudouaou et à l'ouest par la ville de Aïn Taya.

Il est accessible à l'ouest par la route goudronnée de la plage d'El Kadous, au sud par la route nationale 24 reliant Ain-Taya à Boumerdes et à l'est, par la route de Réghaïa plage. Ce territoire fait partie de la Wilaya d'Alger, Circonscription administrative de Rouiba, Communes de Réghaïa et Heraoua.

III. Matériel et Méthodes

Les prélèvements des échantillons aqueux des eaux du lac ont été effectués en saison estivale en surface près de la côte Est. Le lieu de prélèvement est indiqué par une croix sur la carte dans la figure N°8.

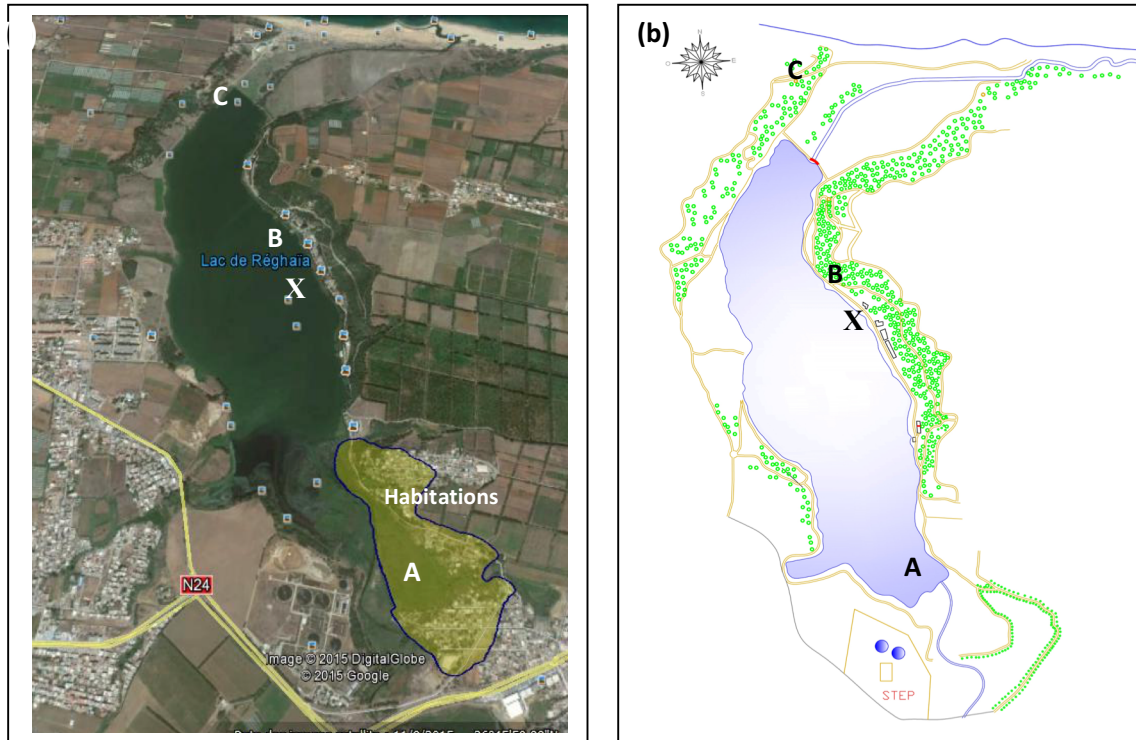


Fig 9. Le lac de Réghaia (a) Photo satellite et (b) représentation schématique.

Le lieu et la saison de prélèvement des eaux du lac ont été choisis soigneusement en se basant sur plusieurs critères à savoir la capacité de résistance de la spiruline à la pollution, tel que rapporté dans la littérature. En effet, cette cyanobactérie peut supporter une pollution qualifiée de médiocre en termes de charge en matières organiques solubles d'origine ménagère (**Fox R. D., 1999**) ainsi que par rapport à sa capacité de biosorption des métaux lourds qui a été déjà testée et approuvée par plusieurs travaux de recherche où elle a démontré une performance remarquable dans l'élimination des métaux lourds (**Çelekli A., 2011**). De plus, on note que la floraison des microalgues à la surface des eaux du lac s'effectue essentiellement au printemps. Nous avons même repéré la présence de la spiruline autochtone dans le lac en cette saison.

De ce fait, les prélèvements de lac ont été effectués au mois d'Avril au niveau du point (B) situé à peu près à mi-chemin entre l'entrée du lac (A) en provenance de la Station d'épuration « STEP Réghaia » ; et la digue (C) qui permet de déverser l'excédent des eaux du lac dans la mer. La STEP, d'après le responsable de l'unité, est sensée assurer quotidiennement le traitement d'environ 80 000 m³ d'eaux usées d'origine domestique et industrielle, en provenance des agglomérations d'habitation et des zones industrielles de Réghaia et Rouiba; situés en amont du lac.

III. Matériel et Méthodes

L'élimination des métaux lourds à partir des effluents pollués en utilisant la biomasse de micro-algues et de cyanobactéries constitue certainement un procédé prometteur. En effet, en 1993 Wilde et Benemann ont pu conclure que la biosorption des métaux lourds a un potentiel d'action plus efficace et plus économique par rapport aux procédés quaternaires de traitement des eaux usées (**Avigad Vonshak, 1997**). Dans le but d'aller plus loin dans l'étude sur de l'effet du voltage sur la productivité d'hydrogène par la spiruline, nous avons procédé au couplage de la production d'hydrogène à la phyco-remédiation des eaux polluées par notre souche de spiruline, en appliquant ce nouveau processus de production d'hydrogène sur une eau naturelle médiocre en termes de pollution.

L'eau de la rive Est du lac de Réghaia a été choisie pour servir de milieu de production d'hydrogène. Cela va permettre d'investiguer sur la capacité de phyco-remédiation de la spiruline. Cette eau, qui a fait l'objet de plusieurs études dans différents domaines mais jamais à des fins énergétiques, se caractérise par une pollution médiocre (voir tableau de caractérisation en annexe (04) qui représente un critère approprié pour la souche de spiruline peu résistante à la pollution.

3.2.2.1. Prétraitement des eaux du lac de Réghaia pour la production d'hydrogène.

Considérant l'utilisation des eaux du lac de Réghaia en tant que milieu de production d'hydrogène par la souche de spiruline, il est judicieux d'éliminer tout autre facteur biotique ainsi que les macro-particules que ces eaux naturelles renferment. Pour se faire, plusieurs étapes de traitement ont été entreprises :

a- Tamisage : Cette étape consiste à passer l'eau à travers un tamis de large mailles (0.1 mm) retenant les plus grandes particules comme les cailloux de différentes tailles, les petites branches et le feuillage des plantes, ainsi que les protozoaires.

b- Microfiltration : Durant cette étape le processus de filtration continu, on a utilisé un papier filtre plissé N°5 d'une porosité de 4 à 7 µm La microfiltration permet l'élimination des plus petites particules et une partie des microorganismes les plus petit de taille.

c- Stérilisation : les eaux, issues des étapes de filtration précédentes, ont subi une dernière étape d'autoclavage durant 20 minutes à 120 °C. Cette étape de stérilisation va assurer la préservation de la pureté de notre souche bactérienne de spiruline et éviter les interférences des métabolismes avec les autres microorganismes des eaux naturelles durant le processus de production d'hydrogène.

3.2.2.2. Caractérisation des eaux de lac de Réghaia

Dans le but de déterminer la composition exacte de l'eau prélevée à partir de la rive du lac de Réghaia, une caractérisation complète (paramètres physico-chimiques et bactériologiques ainsi que les indices de pollution) a été réalisée au sein des laboratoires SEAAL d'Alger. Les bactéries coliformes ainsi que entérocoques intestinaux ont été recherchées et dénombrées suivant la méthode IDEXX. En outre, un balayage pour la détection des différents éléments contenus dans cet eau (métaux lourds, minéraux...etc) a été réalisé par Eurofins Analyses pour l'Environnement (France) selon la norme NF EN ISO 11885 en utilisant la technique de Spectrométrie à plasma à couplage inductif (ICP/EAS). Le dosage de l'indice hydrocarbures HCT (C10-C40) ont été effectué selon la norme NF EN ISO 9377-2 à l'aide d'une GC/FID [Extraction Liquide / Liquide].

Il est à noter que cette caractérisation concerne l'échantillon témoin c'est-à-dire naturellement prélevé de la rive Est du lac, ainsi que les échantillons issus du traitement en contact avec la souche de Spiruline de différents âges : ayant été utilisés en tant que milieu de production d'hydrogène.

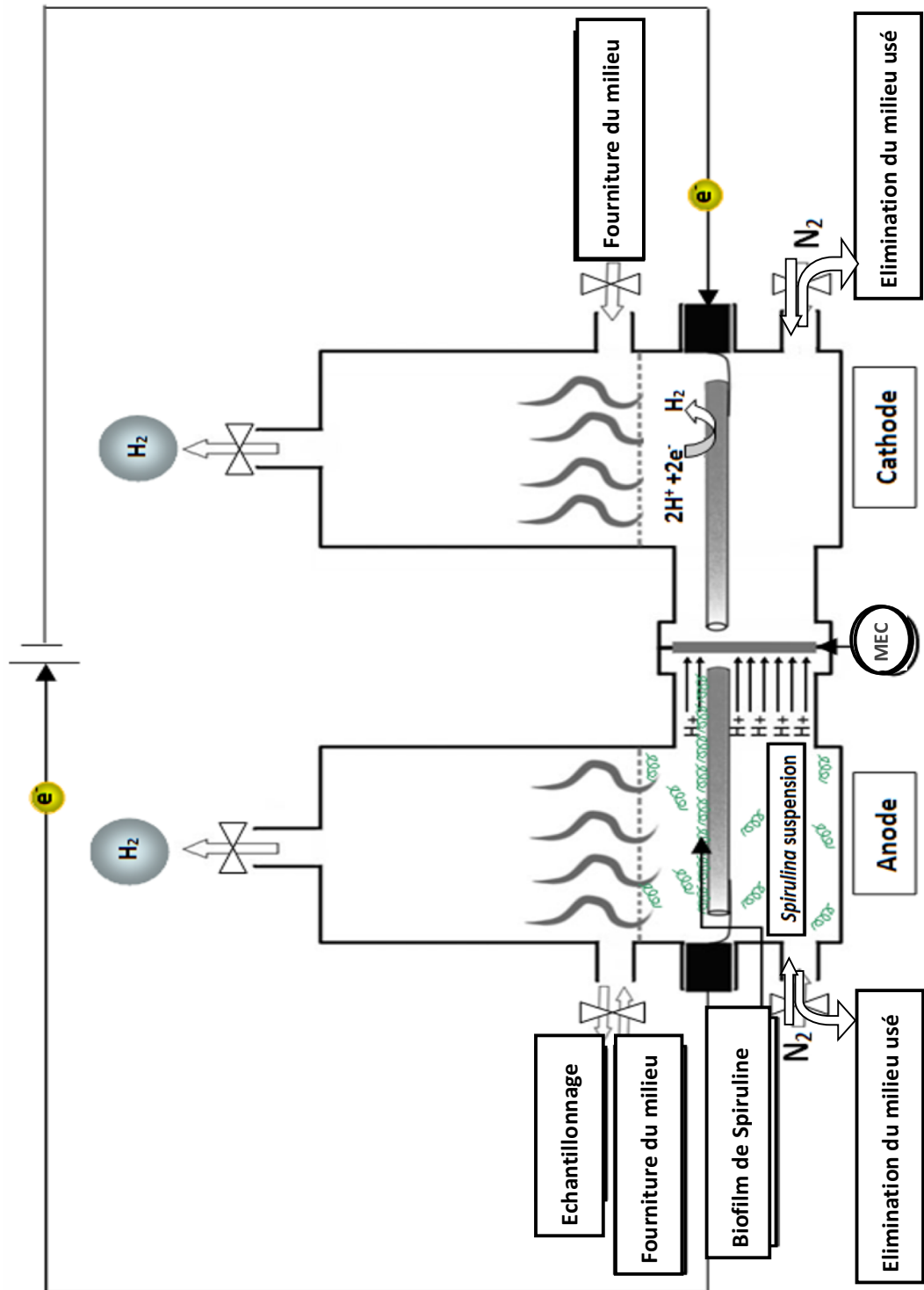
3.3. Photos-bioréacteurs électrochimiques (EPBR)

3.3.1. EPBR bi-compartmenté

Le design du photo-bioréacteur électrochimique bi-compartmenté est inspiré des cellules d'électrolyse microbiennes (MECs) (Figure 10). En effet, les deux systèmes servent à produire de l'hydrogène et sont constituées le plus souvent de deux compartiments ; l'anode où les protons sont générés et la cathode où ils sont transformés en hydrogène gazeux après leur diffusion à travers une membrane échangeuse de cations (CEM) par l'application d'un faible voltage.

Dans les toutes premières conceptions de cellules d'électrolyse microbiennes, il existe toujours un élément clé qui est la séparation des deux compartiments par une membrane échangeuse de cations. L'inclusion de celle-ci aide à améliorer la pureté de l'hydrogène produit et de prévenir sa consommation par les bactéries. En effet, l'utilisation des membranes ne permet pas seulement de réduire la transition des combustibles et des bactéries de l'anode vers la cathode, mais aussi à maintenir la pureté de l'hydrogène produit au niveau de la cathode. Ces membranes jouent également un rôle de séparateur afin d'éviter d'éventuels court-circuits (**Kadier A. et al, 2016**).

Fig 10. Représentation Schématique du Photo Bio-Réacteur Electrochimique (EPBR).



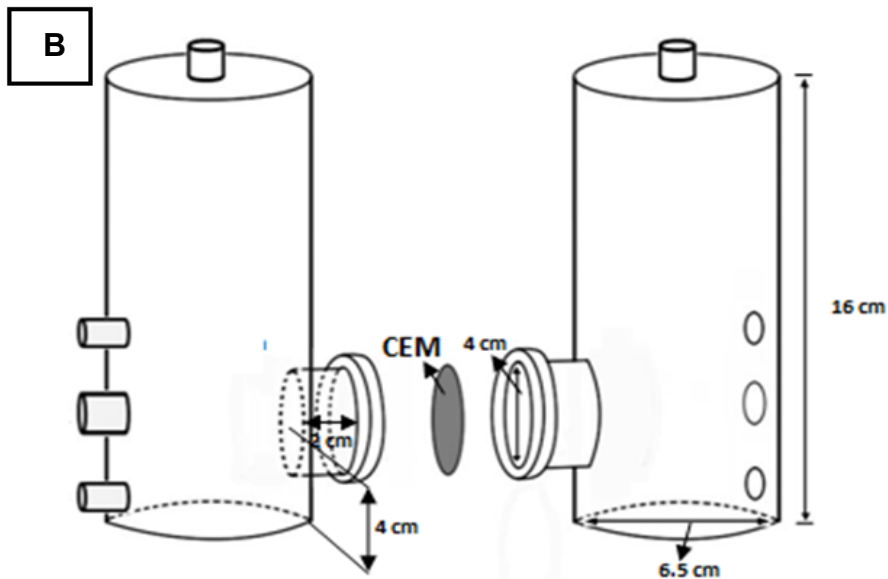
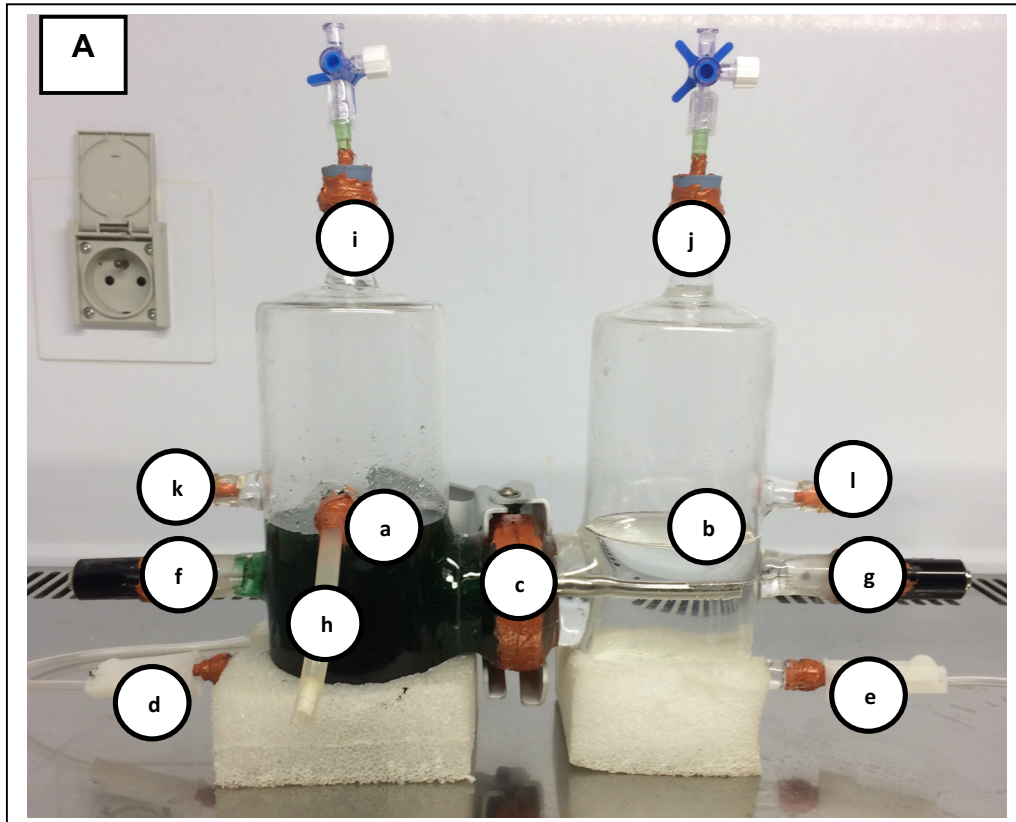


Fig 11. Photo- Bioréacteur Electrochimique bi-compartmenté en Pyrex (A) Appareillage expérimental. (B) Représentation schématique du EPBR. a. Anode, b. Cathode, c. Membrane échangeuse de cations (CEM), d-e. Barbotage à N₂, f-g. sortie électrode Pt h. Pont salin., i-j. Sortie H₂, K-l. Entrée milieu.

III. Matériel et Méthodes

Le réacteur est constitué de deux chambres cylindriques, ayant chacune un diamètre de 6,5 cm et une hauteur de 16 cm. Les deux chambres du réacteur sont faites en verre Pyrex pour assurer une meilleure pénétration des rayons de la lumière blanche utilisée pendant toutes nos expériences.

Nous avons connecté les deux chambres du **Photo- Bioréacteur Electrochimique (EPBR)** grâce à une membrane échangeuse de cations afin de permettre le passage de l'anode vers la cathode des protons résultant du clivage des molécules d'eau par la chaîne photosynthétique bactérienne et/ou de la dégradation microbienne de la matière organique. Le volume total de chaque compartiment est d'environ 600 cm³ avec un volume réactionnel de 250 cm³, laissant approximativement les deux-tiers pour la phase gazeuse (headspace) pour permettre le dégagement du gaz d'hydrogène produit. Les deux compartiments sont collés solidement grâce une silicone cuivrée non conductrice (LOCTITE.SI 5990, France).

Le potentiel de l'anode est mesuré par rapport à une électrode de référence Ag/AgCl en utilisant un potentiostat (TACUSSEL électronique, BI-PAD, France). L'électrode de référence est disposée à l'extérieur de la chambre anodique et elles sont connectées via un pont salin agar-agar. Le potentiel de l'anode est calculé continuellement durant chaque cycle de production et est ajusté à la valeur voulue au début de chaque expérience grâce à un multimètre à haute impédance.

Chaque chambre contient une électrode en platine de forme cylindrique creuse de h=8 cm de longueur et de 0,5 cm et de diamètre extérieur (r_2) et de 0,4 cm de diamètre intérieur (r_1), d'une surface spécifique de 25,2 cm² en prenant en considération l'aire latérale extérieure ($A = 2 \cdot \pi \cdot r_2 \cdot h$) et celle de la couronne ($a = \pi \cdot (r_2^2 - r_1^2)$); où le contact avec les cellules de spiruline et le mélange réactionnel est beaucoup plus accentué. Ainsi, on assure une meilleure conductivité tout en évitant les interactions avec le milieu aqueux.

Des études antérieures sur les piles à combustibles et les cellules d'électrolyse microbiennes ont montré la possibilité d'améliorer la performance de ces systèmes en réduisant l'espacement entre les électrodes (**Cheng S. et al, 2011 ; Zikmund E. et al, 2018**). De ce fait les électrodes de platine ont été disposées horizontalement dans chaque chambre du photo-bioréacteur électrochimique, séparées par une faible distance de 0,5 cm par rapport à la membrane échangeuse de cations afin de maximiser la production de l'hydrogène.

3.3.2. EPBR mono-compartimenté.

Il a été démontré par les études précédentes qu'il y a une baisse de performance des biopiles à double chambre comportant une membrane échangeuse de cation, à cause de la compétition des protons avec les autres espèces cationiques sur le transport membranaire (**Rozendal R. A. et al, 2006 ; Zhao F. et al, 2006 ; Gil G.C. et al, 2003**). En outre, le fait que les MECs soient complètement anaérobies rend la suppression de

III. Matériel et Méthodes

la membrane possible sans impacter négativement sur l'efficacité de la cellule microbienne car cela ne va pas induire le passage de l'oxygène vers l'anode. Par conséquent, on assiste à une simplification de son architecture et ainsi une diminution du coût de confection. Cependant, au sein des MECs classiques l'une des majeures contraintes en absence de la membrane reste la compétition des bactéries méthanogènes avec les bactéries électro-chimiquement actives sur le même substrat, généralement l'acétate de sodium (CH_3COONa) ce qui peut induire une réduction de la production d'hydrogène et donc décroître la performance du système.

Afin de diminuer les pertes de potentiel, augmenter la productivité de ce procédé en hydrogène et ainsi qu'éviter tous les problèmes ci-dessus associés à la membrane, un nouveau design dépourvu de membrane a été testé en jouant sur les paramètres suivants : le matériau des électrodes et la réduction de la distance inter électrodes (**Fig. 11**)

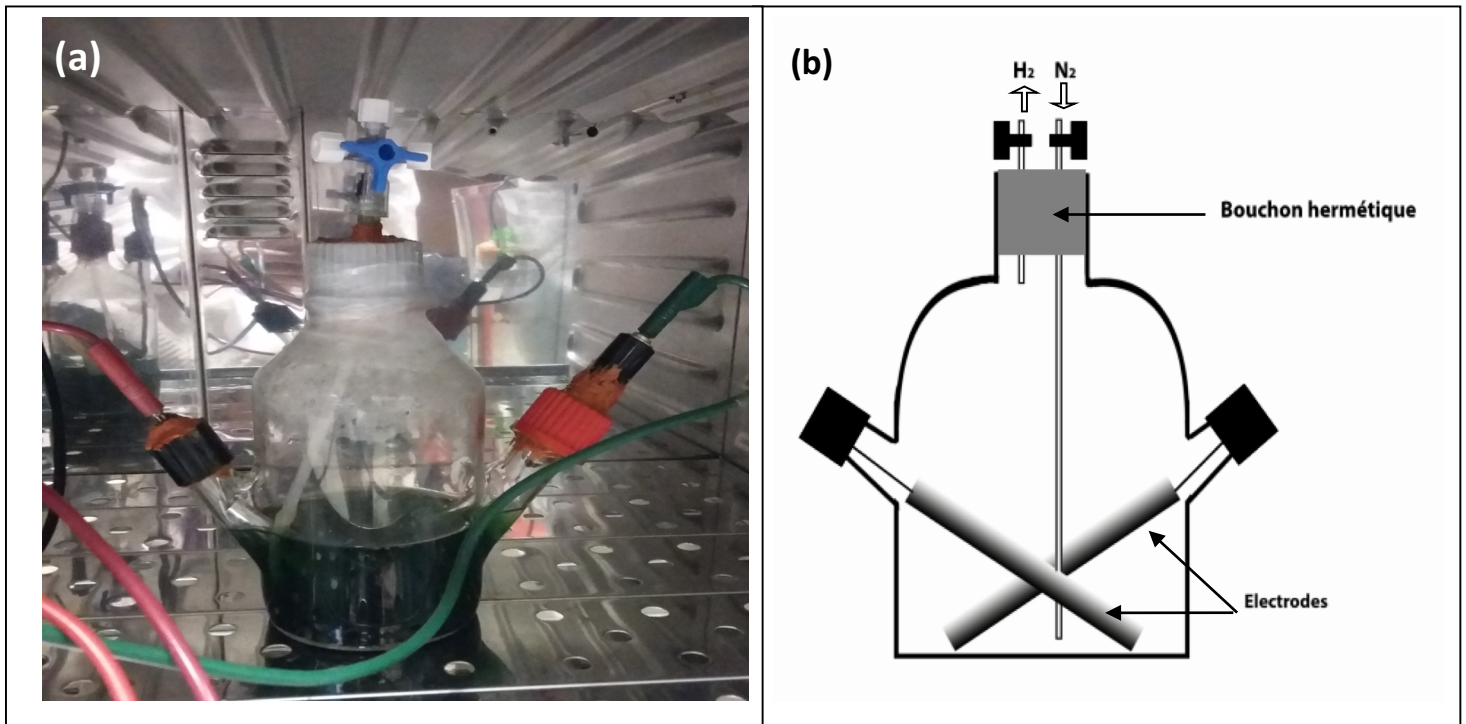


Fig 12. Photo- Bioréacteur Electrochimique mono-compartmenté en Pyrex.
(a) Appareillage expérimental. (b) Représentation schématique du EPBR.

Le EPBR mono-chambre est une enceinte en Pyrex d'une contenance total de 500 mL, avec trois sorties. Une principale sortie en haut du réacteur hermétisée grâce un bouchon spécial en caoutchouc permettant les échanges gazeux à savoir le barbotage en azote pur afin de créer l'ambiance anaérobie dans celui-ci, et deux petites sorties sur les côtés de position opposée qui à leur tour servent à porter les deux électrodes.

III. Matériel et Méthodes

Afin de développer un procédé la production d'hydrogène de faible coût à l'aide de l'EPBR mono-chambre, la productivité de ce dernier est comparée en utilisant deux types d'électrodes : électrode de platine et électrode d'aluminium. Les électrodes sont de forme cylindrique (longueur : 8 cm, diamètre : 0,5 cm) d'une surface spécifique de 12,56 cm².

