

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE  
LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE MENTOURI CONSTANTINE  
FACULTE DES SCIENCES EXACTES  
DEPARTEMENT DE CHIMIE

*N° d'ordre* : .....  
*Série* : .....

**MEMOIRE**

Présenté pour obtenir le diplôme de

**Magister**  
**En Chimie Analytique, Physique et Environnement**

**OPTION**  
**Chimie de l'environnement**

---

---

**ETUDE DE LA REACTION DE DENITRIFICATION  
PAR L'UTILISATION DU SUCCINATE DE SODIUM  
COMME SOURCE DE CARBONE**

---

---

PAR  
**M<sup>elle</sup> MAMMERI Lamia**

**SOUTENU LE 28 FEVRIER 2007**

**Devant le Jury :**

<b>Président :</b>	A. HAOUAM	Professeur	Université de Constantine
<b>Rapporteur :</b>	B. KEBABI	Professeur	Université de Constantine
<b>Examineur :</b>	K. BELMOKRE	Professeur	Université de Skikda
<b>Examineur :</b>	C. MOUATS	Professeur	Université de Constantine



## *DEDICACES*

*A mes parents*

*A tous les membres de ma famille, à  
mes frères*

*A tous mes professeurs*

*A tous mes collègues*

*Et amis*

*A ceux qui me sont chers*

*Avec tout mon amour je leur dédie  
ce modeste travail*



## **REMERCIEMENTS**

*Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire pollution et traitement des eaux de l'université Mentouri de Constantine sous la direction de Monsieur le professeur B. Kebabi. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance pour la confiance qu'il m'a accordée en m'accueillant dans son équipe et pour toutes les connaissances que j'ai acquises à ses côtés.*

*Je remercie vivement Monsieur A. Haouam, professeur à l'université Mentouri de Constantine, qui me fait l'honneur de présider le jury de ce mémoire.*

*Qu'il me soit permis d'adresser mes remerciements à Monsieur C. Mouats, professeur à l'université Mentouri de Constantine, qui a aimablement accepté de siéger à ce jury.*

*Je remercie également Monsieur K. Belmokre, professeur à l'université de Skikda, qui a bien voulu se déplacer pour juger ce travail.*

*Ce travail n'aurait pu avancer sans l'aide précieuse de Monsieur Derbel, Monsieur Mouats et Monsieur Mennour qu'ils trouvent ici le témoignage de ma profonde reconnaissance et ma sincère gratitude.*

*Je ne peux oublier toutes les personnes avec qui j'ai partagé de merveilleux moments en dehors de ce mémoire et avec lesquelles j'ai noué une forte amitié. Il m'est impossible de les nommer tous, mais ils se reconnaîtront bien là. Je leur dis un grand merci pour les moments passés ensemble, ainsi que pour leur soutien durant les moments difficiles.*

*Grand merci enfin à toute ma famille, à mes parents pour tout ce qu'ils ont fait pour moi et l'éducation que j'ai reçue de leur part, je leur dédie ce mémoire.*

**TABLE DES MATIERES**

<b>INTRODUCTION GENERALE.....</b>	<b>1</b>
 <b>CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
<b>I. Introduction.....</b>	<b>3</b>
<b>II. Cycle de l'azote .....</b>	<b>5</b>
<b>II.1. La fixation .....</b>	<b>5</b>
<b>II.2. L'assimilation.....</b>	<b>5</b>
<b>II.3. L'ammonification .....</b>	<b>5</b>
<b>II.4. La nitrification.....</b>	<b>6</b>
<b>II.5. La réduction assimilatrice .....</b>	<b>6</b>
<b>II.6. La dénitrification.....</b>	<b>6</b>
<b>III. Nitrates .....</b>	<b>6</b>
<b>III.1. Sources .....</b>	<b>6</b>
<b>III.2. Origine des nitrates dans les eaux .....</b>	<b>7</b>
<b>III.3. Mécanismes de pollution de l'eau.....</b>	<b>8</b>
<b>III.4. Les effets des nitrates.....</b>	<b>9</b>
<b>III.4.1. Effet sur l'organisme .....</b>	<b>9</b>
<b>III.4.1.1. La méthémoglobinémie .....</b>	<b>9</b>
<b>III.4.1.2. Autres effets.....</b>	<b>10</b>
<b>III.4.2. Effet sur l'environnement .....</b>	<b>11</b>
<b>III.4.2.1. Eutrophisation.....</b>	<b>11</b>
<b>III.4.2.2. Marées vertes.....</b>	<b>12</b>
<b>III.5. Procédés d'élimination des nitrates.....</b>	<b>14</b>

III.5.1. Traitements physico-chimiques .....	14
III.5.1.1. la dénitratation .....	14
III.5.1.2. L'osmose et l'électrodialyse .....	15
III.5.2. Traitements biologiques .....	15
III.5.3. Les avantages et les inconvénients des procédés d'élimination des nitrates .....	16
III.5.4. Choix du traitement.....	18
<b>IV. Dynamique des populations bactériennes en batch .....</b>	<b>18</b>
<b>IV.1. Rôle de la population microbienne .....</b>	<b>18</b>
<b>IV.2. Evolution de la matière organique en présence d'une masse bactérienne.....</b>	<b>18</b>
IV.2.1. Taux de croissance bactérien .....	19
IV.2.2. Taux d'utilisation du substrat.....	20
IV.2.3. Les différents modèles cinétiques .....	21
IV.2.4. Effet de la phase endogène .....	22
<b>IV.3. Croissance bactérienne .....</b>	<b>23</b>
<b>IV.4. Conditions de croissance .....</b>	<b>23</b>
IV.4.1. Facteurs physiques .....	24
IV.4.2. Facteurs chimiques .....	27
<b>IV.5. Conditions favorables à la croissance.....</b>	<b>27</b>
IV.5.1. Sources d'azote et besoins en soufre.....	27
IV.5.2. Besoins inorganiques.....	27
IV.5.3. Autres éléments .....	27
<b>IV.6. Cinétiques de croissance en batch .....</b>	<b>28</b>
IV.6.1. Schéma de la croissance.....	28
IV.6.2. Suivi de la croissance bactérienne en cultures mixtes.....	29
IV.6.2.1. Les mesures directes du nombre de micro-organismes .....	30
IV.6.2.1.1. Dénombrements sur boîte de Petri .....	30
IV.6.2.1.2. Comptages au microscope .....	31
IV.6.2.1.3. Comptages en flux.....	31
IV.6.2.2. Les mesures indirectes du nombre de micro-organismes.....	31
IV.6.2.2. 1. Estimation des densités de biomasse .....	32

<b>V. Elimination biologique des nitrates</b> .....	<b>32</b>
<b>VI.1. Réduction assimilatrice</b> .....	<b>33</b>
<b>VI.2. Réduction dissimilatrice en azote ammoniacal</b> .....	<b>33</b>
<b>VI.3. Dénitrification (Réduction dissimilatrice en azote moléculaire)</b> .....	<b>34</b>
<b>VI.3.1. Définition</b> .....	<b>34</b>
<b>VI.3.2. Bactéries de la dénitrification</b> .....	<b>34</b>
<b>VI.3.2.1 Hétérotrophie</b> .....	<b>34</b>
<b>VI.3.2.2. Autotrophie</b> .....	<b>35</b>
<b>VI.3.3. Biochimie de la dénitrification</b> .....	<b>35</b>
<b>VI.3.3.1. Dénitrification hétérotrophe</b> .....	<b>35</b>
<b>VI.3.3.2. Dénitrification autotrophe</b> .....	<b>36</b>
<b>VI.3.4. Facteurs influençant la dénitrification</b> .....	<b>37</b>
<b>VI.3.4.1. La température</b> .....	<b>37</b>
<b>VI.3.4.2. Le pH</b> .....	<b>37</b>
<b>VI.3.4.3. L'oxygène</b> .....	<b>37</b>
<b>VI.3.4.4. La nature de la source de carbone</b> .....	<b>38</b>
<b>VI.3.4.5. Le rapport C/N</b> .....	<b>38</b>
<b>VII. Les procédés de traitement de l'azote</b> .....	<b>39</b>
<b>VII.1. Les procédés à biomasse libre</b> .....	<b>39</b>
<b>VII.1.1. Les configurations de base : les systèmes à boues activées</b> .....	<b>39</b>
<b>VII.1.2. Le SBR</b> .....	<b>40</b>
<b>VII.1.3. Les réacteurs à membranes</b> .....	<b>41</b>
<b>VII.1.4. Conclusions sur les procédés à biomasse libre</b> .....	<b>42</b>
<b>VII.2. Les procédés à biomasse fixée</b> .....	<b>43</b>
<b>VII.2.1. Le filtre à ruissellement ou lit bactérien</b> .....	<b>43</b>
<b>VII.2.2. Les contacteurs biologiques rotatifs (RBC) ou biodisques</b> .....	<b>44</b>
<b>VII.2.3. Les réacteurs immergés ou biofiltres</b> .....	<b>44</b>
<b>VII.2.4. Les réacteurs à lit fluidisé</b> .....	<b>45</b>
<b>VII.2.5. Conclusions sur les procédés à cellules fixées</b> .....	<b>45</b>

**CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES**

<b>I. Matériel.....</b>	<b>46</b>
<b>I.1. Micro-organismes .....</b>	<b>46</b>
<b>I.2. Milieu de culture .....</b>	<b>46</b>
<b>I.3. Source de carbone et d'énergie .....</b>	<b>48</b>
<b>I.4. Préparation des solutions .....</b>	<b>49</b>
<b>I.5. Conservation des échantillons.....</b>	<b>49</b>
<b>I.6. pH-métrie.....</b>	<b>50</b>
<b>II. Méthodes d'analyses.....</b>	<b>50</b>
<b>II.1. Mesure de la biomasse.....</b>	<b>50</b>
<b>II.1.1. Spectrophotométrie .....</b>	<b>50</b>
<b>II.1.2. dosage de la biomasse.....</b>	<b>52</b>
<b>II.2. Dosage des nitrates .....</b>	<b>52</b>
<b>III. Les conditions opératoires .....</b>	<b>52</b>

**CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION**

<b>I. Suivi de la réaction de dénitrification par l'utilisation d'une culture mixte en présence du Méthanol comme source de carbone .....</b>	<b>54</b>
<b>I.1. Suivi du pH du milieu réactionnel au cours de la dénitrification.....</b>	<b>57</b>
<b>I.2. Influence de la concentration initiale de nitrate.....</b>	<b>57</b>
<b>II. Suivi de la réaction de dénitrification par l'utilisation d'une culture mixte en présence du Succinate de sodium comme source de carbone .....</b>	<b>59</b>
<b>II.1. Suivi de la réaction de dénitrification en présence de 500 ppm du Succinate de sodium comme source de carbone.....</b>	<b>59</b>

<b>II.2. Suivi de la réaction de dénitrification en présence de 1000 ppm du Succinate de sodium comme source de carbone.....</b>	<b>61</b>
<b>II.2.1. Influence de la concentration initiale de la source de carbone.....</b>	<b>64</b>
<b>II.2.2. Influence du rapport C/N .....</b>	<b>66</b>
<b>II.2.3. Influence des chlorures .....</b>	<b>68</b>
<b><i>CONCLUSION GENERALE.....</i></b>	<b>70</b>
<b><i>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</i></b>	<b>72</b>
<b><i>ANNEXES.....</i></b>	<b>80</b>
<i>Annexe 1 : Relation entre la densité optique et l'extrait sec.....</i>	<i>80</i>
<i>Annexe 2 : protocole de dosage des nitrates par colorimétrie .....</i>	<i>81</i>
<i>Annexe 3 : produits chimiques utilisés .....</i>	<i>84</i>

## ***LISTE DES ABREVIATIONS***

<b>N<sub>org</sub></b>	azote organique
<b>N<sub>2</sub></b>	azote moléculaire
<b>NO</b>	oxyde nitrique
<b>NH<sub>3</sub></b>	ammoniac
<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	ammonium
<b>N<sub>2</sub>O</b>	protoxyde d'azote ou oxyde nitreux
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	nitrite
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	nitrate
<b>X</b>	concentration de la biomasse (masse /unité de volume)
<b>μ</b>	taux de croissance spécifique (temps <sup>-1</sup> )
<b>α</b>	taux spécifique de lyse (temps <sup>-1</sup> )
<b>Y<sub>X/S</sub></b>	coefficient de production de la biomasse (masse de cellule formée /masse de substrat consommé)
<b>Y<sub>P/S</sub></b>	coefficient de production des produits de synthèse (masse de produit formé / masse de substrat consommé)
<b>r<sub>g</sub></b>	taux de croissance bactérien (masse /volume .temps)
<b>r<sub>su</sub></b>	taux d'utilisation du substrat (masse /unité de volume .temps)
<b>r<sub>d</sub></b>	taux de la respiration endogène (masse /unité de volume. temps)
<b>r<sub>g</sub>'</b>	taux net de croissance (masse /unité de volume .temps)
<b>S</b>	concentration du substrat (masse /unité de volume)
<b>NAR</b>	nitrate réductase
<b>NIR</b>	nitrite réductase
<b>NOR</b>	oxyde nitrique réductase
<b>N<sub>2</sub>OR</b>	oxyde nitreux réductase
<b>DCO</b>	Demande Chimique en Oxygène
<b>DO</b>	Densité optique
<b>ppm</b>	Milligrammes par litre
<b>MeOH</b>	Méthanol
<b>OMS</b>	Organisation Mondiale de la Santé

## ***LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES***

- Tableau 1** : Bilan azoté mondial (millions de tonnes) pour la production végétale et la production animale (Van der Hoek 1998) (*p 5*)
- Tableau 2** : Avantages et inconvénients des procédés (*p 17*)
- Tableau 3** : composition du milieu de culture (*p 47*)
- Tableau 4** : composition de la solution d'éléments traces (*p 47*)
- Tableau 5** : les caractéristiques physico-chimiques du MeOH (*p 48*)
- Tableau 6** : les caractéristiques physico-chimiques du succinate de sodium (*p 49*)
- Tableau 7** : Les concentrations équivalentes des différentes valeurs du rapport C/N (*p 66*)
- 
- Figure 1** : Le cycle de l'azote (Portejoie *et al.*, 2002) (*p 4*)
- Figure 2** : Distribution spatiale des nitrates (Chabour, 2004) (*p 9*)
- Figure 3** : Mécanisme de la pollution de l'eau par les nitrates (*p 10*)
- Figure 4** : Réduction de la méthémoglobinémie par transfert d'un électron du NADH à l'hème (*p11*)
- Figure 5** : Formation de nitrosamines à partir des nitrites et des amines dans le milieu acide de l'estomac (L'hirondel, 1996) (*p 12*)
- Figure 6** : Le phénomène d'eutrophisation (*p 14*)
- Figure 7** : Evolution de la matière organique et de la biomasse en présence d'une culture bactérienne (*p 18*)
- Figure 8** : Différentes phases de la croissance bactérienne en milieu liquide décrites par Buchanan (1918) (*p 29*)
- Figure 9** : Technique de dénombrement sur boîte de Pétri (Delignette-Muller, 1995) (*p 30*)
- Figure 10** : Technique turbidimétrique de mesure de la biomasse (Delignette-Muller, 1995) (*p 32*)
- Figure 11** : les voies de la réduction du nitrate (*p 33*)
- Figure 12** : Procédé classique à boues activées (d'après Barnard *et al.*, 1998) (*p 39*)
- Figure 13** : Configuration de Ludzack-Ettinger modifiée (*p 40*)
- Figure 14** : Chenal d'oxydation (*p 40*)

- Figure 15** : Principe de fonctionnement du réacteur SBR (Torrijos *et al.*, 2000) (p 41)
- Figure 16** : les principaux modèle de traitement de l'azote par immobilisation de la biomasse (p 43)
- Figure 17** : Schéma pour définir la densité optique du milieu (Lobry J, 1991) (p 51)
- Figure 18** : Schéma de l'absorbance (p 51)
- Figure 19** : Photographie d'un réacteur « batch » (p 53)
- Figure 20** : Cinétique de la croissance bactérienne en présence du méthanol comme source de carbone (P55)
- Figure 21** : Cinétique de la réduction des nitrates en présence du méthanol comme source de carbone (p56)
- Figure 22** : Evolution du pH au cours de la dénitrification en présence du méthanol comme source de carbone (p 57)
- Figure 23** : Influence de la concentration initiale des nitrates sur la croissance bactérienne en présence du méthanol comme source de carbone (p 58)
- Figure 24** : Influence de la concentration initiale des nitrates sur la cinétique de dénitrification en présence du méthanol comme source de carbone (p 58)
- Figure 25** : Cinétique de la croissance bactérienne en présence de 500 ppm du succinate de sodium comme source de carbone (p 60)
- Figure 26** : Cinétique de la réduction des nitrates en présence de 500 ppm du succinate de sodium comme source de carbone (p 60)
- Figure 27** : Variation du pH au cours de la réaction de la dénitrification en présence de 500 ppm du succinate de sodium comme source de carbone (p 61)
- Figure 28** : Cinétique de la croissance bactérienne en présence de 1000 ppm du succinate de sodium comme source de carbone (p 62)
- Figure 29** : Cinétique de la réduction des nitrates en présence de 1000 ppm du succinate de sodium comme source de carbone (p 62)
- Figure 30** : Variation du pH au cours de la réaction de la dénitrification en présence de 1000 ppm du succinate de sodium comme source de carbone (p 63)
- Figure 31** : Influence de la concentration initiale du succinate de sodium sur la croissance bactérienne (p 64)
- Figure 32** : Influence de la concentration initiale du succinate de sodium sur la réduction des nitrates (p 65)

**Figure 33** : Influence de la concentration initiale du succinate de sodium sur le pH (*p 66*)

**Figure 34** : Influence du rapport C/N sur la croissance bactérienne (*p 67*)

**Figure 35** : Influence du rapport C/N sur la réduction des nitrates (*p 67*)

**Figure 36** : Influence des chlorures sur la croissance bactérienne (*p 69*)

**Figure 37** : Influence des chlorures sur le pH (*p 69*)

# *Introduction Générale*

# Introduction Générale

---

Aujourd'hui plus que jamais, la protection de la santé et le respect de l'environnement font parti des préoccupations de l'homme qui est confronté chaque jour à de nouveaux dangers. L'une de ses inquiétudes vient des nitrates, il ne s'agit pas d'un produit nouveau mais depuis les années quarante on insiste sur ses dangers supposés et sa présence dans l'environnement ne cesse de croître.

Les nitrates sont souvent associés à l'eau qui pourtant n'en contient que très peu comparée aux végétaux. Ainsi le problème des nitrates rentre dans le cadre de l'optique du « traitement des eaux ».