Comme dans le cas de l'EPBR à double chambre, l'addition du faible voltage se fait à l'aide d'un potentiostat. Afin de répondre aux bonnes pratiques de laboratoire nous avons procédé à la stérilisation des deux types de réacteurs et les électrodes par autoclavage durant 20 minutes à 120 °C ensuite deux heures minimum sous les rayons UV, avant chaque expérience. De plus, le montage et l'introduction des mélange réactionnel se fait sous un poste de sécurité microbiologique (PSM).

3.4. Méthodologie expérimentale

3.4.1. Optimisation des cultures des cyanobactéries et production d'hydrogène en présence des eaux du Lac de Réghaia

3.4.1.1. Etude de l'effet de l'âge de la souche sur la production d'hydrogène et sa capacité phyco-remédiate

La préoccupation principale des études précédentes concernant la culture des microalgues dans les eaux usées municipaux était la présence des métaux lourds et d'autres composants comme les phénols et les détergents en plus de celle des éléments nutritifs (**Aonghusa CN et Gray NF, 2002; Petrovic et al, 2003**). En effet, les microalgues peuvent accumuler ces composants (**Wang L et al, 2010; Richards RG et Mullins BJ, 2013; Mani et Kumar 2014**), à cause de l'interférence que provoquent ces derniers avec l'assimilation des macronutriments par les cellules microalgales dû à leurs transporteurs communs (**Levy JL et al. 2005**). Toutefois, la présence d'éléments trace de ces métaux (Cu, Cd, Pb...) peuvent jouer un rôle crucial dans leur processus de croissance, de ce fait la connaissance complète des caractéristiques de ces eaux avant leur utilisation dans la culture des microalgues est essentielle (**Renuka N et al, 2014**),

La cyanobactérie *Spirulina sp*, comme toute bactérie passe durant son cycle de vie par plusieurs étapes selon son âge, ce qui veut dire qu'il existe une différence dans le métabolisme des cellules à différents stades de sa vie. Dans le cadre de ce travail, nous avons voulu tester ses capacités et de phyco-remédiation des eaux naturelles du lac de Réghaia parallèlement à la production d'hydrogène. Ainsi, des cultures de spiruline ayant différents âges (3, 8, 21, 28, 30, 35 jours) ont étéensemencées à raison de 0,5 g/L dans 250 mL d'eau naturelle prétraitée comme présentée précédemment. La suspension cellulaire est mise en fermentation pendant 24 heures dans un réacteur cylindrique basique et ce sans l'application du voltage à la réaction. A la fin de chaque expérience l'hydrogène produit par la fermentation obscure est mesuré. Ensuite, les mélanges réactionnels sont filtrés afin de récolter les milieux de production qui ont fait l'objet d'analyses de qualité afin d'apprécier la capacité de phyco-remédiation de la

III. Matériel et Méthodes

souche de spiruline. Les analyses ont été réalisées suivant les méthodes citées précédemment pour la mesure des taux de métaux et minéraux et l'indice d'hydrocarbures, cependant la mesure des DCO soluble dans le milieu de production a été effectuée selon la méthode colorimétrique en présence du bichromate de potassium (**MA. 315 – DCO 1.0**) du Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec (**voir Annexe.03**).

Le taux d'abattement ou rendement de l'élimination (R) des métaux et éléments présents dans les eaux du lac après le processus de production d'hydrogène par la spiruline, ainsi que sa capacité de biosorption de cette dernière (A_s) en milligramme par gramme de biomasse utilisée sont résumés dans le tableau IV.4.

Les relations suivantes ont été utilisées pour la détermination de R et A_s :

$$R = \frac{C_i - C_f}{C_i} \cdot 100$$

$$A_s = \frac{C_i - C_f}{m} \cdot V$$

Avec :

R : Taux d'abattement (%).

A_s : Capacité d'adsorption de la spiruline ou biosorption (mg/g).

C_i : Concentration initiale de l'élément dans le mélange réactionnel (mg/L).

C_f : Concentration finale de l'élément dans le mélange réactionnel (mg/L).

m : Masse de la biomasse utilisée (g).

V : Volume du mélange réactionnel (L).

3.4.1.2. Optimisation des conditions de production d'hydrogène en batch dans l'eau naturelle du lac de Réghaia : effet de la concentration de cyanobactérie et de la durée de la phase obscure.

Dans le but de déterminer le comportement de la souche de spiruline durant la production d'hydrogène dans ce nouveau milieu, nous avons étudié l'effet de la durée de la phase de fermentation obscure ainsi que la concentration de la souche de spiruline sur les taux de production d'hydrogène. Plusieurs essais ont été effectués afin de déterminer les valeurs optimales de ces deux principaux paramètres. Pour réaliser l'optimisation de ces deux paramètres simultanément, nous avons eu recours à l'utilisation du logiciel JMP afin d'appliquer un plan factoriel complet (PFC) à deux niveau 2^2 . En effet, ce dernier a permis d'établir une matrice de données pour ces deux paramètres à savoir (PO) la durée d'exposition à la phase obscure dans l'intervalle 6-24 heures et (CC) la concentration de la cyanobactérie variant entre 0,5 et 1,5 g/L. Un ordre aléatoire des valeurs des

III. Matériel et Méthodes

paramètres est proposé pour chaque expérimentation, et pour chacune d'entre elles des essais au centre du domaine ont été considérés.

L'analyse des réponses obtenues pour les essais du PFC par le logiciel JMP permet de déterminer les coefficients significatifs du modèle mathématique codé pour les plans factoriel 2^2 qui prendrait donc la formule suivante :

$$Y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_{12}X_1X_2$$

Le tableau 3 donne les niveaux minimum et maximum des deux facteurs étudiés :

Tableau 3. Facteurs et domaines d'étude considérée pour le PFC.

Facteurs	Niveau	
	-1	+1
PO : Durée et la phase obscure (heures)	6	24
CC : Concentration de la cyanobactérie (g/L)	0,5	1.5

3.4.2. Production d'hydrogène dans les Photo Bioréacteurs Electro-chimiques (EPBR)

3.4.2.1. Optimisation de la production d'hydrogène par *Spirulina sp* dans l'EPBR en batch.

3.4.2.1.1. Effet de l'application de voltage sur la production d'hydrogène.

Les bactéries de ces cultures ont été récupérées par centrifugation, ont subi trois lavages par le milieu Zarrouk modifié (L-N) stérile, ensuite inoculées dans 250 mL de cette même solution à une concentration de 1 g. L^{-1} avant d'être introduits dans le réacteur **EPBR mono-chambre**. Le même volume de cette suspension cellulaire a été mis dans la chambre anodique du réacteur **EPBR à double chambres**, tandis que le compartiment cathodique de ce dernier est rempli seulement avec 250 mL du même milieu stérile et non inoculé par la souche, et il est renouvelé par une solution fraîche avant chaque expérience.

Puisque le potentiel standard de l'électrolyse de l'eau est compris entre 1,23-1,8 V (**Hallenbeck P. C., 2005 ; Konur O., 2018**), nous avons contrôlé les valeurs du voltage appliquées au photo-bioréacteur électrochimique à 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 V, respectivement à la valeur minimale de densité de courant de 2,5 mA en prenant en considération que les valeurs entre 5 et 10 mA sont complètement adéquates pour conserver l'intégrité cellulaire des microorganismes (**Luo Q., 2005 ; Yang J. S., 2010**). Les résultats de ces expériences ont été comparés avec un témoin sans l'application d'un potentiel afin de montrer l'effet de la valeur de ce dernier sur la production d'hydrogène par la

III. Matériel et Méthodes

Spiruline. Le pH des solutions est suivi grâce à un pH mètre (pH 211, HANNA instruments, USA).

Les deux EPBR fonctionnent en permanence sous condition anaérobie, l'oxygène est pour ce faire éliminé par un barbotage de 10-15 minutes par l'azote moléculaire, ensuite chaque EPBR est isolé du milieu extérieur grâce à des bouchons en caoutchouc fermant hermétiquement les différentes sorties des deux réacteurs.

Le pôle positif du potentiostat est connecté à l'anode, tandis que le pôle négatif est relié à la cathode. Un multimètre (Metrohm Herisau, Model E-510, Switzerland) est utilisé pour mesurer le voltage entre l'anode et l'électrode de référence. La durée de chaque expérience de production d'hydrogène en batch est de 24 heures de fermentation obscure et deux heures d'exposition à la lumière blanche fluorescente à l'intensité optimale de $2,92 \text{ W.m}^{-2}$. Toutes les expériences ont eu lieu à la température optimale de $35 \text{ }^\circ\text{C}$ en plaçant le dispositif complet dans un incubateur bactériologique thermostaté et réglé à cette température (Ainas M., 2017).

3.4.2.1.2. Production prolongée d'hydrogène sous les conditions optimales en mode Batch et séquentiel.

La capacité de la spiruline à produire de l'hydrogène sous certaines conditions environnementales extrêmes comme l'absence de l'oxygène et certains éléments dans le milieu (azote) a été étudiée par plusieurs travaux de recherches. L'originalité de nos travaux consiste à l'étude de l'effet de l'application d'un faible voltage sur le processus de production d'hydrogène chez la spiruline pendant plusieurs jours sous ces conditions de stress.

L'expérience est menée dans les deux types de réacteurs EPBR durant trois cycles successifs en batch, la valeur du voltage appliqué était sélectionnée suivant les résultats de l'optimisation de la section ci-dessus.

De plus, dans le but de montrer l'effet de l'alimentation continue des nutriments à la souche sur la progression du métabolisme de production d'hydrogène sous les mêmes conditions opératoires que décrites précédemment, nous avons sélectionné un mode opératoire appelé ESBR ou « Electrochemical Sequential Batch Reactor » en utilisant le même EPBR à double chambre. Dans le cas de ce mode séquentiel, nous étions amenés à renouveler le milieu de production dans les deux compartiments du réacteur après chaque cycle de production d'hydrogène en batch par le biais d'un système de pompes péristaltiques, afin d'éliminer le milieu Zarrouk (L-N) usé à travers les sortie (d) et (e); pour ensuite le remplacer par le même volume de solution fraîche par l'entrée (k) (l), tout en gardant la souche de spiruline dans la chambre anodique grâce à sa capacité de former un biofilm lorsqu'elle est soumise à de telles conditions extrêmes, ce qui est en faveur de cette étape de remplacement solution liquide. Nous avons également soumis le ESBR à trois cycles successifs de production d'hydrogène.

3.4.2.1.3. Impact de la nature du milieu de production sur les taux d'hydrogène sous les conditions optimales en mode batch.

Dans cette expérience, **dans l'EPBR bi-compartmenté** la souche de spiruline est soumise à trois cycles successifs de production d'hydrogène en batch, où chaque cycle, comme précédemment décrit, est constitué de 24 heures d'obscurité représentant la phase de fermentation obscure et de deux heures d'exposition à la lumière blanche fluorescente.

La comparaison des taux de production d'hydrogène sous les conditions optimales pour chaque type de milieux est le meilleur moyen de déterminer l'efficacité de l'application de ce nouveau procédé à double intérêts ; à savoir : Production d'énergie durable et dépollution des eaux naturelles.

3.4.2.1.4. Comparaison des matériaux des électrodes sur de la production hydrogène sous les conditions optimales : EPBR mono-chambre.

Tous nos premiers essais ont été effectués en utilisant des électrodes en platine qui est un métal noble et très onéreux, toutefois, cela permet d'éviter l'interférence des réactions électrochimiques au sein de l'EPBR. En même temps, un procédé n'est considéré comme rentable et extensible à grande échelle sauf s'il présente l'avantage d'être intéressant sur le plan économique. On a voulu donc tester la rentabilité du procédé en présence du métal le moins cher qui peut exister sur le marché à savoir : l'aluminium. Les deux paramètres importants à suivre sont le taux de production d'hydrogène et la viabilité cellulaire.

Pour ce faire, on a choisi de travailler avec **l'EPBR mono-chambre** grâce à la simplicité de sa conception. Ce dernier a été soumis à quatre cycles de production d'hydrogène en disposant une suspension de spiruline dans un volume de 250 mL de l'eau naturelle du lac de Réghaia à raison de 0.5 g/L, et auquel on a appliqué la valeur optimale du voltage de 0.2 V (2.5 mA). Après chaque cycle on a mesuré les taux de production d'hydrogène et de la concentration des cellules de spiruline afin d'établir une cinétique d'évolution de ces deux paramètres au cours du temps durant le processus de génération d'hydrogène.

3.4.3. Mesure de la production d'hydrogène

La concentration de l'hydrogène est mesurée par un détecteur MQ-8 (HANWEI ELECTRONICS CO., LT, China; range 100 – 10,000 ppm). Avant chaque expérience, le mélange réactionnel est barboté par le gaz d'azote permettant ainsi de chasser et de remplacer les 350 cm³ l'air du « headspace » à une pression totale de 1 bar, en prenant en considération que la pression totale ne change pas très significativement durant les

III. Matériel et Méthodes

différentes expériences. Les productions d'hydrogène ont été calculées avec les teneurs en hydrogène (exprimées en moles) et la loi des gaz parfaits.

Le détecteur MQ-8 de petit prix, est préalablement calibré avec différents mélanges gazeux hydrogène/azote donnant un signal moyen de $2,9 \cdot 10^{-6}$ % par mV. La réponse du MQ-8 était également vérifiée par un chromatographe en phase gazeuse (GC 14 B, Shimadzu) équipée avec une colonne B remplie de carbone de 4 m de longueur (1/8 inch, 100 à 200 mailles), et un détecteur de conductivité thermique. Le gaz d'argon pur est utilisé en tant que gaz vecteur au cours de l'analyse.

3.4.4. Dosage des NADPH et NADP⁺ durant la production du bio-hydrogène EPBR mono-chambre.

Dans le but de déterminer le cheminement du métabolisme de la spiruline lors de la production d'hydrogène sous l'effet d'un potentiel, et afin de déterminer la contribution des équivalents réducteurs dans ce processus, nous avons procédé à la mesure des concentrations des NADPH/NADP⁺ durant le processus de production d'hydrogène à 0.3 V en les comparant à celles du témoin à 0.0 V en mode batch. Les prélèvements des échantillons de suspension de spiruline étaient effectués après : 24 h d'obscurité, 2h, 4h, et 6h d'exposition à la lumière blanche fluorescente.

Pour cela, nous avons utilisé le kit NADP / NADPH-Glo™ test (Promega, G9081™ G9082, USA) qui est une analyse basée sur la bioluminescence afin de détecter la quantité totale de la forme oxydée et réduite des nicotinamides adénine dinucléotides phosphates (NADP⁺ et NADPH, respectivement). L'enzyme NADPH cycling, les réactions de réductase et luciférase sont initiés par l'ajout d'un volume égal du réactif de détection NADP/NADPH-Glo™, qui contient l'enzyme NADPH cycling et son substrat, la réductase, le substrat de la réductase et l'Ultra-Glo™ rLuciférase, à un échantillon contenant des NADP⁺ ou des NADPH. Le détergent présent dans ce réactif entraîne également la lyse cellulaire, permettant ainsi la détection des NADP⁺ et NADPH intracellulaires totaux dans une plaque multipuits par l'addition d'un seul réactif. Ce protocole en une seule étape est utile pour le dépistage rapide du changement dans les niveaux de NADP⁺ et NADPH totaux.

Le kit NADP / NADPH-Glo™ est donc basé sur l'utilisation d'une enzyme dite « NADP Cycling Enzyme » qui possède la capacité de convertir les NADP⁺ en NADPH. En présence des NADPH, une autre enzyme (proluciférine réductase) réduit un substrat donnant la luciférine, qui à son tour est quantifiée par l'utilisation d'une Luciférase Recombinante Ultra-Glo™ (rLuciférase). Le signal lumineux produit est proportionnel à la quantité des NADP⁺ et NADPH dans l'échantillon. Les résultats des analyses sont révélés à l'aide de la lecture de luminescence par le biais d'un Luminomètre (TECAN, Spark 10M, Switzerland). (voir le protocole d'analyse dans l'Annexe 05 :

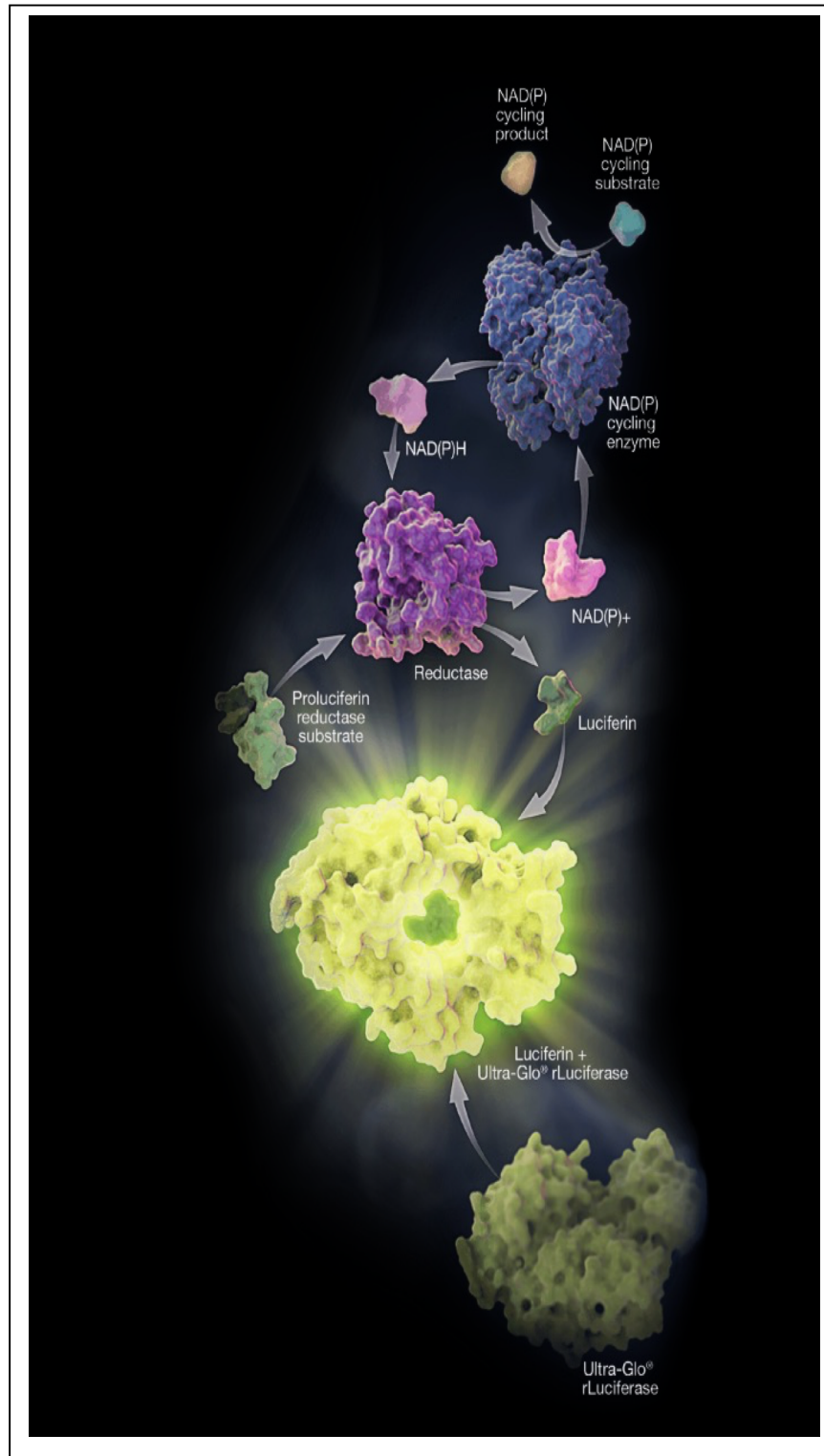


Fig 13. Présentation schématique de la technologie du kit NADP/NADPH-Glo™. L'enzyme NADP Cycling transforme le NADP en NADPH. En présence du NADPH, la réductase réduit enzymatiquement le substrat proluciférine Reductase en luciférine. La Luciférine est détectée en utilisant l'Ultra-Glo™ rLuciferase, et la quantité de lumière produite est proportionnelle à la quantité du NADP et du NADPH dans l'échantillon. (**TECHNICAL MANUAL, NADP/NADPH-Glo™ Assay, USA**).

Résultats et Discussions

4.1. Optimisation des cultures de la Spiruline et production d'hydrogène en présence des eaux du Lac de Réghaia sous les conditions optimales en batch

4.1.1. Caractérisation de l'eau de lac de Réghaia.

Les résultats de la caractérisation physico-chimique et bactériologique de l'eau naturelle du lac de Réghaia ainsi que les indices de pollution sont présentés dans l'annexe (04). On a obtenu un indice de biodégradabilité DCO / DBO₅ égale à 6,62, ce qui est supérieur à 4, donc il s'agit d'une eau naturelle de qualité plus ou moins polluée.

On constate également que l'eau du lac de Réghaia (notre site de prélèvement) présente globalement une bonne qualité physico-chimique, notamment grâce à l'absence des métaux lourds (au-delà des limites détectables). Par contre, les résultats d'analyse de sa qualité microbiologique montrent que ce site est de mauvaise qualité, à cause des concentrations des bactéries coliformes et entérocoques intestinaux (>100 NPP/mL) qui dépassent de loin les limites réglementaires autorisés pour les eaux de surface, indiquant ainsi une pollution d'origine fécale. Cela peut être dû à sa localisation adjacente aux habitations présentes dans cette zone humide. En même temps cette eau se caractérise par un faible indice hydrocarbure (0.14 mg/ mL) est inférieur à la norme (**DIRECTIVE 2008/105/CE**).

4.1.2. Effet de l'âge de la souche sur la production d'hydrogène et sur sa capacité en phycoremédiation.

Le suivi de la production d'hydrogène par des souches de spiruline de différents âges ainsi que les valeurs de DCO des eaux de lac qui ont servi de milieux de production sont représentés dans la **figure 14** :

IV. Résultats et Discussion

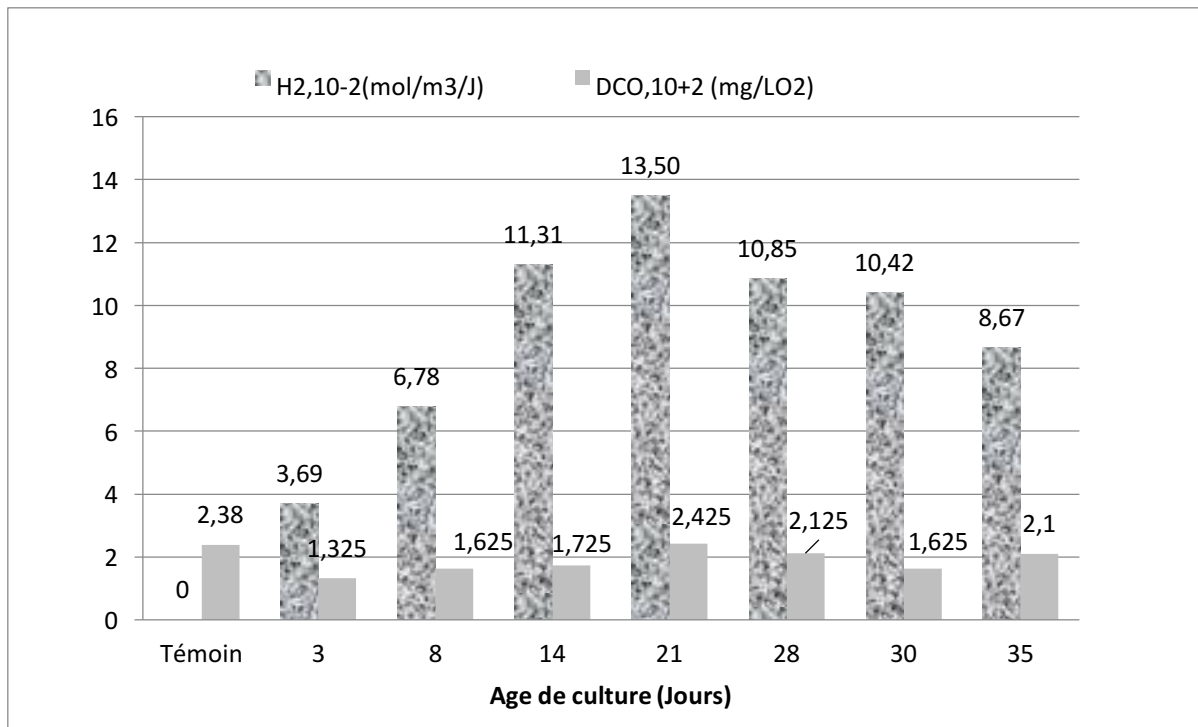


Fig 14. Taux de production d'hydrogène et les DCO correspondantes en fonction de l'âge de la spiruline dans les eaux du lac de Réghaia.

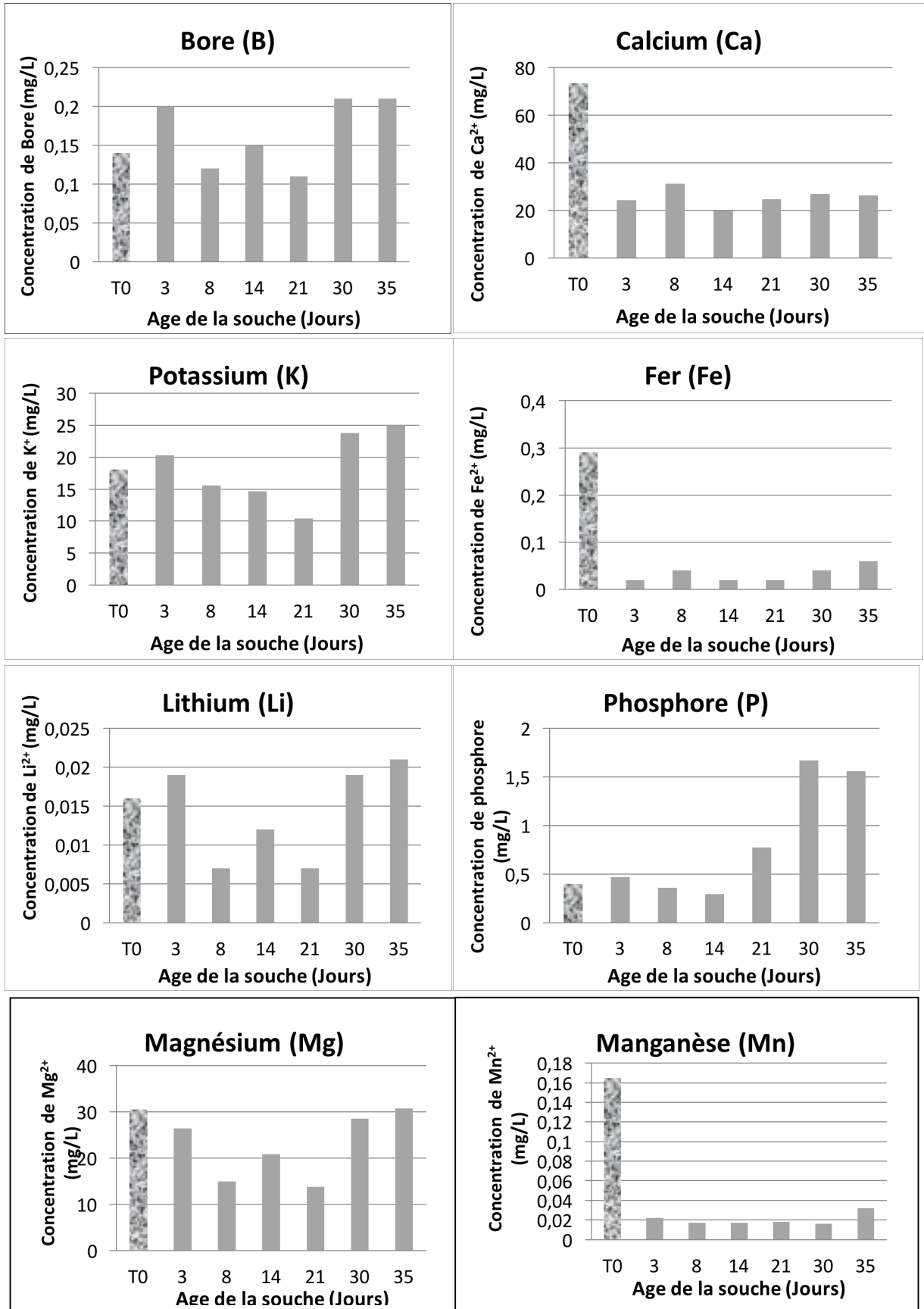
On note que le taux de production d'hydrogène le plus élevé de $13,50 \cdot 10^{-2}$ moles $H_2 \cdot m^{-3} \cdot j^{-1}$ est obtenu par la culture de 21 jours correspondant à la phase exponentielle de culture de la spiruline (voir mémoire de magistère). Selon la cinétique de croissance établie pour notre souche de spiruline, ce taux élevé peut être justifié par le fait qu'elle soit en phase exponentielle à cet âge-là (**Ainas M, 2017**) ; ce qui représente le maximum de l'activité enzymatique. En parallèle, les mesures des valeurs de la DCO des échantillons aqueux récupérées après le processus de production d'hydrogène montrent qu'ils sont relativement proportionnels au taux de production d'hydrogène. En effet, la valeur de DCO initiale de l'échantillon témoin était de 238 mg/LO₂ qui a ensuite légèrement diminué après le traitement par les cultures de 3, 8 et 14 jours. Une légère augmentation a été constatée pour la culture de 21 jours pour revenir pratiquement à la valeur initiale de 242 mg /LO₂, pour ensuite rechuter pour les cultures les plus âgées à savoir : 28, 30 jours pour atteindre la valeur de 210 mg/LO₂ pour la culture de 35 jours. On suggère que la première diminution est due à la dégradation des matières organiques présents dans l'eau du lac par la souche de spiruline au cours du procédé, sachant que la quantité d'acides organiques excrétée dans le milieu par les cellules est proportionnelle au taux de production d'hydrogène du fait qu'ils constituent des sous-produits de cette voie métabolique (**Aoyama K., 1997**). Par

IV. Résultats et Discussion

conséquent, cela peut expliquer la légère augmentation de la valeur de la DCO soluble dans la solution aqueuse dans le cas de la culture de 21 jours qui a généré le taux maximal d'hydrogène, par rapport aux autres cultures de plus jeune âge. Suggérant ainsi que la souche ne réutilise pas la totalité des acides organiques produits au cours de la phase de fermentation obscure afin de stabiliser le pH du milieu ; dans le but de préserver l'activité enzymatique de l'hydrogénase. Autrement dit, le taux de production d'acides organiques par les cellules de spiruline est supérieur à leur taux d'utilisation au cours du procédé de production d'hydrogène (Liu B.F., 2010; Zagrodnik R., 2017).

La bioremédiation des eaux polluées par les microalgues a fait déjà l'objet de plusieurs études de recherche (Wang L et al., 2010 ; Mani D., 2014 ; Nacorda J.O., 2007 ; Richards R.G., 2013). En effet, il a été démontré que pour les espèces les plus résistantes à la pollution les rendements d'élimination de la DCO ont été de 80,64% et 70,97%; pour les souches *C vulgaris* et *S quadricauda*, respectivement (Ayodhya D. K., 2013). Dans le cas de la bioremédiation des eaux du lac de Réghaia par notre souche de spiruline les DCO après traitement ont été réduites au maximum de 44,32 % par la culture ayant l'âge de 3 jours seulement, après on note une diminution des pourcentages d'élimination de la DCO suggérant ainsi le déclin de la capacité de dépollution de notre souche, compte tenu de la libération des acides organiques et composés volatils par celle-ci au cours de production d'hydrogène. En outre, l'analyse des quantités des différents éléments chimiques présents dans les eaux du lac après production d'hydrogène par la spiruline a donné les profils représentés dans la **figure 15** :

IV. Résultats et Discussion



IV. Résultats et Discussion

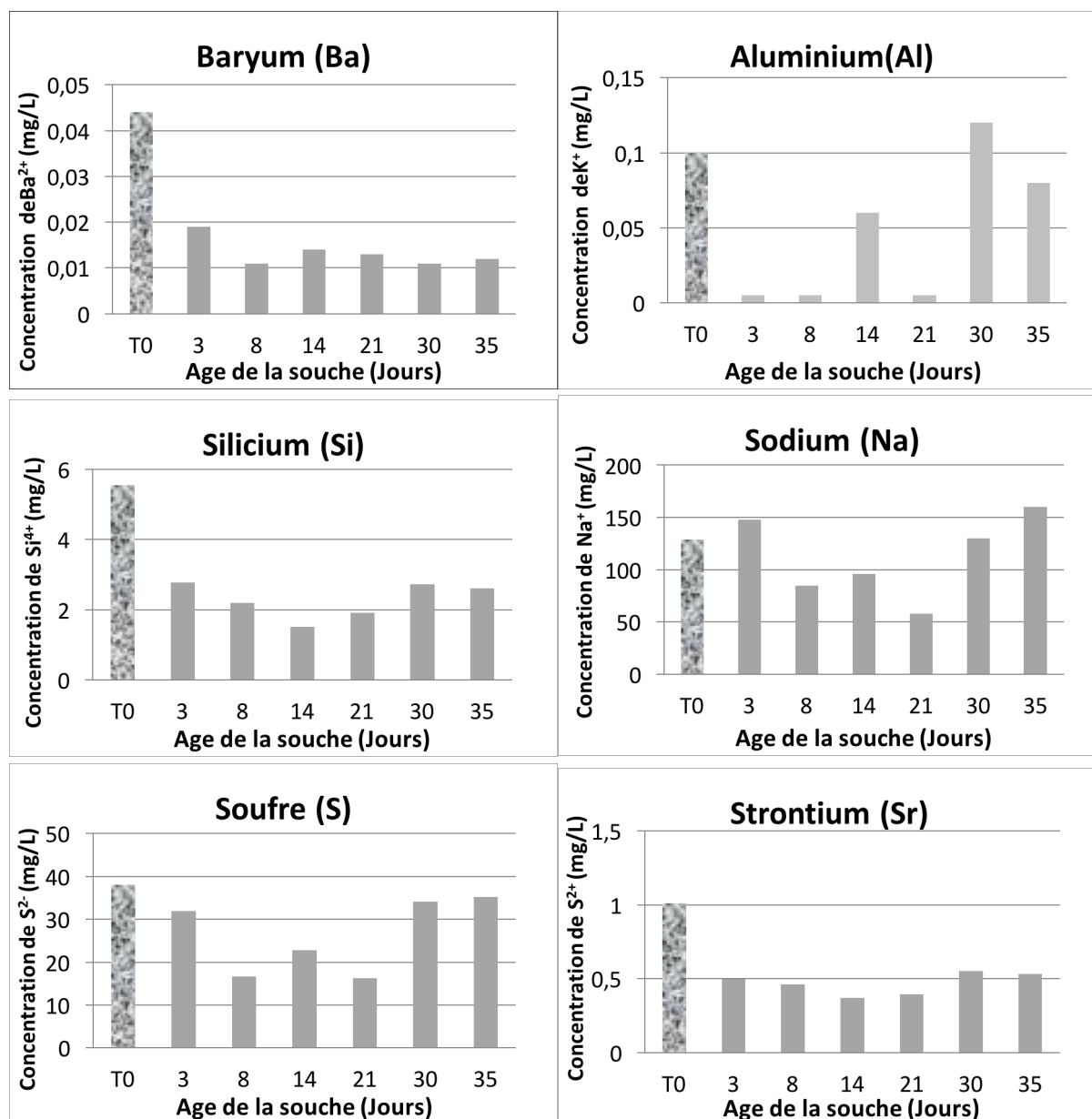


Fig 15. Composition minérale des eaux du lac traitées lors de la production d'hydrogène par des cultures de spiruline de différents âges.

Les résultats de dosage des métaux et minéraux présents dans les échantillons de l'eau du lac de Réghaia ayant servi comme milieu de production d'hydrogène, montrent que leurs taux élimination par la spiruline diffère d'un élément à un autre et selon l'âge de la culture employée. En effet, on remarque que les taux d'abattement les plus significatifs concernent : Al 95% > Fe 93% > Mn 90%. Ensuite vient le Ba 75% > Ca 73% > Si 72% > Sr 63% (**voir tableau 4**). Ces résultats concordent parfaitement avec les résultats de l'étude de Bredell & Darnell (1990) concernant l'utilisation de la biomasse morte des microalgues dont la spiruline *via* l'immobilisation au sein d'un

IV. Résultats et Discussion

système de colonne en batch jouant le rôle de bio-absorbant qui est capable de retenir des métaux lourds avec une affinité décroissante pour $Al > Cd > Zn > Mn$, et peut donc être utilisé pour l'élimination sélective des métaux lourds (Avigad V., 1997). Ces résultats révèlent une propriété intéressante de la spiruline dans la biosorption des métaux et minéraux permettant ainsi cette cyanobactérie de jouer un rôle non négligeable dans les procédés de bioremédiation des eaux polluées ; par ailleurs ces résultats sont en accord avec les travaux de recherche menés sur la capacité de bioremédiation des métaux lourds par la spiruline (Çelekli A. et al., 2011 ; Hong C., 2005).

Tableau 4. Taux d'abattement des éléments présents dans les eaux du lac par la spiruline

Élément	Taux d'abattement (%)	Âge de la souche (jours)
Al	95	3-21
Fe	93	3-21
Mn	90	14
Ba	75	8-30
Ca	73	14
Si	72	14
Sr	63	14
S	57	21
Li	56	8-21
Na	55	21
Mg	54	21
K	42.5	21
B	21	21

De même, une autre étude concernant la culture de *Chlorella sp* dans des eaux municipales a montré que cette microalgue a éliminé 65, 95, 98, 80, 98 et 56 % d'Al, Ca, Fe, Mg, Mn et Zn, respectivement (Wang L et al, 2010).

IV. Résultats et Discussion

Le soufre, le magnésium ainsi que les ions sodium, lithium et potassium sont éliminés à environ 50% par rapport aux concentrations présentes initialement dans l'échantillon témoin. Et enfin, un faible taux d'abattement a été enregistré pour le bore avec un rendement d'élimination maximal de 21%. On a constaté que quelques échantillons contenaient des taux de quelques éléments minéraux plus élevés que ceux de l'échantillon témoin. C'est le cas par exemple du phosphore et du potassium. Ce phénomène peut être lié au taux de ces mêmes éléments qui rentrent dans la constitution des cellules de spiruline. En effet, il est connu que cette cyanobactérie constitue une source riche de phosphore et de potassium (**voir l'annexe 06**).

En plus, ces résultats montrent également que globalement les cultures de spiruline ayant un âge entre 14 et 21 jours démontrent un meilleur rendement d'élimination. Cela suggère que l'âge idéal de la souche donnant les meilleurs taux de phyco-remédiation se situe dans cet intervalle. Et sur cette base, cet âge des cultures a été retenu pour produire de l'hydrogène par le EPBR en utilisant cette eau naturelle comme milieu de production. Le tableau 5 présente un ordre décroissant de la capacité de biosorption de la spiruline des différents éléments présents naturellement dans les eaux du lac de Réghaia.

Tableau 5. Capacité de biosorption des différents éléments présents dans les eaux du lac par la spiruline

Élément	Capacité de biosorption (mg/g)	Age de culture
Na	142,2 10^{-3}	21
Ca	107,4 10^{-3}	14
S	43,6 10^{-3}	21
Mg	33,4 10^{-3}	21
K	15,4 10^{-3}	21
Si	8,06 10^{-3}	14
Sr	1,27 10^{-3}	14
Fe	0,540 10^{-3}	14
Mn	0,298 10^{-3}	14
Al	0,190 10^{-3}	21
Ba	0,066 10^{-3}	21
B	0,060 10^{-3}	21
Li	0,018 10^{-3}	21

On remarque qu'il existe une grande divergence entre ces valeurs. En effet, notre souche a démontré une très grande capacité de biosorption de $142 \cdot 10^3$ mg de Na^+ /g de biomasse. Ce qui est très logique étant donné que la spiruline est capable de co-transporter à l'intérieur de ses cellules les ions sodiums sous forme du bicarbonate de sodium présent habituellement dans le milieu synthétique Zarrouk L-N (**Ananyev G, 2008**), durant le processus de production d'hydrogène ce qui induit la diminution de sa concentration dans le milieu externe, ensuite le réglage de sa concentration dans le milieu lorsque sa concentration intracellulaire arrive à un certain seuil par son rejet à l'extérieur des cellule de spiruline à travers les pompes Na^+ . Cela peut expliquer également les concentrations plus élevées que l'échantillon témoin pour certaines cultures (**voir Fig.15**). Cela constitue aussi le cas du phosphore où compte tenu de la mortalité cellulaire pour les cultures les plus âgées plus sensibles à l'effet d'osmose des eaux du lac. Cela a induit l'éclatement des cellules au cours de la phase de production d'hydrogène et la libération par les cellules de spiruline de leur contenu en phosphore constitutif.

Parallèlement, on a trouvé que les quantités résiduelles des hydrocarbures totaux présents dans les eaux du lac après traitement par la spiruline au cours du processus de production d'hydrogène sont trop faibles (< 0.03); donnant ainsi des taux d'abattement de 78,5 % quel que soit l'âge de la souche utilisée.

4.1.3. Optimisation des conditions de production d'hydrogène en batch dans l'eau naturelle du lac de Réghaia : concentration de la biomasse et de la durée de la phase obscure.

Dans le but de maximiser la production d'hydrogène par la spiruline dans le milieu naturel (eau de lac de Réghaia), un plan factoriel complet centré été appliqué afin de déduire les valeurs optimales de concentration de la biomasse et la durée de la phase de fermentation obscure. Le plan composite centré utilisé prévoit 4 essais (2^2) plus un essai au centre et des essais répétitifs. Après la réalisation des essais prévus par ce plan, une analyse statistique des données par le logiciel JMP nous a permis d'étudier l'effet de ces deux facteurs, leur éventuelle interaction ainsi que de déterminer les conditions optimales pour la production d'hydrogène.

IV. Résultats et Discussion

Le logiciel a permis de calculer les différentes estimations des coefficients du modèle mathématique et d'identifier ainsi les plus significatifs* d'entre eux, en étudiant la réponse qui est le taux de production d'hydrogène en fonction des valeurs des facteurs : CC (concentration en biomasse) et PO (durée de la phase de fermentation obscure). Les estimations des différents coefficients du modèle obtenu sont présentées sur le tableau 6 :

Tableau 6. Estimation des différents coefficients par le PFC.

Terme	Estimation	Erreur standard	Rapport t	Prob.> t
Constante	35,3	0,778	45,35	<,0001*
CC (0,5, 1,5)	-7,4	0,869	-8,47	<,0001*
PO (6, 24)	5,5	0,869	6,32	<,0001*
CC* PO	-14,3	0,869	-16,49	<,0001*

*Coefficients significatifs

Les valeurs du tableau montrent que les facteurs CC et PO sont tous les deux significatifs influençant donc la réponse. En effet, le taux de production d'hydrogène varie en fonction de la concentration de la biomasse et de la durée de la phase de fermentation obscure. Notons aussi que le coefficient du terme CC*PO est également significatif ce qui peut être traduit par une interaction entre ces deux facteurs, ainsi le modèle mathématique exprimant la réponse taux de production d'hydrogène en fonction des facteurs qui ont un impact significatif sur celle-ci est représenté par l'équation suivante:

$$Y = 35,3 - 7,4 X_1 + 5,5 X_2 - 14,3 X_1 X_2$$

$$\text{Avec : } \begin{cases} Y = H_2 \\ X_1 = \text{CC} \\ X_2 = \text{PO} \end{cases}$$

IV. Résultats et Discussion

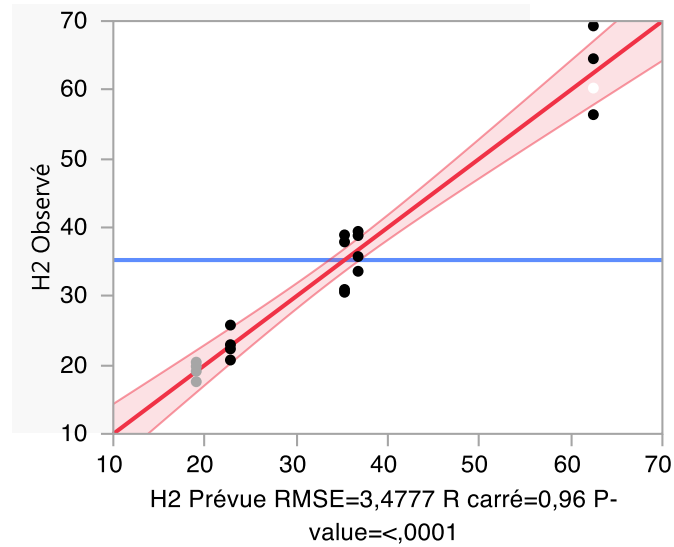


Fig 16. Réponses observées en fonction des valeurs prévues.

Le coefficient de détermination est de $R^2=0,96$ indiquant que 96% de la variable totale est bien exprimée par le modèle. Ce coefficient est très proche de sa valeur maximale égale à 1 indiquant ainsi la bonne qualité de l'ajustement du modèle.

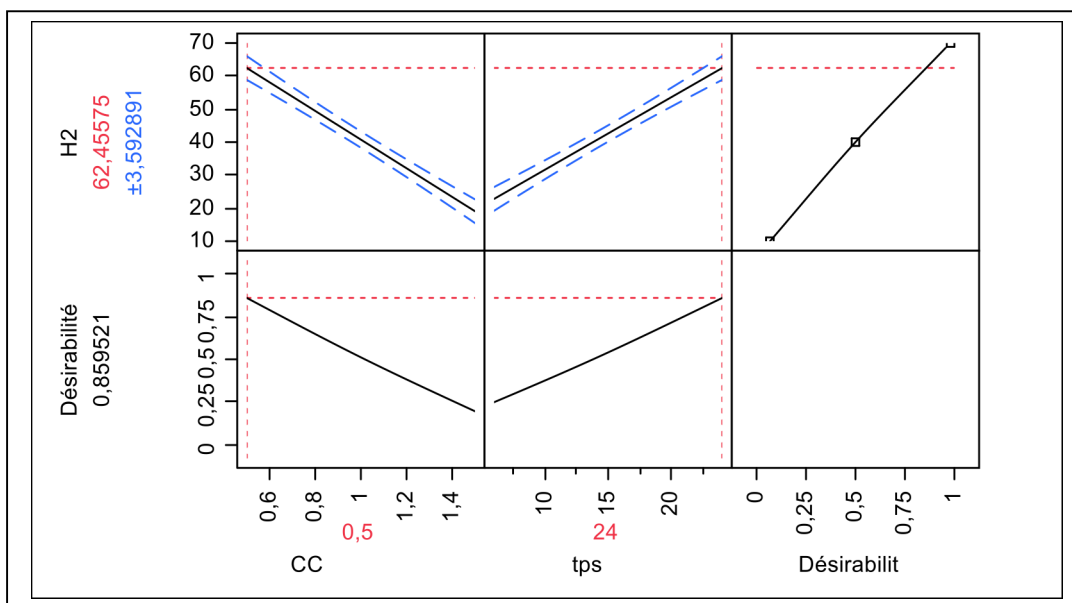


Fig 17. Profil de prévision pour PFC.

Par ailleurs, selon le profil de prévision du plan factoriel appliqué (**Figure 17**), qui renseigne sur les valeurs optimales des conditions opératoires permettant de donner le taux maximal d'hydrogène, on note que la désirabilité maximale de 62,455 (correspondant à un taux de production d'hydrogène de $0,928 \text{ H}_2 \text{ m}^3 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$) est obtenue aux conditions opératoires suivantes: la concentration cellulaire de : 0,5 g/L et la durée de phase de fermentation obscure de 24 heures.

Par conséquent, ces valeurs ont été admises en tant que valeurs optimales des deux facteurs étudiés. Elles ont été utilisées dans l'ensemble des expérimentations de production d'hydrogène par la spiruline dans les eaux de lac de Réghaia.

4.2. Optimisation de la production d'hydrogène avec le système photo-bioréacteur électrochimique EPBR.

4.2.1. Effet de l'application d'un faible voltage sur la production d'hydrogène en mode batch

4.2.1.1. EBPR à double compartiment

La production d'hydrogène avec le système EBPR bicompartimenté sous différentes valeurs de voltage a été testée (**Fig.18.a**). Dans la chambre anodique, l'hydrogène généré par la spiruline augmente linéairement avec la valeur du voltage appliqué dans l'intervalle 0,1-0,3 V. Au-delà de 0,3 V une stabilité des taux de production d'hydrogène a été observée d'où le plateau atteint.

IV. Résultats et Discussion

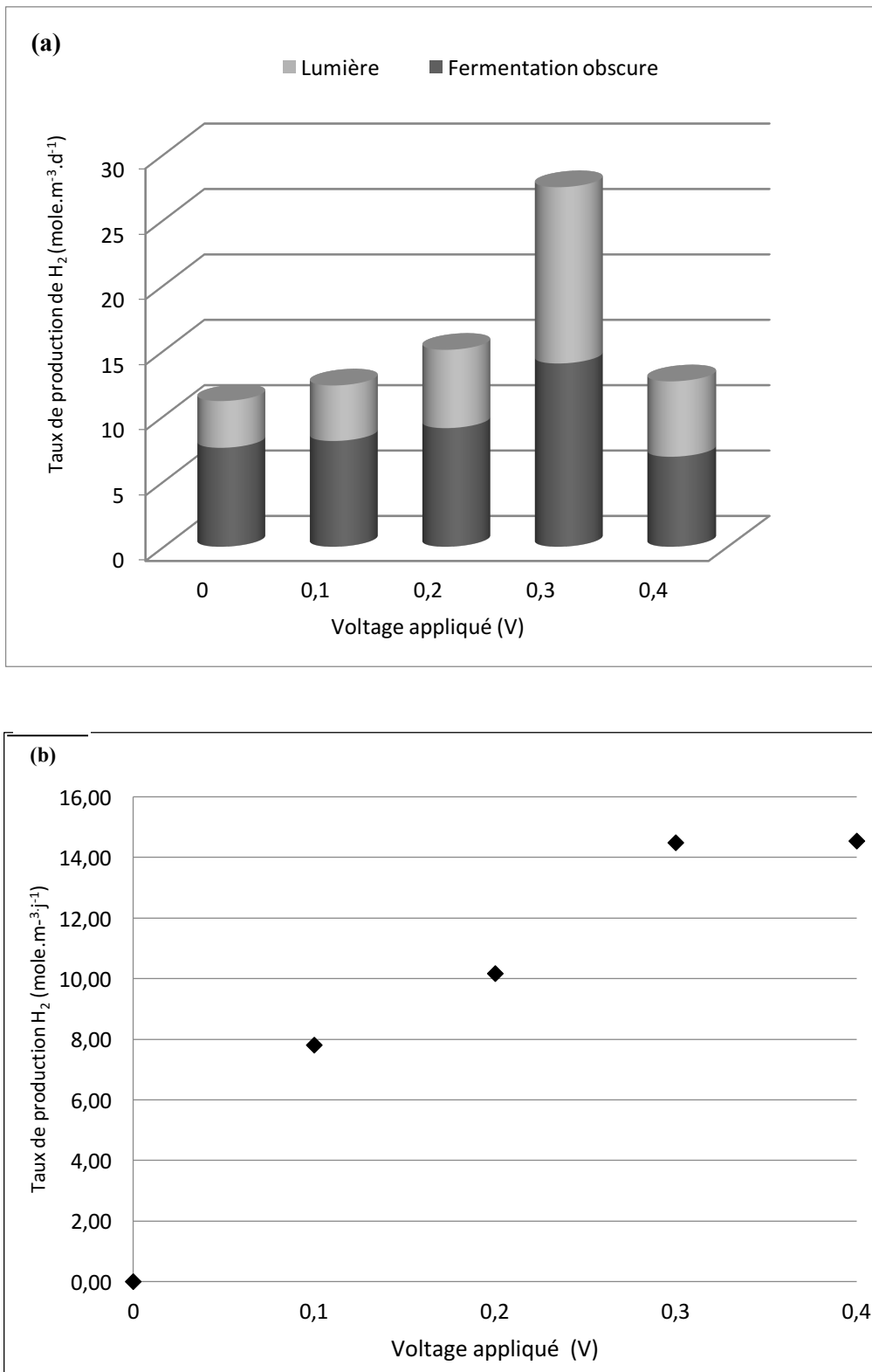


Fig.18. Effet du voltage appliqué sur le taux de production d'hydrogène par la spiruline dans le réacteur EBPR bicompartimenté. (a) Chambre anodique (b) Chambre cathodique.

IV. Résultats et Discussion

Le taux maximal de production d'hydrogène était de 14 moles $\text{H}_2 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$ à 0,3V (2,5 mA) pendant la phase de fermentation obscure, donc il y a eu une augmentation de l'ordre de 85%, en comparaison à celle de l'expérience témoin : 7,56 moles $\text{H}_2 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$. En outre, un effet stimulateur d'environ 277% dans la production de l'hydrogène a été remarqué pour la bio-photolyse directe durant la phase lumineuse ; où l'optimum de 13,48 moles $\text{H}_2 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$ a été aussi enregistré à 0,3 V après 2 h seulement d'exposition anaérobie à la lumière blanche fluorescente.