Les sources de nitrates dans les eaux souterraines comprennent les matières animales et végétales en décomposition, les engrais agricoles, les fumiers, les eaux usées domestiques (Jordan T.E et *al*, 1996). Les nitrates étant très solubles dans l'eau, l'excès non absorbé par les plantes rejoint la nappe phréatique.

L'intensification inconsidérée des activités agricoles a eu pour résultat la pollution des eaux souterraines par les engrais et autres produits chimiques. Les nitrates dégradent le milieu naturel et menacent la santé humaine. Si la pollution des nappes est essentiellement liée aux pollutions diffuses d'origine agricole, celle des cours d'eau subit les effets conjugués de pollutions ponctuelles (industrielle et domestique) et du ruissellement de pollutions agricoles. Les nitrates sont issus d'excès d'azote dans un compartiment du cycle de cet élément, et lorsqu'ils ne sont pas éliminés ou assimilés par la biomasse terrestre, ils conduisent à une dégradation du milieu naturel, il faut donc les éliminer (Nemeth, 2001).

La pollution des eaux par les nitrates présente un double risque. Ingérés en grande quantité, les nitrates ont des effets toxiques sur la santé humaine. Par ailleurs, ils contribuent avec les phosphates à modifier l'équilibre biologique des milieux aquatiques en provoquant des phénomènes d'eutrophisation.

L'élimination des nitrates est devenue possible grâce aux différentes techniques physico-chimiques (échangeurs d'ions, osmose inverse) et biologiques (dénitrification hétérotrophe ou autotrophe). Les nitrates contenus dans les eaux usées urbaines sont essentiellement traités par voie biologique. Les boues activées, les biofiltres, les lits bactériens et le lagunage sont autant de procédés capables de réaliser ce traitement de manière plus ou moins poussée (Dupin, 1992).

La dénitrification biologique permet l'élimination des nitrates par leur réduction en azote gazeux. Lors de la dénitrification au sens strict (respiration des nitrates, ou réduction véritable) le nitrate joue le rôle d'accepteur d'électron dans l'oxydation de composés oxydables sous des conditions anaérobies. Le produit ultime de la réduction est l'azote gazeux.

L'objectif de ce travail est l'étude de la réaction de dénitrification en batch par une culture mixte prélevée dans la station d'épuration d'El Menia Constantine par l'utilisation du méthanol ou le succinate de sodium comme source de carbone et d'énergie.

Avant d'aborder les résultats obtenus au cours de ce travail, une étude bibliographique a été menée afin de décrire l'importance de l'azote dans l'ensemble des systèmes vivants y compris les nitrates, leurs sources, leur effet sur l'organisme et sur l'environnement. Les différents procédés de leur traitement seront ensuite abordés, en insistant sur ceux actuellement utilisés (dénitrification biologique). Un aperçu général sur l'évolution de la matière organique en présence d'une masse bactérienne, la cinétique de croissance en batch, l'influence de quelques facteurs de l'environnement sur cette croissance et la mesure de la croissance bactérienne. Nous terminerons ce chapitre par un rappel sur les procédés de traitement de l'azote.

Le deuxième chapitre regroupe les appareillages et les méthodes spécifiques utilisés lors de l'expérimentation.

Dans le troisième chapitre une série d'expériences a été faite d'abord pour l'étude de la dénitrification en utilisant le Méthanol ou le Succinate de sodium comme source de carbone et d'énergie. Les constantes cinétiques de la croissance bactérienne et l'influence d'un certain nombre de facteurs opératoires (C/N, Cl) sur la vitesse de dénitrification seront examinées.

Une conclusion, résumant les buts atteints et les perspectives qu'on peut atteindre par l'approfondissement de cette étude, termine ce mémoire.

# *Etude Bibliographique*

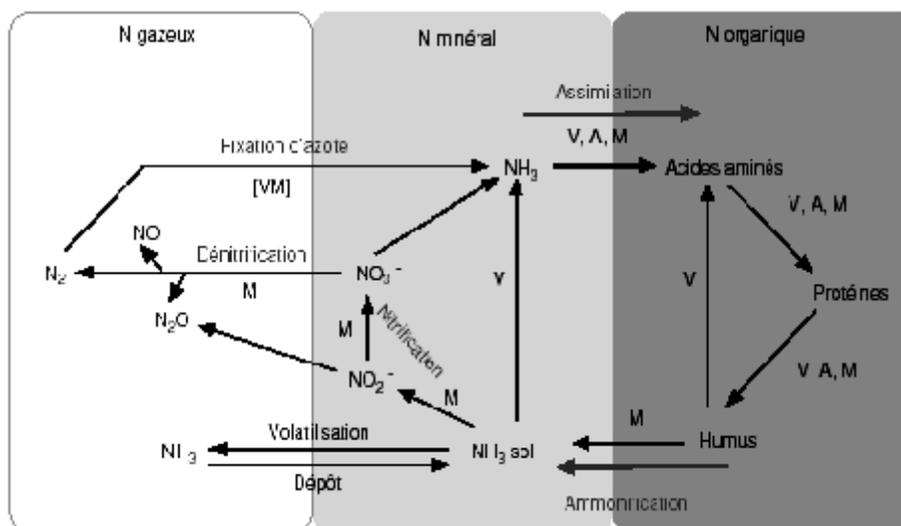
# Etude Bibliographique

## I. Introduction

L'azote représente 78% de l'atmosphère et 4 à 6% du poids sec d'un animal. Il constitue entre 16 et 23% des protéines cellulaires et environ 12% des acides nucléiques (Cole, 1993). L'ensemble des réactions biologiques de croissance et de maintenance requiert la présence de l'élément azote (Patureau, 1995).

Le cycle de l'azote est caractérisé par trois réservoirs : azote organique (acides aminés, protéines...), azote minéral ( $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ...) et composés gazeux ( $\text{N}_2$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{N}_2\text{O}$ ...) et est régi par des processus chimiques et biologiques permettant le passage d'une forme azotée à l'autre (Figure 1). Dans les milieux naturels, on n'observe pas d'accumulation d'azote dans l'un ou l'autre compartiment car un équilibre s'instaure entre ces trois réservoirs. L'azote est un constituant essentiel pour toutes les formes de vie, aussi bien dans les écosystèmes aquatiques que terrestres (l'homme prenant part à ces processus). De façon générale, l'azote est un facteur limitant de la croissance pour les règnes animal et végétal dans les écosystèmes naturels (Portejoie *et al.*, 2002).

Par son expansion démographique et géographique, l'homme a transformé les écosystèmes naturels et a modifié le cycle de l'azote : dans les zones densément peuplées où les activités humaines et particulièrement agricoles sont importantes, on observe une accumulation de l'azote. Cette accumulation résulte de deux processus : le transport d'azote d'une région géographique à une autre par le biais de la nourriture des animaux notamment et la fixation d'azote atmosphérique.



A : animaux, M : microorganismes, V : végétaux, [VM] : symbioses végétal/microorganisme

Figure 1 : Le cycle de l'azote (Portejoie *et al.*, 2002)

En évaluant à l'échelle mondiale les entrées et sorties d'azote dans le système Sol - Plante - Animal, Van der Hoek (1998) arrive à la conclusion que l'efficacité d'utilisation de l'azote est de 60% pour la production végétale mondiale et de 10,5% pour la production animale mondiale. Pour cela, il se base sur un régime alimentaire avec le taux protéique minimal n'entraînant aucune incidence sur les performances zootechniques. Si l'on restreint ces données au secteur agricole mondial, l'efficacité d'utilisation de l'azote est de 37%. Le surplus d'azote introduit dans ce secteur s'accumule dans les sols ou, selon les cas, est redistribué sous différentes formes dans l'eau (Tableau 1).

Tableau 1 : Bilan azoté mondial (millions de tonnes) pour la production végétale et la production animale (Van der Hoek, 1998).

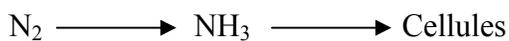
	Production végétale		Production animale	
Entrées	Engrais	73.6	Aliments pour animaux	20.5
	Fixation biologique	45.0	Pâturages	83.1
	Déjections	102.4	Divers (déchets de cuisine...)	10.8
	Total	221.0	total	114.4
<b>Système sol- plante-animal</b>				
Sorties	Culture (alimentation-industrie)	49.1	Production animale (viande, lait, œufs, laine)	12.0
	Pâturages	83.1	Déjections	102.4
	Surplus (sols, air, eau)	88.8		
	Total	221.0	Total	114.4

## II. Cycle de l'azote

Le cycle de l'azote est le résultat du métabolisme microbien sur les composés azotés. Les transformations mises en jeu sont des réactions d'oxydoréduction modifiant le niveau de valence de l'atome azote. Le cycle de l'azote (Figure1) fait intervenir des réactions de fixation, d'assimilation, d'ammonification, de nitrification et de dénitrification.

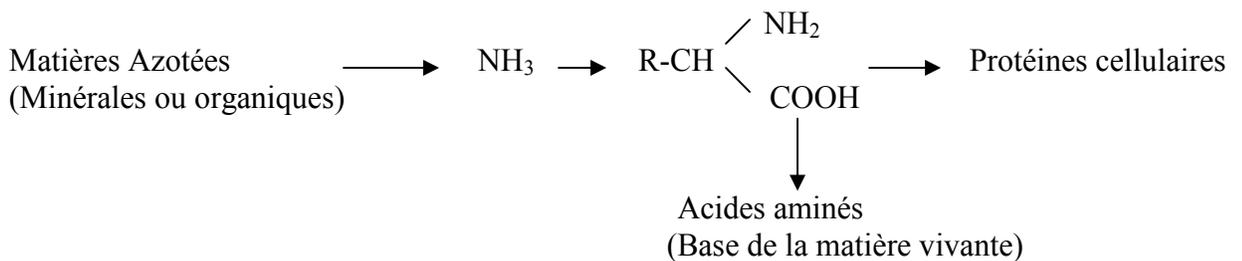
### II.1. La fixation

La fixation correspond au passage de l'azote moléculaire ( $N_2$ ) en azote fixé, habituellement en azote ammoniacal sous l'action de certains organismes.



### II.2. L'assimilation

L'assimilation est la transformation de matière azotée minérale ou organique inerte en matière vivante.



### II.3. L'ammonification

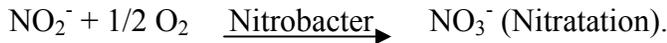
L'ammonification est la libération d'ammoniac à partir de matières azotées organiques provenant soit :

- l'excrétion de matières azotées par les organismes vivants.
- de la mort et de la décomposition des cellules vivantes.



## **II.4. La nitrification**

La nitrification est l'oxydation de l'azote ammoniacal en nitrate par l'intermédiaire de bactéries nitrifiantes.

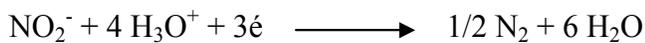
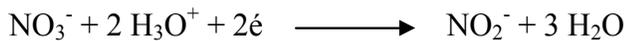


## **II.5. La réduction assimilatrice**

(Ou dissimilatrice) qui est la réduction des composés oxydés ( $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ) en azote ammoniacal ( $\text{NH}_4^+$ ).

## **II.6. La dénitrification**

La dénitrification est la réduction des nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ) en azote gazeux ( $\text{N}_2$ ) par l'intermédiaire de bactéries dénitrifiantes.



## **III. Nitrates**

Les nitrates sont des sels de l'acide nitrique. Ce sont des composés azotés naturels de formule chimique  $\text{NO}_3^-$  (ion nitrate), présents dans tous les écosystèmes. Ils sont essentiels à la croissance des végétaux qui les puisent dans le sol, mais peuvent devenir néfastes pour les plantes et les animaux s'ils sont trop abondants. Ils entrent dans la composition des engrais chimiques et naturels (fumiers). Ce sont des composés facilement entraînés par les eaux de pluie, de drainage, de ruissellement ou d'infiltration.

### **III.1. Sources**

Résidus de la vie, animale et humaine, les nitrates sont présents dans le sol à l'état naturel.

Cependant une pollution aux nitrates est tout de même à déplorer. Les origines en sont diverses :

D'une part, on constate qu'une proportion non négligeable soit 55% provient des rejets de nitrates liés aux activités agricoles. On trouve en tête de liste l'utilisation d'engrais dans les cultures.

Les plus fortes teneurs s'observent soit dans les zones de cultures céréalières et maraîchères, soit dans les zones d'élevage intensif où la production d'engrais de ferme épandue dépasse souvent les capacités d'épuration des sols et des cultures.

Par ailleurs, 35% concernent les activités domestiques avec pour principal acteur les déjections humaines et les fosses septiques.

Enfin, 10% sont attribués aux activités industrielles avec notamment l'industrie alimentaire qui durant plusieurs années a utilisé les nitrites comme agents antimicrobiens, particulièrement pour prévenir le botulisme, dans les produits de salaison comme par exemple dans les viandes et les saucisses.

L'industrie lourde détient aussi sa part de responsabilité avec les émissions de moteurs à combustion interne; le nitrite de sodium utilisé comme agent anti-corrosif dans les liquides de refroidissement; le nitrate d'ammonium dans les blocs à geler et l'azote gazeux dans le soudage à l'arc.

Dans l'industrie pharmaceutique, les nitrates et les nitrites sont essentiels à la synthèse de certains médicaments notamment le nitrate d'argent topique utilisé pour le traitement des brûlures, les antipaludiques, la nitroglycérine, les antidiarrhéiques, les diurétiques, les antidotes pour les intoxications au cyanure et au sulfure d'hydrogène et les vasodilatateurs utilisés pour le traitement de la coronaropathie.

### **III.2. Origine des nitrates dans les eaux**

En culture intensive, le niveau de fertilité naturelle établi par fixation de l'azote de l'air par les bactéries n'est pas suffisant pour assurer un rendement élevé. Un apport important d'azote doit être réalisé afin de mettre à la disposition de la plante les éléments nécessaires à sa croissance et assurer ainsi un rendement élevé (Addiscott et *al.*, 1991). Au niveau de la production agricole, l'azote constitue le principal facteur de rendement sur lequel l'homme peut agir, lorsqu'il ne peut pas maîtriser le facteur eau (culture pluviale).

Les engrais azotés épandus sur les sols contiennent des nitrates ou des composés qui seront transformés en nitrates par la faune microbienne du sol. Même s'ils sont indispensables aux productions végétales, leur excès est néfaste car, très solubles dans l'eau, ils sont facilement entraînés.

Les nitrates sont très solubles dans l'eau, donc très mobiles. Il suffit qu'ils soient en excédent par rapport aux besoins des plantes pour qu'ils soient lessivés vers les nappes souterraines ou qu'ils ruissellent vers les cours d'eau (Le Clech, 1995).

Par exemple, l'origine des nitrates dans les eaux de la nappe de Tézessa dans la plaine de Collo (Nord Est Algérien) a été établie par des bilans des excédents d'origine agricole et urbaine. Il s'avère que les excédents provenant de l'agriculture sont très fortement majoritaires.

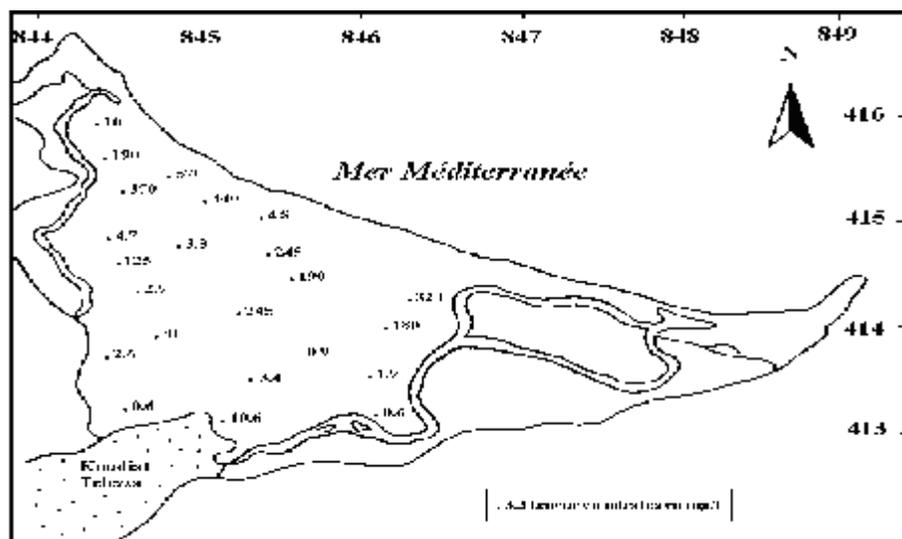


Figure 2 : Distribution spatiale des nitrates (Chabour, 2004)

### III.3. Mécanismes de pollution de l'eau

Toutes les sources précédemment citées vont, à plus ou moins long terme, être au contact du sol. Deux voies peuvent alors être différenciées. L'eau de pluie arrivant au sol peut soit ruisseler en surface et rejoindre directement les cours d'eau et ainsi emporter avec elle les nitrates. Soit l'eau peut s'infiltrer en profondeur dans le sol et les substrats géologiques et y emporter les nitrates. Dans ce cas les plantes absorbent une partie de l'eau nitratée mais pas la totalité. Etant extrêmement solubles dans l'eau, ils sont entraînés par les précipitations et s'infiltrent dans la nappe phréatique. Ils résident alors un certain temps dans la nappe avant de rejoindre finalement les rivières.

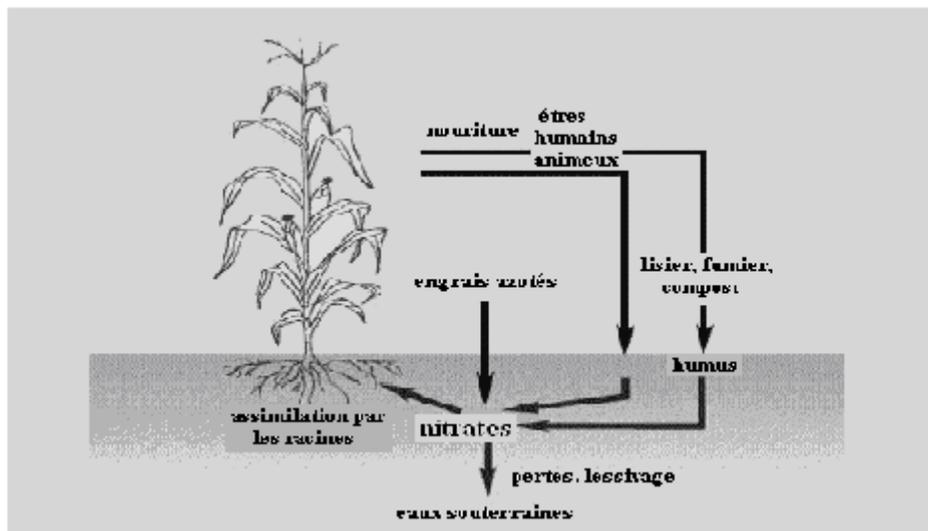


Figure 3 : Mécanisme de la pollution de l'eau par les nitrates.