On notera l'hydrogène généré dans la chambre cathodique lorsqu'on applique un faible potentiel au réacteur (**Fig. 18.b**), à partir des valeurs $\geq 0,1$ V, et que cette production est proportionnelle à la valeur du voltage, ce qui est en accord avec la valeur théorique du voltage requise pour la production d'hydrogène au niveau de la cathode (**Liu H et al., 2005**), et avec les travaux de recherche de Benkaraache et al. (2017) durant lesquels la production d'hydrogène a commencé à augmenter d'une manière significative pour les valeurs de potentiel supérieur à 0,14V. Toutefois, dans la présente étude, le maximum de la production est atteint à 0,3V (13,37 moles $\text{H}_2 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$). Cependant, d'autres travaux reportent que la formation d'hydrogène dans la chambre cathodique a lieu en appliquant des valeurs du potentiel supérieures à 0,2 V par combinaison des protons et électrons sous les conditions biologiquement assistées (**Logan B. E., 2008 ; Hallenbeck P. C., 2005 ; Ditzig J et al., 2007 ; Cheng S et al., 2010**). Ces résultats rendent le système EBPR économiquement intéressant, vu qu'il est moins énergétiquement exigeant pour produire l'hydrogène. Ces résultats ont été publiés dans la revue « The International Journal of Hydrogen » en Janvier 2020 (**Hasnaoui S et al., 2020**).

4.2.1.2. EPBR à chambre unique.

La **figure 19** montre les taux de production d'hydrogène de l'EPBR à chambre unique aux différentes valeurs de voltage pendant 24h d'obscurité suivie par trois phases intermittentes d'exposition à la lumière blanche. Les taux les plus élevés ont été enregistrés sous un voltage 0,2 V, avec une augmentation très appréciée de 204 % pour la phase de fermentation obscure et de 350 % pour les trois phases de lumières ; et ceux par rapport à la valeur de l'expérience témoin à 00 V.

IV. Résultats et Discussion

On note qu'à cette valeur de voltage les taux d'hydrogène des différentes phases sont pratiquement similaires. En effet, la phase obscure a permis de générer 20,95 moles $\text{H}_2 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$, ensuite 20,55 moles $\text{H}_2 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$ pour la première et la deuxième phase lumineuse, et enfin 20,49 moles $\text{H}_2 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$ ont été enregistrées pour la troisième phase lumineuse. Donc l'application d'un faible voltage de 0.2 V à ce dispositif a permis de générer un taux d'hydrogène total de 82.54 moles $\cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$ correspondant à une productivité totale de 1.84 $\text{m}^3 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$. Tandis que les autres valeurs de voltage ont donné des taux d'hydrogène plus faibles.

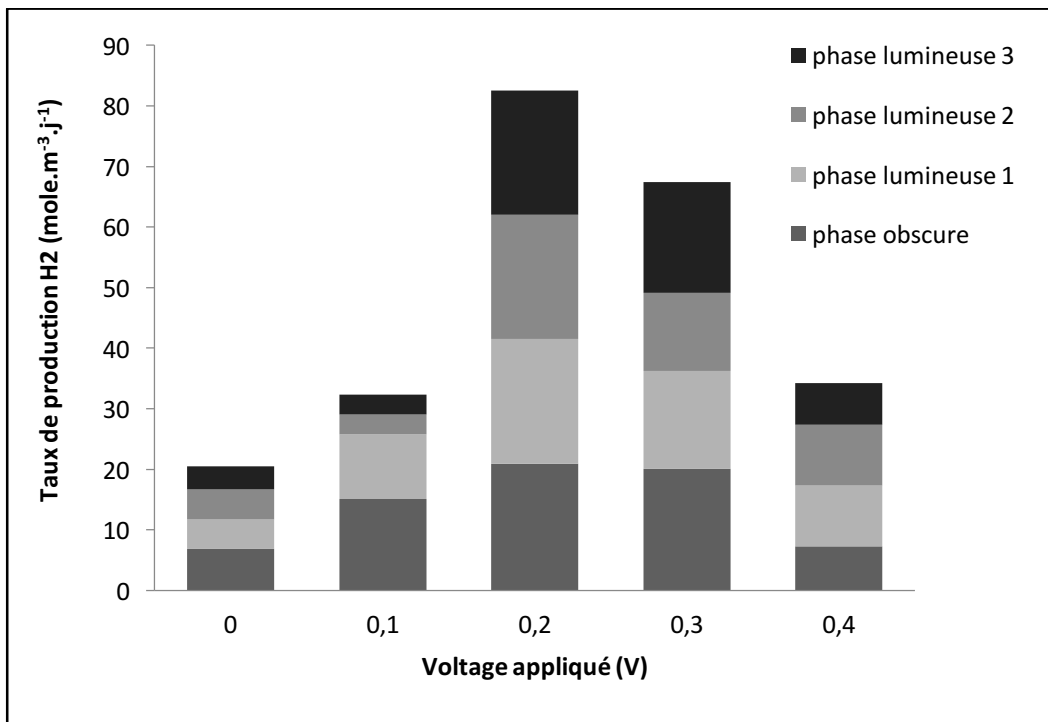


Fig 19. Effet du voltage appliqué sur le taux de production d'hydrogène par la spiruline dans le réacteur EBPR monochambre.

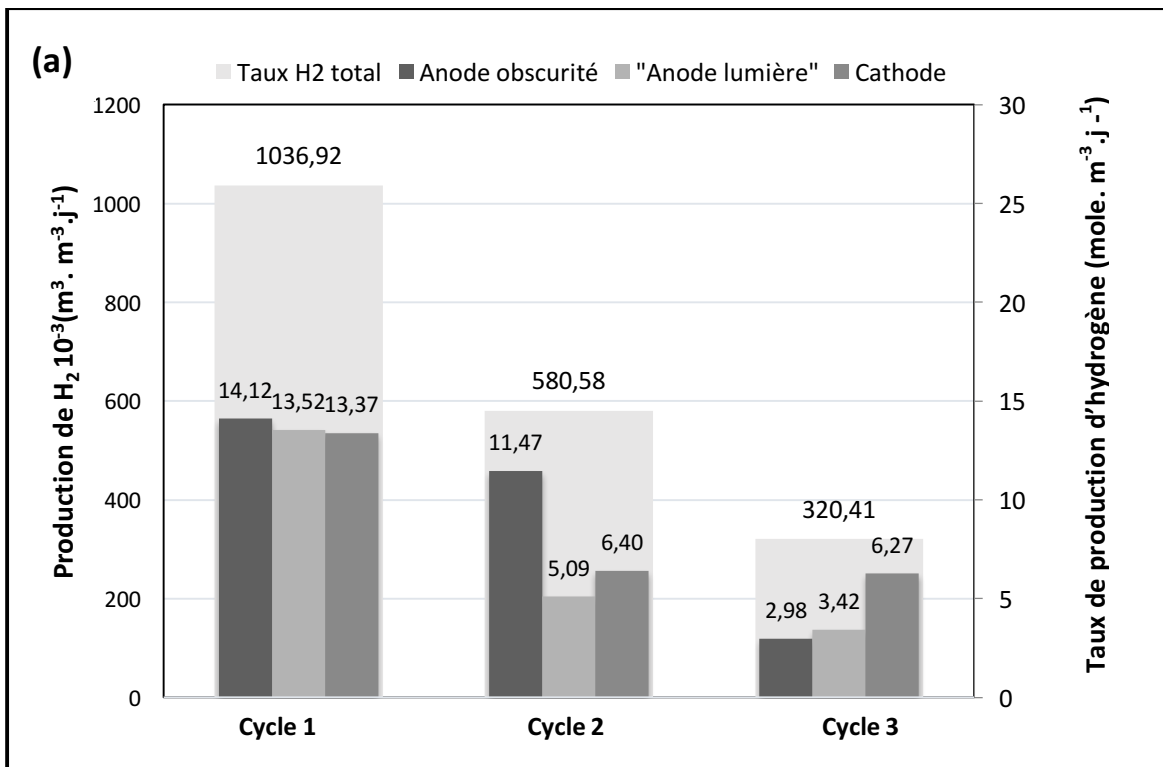
On conclut donc que l'application de faible voltage à EPBR monochambre exerce un effet positif sur la performance de celui-ci en termes de production d'hydrogène. L'optimum est obtenu à la valeur de 0,2V (2,5 mA). Les résultats de cette étape révèlent également que l'élimination de la membrane échangeuse de cations de l'EPBR est en faveur de ce procédé pour la production d'hydrogène, car cela rend ce procédé plus simple et économique par rapport à EPBR bicompartimenté.

4.2.2. Production prolongée d'hydrogène sous les conditions optimales en mode batch et séquentiel.

4.2.2.1. Réacteur bicompartimenté.

L'exposition des souches de spiruline à trois cycles de production d'hydrogène en batch a été testée. Chaque cycle est constitué d'une phase obscure de 24 heures suivie par 2 heures d'illumination par une lumière blanche fluorescente à une intensité de 2000 Lux, et ce sans renouvellement du milieu.

L'application du voltage à 0,3 V conduit à une diminution apparente dans la production de l'hydrogène d'un cycle en batch à un autre dans la chambre anodique du réacteur EBPR. La **figure 20.a** représente les taux non cumulés d'hydrogène pour chaque cycle de production en batch. Dans la phase obscure, environ 14, 11,5 et 3 moles de bio- $\text{H}_2 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$ ont été obtenues respectivement pour le premier, le deuxième et le troisième cycle. Cependant, dans la phase lumineuse la diminution observée au niveau des taux de production d'hydrogène est plus accentuée. En effet, ils déclinent de 13,5 à 5,1 moles d'hydrogène. $\text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$ entre le premier et le second cycle, pour finalement chuter à la valeur de 3,4 moles d'hydrogène $\text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$ pour le troisième cycle.



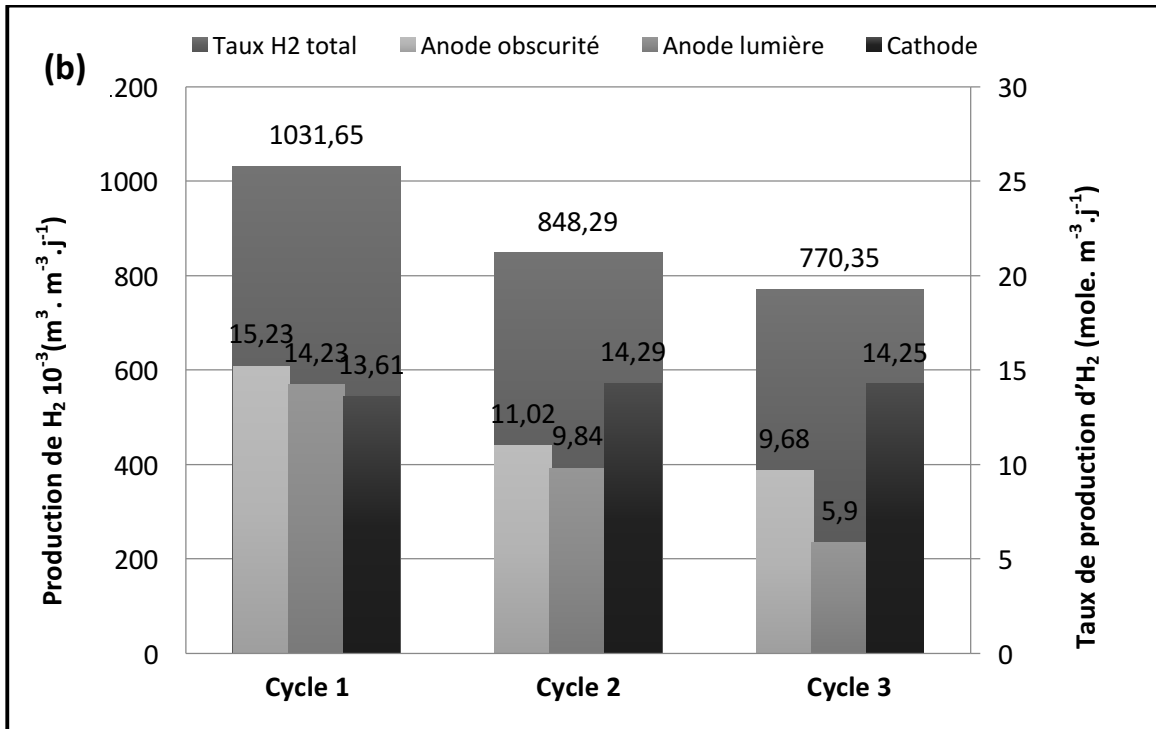


Fig. 20. Production d'hydrogène à 0.3 V durant les 3 cycles en (a) mode EPBR batch (b) Réacteur Séquentiel Electrochimique en mode Batch (ESBR).

Dans le compartiment cathodique, le taux de production électrochimique d'hydrogène est élevé dans le premier cycle ($13,4 \text{ moles H}_2 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$). Ensuite, il diminue et se stabilise autour de $6 \text{ moles H}_2 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$ à cause de la consommation du bicarbonate de la solution aqueuse par les cellules de spiruline. En plus, on assiste à un appauvrissement du milieu de production au bout de trois cycles de production d'hydrogène ce qui peut expliquer la chute des taux cumulés d'hydrogène anodique et cathodique de $1,035$ à $0,320 \text{ m}^3 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$ entre le premier et le troisième cycle.

Puisque la génération de l'hydrogène dans l'obscurité provient de la consommation des équivalents NADH dérivants du catabolisme de sucres accumulés de la souche (glycogène et osmolytes) (Ananyev G et al., 2008), la baisse des niveaux d'hydrogène peut principalement être expliquée par l'épuisement de ces réserves internes au fil du temps, autrement dit la concentration des précurseurs de l'hydrogène a décliné. En outre, l'accumulation des produits de fermentation secondaire pendant les trois jours de l'expérience a entraîné des concentrations inhibitrices dans le milieu externe qui pourraient avoir affecté l'activité de l'hydrogénase de la spiruline et donc la production de l'hydrogène comme rapporté par Aoyama K. et al (1997).

IV. Résultats et Discussion

Comme le montre la **figure 20.b**, il y a eu une légère diminution des taux de production d'hydrogène dans les deux compartiments au cours des trois cycles de production d'hydrogène en mode ESBR, illustrant une certaine stabilité par rapport au mode en batch où la baisse était plus apparente. De plus, presque les mêmes taux de production d'hydrogène entre la phase sombre et lumineuse ont été enregistrés. En effet, la production maximale d'hydrogène dans l'anode était d'environ 14 et 13 moles.m⁻³.j⁻¹ au premier cycle, correspondant à des productivités totales de 0,7 m³ H₂.m⁻³.j⁻¹, sans tenir compte de la production cathodique d'hydrogène (0,36 m³ H₂.m⁻³.j⁻¹). Les résultats obtenus dépassent de loin ceux de certains travaux visant à augmenter la production microbienne d'hydrogène par un processus fed-batch répété avec un rendement moyen de 3 moles H₂ par mole d'acétate basé sur l'ensemble du procédé dont la durée est de plus de 20 jours; soit 3,5 10⁻³ m³ H₂.m⁻³ (**Ren N. Q et al., 2009**).

La stabilité relative de la production d'hydrogène observée en mode Réacteur Electrochimique Séquentiel en Batch (ESBR) est attribuée à l'apport continu en bicarbonate à la souche en quantités requises grâce au renouvellement de la solution usée par une solution fraîche après chaque cycle de production d'hydrogène. Le bicarbonate a un rôle vital dans le métabolisme de production d'hydrogène. Il a été observé qu'il module le transport d'électrons en PSII entre QA et QB (**Blubaugh D. J et al., 1988**). En effet, cette forme dominante de carbone inorganique (HCO₃⁻) présente dans le milieu de production peut facilement être utilisée par les cellules de spiruline à un pH basique, et elle intervient dans les réactions secondaires du donneur du PSII, induisant un effet positif réversible sur l'activité du PSII qui assure le clivage des molécules d'eau (**Ananyev G, 2007; Van Rensen J. J, 2002**). Cela peut également expliquer la durabilité des taux de production d'hydrogène dans la chambre cathodique. De plus, selon Katsuhiko et al. (1997) (**Aoyama K. et al., 1997**) l'élimination des produits secondaires de fermentation qui, à partir de certaines concentrations, peuvent affecter la production d'hydrogène et permettre une stabilité de l'activité de l'enzyme hydrogénase.

Ces résultats sont nettement meilleurs que ceux obtenus précédemment par notre équipe de recherche (**Ainas M et al., 2017**) et ceux de plusieurs autres études portant sur différents types de cellules d'électrolyse microbienne (**Cheng S et al, 2010 ;**

IV. Résultats et Discussion

Carmona M. A., 2015; Kyazze G., 2010; An J., 2013; Carrera L. G., 2013; Munoz L. D., 2010; Cheng S, 2007; Jia Y. H., 2010) comme le montre le tableau 7. Les productivités d'hydrogène sont rapportées au volume du réacteur et à la surface de la cathode.

Tableau 7. Taux de production volumétrique d'hydrogène de quelques travaux sur les MECs

Référence	Surface spécifique de cathode (cm ²)	Voltage appliqué (V)	Productivité de H ₂ (m ³ .m ⁻³ .j ⁻¹ .cm ⁻²)
Cheng S et al., 2011	7	1	2,5
Cheng S et al., 2007	1	0.6	1,1
Selembo A P, 2009	7	0.9	0,2
Cette étude*	25.2	0,3	106. 10⁻³
Carrera L G et al, 2013	50	1	52. 10 ⁻³
Zikmund E et al, 2018	7	0.9	5,7.10 ⁻³
Munoz L. D et al, 2010	100	0.8	4,9. 10 ⁻³
Carmona-Martínez A et al, 2015	188	0,2	4,7. 10 ⁻³
Benkaraache A et al, 2017	232	5	4,7. 10 ⁻³
Kyazze G et al, 2010	75	0.85	2,7. 10 ⁻³
Jia Y. H et al, 2010	46	1	2. 10 ⁻³
An J et al, 2013	1060	1,2	0,12. 10 ⁻⁷
Rozendal R A et al, 2006	400	0,5	0,05. 10 ⁻³

* Production totale d'hydrogène dans le Photo Bio Réacteur Electrochimique en mode Batch (EPBR).

***performances rapportées au volume du réacteur et à la surface de la cathode.

4.2.2.2. Réacteur monocompartimenté.

Le photo-bioréacteur électrochimique à chambre unique a démontré une très bonne productivité en termes des taux d'hydrogène totaux. En effet, le premier cycle en batch a donné 25,1 et 27,9 moles H₂.m⁻³.j⁻¹ pour la phase obscure et lumineuse respectivement. Ensuite on assiste à une chute de production d'environ 53 et 48 %, en moyenne pendant les phases obscures et lumineuses des cycles 2 et 3, respectivement.

Malgré cette diminution, les productivités d'hydrogène produit durant chaque cycle restent prometteuses et comparables à ceux des deux modes du réacteur

IV. Résultats et Discussion

bicompartimenté. En effet, le réacteur EPBR monocompartimenté a généré un totale $2,66 \text{ m}^3 \text{ H}_2 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$

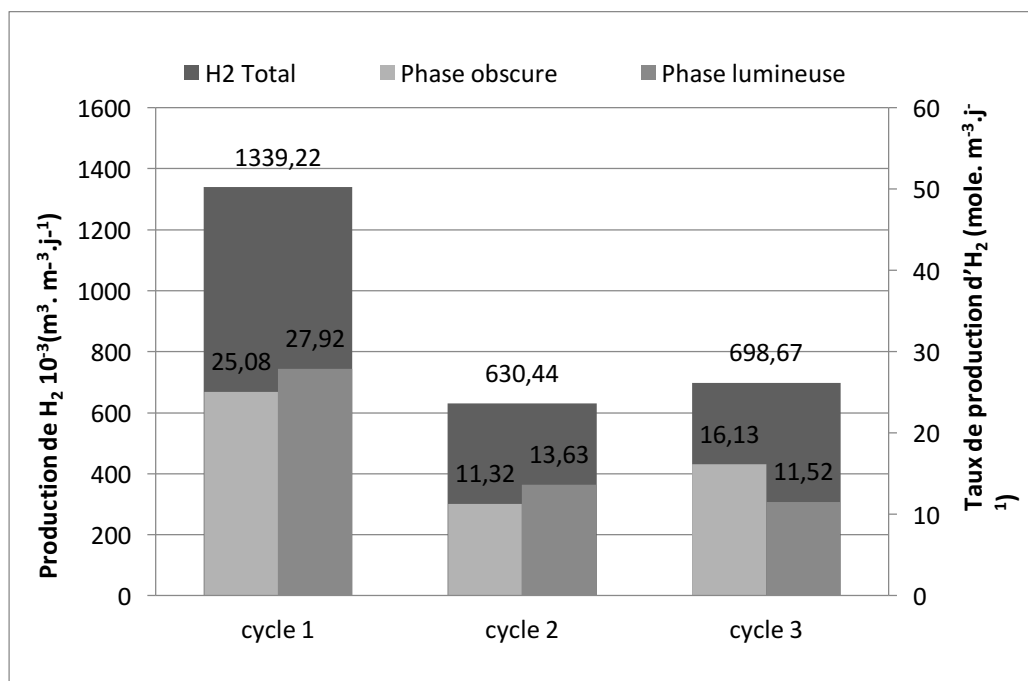


Fig 21. Production d'hydrogène à 0,2 V durant 3 cycles en batch via le EPBR monochambre.

La comparaison de nos résultats aux autres études (Tableau 8) portant sur les cellules d'électrolyse microbiennes (MECs) à chambre unique avec pour catalyseur le platine est très concluante. En effet, nous avons obtenu des taux de production très élevés par rapport à ceux des études antérieures (Hu H., 2009 ; Guo K., 2010 ; Rozendal R. A. et al, 2007) :

Tableau 8. Comparaison des taux volumétrique d'hydrogène produits par les MECs monochambre.

Référence	Surface spécifique de cathode (cm ²)	Voltage appliqué (V)	Productivité de H ₂ (m ³ · m ⁻³ · j ⁻¹ · cm ⁻²)
Call et Logan., 2008	7	0,8	446 10 ⁻³
Cette étude*	25.2	0,2	105 10⁻³
Hu H., 2009	9	0,6	77 10 ⁻³
Guo K., 2010	110	1,0	14,4 10 ⁻³
Rozendal R. A. et al, 2007	400	1,0	0,75 10 ⁻³

4.2.2.3. Comparaison des taux de production d'hydrogène des trois types de réacteurs.

La comparaison des taux d'hydrogène produit pendant le mode batch et le mode séquentiel (ESBR) dans les deux compartiments du réacteur, est représentée dans la figure 22 :

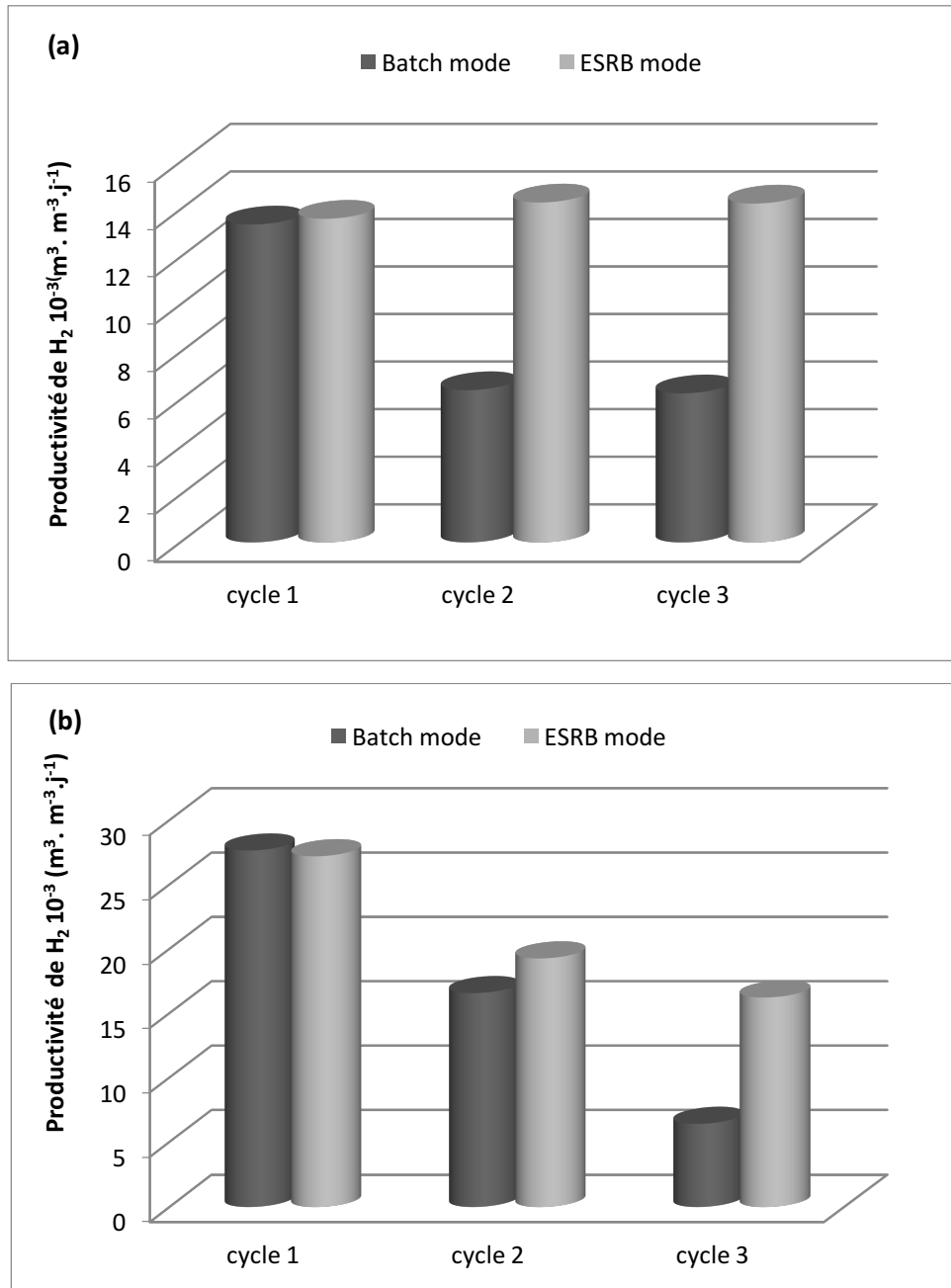


Fig.22. Comparaison entre le mode EPBR en batch et ESRB en termes de productivité totale en hydrogène. (a) Chambre anodique (b) Chambre cathodique.