### III.4. Les effets des nitrates

La présence d'ions nitrates dans les eaux engendre deux principaux impacts (Casellas, 2002) :

- 1- Sanitaire en étant cause potentielle de méthémoglobine et source de nitrosamines.
- 2- Ecologique en contribuant aux phénomènes d'eutrophisation.

#### III.4.1. Effet sur l'organisme

Les nitrates ne sont pas dangereux à dose physiologique tant qu'ils sont sous cette forme, ils ont une toxicité indirecte. Le danger vient des nitrites et autres composés formés à partir des nitrates qui eux ont une toxicité directe.

##### III.4.1.1. La méthémoglobinémie

C'est l'effet le plus anciennement connu, et sûrement le seul scientifiquement prouvé, des nitrates. La méthémoglobine est une forme d'hémoglobine qui ne permet pas le transport d'oxygène. Chez un individu normal, environ 0,8 % de l'hémoglobine se trouve sous forme de méthémoglobine. La méthémoglobinémie correspond à l'accumulation anormale de méthémoglobine, lorsqu'elle est trop importante, le transport de l'oxygène ne se fait plus correctement avec des conséquences plus ou moins graves. Les symptômes de cette maladie apparaissent lorsque le taux de méthémoglobine atteint 10 % avec les premiers signes de cyanose (coloration bleue de la peau). Lorsque la méthémoglobine dépasse 20 %, des signes plus sérieux se font jour, comme des maux de tête, vertiges, tachycardie, asthénie... Des troubles de

conscience et des signes neurologiques suivent au-delà de 60 % et, à partir de 70 %, l'intoxication peut-être mortelle.

Les personnes les plus menacées sont les nourrissons de moins de 6 mois car leur hémoglobine est plus facilement oxydable en méthémoglobine. Le pH de leur estomac est proche de la neutralité, les nitrates s'y transforment donc plus aisément en nitrites et leur alimentation à base d'eau et de légumes (carottes, épinard...) leur apporte beaucoup de nitrates.

Les nitrites transforment le fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) du sang en fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) et l'hémoglobine devient incapable de transporter l'oxygène. Il s'agit d'une oxydation de l'hémoglobine en méthémoglobine.



Stoichiométrie de la réaction entre l'ion nitrite et l'oxyhémoglobine (L'hirondel, 1996)

Il existe une enzyme qui régénère l'hémoglobine empêchant l'accumulation de méthémoglobine inactive, elle est appelée méthémoglobine-réductase ou NADH-cytochrome b5 réductase. Chez le nourrisson, cette enzyme est inactive ce qui renforce sa sensibilité.

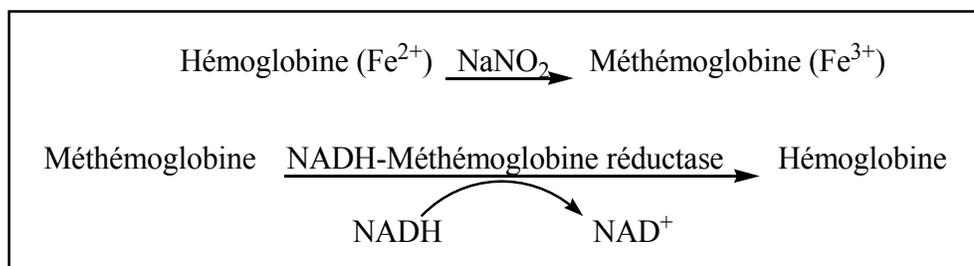


Figure 4 : Réduction de la méthémoglobinémie par transfert d'un électron du NADH à l'hème.

### III.4.1.2. Autres effets

D'autres effets des nitrates sur l'homme sont supposés mais pour l'instant, aucun n'est scientifiquement prouvé.

- Les nitrosamines : ce sont le produit de réaction entre des dérivés des nitrates et certains acides aminés. Le caractère cancérigène de ces nitrosamines a été établi chez l'animal et est suspecté chez l'homme par extrapolation.

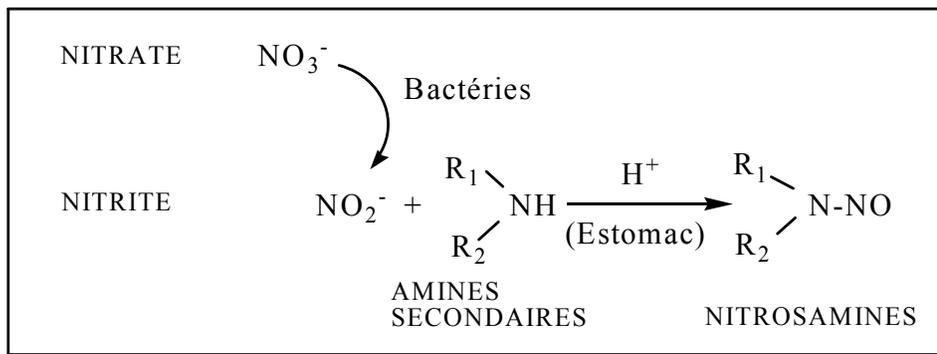


Figure 5 : Formation de nitrosamines à partir des nitrites et des amines dans le milieu acide de l'estomac (L'hirondel, 1996).

- L'augmentation du risque de mort fœtale
- L'augmentation du risque de malformation congénitale
- L'augmentation du volume de la glande thyroïde
- L'apparition plus précoce de l'hypertension artérielle

Tout ceci n'est que suppositions, tantôt démontrées puis réfutées, le danger des nitrates reste à prouver malgré tout celui-ci ne viendrait pas de sa forme  $\text{NO}_3^-$  mais d'une forme dérivée, le nitrite  $\text{NO}_2^-$ .

Ces conséquences justifient la fixation de normes strictes : la limite pour une eau destinée à la consommation humaine est actuellement fixée par OMS à 50 mg de nitrates par litre.

### III.4.2. Effet sur l'environnement

L'augmentation des teneurs en nitrates dans les eaux a également un impact sur l'environnement par sa contribution à l'apparition du phénomène d'eutrophisation de certains milieux aquatiques.

#### III.4.2.1. Eutrophisation

L'eutrophisation est décrite comme la dégradation particulière de la qualité des eaux calmes tels que les lacs, ce processus naturel est très lent : il peut s'étaler sur des siècles ou des millénaires, et parfois sur de plus longues périodes encore.

Les nitrates en excès dans l'eau sont une des causes, avec les phosphates, de l'eutrophisation des milieux aquatiques (Jacques Capblancq *et al.*2002). L'eutrophisation d'un milieu aquatique se caractérise par une prolifération de plantes et d'algues, qui réduisent la teneur en oxygène,

parfois jusqu'à une teneur létale et par conséquence une mortalité des espèces aquatiques animales.

Mais l'eutrophisation peut être fortement accélérée par l'apport d'effluents domestiques, industriels et/ou agricoles et conduire à la mort de l'écosystème aquatique en quelques décennies voire même en quelques années. On parle alors d'hypereutrophisation ou encore de dystrophisation.

Les régions littorales et les estuaires ne sont pas épargnés par l'eutrophisation car leurs eaux sont peu brassées et reçoivent beaucoup de rejets issus de l'activité humaine. C'est en particulier le cas des marées vertes.

#### **III.4.2.2. Marées vertes**

C'est un type particulier d'eutrophisation marine côtière provoqué par un enrichissement excessif des eaux en nutriments. Il s'agit de la prolifération massive d'algues vertes, généralement du genre *Ulva*, au printemps et en été. Ces algues s'accumulent ainsi sur l'estran en quantité très importante.

Plusieurs régions du globe ont été touchées par ce phénomène on peut citer la lagune de Venise avec 500 000 t d'ulves sur 500 km<sup>2</sup> en 1987. En France les neufs dixièmes des tonnages d'ulves ramassées chaque année proviennent de Bretagne.

L'azote est l'élément limitant à la croissance algale en fin de printemps et en été. L'augmentation des rejets de nitrates provoque une prolifération d'ulves. Ce problème concerne la Bretagne où le lessivage important des terres agricoles conduisait à une arrivée sur le littoral d'eau riche en nitrates, au moment où la demande des ulves en croissance était maximale.

L'hydrodynamisme et les conditions météorologiques jouent un rôle important dans la prolifération et l'échouage de ces algues (énergie des vagues, vent, courants...).

Le genre *Ulva* présente une grande plasticité ainsi qu'un rapport surface/volume favorable qui augmente les échanges avec le milieu. Ainsi il peut extraire du milieu et stocker des réserves d'azote importantes ce qui lui est favorable lors d'apports irréguliers. De plus ce genre est capable de s'adapter à des éclaircissements faibles ou élevés mais ces ulves peuvent aussi résister à

des températures allant jusqu'à  $-5^{\circ}\text{C}$ . Ainsi l'ulve peut passer l'hiver et reprendre ensuite sa croissance lorsque les conditions redeviennent plus favorables.

Parmi les conséquences d'ulves on peut citer :

- Algues échouées sur l'estran : les ulves décomposées sur l'estran constituent une réserve importante d'azote et de phosphore sous forme organique. Ces stocks nutritifs sont libérés progressivement dans l'eau et ils peuvent être alors réutilisés. Il faut également mentionner la libération dans l'atmosphère de composés polluants tel que ( $\text{H}_2\text{S}$ ).
- Impact sur la faune : lorsque les ulves viennent se plaquer contre les mollusques (huîtres, moules...) elles diminuent le renouvellement de l'eau et l'apport en nourriture. Les poissons plats proches de la plage subissent aussi les conséquences de ces marées vertes.
- Conséquences économiques : tout d'abord, le ramassage des algues à un coût relativement important, en ce qui concerne la Bretagne, le ramassage coûte entre 300 000 et 600 000 € par an. De plus les algues ont un impact défavorable sur le tourisme. Les élevages en milieu marin subissent de gros dommages eux aussi.



Marrée vertes

Eutrophisation

Figure 6 : Le phénomène d'eutrophisation.

Pour toutes ces raisons, les nitrates doivent être éliminés des rejets vers les lacs et les rivières (Bougard, 2004). Il est possible d'utiliser et de combiner certaines techniques pour que les eaux usées, domestiques et urbaines et les eaux usées résiduelles industrielles, ne soient déversées dans le milieu naturel qu'après avoir subi des traitements réduisant la pollution dans les limites acceptables, respectant les exigences biologiques du règne animal, du règne végétal et au-dessus de tout du genre humain.

Pour limiter les apports des nitrates dans les eaux, il paraît intéressant de faire une rapide synthèse des connaissances actuelles en ce qui concerne les principaux procédés d'élimination des nitrates dans les eaux.

### **III.5. Procédés d'élimination des nitrates**

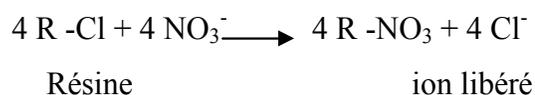
L'élimination des nitrates peut être réalisée soit par traitements physico-chimiques : échanges d'ions, procédés membranaires, soit par traitements biologiques : dénitrification (hétérotrophe ou autotrophe) (Calvet, 1990).

#### **III.5.1. Traitements physico-chimiques**

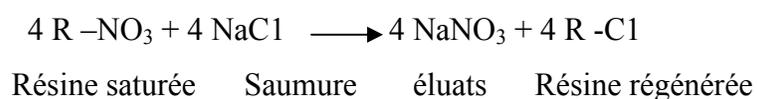
##### **III.5.1.1. la dénitratation**

Il s'agit d'un procédé physico-chimique où l'on utilise des résines échangeuses d'ions. Les résines échangeuses d'ions sont des produits synthétiques possédant des fonctions chimiques actives capables, sous certaines conditions, d'échanger certains ions contre d'autres. On distingue les résines cationiques, échangeurs d'ions électropositifs (cations), les résines anioniques, échangeurs d'ions électronégatifs (anions).

Les résines utilisées pour l'enlèvement des nitrates sont des résines anioniques. L'eau brute chargée en nitrate percole à travers les résines (généralement de haut en bas). Les ions nitrates se fixent sur la résine, laquelle libère dans l'eau traitée des ions chlorures en quantité équivalente. On a alors :



A la sortie, l'eau dénitratée est mélangée avec de l'eau brute dans un rapport de débits permettant d'obtenir à la distribution une teneur résiduelle en nitrates < 25 mg/l. Cependant, la production de l'échangeur doit être arrêtée lorsque la résine atteint un niveau de saturation tel que la teneur en nitrates dans l'eau traitée dépasse un seuil. Il faut alors régénérer la résine. Cette régénération a pour équation :



Les nitrates sont donc déplacés, mais non éliminés, et se retrouvent dans les éluats, non biodégradables facilement, dont l'évacuation pose problème. En fait ceux-ci peuvent être :

- Rejetés dans une station d'épuration des eaux usées.
- Délivré à une industrie de fabrication d'engrais azotés.

De plus ce procédé est très coûteux.

### **III.5.1.2. L'osmose et l'électrodialyse**

Ce sont des procédés mettant en œuvre des membranes synthétiques qui s'opposent au passage des sels dissous dans l'eau. Tous deux sont également maîtrisés mais très coûteux.

L'osmose : est un phénomène de diffusion entre deux solutions de concentration différente, à travers une membrane perméable ou semi-perméable. Le solvant passe de la solution la moins concentrée vers la plus concentrée, la substance dissoute suit le trajet inverse. Lors de l'osmose inverse, on inverse le processus en appliquant une pression supérieure à la pression osmotique.

Electrodialyse : filtration sous l'effet d'un potentiel électrique, qui permet la migration et la séparation des espèces ioniques à travers des membranes de polarité différente.

Un inconvénient des traitements physico-chimique réside dans le fait que les nitrates sont extraits de l'eau, mais non éliminés. Ils se retrouveront donc d'une manière ou d'une autre sous forme de déchets.

### **III.5.2. Traitements biologiques**

Les traitements aérobies par boues activées (traitements biologiques) constituent un moyen relativement efficace pour l'élimination de la pollution azotée et carbonée.

Les processus biologiques ont l'avantage de ne générer aucun déchet secondaire nuisible, contrairement aux méthodes physico-chimiques. Les extraits du procédé sont du gaz carbonique (CO<sub>2</sub>), des vapeurs d'eau (H<sub>2</sub>O) ainsi qu'une fraction résiduelle des contaminants. Les traitements biologiques occupent une place importante parmi les procédés mis en place pour éliminer les nitrates.

L'enlèvement de nitrate dans les eaux usées est principalement effectué par dénitrification, processus biologique qui s'avère habituellement plus économique que les traitements physico-chimiques (Metcalf et Eddy, 2003).

La dénitrification est un processus anoxie au cours duquel les bactéries hétérotrophes vont modifier leur métabolisme pour utiliser les nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ) comme accepteurs d'électron au lieu de l'oxygène moléculaire. La réduction biologique du nitrate au cours de la dénitrification mènera à la production finale de  $\text{N}_2$  (produit gazeux inerte).

### **III.5.3. Les avantages et les inconvénients des procédés d'élimination des nitrates**

Le tableau 2 montre les avantages et les inconvénients de chaque procédé.

Tableau 2 : Avantages et inconvénients des procédés d'élimination des nitrates.

<b>Procédé</b>	<b>Avantages</b>	<b>Inconvénients</b>
<b>biologique</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rejets exempts de nitrates,</li> <li>• Probabilité faible de formation de sous-produits toxiques,</li> <li>• Spécifique des nitrates,</li> <li>• Faible concentration.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rendement acceptable dans un domaine de température entre 5°C à 75°C,</li> <li>• Surveillance suivie.</li> </ul>
<b>Résines échangeuses d'ions</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fiable en toutes circonstances,</li> <li>• Adaptable à un fonctionnement automatique peu sensible aux basses températures.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dépend de la qualité de l'eau brute : si SO<sub>4</sub> trop élevée, et en Cl si cycle chlorures,</li> <li>• Non spécificité des espèces retenues (SO<sub>2</sub><sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>),</li> <li>• Risque de relargage,</li> <li>• Nécessité d'une régénération,</li> <li>• L'eau traitée peut être corrosive,</li> <li>• Rejets très concentrés en nitrate,</li> <li>• Très coûteux.</li> </ul>
<b>Osmose inverse</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Procédé bien maîtrisé fiable en toutes circonstances,</li> <li>• Peut fonctionner en automatique,</li> <li>• La composition de l'eau brute a peu d'importance.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Modifie la qualité de l'eau initiale (l'eau traitée peut être corrosive),</li> <li>• Non spécificité des espèces retenues,</li> <li>• Nécessité un prétraitement et quelquefois un post-traitement,</li> <li>• Problème d'évacuation des éluats riches en nitrates,</li> <li>• Durée de service des membranes,</li> <li>• Très coûteux.</li> </ul>
<b>Electrodialyse sélective</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ne nécessite pas de régénération.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Spécificité moyenne pour des rendements limités,</li> <li>• Nécessité d'un prétraitement,</li> <li>• Présence de rejets concentrés.</li> </ul>

### **III.5.4. Choix du traitement**

Les méthodes d'élimination de l'azote par voie physico-chimique ne semblent actuellement ni techniquement ni économiquement intéressantes. Ce sont des procédés d'une technologie assez complexe qui ne sont pas recommandées pour notre pays.

Les traitements biologiques apparaissent comme les mieux adaptés dans la majorité des cas, en raison de leur facilité de mise en œuvre et de leur coût modéré.

## **IV. Dynamique des populations bactériennes en batch**

La dénitrification implique nécessairement la présence d'une pollution carbonée qui peut être directement puisée dans l'eau brute ou ajoutée. Les polluants sont utilisés comme source de carbone et d'énergie et la réaction globale, qui est exothermique, peut s'écrire comme suit :



### **IV.1. Rôle de la population microbienne**

L'élimination de la pollution, la coagulation des solides colloïdaux et la stabilisation de la matière organique sont accomplis biologiquement en utilisant une variété de micro-organismes, principalement les bactéries : les micro-organismes sont utilisés pour convertir la matière organique dissoute ou colloïdale en différents gaz et en tissus cellulaires. Parce que le tissu cellulaire a un poids spécifique un peu plus grand que celui de l'eau, les cellules résultantes (boue) peuvent être éliminées du liquide traité par décantation ou filtration.

### **IV.2. Evolution de la matière organique en présence d'une masse bactérienne**

Lorsqu'on apporte des matières organiques dans un milieu microbien, et si celui-ci n'est pas dépourvu en éléments nutritifs, on assiste à une évolution progressive de la masse microbienne suivant quatre phases principales (Figure 7).