IV. Résultats et Discussion

Cette comparaison a révélé que ce dernier est plus intéressant et plus efficace, principalement en raison de la durabilité des taux de production d'hydrogène dans la chambre anodique avec un maximum de $14,3 \text{ moles H}_2 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$ (**Fig. 22.a**). Ce fait est principalement dû à l'origine de l'hydrogène généré directement à partir du fractionnement des molécules d'eau apportées par le milieu frais constamment renouvelé en mode ESBR, en plus de l'hydrogène provenant du processus appelé auto-fermentation permettant la consommation des réserves glucidiques précédemment accumulées (glycogène, osmolytes et sucres solubles) durant la phase photosynthétique de culture.

En revanche, en mode ESBR, les taux totaux de production d'hydrogène dans la chambre cathodique ont diminué avec le temps. Cette diminution est inférieure à celle observée en mode batch (**Fig. 22.b**), qui dérive principalement de la transformation du flux de protons traversant la CEM, car le renouvellement du milieu de production régulièrement fourni plus de molécules d'eau et de bicarbonate à la souche de spiruline.

De plus, le pH du milieu aqueux en mode batch a subi une légère augmentation entre la valeur initiale et la fin du troisième cycle de production d'hydrogène. Cela est probablement dû au fait que la souche doit continuellement pomper des niveaux élevés d'ions sodium via une pompe à sodium nécessitant de l'ATP, qui est co-transporté avec du bicarbonate vers l'intérieur des cellules (**Ananyev G., 2008**). Cela favorise la génération d' OH^- dans le milieu de culture, entraînant la neutralisation de l'acidité provoquée par les acides organiques produits lors de l'autofermentation. Ceci suggère également que la phase de carboxylation se poursuit dans la phase sombre de la production d'hydrogène.

Si on compare les taux de production totaux enregistrés durant les deux modes du réacteur bicompartimenté (EBPR en batch et ESBR) avec ceux de l'EPBR mono-chambre (**Fig 23**), on note que pour le cycle 1 les quantités d'hydrogène générées sont presque égales pour les deux premiers types de réacteurs : $39 \pm 2 \text{ moles H}_2 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$, ensuite on assiste à une chute des taux d'hydrogène de l'EPBR bicompartimenté en batch atteignant 23 et $12,7 \text{ moles H}_2 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$ pour les cycles 2 et 3, respectivement. Cependant, on remarque une légère diminution des taux de production pour les cycles

IV. Résultats et Discussion

2 et 3, ainsi qu'un rapprochement des valeurs à savoir : 35.15 et 30.5 moles $H_2 \cdot m^{-3} \cdot j^{-1}$ pour le cycle 2, et 25 et 27,8 moles $H_2 \cdot m^{-3} \cdot j^{-1}$ pour le cycle 3 pour l'ESBR et l'EPBR monochambre, respectivement.

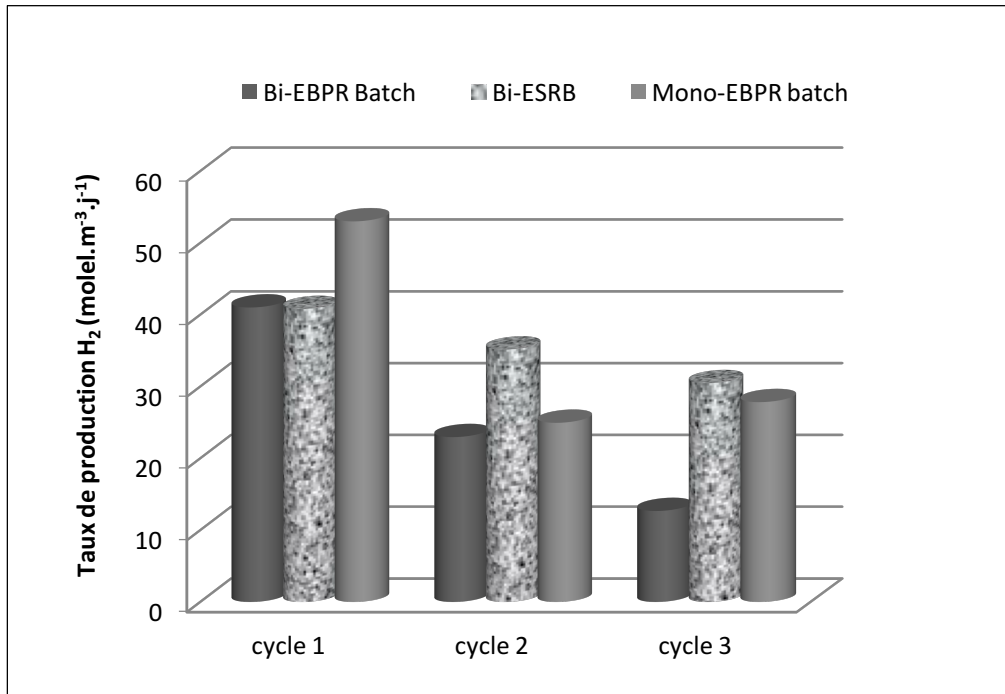


Fig 23. Comparaison des taux de production de H_2 des trois types de réacteurs.

Les taux totaux de production obtenus pour chaque type de réacteur étant : 76,6 ; 105,8 ; et 105.6 moles $H_2 \cdot m^{-3} \cdot j^{-1}$ pour l'EPBR bicompartimenté en batch, l'ESBR et l'EPBR monochambre, respectivement. L'ESBR possède la productivité en hydrogène la plus élevée, mais il est complexe et requiert un volume de milieu plus grand. L'EPBR monochambre représente un moyen rentable, plus simple et plus intéressant sur le plan économique avec une différence non significative dans la production d'hydrogène par rapport à l'ESBR. Cette diminution de performance de l'EPBR bicompartimenté est probablement due à la résistance ohmique de la membrane échangeuse de cations séparant les deux compartiments de EPBR bicompartimenté; mais elle peut être causé éventuellement à la position des deux électrodes dans l'EPBR bicompartimenté. L'effet de cette résistance peut expliquer aussi les valeurs optimales de voltage pour les deux types de réacteurs. En effet, le réacteur constitué de deux chambres requiert un voltage plus élevé que celui du réacteur monochambre. Cependant, on note que l'effet de la résistance ohmique n'a pas affecté la performance de l'ESBR, grâce au

IV. Résultats et Discussion

renouvellement du milieu liquide ce qui a compensé la diminution des taux de production pendant les cycles 2 et 3 due à cet effet de résistance.

L'évolution du pH de la solution aqueuse au cours du processus de production d'hydrogène est un indicateur flagrant de la performance d'une cellule d'électrolyse microbienne. En effet, bien que certains types de cellules d'électrolyse microbienne contiennent des membranes échangeuses d'ions afin de garder au maximum la pureté de l'hydrogène produit, d'autres en sont dépourvus afin d'éviter le problème de gradient de pH qui se forme entre les deux compartiments et qui cause des pertes de voltage qui diminuent la performance de la cellule. Durant notre étude, nous avons pu constater cette différence d'évolution du pH suivant le type de réacteur et le mode opératoire, car contrairement au batch durant lequel on a assisté à une légère augmentation du pH; les valeurs du pH de l'ESBR se situaient autour du pH initial tout au long du processus. Ce fait pourrait être attribué au renouvellement continu de la solution aqueuse qui a permis la stabilisation du pH du milieu, ce qui a contribué à son tour à maintenir l'activité de l'hydrogénase, d'où les taux de production d'hydrogène plus élevés par rapport au mode batch.

Parallèlement, la comparaison des gradients de pH à travers la membrane échangeuse de cation (CEM) de nos différents réacteurs à la fin du processus de production d'hydrogène nous a indiqué que ces ΔpH étaient inversement proportionnels à la performance de celui-ci en termes de taux d'hydrogène. En effet, l'EBPR présente le $\Delta\text{pH}=0,6$ le plus important avec le taux de production d'hydrogène le plus faible $76,6 \text{ moles H}_2 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$, contrairement à l'ESBR où le $\Delta\text{pH}=0,01$ est le plus faible d'où sa meilleure performance avec un taux maximal de $105,8 \text{ moles H}_2 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$. Pour l'EPBR monochambre qui est dépourvu de CEM on peut dire qu'il n'existe pas de gradient de pH; par contre entre le début et la fin du processus de production d'hydrogène il était de 0,19 alors que sa performance de production d'hydrogène ($105,6 \text{ moles H}_2 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$).

4.2.2.4. Comparaison des taux d'hydrogène dans le milieu synthétique L-N et l'eau naturelle du lac de Réghaia.

Comme le montre le tableau de caractérisation de l'eau naturelle du lac de Réghaia, par rapport au le milieu synthétique Zarrouk modifié (L-N) ce milieu naturel est moins riche en termes d'oligoéléments cruciaux pour la survie, mais aussi le maintien d'un état physiologique équilibré de la souche de spiruline, par conséquent son aptitude à produire l'hydrogène est plus élevée dans le milieu synthétique.

Les résultats présentant les taux de production d'hydrogène dans le EBPR à double compartiments (**Fig.24**) confirment ce fait. De plus, la quantité du bicarbonate dans le milieu (L-N) est 16,8 g/L tandis que celle du milieu naturel est seulement de 500 mg/L. Cela explique aussi cette différence très significative en termes de production de l'hydrogène par la spiruline à l'anode vu le rôle vital que joue cet anion en relation avec la chaîne photosynthétique durant la production d'hydrogène en présence de lumière (**Blubaugh D. J et al., 1988**), avec une production de 15,2 contre 6,7 moles $\text{H}_2 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$ pendant la phase obscure, ensuite 14,6 contre 2 (phase lumière 1), 10,5 contre 1 (phase lumière 2). Par contre, elle était de 3,8 contre 0,7 moles $\text{H}_2 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$ (phase lumière 3), en présence du milieu synthétique (L-N) et du milieu naturel, respectivement.

IV. Résultats et Discussion

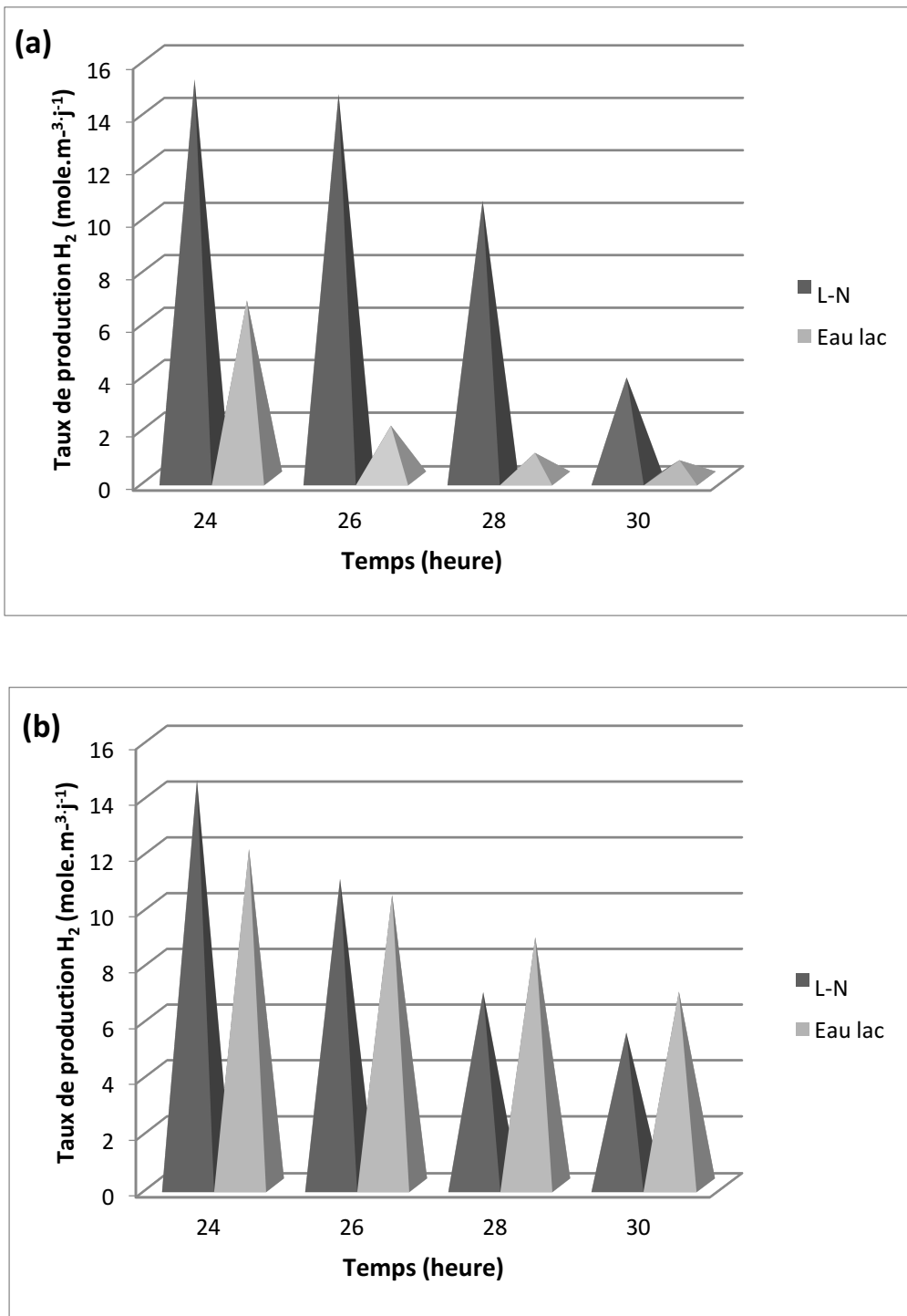


Fig 24. Impact de la nature du milieu de production sur les taux d'hydrogène dans le EBPR à double compartiments (a) Anode (B) Cathode.

On sait aujourd'hui que l'hydrogène produit dans l'anode provient principalement de la consommation des NADPH par l'enzyme hydrogénase, et qui à leur tour sont originaires du clivage des molécules d'eau par la chaîne photosynthétique au sein des cellules de spiruline (Yu J., 2007 ; McNeely K *et al.*, 2010 ; Bothe H., 2011). Cela

IV. Résultats et Discussion

donne naissance aux protons et électrons qui migrent vers la chambre cathodique et forme l'hydrogène sous l'effet du faible voltage appliqué. Ces résultats suggèrent que la capacité des cellules de spiruline à scinder les molécules d'eau est indépendante de la composition du milieu de production. Cependant cette petite différence au niveau des taux d'hydrogène est due probablement à la différence de pH entre les deux milieux utilisés. En effet, le pH optimal pour notre souche de spiruline est de l'ordre de 8,5 ce qui favorise son bon fonctionnement physiologique, la croissance cellulaire et le mécanisme de production d'hydrogène au moment où l'hydrogénase est acido-labile (**Ainas M et al, 2017**). Le pH du milieu synthétique (L-N) est de 8,5, alors que celui du milieu naturel est de l'ordre de 7,5; ce qui peut expliquer la grande différence des productions d'hydrogène. En revanche, le gradient de pH créé entre les deux compartiments du EPBR en présence du milieu (L-N) est plus important que celui du milieu naturel ($\Delta\text{pH}_{(L-N)}=0,6$, $\Delta\text{pH}_{EL}=0.24$) ce qui a compensé un peu la diminution de voltage qui a affecté la performance de ce dernier.

Par contre, les taux d'hydrogène enregistrés dans la chambre cathodique dans les deux cas de figure sont très proches, et laissent penser que la composition du milieu naturel présente un effet négatif uniquement sur la production d'hydrogène effectuée par la souche de spiruline. En effet, durant la phase obscure le taux de production d'hydrogène était de l'ordre de $13,2 \pm 0,8$ moles $\text{H}_2 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$; on assiste après à une diminution de production en présence de la lumière avec $10,7 \pm 0,2$, $7,9 \pm 0,7$, et $6,15 \pm 0,5$ moles $\text{H}_2 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$, respectivement pour la première, la deuxième, et la troisième phase lumineuse. Ces valeurs ont permis de conclure que le milieu synthétique (L-N) est environ deux fois plus favorable pour la production d'hydrogène ($81,8$ moles $\text{H}_2 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$) par rapport au milieu naturel ($48,4$ moles $\text{H}_2 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$).

IV. Résultats et Discussion

4.2.2.5. Impact du matériau des électrodes sur les taux d'hydrogène sous les conditions optimales en batch : EPBR mono-compartmenté.

Comme il est montré clairement dans la représentation graphique ci-dessous, le comportement de la souche de spiruline diffère selon la nature des électrodes utilisées.

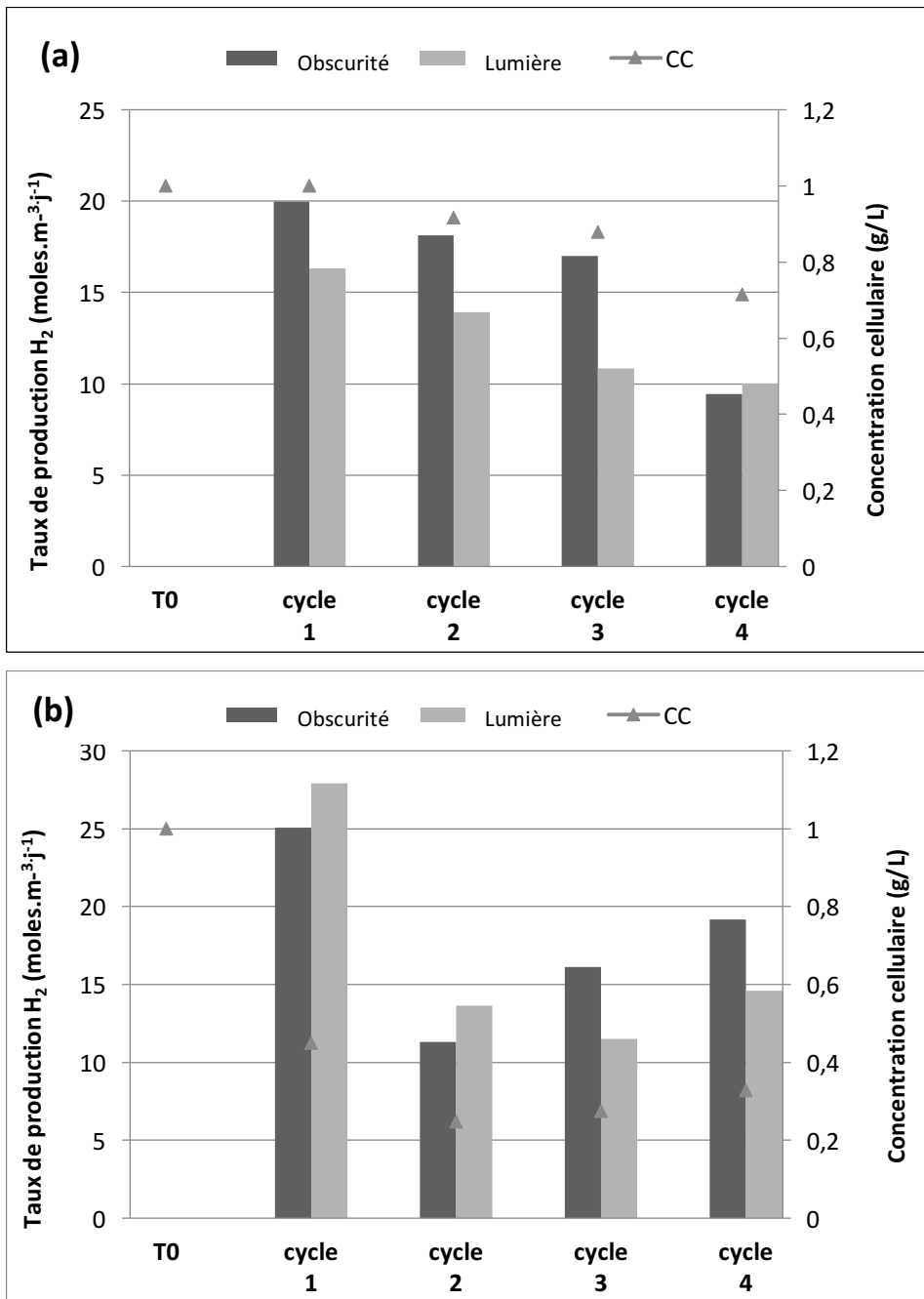


Fig 25. Impact du matériau des électrodes sur les taux de production d'hydrogène.
(a) Aluminium (b) Platine.

IV. Résultats et Discussion

En effet, en présence d'électrode en aluminium nous assistons à une diminution progressive des taux de production d'hydrogène entre le cycle 1 et le cycle 4: 20 et 16,3 moles $\text{H}_2 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$; 18,1 et 13,9 moles $\text{H}_2 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$; 17 et 10,8 moles $\text{H}_2 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$; et enfin 9,45 et 10 moles $\text{H}_2 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$ pour les phases obscures et lumineuses de chaque cycle, respectivement, avec un taux total d'hydrogène de 115,7 moles $\text{H}_2 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$. Ces résultats sont comparables à ceux d'autres études utilisant des électrodes en matériaux non précieux comme le NiMo avec un taux de production de $2 \text{ m}^3 \text{ H}_2 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$ soit 79,2 moles $\text{H}_2 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$ (Hu H., 2009).

En ce qui concerne la viabilité des cellules de spiruline en contact avec l'aluminium, on constate qu'il y'a pas forcément un effet néfaste, car on note une légère diminution des concentrations cellulaires proportionnellement à la baisse de production d'hydrogène entre T_0 et le cycle 4 qui décroissent de 1 à 0,71 g/L.

En présence des électrodes de platine, on assiste à une chute des taux d'hydrogène entre le cycle 1 et 2. Ils passent de 25 à 11 moles $\text{H}_2 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$ et de 28 à 14 moles $\text{H}_2 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$ pour les deux phases de production obscure et lumineuse, respectivement. Par la suite, nous constatons que la production d'hydrogène augmente légèrement à partir du cycle 3 pour atteindre les valeurs de 19 moles $\text{H}_2 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$ dans l'obscurité et 15 moles $\text{H}_2 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$ pour la phase de lumière. Ce comportement inhabituel est observé également dans les valeurs de concentration cellulaire qui y sont exactement proportionnelles et chutent de 1 à 0,25 g/L après le cycle 2 pour ensuite augmenter légèrement à la valeur de 0,3 g/L. On suggère que la vitalité des cellules de spiruline et leur capacité de génération de l'hydrogène sont affectées plus en présence des électrodes en platine à cause de sa faible surtension par rapport à l'aluminium. En effet, le platine est un métal noble et il constitue généralement un système électrochimique rapide ; d'où la possibilité de génération des formes oxydés (radicaux libre OH° par exemple) qui à leur tour affectent l'intégrité cellulaire de la spiruline. Cela laisse à dire qu'en pratique notre souche supporte mieux des valeurs du potentiel beaucoup plus faibles que les valeurs réellement appliqués. En effet, les cellules bactériennes deviennent plus vulnérables et on assiste donc à une baisse de la concentration cellulaire dans le mélange réactionnel et par conséquent à la diminution des taux d'hydrogène. On suggère également qu'une période d'adaptation de 24 heures (pendant le cycle 3) était suffisante à notre souche pour bien reprendre la

IV. Résultats et Discussion

production d'hydrogène en réorientant sa voie métabolique vers une fermentation hétérotrophe éventuellement à partir des débris cellulaire « cannibalisme » afin de survivre, ce qui peut expliquer la petite augmentation dans la concentration cellulaire ainsi que les taux de production d'hydrogène.

4.3. Capacité phyco-remédiate de la spiruline sous les conditions optimales.

4.3.1. Biosorption des éléments chimiques

La spiruline a fait preuve d'une bonne capacité de biosorption des éléments chimiques présents dans les eaux du lac notamment pour le calcium (19.2 mg/g), et le soufre (15.5 mg/g); et ceux à 0,2 V et en présence des électrodes en aluminium pendant les 4 cycles de production d'hydrogène avec le réacteur EBPR monochambre (Tableau 9).

Tableau 9. Élimination des métaux des eaux de lac Réghaia traitées par la spiruline durant la production d'hydrogène à 0,2 V dans le EPBR mono-chambre.

Élément	As (mg/g)	R _{max} %	Cycle
S	15,5	81	2
Fe	0,105	72,4	4
P	0,142	71	4
Mn	0,055	67	2
Ba	14 10 ⁻³	64	2
Ca	19,2	52	2
Si	1,28	46	1
Sr	0,19	37	2
Al	5 10 ⁻³	10	3
B	5 10 ⁻³	7	4
Mg	0,65	4,26	4

Tandis que, les taux d'abattement sont de 81 % (S), 72 % (Fe), 57.5 (Mn), 43,5 % (Ca), 42 % (Si), 41 % (Ba), 31 % (Sr), et 10 % (Al) malgré que l'on note une légère augmentation en fin de processus dû à l'effet de l'électrolyse du matériau des électrodes. Ces résultats sont plus ou moins en adéquation avec les essais préliminaires démontrant la capacité de phyco-remédiation effectuée en première étape (section 4.1.2). Par ailleurs, on note que sous ces conditions stressantes la biosorption de l'aluminium et le manganèse sont défavorisés contrairement au soufre

IV. Résultats et Discussion

et au phosphore avec les plus élevés taux d'abattement, suggérant ainsi que l'application du faible voltage de 0,2 V au système s'avère intervenir dans le mécanisme de biosorption de certains éléments en faveur d'autres par cellules bactériennes.

On a également constaté que certains éléments sont éliminés par la spiruline beaucoup plus rapidement que d'autres. En effet, pour certains d'entre eux le taux d'abattement R atteint son maximum au bout du cycle 1 de production d'hydrogène ce qui est le cas du silicium, ou bien au deuxième et troisième cycle comme pour le calcium, le baryum, le manganèse, le strontium et l'aluminium. Tandis que d'autres comme le fer et le phosphore ne sont efficacement éliminés qu'au bout du 4ème cycle du processus de production d'hydrogène, ce qui laisse à penser que le niveau d'affinité envers les différents métaux par la structure membranaire des cellules de spiruline est affecté par l'effet du faible potentiel appliqué. En outre, ces résultats qui sont plus faibles que ceux en absence du voltage (section 4.1.2), écartent donc l'hypothèse de l'effet du voltage appliqué sur le niveau de porosité membranaire des cellules bactériennes ; mais en même temps cette diminution peut être attribuée au taux de mortalité cellulaire durant ce processus de production d'hydrogène. Cependant, il est à noter que sous ces conditions opératoires la quantité du sodium est restée inchangée entre l'échantillon témoin et les 4 cycles de production d'hydrogène. Cela indique clairement que la spiruline perd sa capacité d'assimiler le sodium en présence d'un potentiel extérieur. Cela confirme la possibilité de modification de l'affinité membranaire de la spiruline envers les différents éléments minéraux et métaux présents dans le milieu de production d'hydrogène.