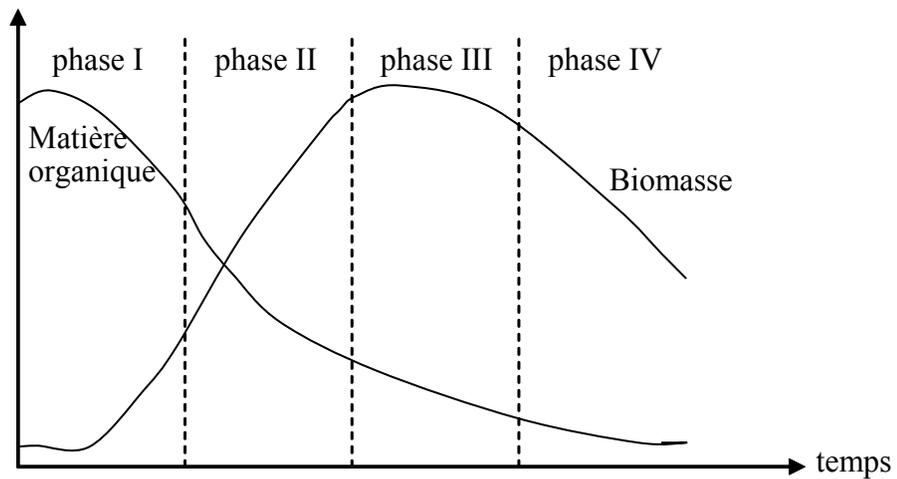


Figure 7 : Evolution de la matière organique et de la biomasse en présence d'une culture bactérienne.

Au cours de la première phase, le milieu riche en nutriment permet un développement rapide des bactéries. La concentration de la matière organique diminue rapidement, la biomasse augmente alors que la masse d'oxygène présente dans le milieu décroît. C'est la phase de synthèse cellulaire au cours de laquelle, les matières organiques oxydées sont transformées en produits finaux de dégradations tels que  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NO}_2$  ...

Au cours de la seconde phase, l'insuffisance de la nourriture entraîne un ralentissement de la croissance bactérienne, on observe alors un début du plafonnement de la biomasse. C'est la phase dite décroissante ralentie.

La phase III correspond à une phase stationnaire. Elle signifie qu'à ce moment, les bactéries utilisent les réserves accumulées précédemment.

Enfin, la dernière phase (IV), au cours de la quelle le milieu est pauvre en matières organiques, se traduit par la mort de nombreux micro-organismes. C'est la phase endogène. L'oxygène apporté est alors utilisé par les bactéries pour leur propre transformation en produits finaux.

#### **IV.2.1. Taux de croissance bactérien**

Le taux de croissance spécifique  $\mu$  ( $\text{h}^{-1}$ ) est défini à n'importe quel temps durant la croissance dans un réacteur batch où on a :

$$\left\{ \begin{array}{l} \text{Le poids sec de la} \\ \text{Biomasse accumulée} \end{array} \right\} = \left\{ \begin{array}{l} \text{Croissance} \\ \text{de la biomasse} \end{array} \right\} - \left\{ \begin{array}{l} \text{Transport} \\ \text{de la biomasse} \end{array} \right\} - \left\{ \begin{array}{l} \text{La Lyse} \\ \text{de la biomasse} \end{array} \right\}$$

$$\frac{dX}{dt} = \mu X - \frac{F}{V} X - \alpha X \dots\dots\dots (1)$$

X : concentration de la biomasse (masse /unité de volume)

$\mu$  : taux de croissance spécifique (temps<sup>-1</sup>)

F : flux de la biomasse (volume /unité de temps)

V : volume de la biomasse (unité de volume)

$\alpha$  : taux spécifique de lyse (temps<sup>-1</sup>)

Puisque un réacteur batch est utilisé, aucun transport de la biomasse (influent et effluent) n'a lieu et si on suppose que la croissance est en phase logarithmique, la respiration endogène (la lyse) peut être négligée et donc  $\alpha \ll \mu$  l'équation (1) devient :

$$\frac{dX}{dt} = \mu X = r_g \dots\dots\dots (2)$$

$r_g$  : taux de croissance bactérien (masse /volume .temps)

**IV.2.2. Taux d'utilisation du substrat**

Les substrats sont consommés pour fournir le nécessaire en nutriments, en énergie, en composés structuraux de la croissance bactérienne.

$$\left\{ \begin{array}{l} \text{Accumulation} \\ \text{du substrat} \end{array} \right\} = \left\{ \begin{array}{l} \text{alimentation} \\ \text{en substrat} \end{array} \right\} - \left\{ \begin{array}{l} \text{le substrat} \\ \text{consommé} \\ \text{pour la} \\ \text{croissance} \end{array} \right\} - \left\{ \begin{array}{l} \text{le substrat} \\ \text{utilisé pour} \\ \text{les produits} \\ \text{de synthèse} \end{array} \right\} - \left\{ \begin{array}{l} \text{le substrat} \\ \text{consommé} \\ \text{pour la} \\ \text{maintenance} \end{array} \right\} - \left\{ \begin{array}{l} \text{le substrat} \\ \text{consommé} \\ \text{pour le} \\ \text{transport} \end{array} \right\}$$

$$\frac{dS}{dt} = \frac{F}{V} . S - \frac{\mu X}{Y_{X/S}} - \frac{q_p X}{Y_{P/S}} - m . X - \frac{F'}{V} . S' \dots\dots\dots (3)$$

F et F' : flux du milieu injecté et rejeté du bioréacteur respectivement (volume /temps)

V : volume de la culture (unité de volume)

S et S' : concentration du substrat injecté et rejeté du bioréacteur respectivement (masse /unité de volume)

$Y_{X/S}$  : coefficient de production de la biomasse (masse de cellule formée /masse de substrat consommé)

$Y_{P/S}$  : coefficient de production des produits de synthèse (masse de produit formé / masse de substrat consommé)

$\mu$  et  $q_p$  : taux spécifique de croissance et de formation de produits respectivement (temps<sup>-1</sup>)

$m$  : coefficient de maintenance (masse de substrat consommé / masse de biomasse .temps)

Dans le réacteur batch on a ni alimentation en substrat ni transport du substrat l'équation (3) devient :

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{\mu X}{Y_{X/S}} - \frac{q_p X}{Y_{P/S}} - mX \dots\dots\dots (4)$$

Fréquemment et spécialement en culture aérobie le coefficient de maintenance est très petit comparé au terme  $\frac{\mu X}{Y_{X/S}}$  et si aucun produit n'a été formé l'équation (4) sera :

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{\mu X}{Y_{X/S}} = -\frac{1}{Y_{X/S}} \cdot \frac{dX}{dt} = r_{su} \dots\dots\dots (5)$$

Donc :

$$r_g = -Y_{X/S} \cdot r_{su} \dots\dots\dots (6)$$

$r_{su}$  : taux d'utilisation du substrat (masse /unité de volume .temps)

**IV.2.3. Les différents modèles cinétiques**

Différents modèles ont été formulés et utilisés dans la modélisation des systèmes d'eau usée, parmi ces derniers, le plus simple est celui de MONOD souvent valable en première approximation, il exprime la limite de croissance et l'utilisation du substrat et prend en compte les différentes étapes de la croissance bactérienne.

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} \dots\dots\dots (7)$$

$\mu$  : taux spécifique de croissance (temps<sup>-1</sup>)

$\mu_{\max}$  : taux spécifique maximum de croissance (temps<sup>-1</sup>)

$S$  : concentration du substrat en solution (masse / unité de volume)

$K_s$  : constante de saturation en substrat (masse / unité de volume)

D'après l'équation (2), (6) et (7) on aura :

$$r_g = \frac{\mu_{\max} \cdot S \cdot X}{(K_S + S)} \dots\dots\dots (8)$$

$$r_{su} = -\frac{\mu_{\max} \cdot S \cdot X}{Y_{X/S}(K_S + S)} \dots\dots\dots (9)$$

#### **IV.2.4. Effet de la phase endogène**

L'expression du taux de croissance doit être corrigé en prenant en compte l'énergie utilisée pour la maintenance, la lyse des bactéries, la prédation et beaucoup d'autres facteurs causant la diminution des cellules.

$$r_d = K_D \cdot X \dots\dots\dots (10)$$

$r_d$  : taux de la respiration endogène (masse /unité de volume . temps)

$K_D$  : coefficient de respiration endogène (temps<sup>-1</sup>)

$X$  : concentration de la biomasse (masse /unité de volume)

L'équation (7) sera :

$$\mu' = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} - K_D \dots\dots\dots (11)$$

$\mu'$  : taux net spécifique de la croissance (temps<sup>-1</sup>)

$$r_g' = r_g - r_d \dots\dots\dots (12)$$

$$r_g' = \frac{\mu_{\max} \cdot S \cdot X}{(K_S + S)} - K_D X \dots\dots\dots (13)$$

$r_g'$  : taux net de croissance (masse /unité de volume . temps)

L'effet de la respiration endogène sur la production net des micro-organismes est pris en compte par la définition de la production observée.

$$Y_{obs} = -\frac{r_g'}{r_{su}} \dots\dots\dots (14)$$

Parmi les divers organismes responsables des phénomènes biologiques, les bactéries sont les plus importantes et les plus nombreuses. Une bactérie peut être considérée comme un système utilisant un substrat pour produire de l'énergie, fabriquer de nouvelles cellules, et rejeter des produits de métabolisme.