4.3.2. Demande chimique en oxygène (DCO)

Les DCO à l'issus de chaque cycle de production de l'hydrogène par des cultures à l'âge optimal de 21 jours ; ont été comparées à celle de l'échantillon témoin brute des eaux du lac de Réghaia (figure 26)

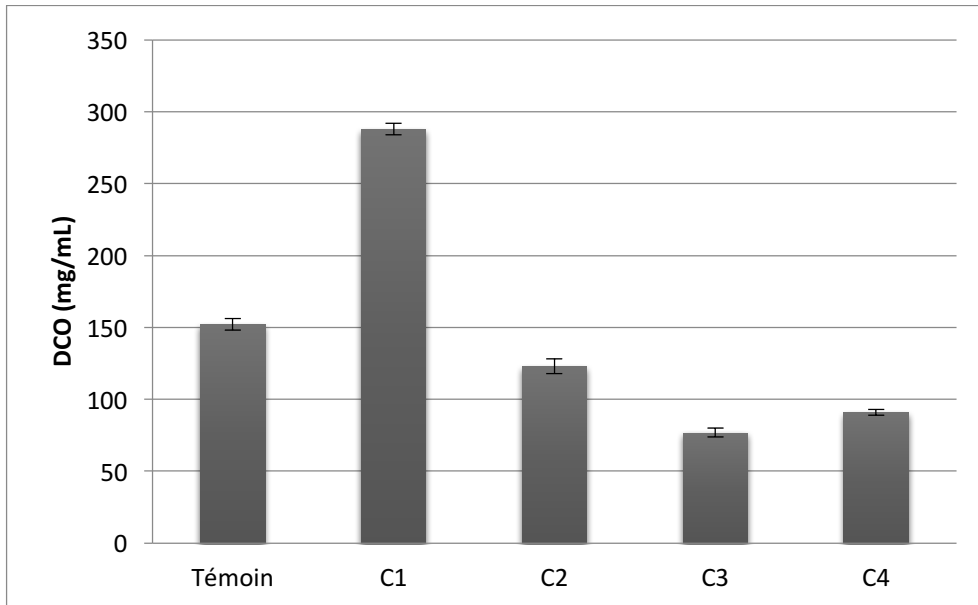


Figure 26. Evolution des valeurs de DCO dans les eaux de lac de Réghaia durant la production de H₂ par la spiruline.

On note que la valeur de la DCO double rapidement après le premier cycle de production d'hydrogène, elle passe de 152 à 288 mg/m cette augmentation peut être attribuée aux acides organiques ; résultant du métabolisme de production de H₂ ; dans le milieu par les cellules de spiruline. Ensuite, on assiste à une dégression brutale durant le processus de production de H₂ ce qui peut être dû à la dégradation des matières organiques par la spiruline, avec une valeur minimale de 77 mg/mL au bout du troisième cycle de production de H₂, désignant ainsi un taux maximal d'élimination des matières organiques éventuellement polluantes, de 73 %, ce qui coïncide exactement avec les taux d'abattement maximal de dégradation des HCT de 78,5 % est enregistré durant le cycle 3. Ces résultats sont très comparables aux résultats de l'étude de Cardoso L G et al (2021) menée sur la bioremédiation des effluents des

IV. Résultats et Discussion

aquacultures par la spiruline sous les conditions de culture en additionnant de la solution Zarrouk au milieu, avec un taux d'abattement maximal de 90%.

En comparaison avec les résultats de la section (4.1.2), on voit clairement que l'application du faible voltage affecte la capacité de phycoremédiation de notre souche de spiruline. Ces résultats s'élèvent pratiquement au même taux de biodégradation de certaines bactéries marines capables d'utiliser 83,68% des hydrocarbures pétroliers comme seule source de carbone (ZENATI B., 2019), et suggèrent ainsi que la Cyanobactérie autotrophe *Spirulina sp* peut en effet varier ses sources de carbone et devenir hétérotrophe en fonction des conditions environnementales.

4.3.3. Hydrocarbures totaux

Les analyses de l'indice des hydrocarbures totaux HTC (C10-C40) nous ont permis d'apprécier un autre volet de la capacité de phycoremédiation de notre souche de spiruline à dégrader les hydrocarbures en milieu aqueux, tout en sachant que cette cyanobactérie est naturellement autotrophe. Le dosage des quantités résiduelles d'hydrocarbures dans les échantillons des eaux du lac après traitement nous a permis de calculer les taux d'abattement liés à chaque cycle de production d'hydrogène dans le EBPR mono-chambre; donnant les résultats représentés dans la figure 27 :

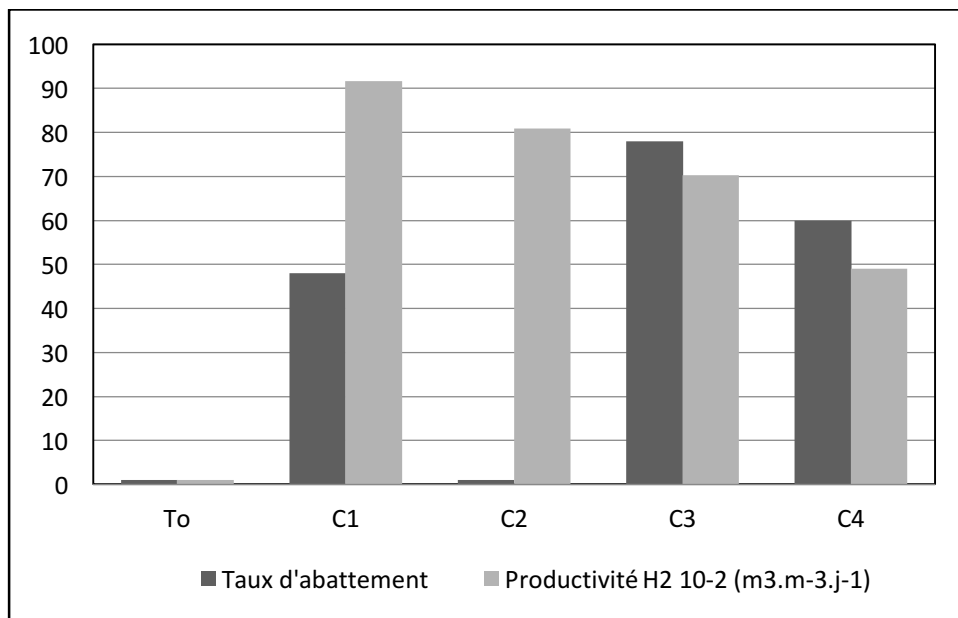


Fig.27. Production d'hydrogène en fonction des taux d'abattement des HCT dans les eaux du lac de Réghaia durant la production d'hydrogène par la spiruline dans le EBPR mono-chambre en mode batch.

IV. Résultats et Discussion

On peut constater clairement que le taux d'abattement des HCT dans les échantillons du milieu naturel diffère d'un cycle de production d'hydrogène à l'autre. En effet, il n'existe pas une vraie cohérence entre les paramètres. Ainsi, un taux maximal de dégradation des HCT de 78,5 % est enregistré durant le cycle 3 de production d'hydrogène donnant $70.2 \cdot 10^{-2} \text{ m}^3 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$, et la productivité maximale d'hydrogène de $49.1 \cdot 10^{-2} \text{ m}^3 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$ pour un taux d'abattement de 59 % au bout du cycle 4

Ces résultats qui indiquent que notre souche de spiruline est capable de dégrader les hydrocarbures dissous dans son milieu aqueux. Cependant cette capacité de dégradation est nulle au bout du cycle 2. Ce phénomène est peut-être lié à l'interférence des sources de carbone pour la spiruline, ainsi pendant cette étape elle avait probablement une préférence pour son autotrophie en utilisant seulement ses stocks de glucides intracellulaires pour produire l'hydrogène ; au lieu de la dégradation des hydrocarbures extérieurement disponibles.

4.4. Dosage des équivalents réducteurs NADPH/NADP⁺

D'après les cinétiques représentées dans la **figure 28.a** on observe que les concentrations du NADPH varient durant le processus de production d'hydrogène. Elles diminuent durant la phase obscure, ensuite elles augmentent graduellement dans la phase lumineuse pour revenir environ aux valeurs initiales de 40 mM à la fin du processus. Ce phénomène est peut-être expliqué par l'oxydation des NADPH par l'hydrogénase bidirectionnelle au sein des cellules de spiruline sous ces conditions extrêmes, afin de subvenir aux besoins énergétiques de notre souche tout en générant de l'hydrogène. Cependant, l'augmentation des concentrations du NADPH dans la phase lumineuse est peut-être dû à la réduction d'une partie des NADP⁺ afin de préserver l'équilibre intracellulaire entre la forme réduite et la forme oxydée de cet équivalent réducteur (NADPH/NADP⁺).

En même temps, une augmentation rapide des concentrations des NADP⁺ dans les cellules de spiruline a été observée, notamment dans la phase lumineuse (**Fig. 28.b**). Cette augmentation est le résultat de la génération des NADP⁺ survenant de la consommation des NADPH par l'hydrogénase bidirectionnelle sous ses conditions de limitation en O₂. Ce phénomène continu au-delà des concentrations initiales des

IV. Résultats et Discussion

NADP⁺ (40mM), pour générer plus de molécules d'ATP afin d'éviter la surréduction intracellulaire. Ces NADPH oxydés servent comme donneurs d'électron pour l'hydrogénase, puisque l'hydrogène peut être produit via le transport photosynthétique d'électrons, par l'intervention de la ferrédoxine, NADPH ferrédoxine oxydoréductase (FNR), NADPH et l'hydrogénase bidirectionnelle, après l'exposition à la lumière fluorescente blanche durant phase lumineuse de la production d'hydrogène. En effet, quelques auteurs avaient noté une augmentation de la production d'hydrogène, lorsque les cyanobactéries sont soudainement exposées à des intensités lumineuses trop élevées dans leur écosystème naturel (Bothe H., 2011 ; Hallenbeck P. C., 2005).

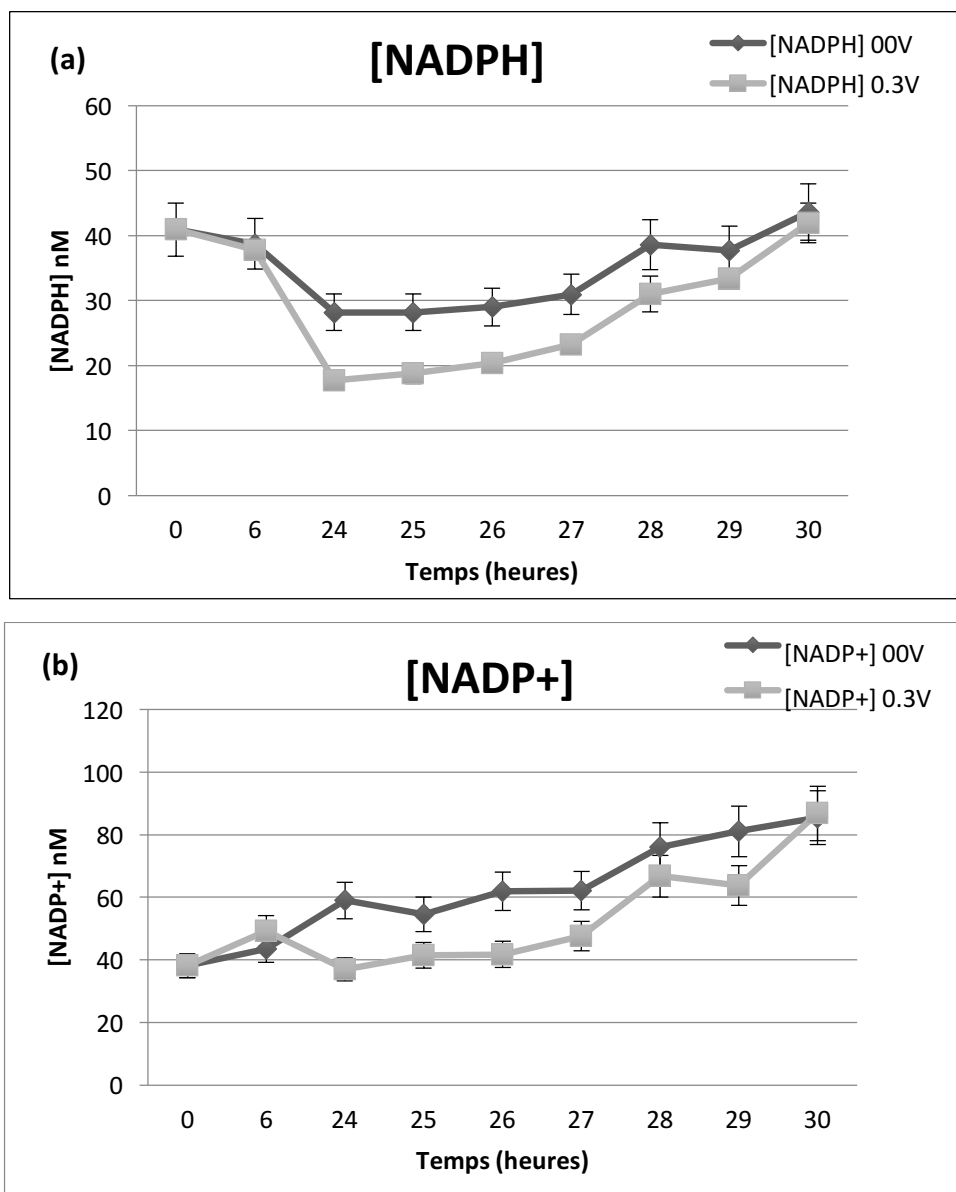


Fig.28. Cinétiques des concentrations intracellulaires des équivalents réducteurs de spiruline durant la production d'hydrogène dans le réacteur EBPR bicompartimenté.

IV. Résultats et Discussion

En outre, ces courbes montrent clairement que l'addition d'un potentiel d'une valeur de 0,3 V au système EBPR, entraîne une surconsommation des équivalents NADPH qui étaient réduits après seulement 6 heures de l'étape de la fermentation obscure, conduisant à une « chute » dans les concentrations intracellulaires de cet équivalent réducteur. Cet effet est plus accentué dans le cas de l'addition du voltage comparé à l'expérience témoin sans l'ajout du potentiel. Par contre, l'application du voltage n'exerce forcément pas un effet positif sur la régénération des NADP^+ , car la cinétique des concentrations montre clairement qu'en absence du potentiel l'augmentation des concentrations des NADP^+ se fait plus ou moins rapidement par rapport à celle en sa présence.

On peut également conclure que la diminution des concentrations des NADPH par oxydation excessive sous l'effet de l'application de potentiel et l'augmentation des concentrations des NADP^+ ; sont accompagnées d'une augmentation dans la production d'hydrogène (**Figure 29**) :

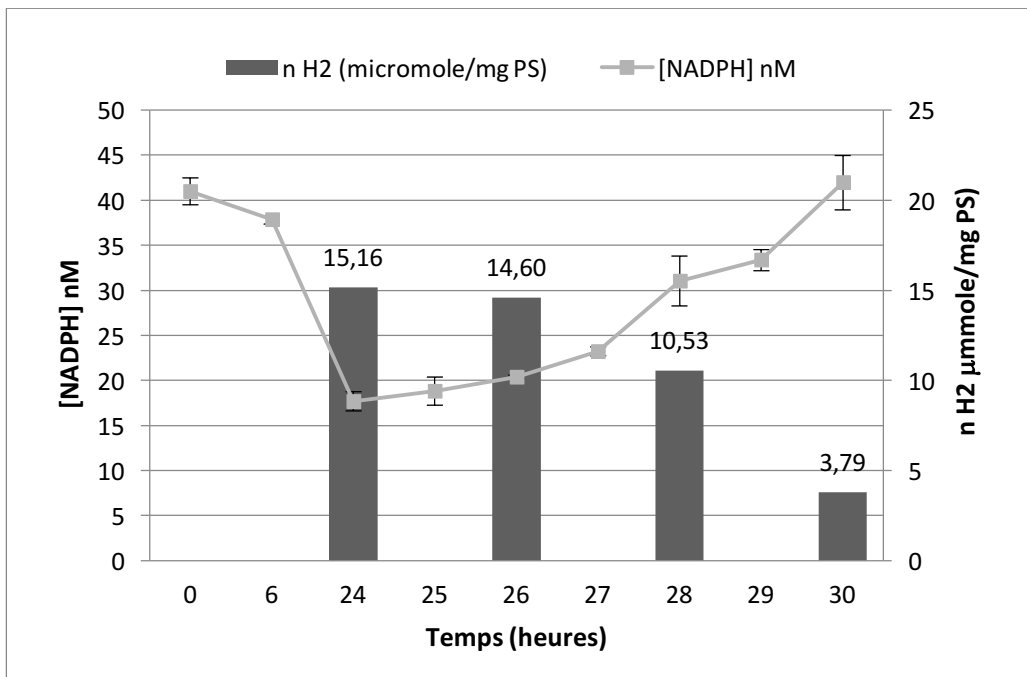


Fig. 29. L'évolution des concentrations des NADPH et des taux d'hydrogène durant le processus de production d'hydrogène à 0.3 V.

IV. Résultats et Discussion

La stimulation de l'activité de l'hydrogénase par l'application du faible voltage est spéculée, c'est-à-dire l'oxydation des NADPH en NADP^+ par cette enzyme peut être rapidement achevée afin de permettre la production d'hydrogène, indiquant ainsi une interaction possible entre l'enzyme hydrogénase et la membrane cellulaire de la spiruline. En même temps, différents modèles concernant les interactions entre les bactéries et les électrodes des bio-piles (MFCs) ont été établis. L'un d'entre eux suggère que les enzymes contenant les centres redox du nicotinamide adénine dinucléotide (NADH/NAD^+) et nicotinamide adénine dinucléotide phosphate ($\text{NADPH}/\text{NADP}^+$); ce qui est le cas de l'hydrogénase de la spiruline; sont capables d'effectuer le transfert direct des électrons entre les centres actifs des enzymes et la surface des électrodes ce qui entraîne une modification de l'activité enzymatique **(Scott K., 2012)**.

Cependant, l'hypothèse d'intensification de l'expression des gènes *hoxEFUYH* codant pour l'hydrogénase bidirectionnelle par l'effet du voltage appliqué au système est rejeté, étant donné qu'il s'agit d'une enzyme constitutive, qui est donc exprimée sous les conditions aérobies de culture cellulaire **(Bothe H., 2011 ; Tamagnini P., 2007)**.

Finalement, ces résultats montrent clairement que le processus de la production d'hydrogène en utilisant les équivalents réducteurs NADPH au sein des cellules de spiruline se produit non seulement durant la phase lumineuse, mais cela commence dès la phase obscure. Suggérant ainsi, que l'hydrogène produit provient principalement de la consommation des NADPH déjà présent dans les cellules par l'enzyme hydrogénase, et qui à leur tour sont originaires du clivage des molécules d'eau par la chaîne photosynthétique durant la phase photosynthèse aérobie de culture cellulaire de la spiruline. Cela signifie donc, que la mineur partie de l'hydrogène serait générée à partir des NADH durant le processus d'auto-fermentation ; c'est-à-dire la phase obscure de la production d'hydrogène ; par la dégradation des réserves glucidiques intracellulaire stockées durant le processus de photosynthèse aérobie **(Yu J., 2007 ; McNeely K et al., 2010 ; Bothe H., 2011)**.

Conclusions Générales

V. Conclusions générales et perspectives

Le présent travail vise à démontrer l'impact positif de l'application d'un faible potentiel sur la production d'hydrogène par la spiruline à l'aide d'un Photo-Bio-Réacteur Electrochimique (EPBR). Le taux total de production d'hydrogène par le EPBR bi-compartimenté est d'environ $42 \text{ moles H}_2 \text{ m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$ à $0,3 \text{ V}$ ($2,5 \text{ mA}$). Ce taux étant la somme de l'hydrogène généré dans les deux chambres du réacteur sous l'effet du voltage appliqué, qui a entraîné la conversion des protons, en provenance du compartiment anodique, en hydrogène moléculaire. Cela suggère que l'efficacité de production d'hydrogène du EPBR est améliorée par l'ajout du potentiel au système par rapport aux résultats d'études portant sur les MEC conventionnels. Par ailleurs le EPBR mono-chambre a démontré une meilleure performance pour la valeur de $0,2 \text{ V}$ ($2,5 \text{ mA}$) avec une production maximale de $41,5 \text{ mole H}_2 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$ juste pour la phase obscure et la première phase lumineuse de 2 heures, ce qui représente pratiquement la même production que tout en étant moins énergivore ; surtout avec le fait que nos résultats sont nettement meilleurs à ceux de plusieurs autres études portant sur différents types de MECs à double compartiments et mono-chambre.

L'exploitation de l'EPBR bi-compartimenté en mode batch et en mode séquentiel (ESRB) pendant trois cycles successifs de production d'hydrogène a donné une productivité de $1,93$ et $2,67 \text{ m}^3 \text{ H}_2 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$, respectivement, révélant que ce dernier est plus intéressant et plus efficace en termes de production totale d'hydrogène par rapport à l'EPBR en mode batch. D'un autre côté, le réacteur EPBR mono-compartimenté a démontré une bonne durabilité pendant les 3 cycles de production d'hydrogène avec une productivité totale de $2,66 \text{ m}^3 \text{ H}_2 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$ qui est du même ordre que celle du mode séquentiel qui est plus complexe et plus énergivore. Ces résultats impliquent que l'EPBR mono-compartimenté en batch; et éventuellement en mode séquentiel dans des travaux futurs; pourrait constituer un moyen économique et rentable pour la production d'hydrogène étant donné ses taux élevés de production d'hydrogène malgré le faible potentiel et la densité de courant ($2,5 \text{ mA}$) appliqués à ce système, par rapport aux deux réacteurs précédemment cités.

L'autre volet de cette étude, consistait à tester l'impact du matériau des électrodes sur les taux de production d'hydrogène dans le EPBR mono-chambre à $0,2 \text{ V}$. Cela nous a permis de constater que le comportement de la spiruline diffère selon la nature du

V. Conclusions générales et perspectives

matériau constituant les électrodes utilisées. En effet, il s'est avéré que notre souche supporte mieux l'aluminium que le platine, compte tenu du taux de mortalité cellulaire qui est plus prononcé en contact avec ce dernier ; malgré les taux totaux de production d'hydrogène qui sont presque du même ordre dans les cas: $115,64 \text{ moles H}_2 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$ pour les électrodes en aluminium contre $139,38 \text{ moles H}_2 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$ dans le cas des électrodes en platine Ce qui permet de conclure que l'aluminium qui est métal très bon marché, peut constituer un bon matériau pour notre procédé de production d'hydrogène.

Par ailleurs, mise à part les premières constatations qui ont permis de conclure que le milieu synthétique (L-N) est plus favorable pour la production d'hydrogène ($81,8 \text{ moles H}_2 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$) par rapport au milieu naturel ($48,4 \text{ moles H}_2 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$); les résultats prometteurs de l'application de ce nouveau procédé au traitement d'un milieu aqueux naturel médiocre en termes de pollution ont démontré que ce couplage est parfaitement possible et avantageux. En effet, l'utilisation des eaux de lac de Réghaia semble donc présenter une bonne alternative au milieu synthétique. Les tests préliminaires en absence du potentiel (0,0 V) ont démontré que les souches ayant un âge entre 14 et 21 jours ont une très bonne capacité en phyco-remédiation dans le traitement des eaux du lac, avec des taux d'abattement maximal de 95 % Al, 93 % Fe, 90 % Mn. En outre, le soufre, le sodium, le lithium, le magnésium, et le potassium sont éliminés à environ 50% par rapport aux quantités présentes initialement dans l'échantillon témoin. Cependant, cette capacité de phyco-remédiation est moins efficace en appliquant un faible voltage au système de l'EPBR, et semble influencer l'affinité de biosorption de la Spiruline envers les différents éléments présents dans les eaux du lac donnant des taux d'abattement suivants ; les taux d'abattement sont de 72 % (Fe), 57,5 (Mn), 43,5 % (Ca), 42 % (Si), 41 % (Ba), 31 % (Sr), et 10 % (Al). Parallèlement à cela, notre souche a démontré une très bonne capacité de biodégradation des hydrocarbures dissous dans les eaux du lac avec un maximum d'élimination de 78,5 % enregistré durant le cycle 3 de la production d'hydrogène, ce qui suggère la capacité de la cyanobactérie autotrophe *Spirulina sp* à détourner son métabolisme afin de survivre en présence d'autres source de carbone et devenir ainsi hétérotrophe en fonction des conditions environnementale tout en gardant son pouvoir à produire de l'hydrogène pour générer de l'ATP afin de survivre sous certaines conditions environnementales extrêmes. Des travaux supplémentaires dans ce sens

V. Conclusions générales et perspectives

seront nécessaires afin de dévoiler l'éventuel chevauchement entre ses voies cataboliques et le métabolisme de production d'hydrogène au sein des cellules en présence de différentes sources de carbone, compte tenu des résultats de dosage des équivalents réducteurs qui indiquent clairement que l'hydrogène produit provient principalement de la consommation des NADPH par l'enzyme hydrogénase; est positivement proportionnelle aux taux de production d'hydrogène.

Cependant, il est essentiel à noter que la biomasse résultante de ce procédé s'avère une problématique pour les applications alimentaires ou pharmaceutiques. La régénération de la biomasse peut donc être envisagée pour ce genre d'application afin de récupérer les éléments adsorbés à partir de la biomasse résultante.

Dans les travaux futurs, il serait intéressant d'étendre ce nouveau bioprocédé à l'échelle pilote ensuite à grande échelle ; en étudiant sa durabilité à long terme ainsi que la possibilité de le compter parmi les méthodes conventionnelles de production d'hydrogène. Cependant, ce passage présente tout un nouvel ensemble de défis. Il serait également intéressant d'utiliser des échantillons d'eaux naturelles plus pollués, et contenant éventuellement des métaux lourds afin d'étudier la capacité phycoremédiate de la spiruline sous ces conditions et leur impact sur sa capacité de production d'hydrogène, en plus d'une étude de durabilité en termes de productivité d'H₂ et de viabilité cellulaire au cours du procédé ; en testant différentes techniques d'immobilisation cellulaire, ainsi que la sélection des souches mutantes les plus résistantes

Le présent travail représente donc un point de départ pour le processus à grande échelle. Par contre, la conception générale du système de photo-bioréacteur et les matériaux adéquats devront être soigneusement sélectionnés et adaptés pour permettre une optimisation de la production d'hydrogène à grande échelle, tout en maintenant un coût relativement convenable, d'où l'intérêt d'une étude technico-économique approfondie afin d'évaluer les coûts prévisionnels ainsi que la détermination des risques liés au projet à grande échelle.

Références Bibliographiques

Références

Abudukeremu K, Yibatihan S, Peyman Nadia F.A, Chandrasekhar K, Mohd S.K (2016) A comprehensive review of microbial electrolysis cells (MEC) reactor designs and configurations for sustainable hydrogen gas production. *Alexandria Engineering Journal*, 55: 427–443.

Ahalya N, Ramachandra T.V, Kanamadi R.D (2003) Biosorption of heavy metals. *Res J Chem Environ* 7: 71-78.

Ainas M, Hasnaoui S, Bouarab R, Abdi N, Drouiche N, Mameri N (2017) Hydrogen production with the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *International Journal of Hydrogen Energy*; 42:4902- 490.

Aksu Z (1998) Biosorption of heavy metals by micro algae in batch and continuous systems. In: WONG, Y-S. and TAM, N.F.Y. eds. *Algae for waste water treatment*. Germany. Springer, p 164-182

An J, Lee H.S (2013) Implication of endogenous decay current and quantification of soluble microbial products (SMP) in microbial electrolysis cells. *Royal Society of Chemistry advances*; 3: 14021–14028.

Ananyev G, Carrieri D, Brown T, Dismukes G.C (2007) *In vivo* bicarbonate requirement for water oxidation by photosystem II in the hypercarbonate-requiring cyanobacterium *Arthrospira maxima*. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 101: 1865-1874.

Ananyev G, Carrieri D, Dismukes G.C (2008) Optimization of metabolic capacity and flux through environmental cues to maximize hydrogen production by the Cyanobacterium “*Arthrospira (Spirulina) maxima*.” *Applied and Environmental Microbiology*, 74, Issue 11-12: 6102–6113.

Aonghusa C.N, Gray N.F (2002) Laundry detergents as a source of heavy metals in Irish domestic wastewater. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 37:1–6.

Aoyama K, Uemura I, Miyake J, Asada Y (1997) Fermentative metabolism to produce hydrogen gas and organic compounds in a cyanobacterium, *Spirulina platensis*. *Journal Of Fermentation And Bioengineering*, 83: 17-20.

Ayodhya D.K (2013) Bioremediation of wastewater by using microalgae: an experimental study, 2: 2250-3137.

Ayse B.Y, Oya I, Selin S (2005) Bioaccumulation and Toxicity of different copper concentrations in *Tetraselmis chuii*. E.U. *Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* , 22(3-4): 297-304.

Références

Avigad Vonshak (1997) *Spirulina Platensis Arthrospira: Physiology, Cell-Biology and biotechnology*. Taylor and Francis. Ltd. ISBN: 0-7484-0674-3.

Avino P, Carconi P.L., Lepore L., Moauro A (2000) Nutritional and environmental properties of algal products used in healthy diet by INAA and ICP-AES. *Journal of Radio-analytical and Nuclear Chemistry*, 244: 247-252.

Azwar M.Y, Hussain M.A, Abdul-Wahab A.K (2014) Development of bio-hydrogen production by photobiologicalm fermentation and electrochemical processes: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 31: 158-173.

Barnes C.S, Alexis N.E, Bernstein J.A, Cohn J.R, Demain J.G, Horner E, et al (2013) Climate change and our environment: the effect on respiratory and allergic disease. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 1: 137–41.

Benkaraache A (2017) Production de l'hydrogène par un procédé d'électrosynthèse microbienne (ESM), Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique, Mémoire de Maîtrise en sciences de l'eau, p 77.

Bennetto H.P, Stirling J.L, Tanaka K, and Vega C.A (1983) Anodic reactions in microbial fuel cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 25(2): 559–568.

Bolatkhan K, Kossalbayev B.D, Zayadan B.K, Tomo T, Veziroglu T.N, and Allakhverdiev S.I (2019) Hydrogen production from phototrophic microorganisms: Reality and perspectives. *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(12): 5799-5811.

Bond D.R, Lovley D.R (2003) Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(3): 1548–1555.

Bothe H, Schmitz O, Yates M.G, William E. Newton (2011) Nitrogenases and Hydrogenases in Cyanobacteria. *Bioenergetic Processes of Cyanobacteria*, Springer Science Business Media B.V: 137-157.

Burgess S.J, Tamburic B, Zemichael F, et al (2011) Solar-Driven Hydrogen Production in Green Algae. *Advances in Applied Microbiology*, 75: 71–110.

Calabrese Barton S, Gallaway J, and Atanassov P (2004) Enzymatic biofuel cells for implantable and microscale devices. *Chemical Reviews*, 104(10): 4867–4886.

Call D, Logan B.E (2008) Hydrogen production in a single chamber microbial electrolysis cell lacking a membrane. *Environmental Science & Technology*, 42(9): 3401–3406.

Références

Call D.F, Logan B.E (2011) A method for high throughput bioelectrochemical research based on small scale microbial electrolysis cells, *Biosens. Bioelectron*, 26: 4526–4531.

Carmona-Martínez A, Trably E, Milferstedt K, Lacroix R, Etcheverry L, Bernet N (2015) Long-term continuous production of H₂ in a microbial electrolysis cell (MEC) treating saline wastewater. *Water Research*, 81:149-156.

Carrera L.G, Escapa A, Mehta P, Santoyo G, Guiot S.R, Morán A, Tartakovsky B (2013) Microbial electrolysis cell scale-up for combined wastewater treatment and hydrogen production. *Bioresource Technology*, 130: 584–591.

Carpenter A, MacGill S (2001) Charging for port reception facilities in North Sea Ports: putting theory into practice. *Mar Pollut Bull*, 42: 257–266.

Castenholz RW, Rippka R, Herdman M, Wilmotte A. Form-genus I (2001) *Arthrospira* Stizenberger. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (D. R. Boone & R.W. Castenholz, eds.); 1: 542-543

Çelekli A, Bozkurt H (2011) Bio-sorption of cadmium and nickel ions using *Spirulina platensis*: Kinetic and equilibrium studies. *Desalination*, 275: 141–147.

Chae K.J, Choi M.J, Lee J, Ajayi F.F, Kim I.S (2008) Biohydrogen production via biocatalyzed electrolysis in acetate-fed bioelectrochemical cells and microbial community analysis. *International Journal of Hydrogen and Energy*, 33: 5184–5192.

Charpy. L, Langlade/ M J et Alliod. R. (2008) La Spiruline peut-elle être un atout pour la santé et le développement en Afrique ? Institut de Recherche pour le Développement.

Chen Hong, PAN Shan-shan (2005) Bioremediation potential of spirulina: toxicity and biosorption studies of lead. *Chen et al. / J Zhejiang Univ SCI*, 6B(3):171-174.

Cheng S, Logan B.E (2007) Sustainable and efficient bio-hydrogen production via electrohydrogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104: 18871-18873.

Cheng S, Logan B. E (2011) High hydrogen production rate of microbial electrolysis cell (MEC) with reduced electrode spacing. *Bioresource Technology*, 102: 3571-3574.

Cobbett C, Goldsbrough P (2002) Phytochelatin and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu Rev Plant Biol*, 53:159–182.

Références

Cardoso L G , Duarte J H , Costa J A V , Assis DJ , Lemos P V F, Druzian J L , De Souza C O , Nunes T L , Chinalia F A (2021) *Spirulina* sp. as a Bioremediation Agent for Aquaculture Wastewater: Production of High Added Value Compounds and Estimation of Theoretical Biodiesel. *Bioenergy Research*; 14: 254–264.

Ciferri O. *Spirulina* (1983) The edible microorganism. *Microbiological Reviews*; 47: 551-578.

Contreras A, Yiğit S, Özay K, Veziroğlu T (1997) Hydrogen as aviation fuel: a comparison with hydrocarbon fuels. *International Hydrogen Energy*, 22: 1053–60.

Cooney M.J, Lau V.S.C, Martin G, and Minteer S.D (2008) Enzyme catalysed biofuel cells. *Energy & Environmental Science*, 1: 320–337.

Danny B.J, Govindjee (1988) The molecular mechanism of the bicarbonate effect at the plastoquinone reductase site of photosynthesis. *Photosynthesis Research*; 19: 85-128.

Davis T, Volesky B, Vieira, R (2000) *Sargassum* seaweed as biosorbent for heavy metals. *Wat Res*, 34:4270-4278

Demirbaş A (2005) Hydrogen and boron as recent alternative motor fuels. *Energy Sources*, 27: 741–748.

Ditzig J, Liu H, Logan B.E (2007) Production of hydrogen from domestic wastewater using a bioelectrochemically assisted microbial reactor (BEAMR). *International Journal of Hydrogen Energy*, 32: 2296 – 2304.

Duteanu N (2008) Pile de combustie directa a metanolului echipate cu electrolit polimer solid. Timisoara, Romania: Editura 'POLITEHNICA'.

Duteanu N.M, Ghangrekar M.M, Erable B, and Scott K (2010) Microbial fuel cells: An option for wastewater treatment. *Environmental Engineering and Management Journal*, 9(8): 1069–1087.

Edgington D.N, Gorden S.A, Thommes M.M et al (1970) The concentration of radium, thorium and uranium by tropical marine algae. *Limnology and Oceanography*, 15(1): 945-955

EG&G Technical Services, I., ed. (2004) Fuel cell handbook, 7th edn. US Department of Energy, Morgantown, West Virginia.

Références

- Fayaz H, Saidur R, Razali N, Anuar F, Saleman A, Islam M (2012) An overview of hydrogen as a vehicle fuel. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 16: 5511–28.
- Fischer M (1986) Review of hydrogen production with photovoltaic electrolysis systems. *International Journal of Hydrogen Energy*, 11(8): 495–501.
- Fox R.D (1999) Spiruline: Technique pratique et promesse. *EDISUD*, Aix-en-Provence, France.
- Gallaway J.W, Calabrese Barton S.A (2008) Kinetics of redox polymer-mediated enzyme electrodes. *Journal of the American Chemical Society*, 130(26): 8527–85.
- Ghangrekar M.M, Shinde V.B (2008) Simultaneous sewage treatment and electricity generation in membrane-less microbial fuel cell. *Water Science and Technology*, 58(1): 37–43.
- Gil G.C, Chang, I.S, Kim, B.H, Kim M, Jang, J.K, Park, H.S, Kim H.J (2003) Operational parameters affecting the performance of a mediator-less microbial fuel cell. *Biosens. Bioelectron.* 18 (4): 327–334.
- Gooding J.J, Mearns F, Yang W.R, and Liu J.Q (2003) Self-assembled monolayers into the 21(st) century: Recent advances and applications. *Electroanalysis*, 15(2): 81–96.
- Guglielmi. G, Rippka. R, Tandeau De Marsac. N (1993) Main properties that justify the different taxonomic position of *Spirulina* sp. and *Arthrospira* sp. among cyanobacteria. In: Doumenge, F., Durand-Chastel, H., Toulemont, A., Eds. *Spiruline* algue de vie. Bulletin de l'Institut Océanographique Monaco. Musée Océanographique. Numéro spécial; 12:13-23.
- Guo K, Tang X, Du Z, Li H (2010) Hydrogen production from acetate in a cathode-on-top single-chamber microbial electrolysis cell with a mipor cathode, *Biochem. Eng. J.* 51: 48–52
- Guo X, Liu J, Xiao B (2013) Bioelectrochemical enhancement of hydrogen and methane production from the anaerobic digestion of sewage sludge in single-chamber membrane-free microbial electrolysis cells, *Int. J. Hydrogen Energy*, 38: 1342–1347.
- Gurz M, Baltacioglu E, Hames Y, Kaya K (2017) The meeting of hydrogen and automotive: A review. *International journal of hydrogen energy*, 42: 23334-23346.
- Hallenbeck P.C (2005) Fundamentals of the Fermentative Production of Hydrogen. *International Water Association*, 52: 21–29.

Références

- Hasnaoui S, Pauss A, Abdi N, Grib H, Mameri N (2020) Enhancement of bio-hydrogen generation by *spirulina* via an electrochemical photo-bioreactor (EPBR). *International Journal of Hydrogen Energy*, 5: 6231-6242.
- Heilmann J, Logan B.E (2006) Production of electricity from proteins using a microbial fuel cell. *Water Environment Research*, 78(5): 531–537.
- Heilmann J, Logan BE (2006) Production of electricity from proteins using a microbial fuel cell. *Water Environment Research*, 78(5): 531–537.
- Heller A (1999) Implanted electrochemical glucose sensors for the management of diabetes. *Annual Review of Biomedical Engineering* 1: 153–175.
- Hu H, Fan Y, Liu H (2008) Hydrogen production using single- chamber membrane-free microbial electrolysis cells, *Water Res.* 42: 4172–4178.
- Hu H, Fan Y, Liu H (2009) Hydrogen production in single-chamber tubular microbial electrolysis cells using non-precious metal catalysts, *Int. J. Hydrogen Energy*, 34: 8535–8542.
- Hug. C, Von der Weid. D (2011) La spiruline dans la lutte contre la malnutrition. *Bilan et perspectives : Fondation Antenna Technologies*.
- Inthorn D (2001) Removal of heavy metal by using microalgae. Edited by Hiroyuki Kojima and Yuan Kun Lee, *Photosynthetic Microorganisms in Environmental Biotechnology*. Springer, Verlag Hong Kong Ltd, 310: 111-169
- Itamar W (2009) Biofuel cells: Harnessing biomass or body fluids for the generation of electrical power. *Fuel Cells*, 9(1): 5.
- Jain I.P (2009) Hydrogen the fuel for 21st century international journal of hydrogen energy, 34: 7368 – 7378.
- Jia Y.H, Choi J.Y, Ryu J.H, Kim C.H, Lee W.K, Tran H.T, Zhang R.H, Ahn D.H (2010) Hydrogen production from wastewater using a microbial electrolysis cell. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 27: 1854–1859.
- Jourdan J.P (2006) Cultivez Votre Spiruline. Manuel de Culture Artisanale de la Spiruline.
- Journal officiel de l'Union européenne. DIRECTIVE 2008/105/CE DU parlement européen et du conseil établissant des normes de qualité environnementale dans le domaine de l'eau. 16 décembre 2008.
- Jung R.K, Dec J, Bruns M.A, and Logan B.E (2008) Removal of odors from swine wastewater by using microbial fuel cells. *Applied and Environmental Microbiology* 74(8): 2540–2543.

Références

- Kadier A, Simayi Y, Abdesahian P, Azman N.F, Chandrasekhar K, Kalil M.S (2016) A comprehensive review of microbial electrolysis cells (MEC) reactor designs and configurations for sustainable hydrogen gas production. *Alexandria Engineering Journal*; 55:427-443.
- Katz E, Lioubashevsky O, and Willner I (2004) Electromechanics of a redox-active rotaxane in a monolayer assembly on an electrode. *Journal of the American Chemical Society* 126(47): 15520–15532.
- Kim H.J, Hyun M.S, Chang I.S, and Kim B.H (1999) A microbial fuel cell type lactate biosensor using a metal-reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 9(3): 365–367.
- Komárek J, Anagnostidis K (2005) Cyanoprokaryota – Part 2: oscillatoriiales. In: Büdel B, Krienitz L, Gärtner G, Schagerl M (eds) *Süßwasserflora von Mitteleuropa* 19/2. Elsevier/Spektrum, Heidelberg, pp 341–353, 759 pp
- Komárek J, Hauer T (2011) CyanoDB.cz – On-line database of cyanobacterial genera. – Word-wide electronic publication, University of South Bohemia & Institute of Botany AS CR. [http:// www.cyanodb.cz](http://www.cyanodb.cz)
- Konur O (2018) *Bioenergy and biofuels*, Taylor & Francis Group, LLC.
- Kobayashi H, Rittman B.E (1982) Microbial removal of hazardous organic compounds. *Environ Sci Technol*,16: 170A183A.
- Kumar G, Zhen G, Sivagurunathan P, Bakonyi P, Nemestóthy N, Bélafi-Bakó K, Kobayashi T. and Xu K.Q (2016) Biogenic H₂ production from mixed microalgae biomass: impact of pH control and methanogenic inhibitor (BESA) addition. *Biofuel Research Journal*, 3(3): 470-474.
- Kyazze G, Popov A, Dinsdale R, Esteves S, Hawkes F, Premier G, Guwy A (2010) Influence of catholyte pH and temperature on hydrogen production from acetate using a two chamber concentric tubular microbial electrolysis cell. *International Journal of Hydrogen Energy*; 35, Issue 15: 7716-7722.
- Laul JC (1992) Natural radionuclides in ground water. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. 156(1): 235-241
- Levy J.L, Stauber J.L, Adams M, Maher W, Kirby J.K, Jolly D.F (2005) Toxicity, biotransformation, and mode of action of arsenic in two freshwater microalgae (*Chlorella* sp. and *Monoraphidium arcuatum*). *Environ Toxicol Chem*, 24:2630–2639.

Références

- Liu H, Grot S, Logan B.E (2005) Electrochemically Assisted Microbial Production of Hydrogen from Acetate. *Environmental Science and Technology*, 39: 4317–4320.
- Liu L.J, Chen Z.C, Yang S.N, et al (2008) A novel inhibition biosensor constructed by layer-by-layer technique based on biospecific affinity for the determination of sulfide. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 129(1): 218–224.
- Liu B.F, Ren N.Q, Tang J, Ding J, Liu W.Z, Xu J.F et al (2010) Biohydrogen production by mixed culture of photo- and dark fermentation bacteria. *Int J Hydrogen Energy*, 35: 2858-2862.
- Liu Y, Dong S.J (2007) A biofuel cell harvesting energy from glucose-air and fruit juice-air. *Biosensors & Bioelectronics*, 23: 593–597.
- Logan B.E (2008) *Microbial Fuel Cells*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ: 125–144.
- Logan B.E, Grot S, Mallouk T.E, Liu H (2010) Bio-electrochemically assisted microbial reactor that generates hydrogen gas and methods of generating hydrogen gas. *United States Patent*, (7)709,113, B2.
- Logan B.E, Call D, Cheng S, et al. (2008) Microbial electrolysis cells for high yield hydrogen gas production from organic matter. *Environmental Science and Technology* 42(23): 8630–8640.
- Logan B.E, Murano C, Scott K, et al (2005) Electricity generation from cysteine in a microbial fuel cell. *Water Research* 39(5): 942–952.
- Logan B.E, Regan J.M (2006) Electricity-producing bacterial communities in microbial fuel cells. *Trends in Microbiology* 14(12): 512–518.
- Lu N, Zhou S.G, Zhuang L, et al (2009) Electricity generation from starch processing wastewater using microbial fuel cell technology. *Biochemical Engineering Journal* 43(3): 246–251.
- Luo Q, Wang H, Zhang X, Qian Y (2005) Effect of direct electric current on the cell surface properties of phenol-degrading bacteria. *Applied Environmental Microbiology*; 71: 423–427.
- MA. 315 – DCO 1.0 (2004) Méthode d'analyse Détermination de la demande chimique en oxygène dans les effluents : méthode de reflux en système fermé suivi d'un dosage par colorimétrie avec le bichromate de potassium. Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec.

Références

Mani D, Kumar C (2014) Biotechnological advances in bioremediation of heavy metals contaminated ecosystems: an overview with special reference to phytoremediation. *Int J Environ Sci Technol*, 11:843–872.

McKinlay J.B, Zeikus J.G (2004) Extracellular iron reduction is mediated in part by neutral red and hydrogenase in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 70(6): 3467–3474.

McNeely K, Xu Y, Bennette N, Bryant D.A, Dismukes G.C (2010) Redirecting reductant flux into hydrogen production *via* metabolic engineering of fermentative carbon metabolism in a cyanobacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 76: 5032–5038 .

Megharaja M, Ragusa S.R, Naidu R (2003) Metal–algae interactions: implication of bioavailability, Toxicity and Risk Relationships in Ecosystems, Science Publishers, Enfield, New Hampshire, 109–144.

Mertens R, Liese A (2004) Biotechnological applications of hydrogenases. *Current Opinion in Biotechnology*, 15(4): 343–348.

Min B, Logan B.E (2004) Continuous electricity generation from domestic wastewater and organic substrates in a flat plate microbial fuel cell. *Environmental Science and Technology* 38(21): 5809–5814.

Moehlenbrock M.J, Minteer S.D (2008) Extended lifetime biofuel cells. *Chemical Society Reviews* 37: 1188–1196.

Munoz L.D, Erable B, Etcheverry L, Riess J, Basséguy R, Bergel A (2010) Combining phosphate species and stainless steel cathode to enhance hydrogen evolution in microbial electrolysis cell (MEC). *Electrochemistry Communications*, 12: 183–186.

Nacorda J.O, Martinez-Goss M.R, Torreta N.K, Merca F.E (2007) Metal resistance and removal by two strains of the green alga, *Chlorella vulgaris* Beijerinck, Isolated from Laguna de Bay, Philippines. *J Appl Phycol* 19: 701–710.

Nishizawa K, Konno T, Takai M, and Ishihara K (2008) Bioconjugated phospholipid polymer biointerface for enzyme-linked immunosorbent assay. *Biomacromolecules* 9(1): 403–407

NIST chemistry webbook, in: US Secretary of Commerce, 2005, page 69.

Oh S, Logan B.E (2005) Hydrogen and electricity production from a food processing wastewater using fermentation and microbial fuel cell technologies. *Water Research*, 39(19): 4673–4682.

Références

- Pengfu L, Zhili L, Ren X (2001) Chemical characterisation of the released polysaccharide from the cyanobacterium *Aphanothece halophytica* GR02, *J Appl Phycol*, 13: 71 – 77.
- Pergent C, Pergent-Martini C (1999) Mercury levels and fluxes in *Podosonia oceanica* meadows. *Environ Pollut*, 106: 33–7.
- Petrovic M, Gonzalez S, Barcelo D (2003) Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. *Trends Anal Chem*, 22: 685–696.
- Potter MC (1911) Electrical effects accompanying the decomposition of organic compounds. *Proceedings of the Royal Society of London (Series B, Containing Papers of a Biological Character*. 84(571): 260–276.
- Priyadarshani I, Sahu D, Rath B (2011) Microalgal bioremediation : Current practices and perspectives. *J Biochem Tech*. 3(3): 299-304
- Rabaey, K., & Verstraete, W. (2005) Microbial fuel cells: novel biotechnology for energy generation. *Trends in biotechnol*, 23(6): 291–8.
- Rakotoarisoa. R, Riva. A, Vicente. N (2011) Experimental Culture of *Arthrospira (Spirulina) platensis* - Nordsted, 1844. Springer Science Business Media B.V; Part 1, 35-36.
- Ramanavicius A, Kausaite A, and Ramanaviciene A (2005) Biofuel cell based on direct bioelectrocatalysis. *Biosensors & Bioelectronics*, 20(10): 1962–1967.
- Reguera G, Mccarthy KD, Mehta T, et al (2005) Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature*, 435(7045): 1098–1101.
- Ren N.Q, Liu B.F, Zheng G.X, Xing D.F, Zhao X, Guo W.Q, Ding J (2009) Strategy for enhancing photo-hydrogen production yield by repeated fed-batch cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34: 7579-7584.
- René A. Rozendal, Hubertus V.M. Hamelers, Redmar J. Molenkamp, Cees J.N. Buisman (2007) Performance of single chamber biocatalyzed electrolysis with different types of ion exchange membranes. *Water Research*, 41:1984 – 1994.
- Renuka N, Sood A, Prasanna R, Ahluwalia AS (2014) Influence of seasonal variation in water quality on the microalgal diversity of sewage wastewater. *S Afr J Bot* , 90:137–145.
- Richards RG, Mullins BJ (2013) Using microalgae for combined lipid production and heavy metal removal from leachate. *Ecol Model*, 249: 59–67.
- Rigla M, Hernando ME, Gomez EJ, et al. (2008) Real-time continuous glucose monitoring together with telemedical assistance improves glycemic control and

Références

glucose stability in pump-treated patients. *Diabetes Technology & Therapeutics* 10(3): 194–199.

Rismani-Yazdi H, Christy AD, Dehority BA, et al. (2007) Electricity generation from cellulose by rumen microorganisms in microbial fuel cells. *Biotechnology and Bioengineering* 97(6): 1398–1407.

Rozendal R A, Hamelers H V M, Euverink, Metz S J, Buisman C J N (2006) Principle and perspectives of hydrogen production through biocatalyzed electrolysis. *The International Journal of Hydrogen Energy*, 31: 1632–1640.

Rodrigo M.A, Cañizares P, Lobato J, et al (2007) Production of electricity from the treatment of urban waste water using a microbial fuel cell. *Journal of Power Sources* 169(1): 198–204.

Rozendal R.A, Hamelers H.V.M, Euverink G.J.W, Metz S.J, Buisman C.J.N (2006) Principle and perspectives of hydrogen production through biocatalyzed electrolysis, *Int. J. Hydrogen Energy*, 31:1632–1640.

Rozendal R.A., Hamelers H.V.M., Molenkamp R.J., Buisman C.J.N. (2007) Performance of single chamber biocatalyzed electrolysis with different types of ion exchange membranes, *Water Res*, 41:1984–1994.

Rozendal R.A, Jeremiasse A.W, Hamelers H.V.M. (2008) Effect of the type of ion exchange membrane on performance ion transport and pH in biocatalyzed electrolysis of wastewater, *Water Sci. Technol*, 57: 1757–1762.

Rozendal R.A, Hamelers H.V.M, Rabaey K, Keller J, Buisman C.J.N (2008) Towards practical implementation of bioelectrochemical wastewater treatment. *Trends in Biotechnology*, 26: 450-459.

Rusling J, Ito K (1991) Voltammetric determination of electron-transfer rate between an enzyme and a mediator. *Analytica Chimica Acta*, 252(1–2): 23–27.

Schröder, U. (2007). Anodic electron transfer mechanisms in microbial fuel cells and their energy efficiency. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 9(21): 2619-2629.

Scott K, Murano C (2007) A study of a microbial fuel cell battery using manure sludge waste. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 82(9): 809–817.

Scott K, Yu E.H, Ghangrekar M.M, Erable B, Duțeanu N.M (2012) Biological and microbial fuel cells. In: *Comprehensive Renewable Energy. Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences*; 4: 277-300.

Références

Scott, Keith and Yu, Eileen Hao and Ghangrekar, Makarand Madhao and Erable, Benjamin and Duțeanu, Narcis Mihai. (2012) Biological and microbial fuel cells. In: *Comprehensive Renewable Energy*. Elsevier, United States, pages: 277-300. ISBN 978-0-08-087872-0.

Selembo A.P, Mathew D.M, Logan B.E (2009) The use of stainless steel and nickel alloys as low-cost cathodes in microbial electrolysis cells. *Journal of Power Sources*; 190: 271–278.

Sili. C, Torzillo. G, Vonshak. A (2012) *Arthrospira (Spirulina)*. B.A. Whitton (ed.), *Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time*, Springer Science+Business Media B.V.

Sivagurunathan, P, Kumar G, Kobayashi T, Xu K, Kim S.H, Nguyen D.D and Chang, S.W (2018) Co-digestion of untreated macro and microalgal biomass for biohydrogen production: Impact of inoculum augmentation and microbial insights. *International Journal of Hydrogen Energy*, 43(25):11484-11492.

Solomon KR (1996) Ecological risk assessment of atrazine in North America surface waters. *Environ Toxicol Chem* 15: 31–76.

Suwansa-Ard S, Kanatharana P, Asawatreratanakul P, et al. (2005) Semi disposable reactor biosensors for detecting carbamate pesticides in water. *Biosensors & Bioelectronics* 21(3): 445–454.

Takagi M, Karseno Yoshida T (2006) Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells. *J Biosci Bioeng* 101: 223–226.

Tamagnini P (2007) Cyanobacterial hydrogenases. Diversity, regulation and application. *Federation of European Microbiological Societies*; 31: 692–720.

Tanisho S, Kamiya N, and Wakao N (1989) Microbial fuel cell using *Enterobacter aerogenes*. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 21(1): 25–32.

Tartakovsky B, Manuel M.F, Wang H, and Guiot S.R (2009) High rate membrane-less microbial electrolysis cell for continuous hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy* 34(2): 672–677.

The bioeconomy at work: Sony develops most efficient biofuel cell ever, powered by sugar (2007) Available from:
<http://news.mongabay.com/bioenergy/2007/08/bioeconomy-at-work-sony-develops-most.html>.

Références

- Thiel T (1988) Phosphate transport and arsenate resistance in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *J Bacteriol* 170:1143–1147.
- ung R.K, Dec J, Bruns M.A, and Logan BE (2008) Removal of odors from swine wastewater by using microbial fuel cells. *Applied and Environmental Microbiology* 74(8): 2540–2543.
- Tribot S (2013) Piles à combustible : c'est pour aujourd'hui ou pour demain? *Techniques de l'ingénieur*.
- USA (2004) Microbial fuel cell research continues. *Chemical Engineer* 762–763: 11.
- Van Rensen J.J (2002) Role of bicarbonate at the acceptor side of photosystem II. *Photosynthesis Research*; 73: 185-192.
- Venkata Mohan S, Mohanakrishna G, Reddy B.P, et al (2008) Bioelectricity generation from chemical wastewater treatment in mediatorless (anode) microbial fuel cell (MFC) using selectively enriched hydrogen producing mixed culture under acidophilic microenvironment. *Biochemical Engineering Journal* 39(1): 121–130.
- Venkata Mohan S, Mohanakrishna G, Srikanth S, and Sarma P.N (2008) Harnessing of bioelectricity in microbial fuel cell (MFC) employing aerated cathode through anaerobic treatment of chemical wastewater using selectively enriched hydrogen producing mixed consortia. *Fuel* 87(12): 2667–2676.
- Vincenzini, M., SILI, C., Philippis, R., Ena, A., and Materassi, R. (1990) Occurrence of poly- β -hydroxybutyrate in *Spirulina* species. *J. Bacteriol*; 172:2791-2792.
- vonshak, A. Tomaselli, L. (2000) *Arthrospira (Spirulina): Systematics and ecophysiology*. In: Whitton, A., Potts, M., Eds. *The Ecology of Cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands; pp. 505-522.
- Wake H (2005) Oil refineries: a review of their ecological impacts on the aquatic environment. *Estuar Coast Shelf Sci*, 62:131– 140.
- Wang L, Li Y, Chen P, Min M, Chen Y, Zhu J, Ruan RR (2010) Anaerobic digested dairy manure as a nutrient supplement for cultivation of oil-rich green microalgae *Chlorella* sp. *Bioresour Technol* 101:2623–2628.
- Wan L.L, Li X J, Zang G L, Wang X, Zhang Y.Y, Zhou Q.X (2015) A solar-assisted microbial electrolysis cell for hydrogen production driven by a microbial fuel cell. *Royal Society of Chemistry Advances*, 5: 82276-82281.

Références

Wang X, Feng Y.J, and Lee H (2008) Electricity production from beer brewery wastewater using single chamber microbial fuel cell. *Water Science and Technology*, 57(7): 1117–1121.

Walker J.D, Colwell R.R, Petrakis L (1975) Degradation of petroleum by an alga, *Prototheca zopfii*. *Appl Micro-biol*, 30: 79-81

Woodward J, Mattingly SM, Danson M, et al. (1996) In vitro hydrogen production by glucose dehydrogenase and hydrogenase. *Nature Biotechnology*, 14(7): 872–874.

Yahiro A.T, Lee S.M, and Kimble D.O (1964) Bioelectrochemistry I: Enzyme utilizing bio-fuel cell studies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Specialized Section on Biophysical Subjects*, 88(2): 375–383.

Yang J.S, Liu C, Wang G.Y, Zhao X.Y, Li B.Z, Yuan H.L (2010) The effect of low direct current on *Pseudomonas aeruginosa* PKE117's enzyme production and degradable ability. *Biotechnology bulletin*, 6: 185–188.

You S.J, Zhao Q.L, Jiang J.Q, and Zhang J.N (2006) Treatment of domestic wastewater with simultaneous electricity generation in microbial fuel cell under continuous operation. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 20(4): 407–412.

You S.J, Zhao Q.L, Jiang J.Q, et al. (2006) Sustainable approach for leachate treatment: Electricity generation in microbial fuel cell. *Journal of Environmental Science and Health – Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 41(12): 2721–2734.

Yu J, Takahashi P (2007) Biophotolysis-based hydrogen production by cyanobacteria and green Microalgae. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology A*. Méndez-Vilas Edition, pages: 79-89.

Zarrouk C (1966) Contribution à l'étude d'une cyanophycée: influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima*, Thèse de doctorat, Faculté des Sciences de l'Université de Paris.

Zagrodnik R, Laniecki M (2017) The effect of pH on cooperation between dark-and photo-fermentative bacteria in a coculture process for hydrogen production from starch. *Int J Hydrogen Energy*, 42: 2878-2888


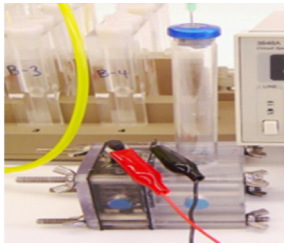
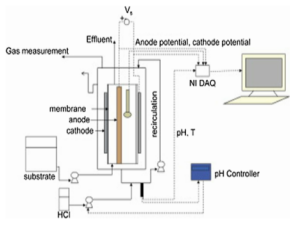
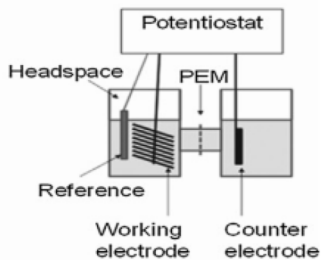
Zeng K, Zhang D (2010) Recent progress in alkaline water electrolysis for hydrogen production and applications. *Progress in Energy and Combustion Science*; 36: 307–26.




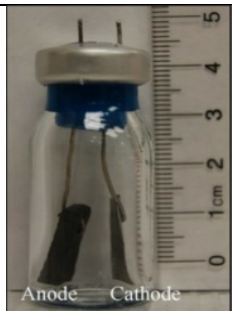
Références

- Zhang T, Cui C, Chen S, et al. (2008) The direct electrocatalysis of *Escherichia coli* through electroactivated excretion in microbial fuel cell. *Electrochemistry Communications* 10(2): 293–297.
- Zhang X.R, Yamaguchi H, and Cao Y (2010) Hydrogen production from solar energy powered supercritical cycle using carbon dioxide. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(10): 4925–4932.
- Zhao F, Harnisch F, Schroder U, Scholz F, Bogdanoff P, Herrmann I (2006) Challenges and constraints of using oxygen cathodes in microbial fuel cells. *Environ. Sci. Technol*, 40 (17), 5193–5199.
- Zhu Z, Wang M, Gautam A, et al (2007) Directed evolution of glucose oxidase from *Aspergillus niger* for ferrocenemethanol-mediated electron transfer. *Biotechnology Journal*, 2(2): 241–248.
- Zhu Z.W, Momeu C, Zakhartsev M, and Schwaneberg U (2006) Making glucose oxidase fit for biofuel cell applications by directed protein evolution. *Biosensors & Bioelectronics*, 21(11): 2046–2051.
- Zikmund E, YeolKim K, Logan B.E (2018) Hydrogen production rates with closely spaced felt anodes and cathodes compared to brush anodes in two-chamber microbial electrolysis cells. *International Journal of Hydrogen Energy*, 43: 9599-9606.

Annexes

ANNEXE 01. Tableau illustratif de quelques configurations innovantes des MECs.

Dénomination selon les auteurs	Description	Voltage appliqué	Dispositif expérimental
MECs bi-compartmentés	<p>Le premier bioréacteur électrochimiquement assisté (Liu et al. 2005)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Capacité : 2×0.31L • Membrane échangeuse de protons. • L'anode et la cathode sont en carbone • la cathode contient 0.5 mg Pt/cm² 	≥ 0.25 V	
	<p>Nouvelle MEC à haute performance (Cheng et Logan, 2007)</p> <ul style="list-style-type: none"> • capacité : anode : 14 mL, cathode : 28 mL. • Membrane échangeuse d'anions. • Compartiment anodique remplis de granule de graphite afin d'augmenter la surface d'échange • la cathode est constituée de carbone et contient 0.5 mg Pt/cm² 	0.2-0.8 V	
	<p>MEC tubulaire concentrique Kyazze et al, 2010)</p> <ul style="list-style-type: none"> • La chambre anodique étant le tube le plus petit ; qui est radialement perforée sur un de ses cotés • L'ensemble des électrodes sont enroulées plusieurs fois autour d'une tige en plastique • La chambre anodique enveloppée par La membrane échangeuse de cations ; est introduite à l'intérieur d'un autre tube plus large qui constitue la chambre cathodique. 	0.85 V	
	<p>MEC avec une anode de grande surface. J. An & H.S. Lee, 2013.</p> <ul style="list-style-type: none"> • La chambre anodique est conçue de grande surface afin d'étudier l'effet du courant sur la quantité des produits microbiens solubles. • La distance entre l'anode la membrane échangeuse d'anions et la cathode, est très faible. 	0–1.2 V	

MECs mono-compartmentés	<p>MEC avec une anode en peigne et une cathode plate. (Call et Logan, 2008)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • La chambre unique est un cylindre (37.70 cm²) en polycarbonate. • L'anode est en graphite traité par l'ammoniac • La cathode est recouverte par carbone résistant à l'eau et contient 0.5 mg de Pt /cm². • La collecte de H₂ produit s'effectue à l'aide d'un tube collecteur cylindrique de 1,6 cm de diamètre placé verticalement au-dessus de la chambre du réacteur. 	0.8V	
	<p>MEC type bouteille Hu H et <i>al.</i>, 2008.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Une bouteille de sérum en Borosilicate (0.1 L). • La surface de l'anode: et de la cathode : 9 cm². • L'anode est faite d'un revêtement en carbone type A. • La cathode est faite d'un revêtement en carbone type contenant un catalyseur en Pt de 0.5 mg/cm. 	0.6 V	
	<p>MEC pour la digestion anaérobie des boues d'épuration (Guo X et <i>al.</i>, 2013)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • La chambre unique est fabrique en Plexiglass, avec un total volume de 0.3 L. • L'anode et la cathode (4.0 x 5.0 x 0.2 cm) sont fait en plaques de maille avec un alliage Ti / Ru. 	1,4-1,8 V	
	<p>MEC de la plus petite échelle (Call D.F et <i>al.</i>, 2011)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Ce système se compose d'une série de petits flacons de sérum transparents (0.005 L). • Les anodes sont des plaques de graphite isomoulées (0.32 cm x1.5 cm x1 cm). 	0.7 V	

ANNEXE 02. Composition chimique du milieu Zarrouk modifié (L-N).

Composés	Teneur (g. L ⁻¹)
NaHCO₃	16.8
K₂HPO₄	0.50
NaNO₃	0.005
K₂SO₄	1.00
NaCl	1.00
MgSO₄. 7 H₂O	0.20
CaCl₂	0.04
FeSO₄. 7 H₂O	0.01
EDTA	0.08
A5	1*
B6	1*

* 1 mL

Oligo-éléments		Teneur (g. L ⁻¹)
solution A₅	H ₃ BO ₄	2.86
	MnCl ₂ . 4 H ₂ O	1.80
	ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	0.22
	CuSO ₄ . 7 H ₂ O	0.08
	MoO ₃	0.01
solution B₆	K ₂ Cr(SO ₄). 24H ₂ O	0.096
	NiSO ₄ . 7H ₂ O	0.0477
	Ti(SO ₄) ₃	0.0400
	NH ₄ VO ₃	0.0229
	Na ₂ WO ₄	0.0179
	Co(NO ₃) ₂ . 6H ₂ O	44

ANNEXE 03. Dosage de DCO soluble par colorimétrie avec le bichromate de potassium (MA. 315 – DCO 1.0, Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec)

Principe

Le principe étant le suivant, La dégradation des matières organiques (d'hydrates de carbone, de matières protéiques, d'acides aminés, de lipides et autres substances de réserves) déversées dans les cours d'eau entraîne une consommation de l'oxygène dissout dans l'eau, la DCO correspond donc à la fraction qui a été consommée et elle s'exprime en mg par Litre d'oxygène.

Solution de digestion pour la méthode à haut niveau

- Dissoudre 10,2 g de $K_2Cr_2O_7$, préalablement séché à 105 °C pendant 2 heures, dans environ 500 ml d'eau.
- Ajouter doucement 167 ml de H_2SO_4 et 33,3 g de $HgSO_4$. Agiter jusqu'à dissolution complète, laisser refroidir et compléter à 1 000 ml avec de l'eau.

Réactif acide

- Verser 23,4 g de Ag_2SO_4 dans une bouteille de 4,25 kg de H_2SO_4 (2,5 l)
- Laisser reposer 1 à 2 jours afin que le Ag_2SO_4 soit complètement dissous.
- La solution peut également être préparée dans une quantité moindre d'acide sulfurique. Cependant, la quantité de Ag_2SO_4 .
- Ajoutée doit représenter 5,5 g de Ag_2SO_4 par kg d'acide sulfurique. La solution doit être conservée à l'obscurité.

Solution d'acide sulfurique 9 N

- Diluer 250 ml de H_2SO_4 dans environ 600 ml d'eau.
- Laisser refroidir et compléter à 1 000 ml avec de l'eau.

Solution étalon de 10 000 mg/LO₂

- Sécher le biphthalate de potassium au four à 120 °C pendant 2 heures et laisser refroidir au dessiccateur.
- Dissoudre 2,125 g de biphthalate de potassium dans environ 200 ml d'eau et compléter à 250 ml avec de l'eau. Cette solution se conserve 2 ans à environ 4 °C.

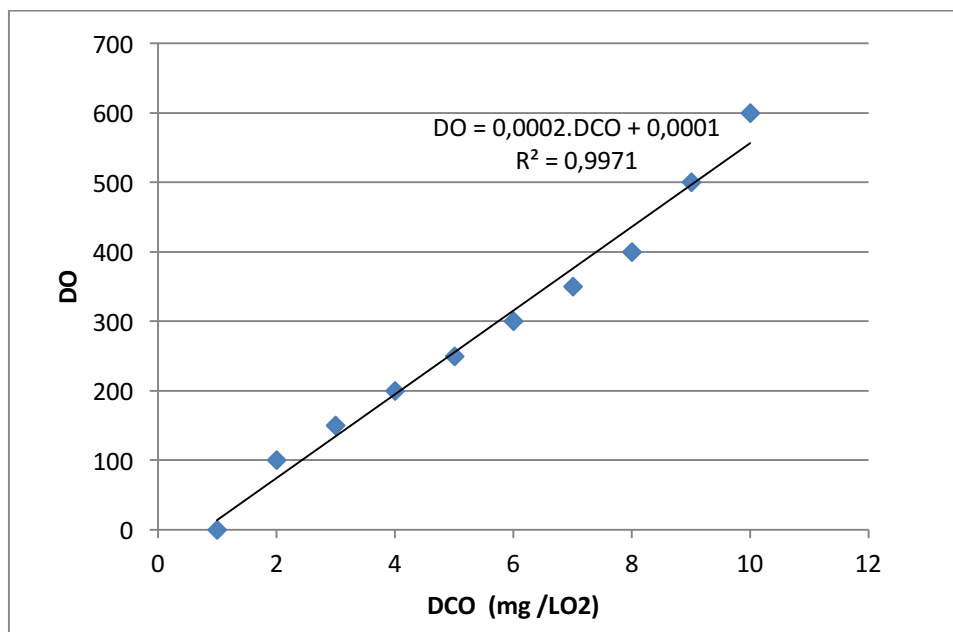
Protocole d'analyse

- Prélevez 2,5 ml de l'échantillon aqueux dans un tube à essais.
- Ajouter lentement 1,5 ml de la solution de digestion à l'aide d'une burette automatique.
- Ajouter lentement 3,5 ml du réactif acide, par la suite visser fermement le bouchon du tube et mélanger à l'agitateur. Étant une réaction exothermique, lors du mélange une chaleur dégagée est très grande.
- Porter à reflux dans un bloc chauffant à une température de 150 °C pendant une période de 2 heures.
- Laisser refroidir à la température ambiante.

- Lire les valeurs de la densité optique à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.
- Réaliser un essai à blanc en remplaçant l'échantillon par 2,5 ml d'eau distillée.
- **Solutions étalons pour la méthode à haut niveau** : Préparer une série de solutions étalons aux concentrations suivantes :

solution	DCO (mg /L O2)
1	0
2	100
3	150
4	200
5	250
6	300
7	350
8	400
9	500
10	600

La représentation graphique des valeurs de la DCO en fonction des densités optiques correspondante donne Courbe d'étalonnage suivante :



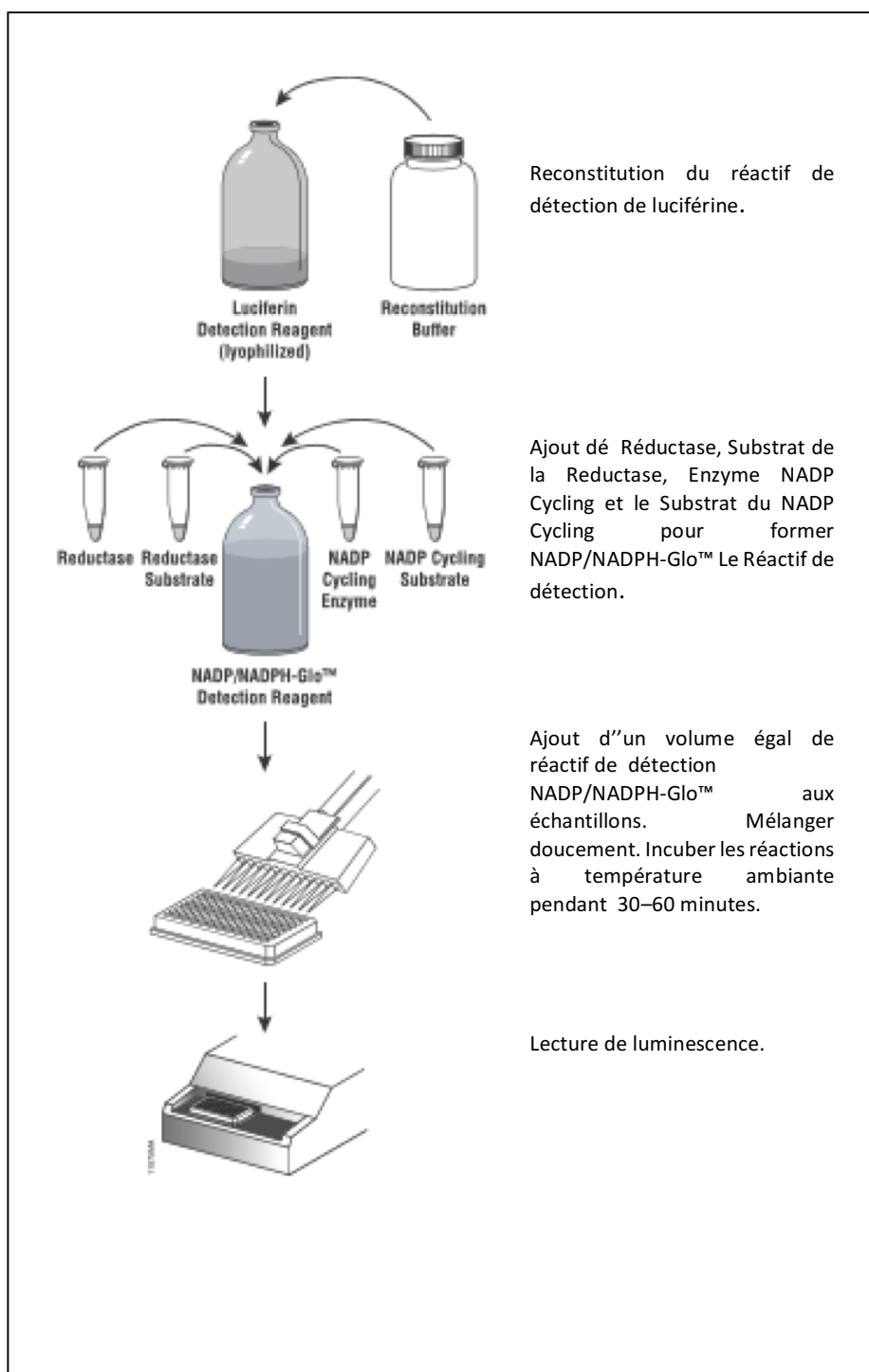
ANNEXE 04. Caractérisation complète des eaux du Lac de Réghaia.

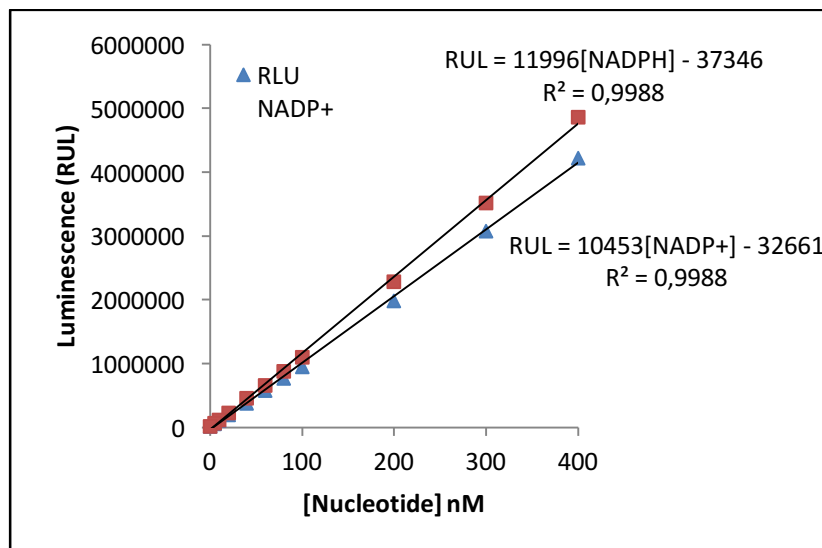
Paramètres	Résultats	Unité	Limites réglementaires*
Bactériologie			
Recherche et dénombrement des bactéries coliformes.	>200	NPP/100 mL	<20
Recherche et dénombrement des entérocoques intestinaux.	>200	NPP/100 mL	0
Paramètres physico-chimiques			
Détermination de la turbidité.	1.4	NTU	5
Détermination du pH.	7.52	-	6.5 ≥ ≤9
Détermination de la température.	20	°C	25
Détermination de la conductivité électrique.	1573	µs/cm	2800
Chimie des eaux			
Azote total	<2	mg/L	12
Orthophosphates	<0.04	mg/L	1
Chlorures	261	mg/L	<150
Sulfates	140	mg/L	<120
Alluminium (Al)	0.13	mg/L	0.2
Antimoine (Sb)	<0.02	µg/L	10
Argent (Ag)	<0.01	µg/L	50
Arsenic (As)	<0.005	µg/L	50
Baryum (Ba)	0,044	µg/L	120
Béryllium (Be)	<0.002	mg/L	0.5
Bismuth (Bi)	<0.05	µg/L	0.3
Bore (B)	0,14	mg/L	1
Cadmium (Cd)	<0.005	µg/L	<5
Calcium (Ca)	73,5	mg/L	270
Chrome (Cr)	<0.005	µg/L	<50
Cobalt (Co)	<0.005	µg/L	1
Cuivre (Cu)	0,01	µg/L	50
Fer (Fe)	0,29	mg/L	0.2
Lithium (Li)	0,016	mg/L	0.25
Magnésium (Mg)	30,5	mg/L	50

Manganèse (Mn)	0,165	µg/L	50
Molybdène (Mo)	<0.005	µg/L	10
Nickel (Ni)	<0.005	µg/L	20
Phosphore (P)	0,399	µg/L	-
Plomb (Pb)	<0.005	µg/L	7.2
Potassium (K)	18,1	mg/L	-
Sélénium (Se)	<0.01	mg/L	-
Silicium (Si)	5,54	mg/L	-
Sodium (Na)	129	mg/L	-
Soufre (S)	38,1	mg/L	-
Strontium (Sr)	1,01	mg/L	1.5
Thallium (Tl)	<0.02	mg/L	-
Titane (Ti)	<0.005	mg/L	-
Tungstène (W)	<0.05	mg/L	-
Zirconium (Zr)	<0.02	mg/L	-
Zinc (Zn)	<0.02	µg/L	20
Paramètres de pollution			
Détermination de la Demande Biochimique en Oxygène (DBO).	36	mg/LO ₂	<6
Détermination de la Demande Chimique en oxygène (DCO).	152	mg/LO ₂	<30
Indices hydrocarbures	0.14	mg/L	1

- Selon Journal officiel de l'Union européenne

ANNEXE 05. Diagramme Schématique du protocole de l'essai NADP/NADPH-Glo™.





Courbe d'étalonnage des équivalents réducteurs NADP/NADPH.

Annexe 06. Composition de *Spirulina platensis* en éléments minéraux et éléments traces (Avino P et al, 2000)

Elément	Quantité (mg/kg biomasse sèche)
Cr	11,3 à 14,2
Fe	900 à 1176
Mn	554 à 592
Zn	21 à 375
K	9000
Ca	4320
Mg	670 à 2700
Na	4500 à 235000
P	6700 à 9000
Cl	4890
As	0,002
Br	17,9
Co	0,720
Cr	14,2
Cs	0,021
Cu	37,5
Eu	0,023
Hg	0,120
La	0,514
Mn	27,88 à 554
Pb	12,9
Sb	0,064
Sc	0,075
Se	0,198
Zn	21 à 375