L'opération de synthèse cellulaire porte le nom d'anabolisme, et celle relative à la production d'énergie et formation de produits de dégradation s'appelle le catabolisme. L'ensemble de ces deux opérations est le métabolisme.

### **IV.3. Croissance bactérienne**

Dans un milieu où les conditions nutritionnelles et physico-chimiques adéquates sont réunies, les bactéries entrent dans un processus de croissance engendré par l'ensemble de leurs activités physiologiques. Ce processus se traduit par l'augmentation coordonnée et irréversible du matériel cellulaire, suivi de la division cellulaire qui engendre l'accroissement de la population bactérienne.

La croissance est un processus complexe qui se déroule en plusieurs séquences : absorption des nutriments de base requis présents dans le milieu, conversion de ces nutriments en matériel cellulaire et en énergie, réplication du génome et augmentation de la taille avec duplication de l'ensemble des éléments constituant le matériel cellulaire, division en deux cellules filles dotée chacune d'une copie du génome et des autres composants cellulaires.

En fait, la présence des nutriments requis est une condition nécessaire mais non suffisante à la croissance bactérienne qui n'est possible que dans des conditions physico-chimiques favorables du milieu. Et elle n'est optimale, que si ces conditions sont elle-même optimales.

### **IV.4. Conditions de croissance**

De nombreux facteurs de l'environnement ont une influence significative sur la croissance bactérienne qu'ils peuvent favoriser ou au contraire inhiber, le plus souvent avec des interactions synergiques entre eux. En effet, la croissance bactérienne est seulement possible si l'ensemble des facteurs physico-chimiques du milieu sont réunis et favorables.

#### **IV.4.1. Facteurs physiques**

On appelle facteurs physiques les facteurs qui relèvent de l'environnement :

Eau – température – pH – oxygène - pression osmotique- radiations- disponibilité des nutriments

##### Eau

L'eau représente 80% des constituants cellulaires, indispensable au développement. C'est le solvant biologique universel au sein duquel les innombrables réactions biochimiques du métabolisme cellulaire peuvent se dérouler (la catalyse enzymatique se déroule sur des substrats en solution aqueuse).

##### Température

Elle est importante, elle agit sur le développement bactérien. Les différentes espèces ont une température :

- Minimale : à laquelle elles peuvent se développer
- Optimale : c'est la meilleure à laquelle elles peuvent se développer
- Maximale : au-delà de laquelle elles ne peuvent se développer

Selon leur température optimale, les microorganismes sont dits :

- Psychrophiles : températures de croissance proches de 0°C (optimum entre 10°C et 15°C)
- Mésophiles : températures de croissance proches de celle du corps humain 37°C (optimum entre 20°C et 40°C)
- Thermophiles : températures de croissance comprises entre 45°C et 70°C
- Hyperthermophiles : températures de croissance supérieures à 80°C

##### pH

Il influence les réactions enzymatiques. On définit une échelle dont les valeurs supérieures et inférieures constituent les limites de croissance pour une espèce donnée. Les milieux de culture doivent avoir un pH correspondant avec l'espèce recherchée. C'est pour cela que l'on utilise des tampons de pH pour stabiliser la valeur de ce dernier.

## Oxygène

Les bactéries réagissent différemment en présence de l'oxygène moléculaire. On distingue selon ce critère différents groupes bactériens.

- Les microorganismes aérobies stricts : ne peuvent se développer qu'en présence d'oxygène.
- Les microorganismes anaérobies stricts : ne peuvent se développer qu'en absence d'oxygène.
- Les microorganismes micro aérophiles qui ne se développent qu'à des pressions partielles d'oxygène inférieures à celle de l'atmosphère.
- Les microorganismes anaérobies facultatifs s'accommodent de la présence ou de l'absence de ce gaz.

On constate que les anaérobies fournissent (exemple dans l'oxydation du glucose) environ 20 fois plus d'énergie que les aérobies, les deux types peuvent coexister dans une même cellule (Edeline F, 1993).

## Pression osmotique

Les bactéries peuvent supporter des variations importantes de pression osmotique à l'extérieur de la cellule. Quand elles sont cultivées en milieu hypotonique certaines bactéries peuvent se développer.

Certaines bactéries peuvent se développer dans des milieux très salés comme la Mer Morte, on les dit halophiles.

## Radiations

Elles proviennent du soleil sous forme de photons dont la longueur d'onde est comprise entre 200 et 800 nm. Certaines bactéries ont la propriété d'absorber, grâce à leur pigment, certaines radiations dans le rouge ou le bleu et peuvent transformer l'énergie lumineuse en énergie chimique.

## Types nutritionnels

Les populations microbiennes des boues sont complexes et ne peuvent se définir qu'au moyen des principaux groupes écologiques : bactéries, champignons, protozoaires, ou si l'on combine des critères concernant le type de source d'énergie et ceux concernant la nature des donneurs d'électrons exogènes, on aboutit à une autre classification essentiellement nutritionnelle :

Selon la nature de la source de carbone utilisé :

- Les autotrophes ont besoin pour se développer de gaz carbonique, d'eau, de quelques éléments minéraux et d'un peu d'azote. Ces microorganismes dépendent de la photosynthèse. Ils peuvent élaborer toutes les molécules indispensables à leur développement.
- Les hétérotrophes ont besoin de molécules organiques déjà préformées pour se développer. Ils ont des besoins nutritifs très stricts. Ces microorganismes dégradent une grande quantité de substances hydrocarbonées (alcool, acide acétique, acide lactique, polysaccharides, sucres divers).

Selon la source d'énergie utilisé :

Les bactéries doivent trouver dans leur environnement les substances nécessaires à leur énergie et à leurs synthèses cellulaires.

Les bactéries phototrophes utilisent l'énergie lumineuse pour la photosynthèse (synthèse d'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique). Elles utilisent des donneurs et des accepteurs d'électrons (élément minéral : bactérie photolithotrophe; élément organique : bactérie photoorganotrophe)

Les bactéries chimiotrophes puisent leur énergie à partir de composés minéraux ou organiques. Elles utilisent des donneurs et des accepteurs d'électrons (élément minéral : bactérie chimiolithotrophe; élément organique : bactérie chimioorganotrophe).

#### **IV.4.2. Facteurs chimiques**

De nombreux produits chimiques sont des agents toxiques pour les bactéries. Ils peuvent agir de différentes manières :

Soit ils arrêtent la croissance des bactéries mais ne les tuent pas, ils sont appelés bactériostatiques.

Soit ils détruisent les cellules bactériennes, ce sont des agents bactéricides.

Les produits chimiques à base de chlore, de phénols, de métaux lourds, les détergents sont des agents potentiellement bactéricides ou bactériostatiques, selon la dose à laquelle ils sont employés.

#### **IV.5. Conditions favorables à la croissance**

##### **IV.5.1. Sources d'azote et besoins en soufre**

Les bactéries ont besoin de substances azotées pour synthétiser leurs protéines. La provenance de cet azote peut se faire par fixation directe de l'azote atmosphérique ou par incorporation de composés azotés (réactions de désamination, de transamination).

Le soufre est incorporé par les bactéries sous forme de sulfate ou de composés soufrés organiques.

##### **IV.5.2. Besoins inorganiques**

Le phosphore fait partie des acides nucléiques et de nombreuses réactions enzymatiques. Il permet la récupération, l'accumulation et la distribution de l'énergie dans la bactérie. Il est incorporé sous forme de phosphate inorganique.

##### **IV.5.3. Autres éléments**

D'autres éléments jouent un rôle dans le métabolisme bactérien (sodium, potassium, magnésium, chlore) et dans les réactions enzymatiques (calcium, fer, magnésium, manganèse, nickel, sélénium, cuivre, cobalt, vitamines).

## **IV.6. Cinétiques de croissance en batch**

Ce mode de croissance est obtenu en culture sur milieu liquide, réalisée en flacons (tube à essais, erlens) ou en bioréacteur (équipement spécifique pour mener des cultures en conditions contrôlées), contenant le milieu de croissance pourvu des nutriments requis et placé dans les conditions convenables d'environnement. Le milieu n'est pas renouvelé et sa capacité d'utilisation se limite donc à ses ressources initiales.

Le milieu estensemencé par un inoculum constitué de 0,5 à 3% (V/V) d'une culture pure préalable de la bactérie considérée. La croissance s'enclenche alors et se poursuit, jusqu'à ce que les conditions de milieu ne répondent plus aux besoins bactériens de croissance.

Toutes les bactéries, cultivées dans ces conditions, développent une même cinétique de croissance, exprimée par une courbe de croissance caractéristique qui rend compte de l'évolution de la concentration cellulaire, exprimée en nombre de cellules ou en masse bactérienne par unité de volume du milieu de culture, en fonction du temps.

### **IV.6.1. Schéma de la croissance**

La culture en batch permet de suivre tout le cycle d'une population bactérienne. Ce cycle est généralement représenté sous forme d'une courbe de croissance correspondant au suivi de la population (densité de population) ou au suivi de la biomasse (densité de biomasse), éventuellement après transformation logarithmique, en fonction du temps (Cornu, 2000).

Le schéma classique de la croissance d'une population bactérienne en milieu non renouvelé a été établi par Buchanan (1918) (Figure 8). Il décompose la cinétique de croissance en sept phases distinctes (Charles-Bajard, 1996) :

1. la phase de latence, qui correspond à une phase de transition entre un état physiologique initial et un état de croissance à proprement parler (phase d'adaptation au nouvel environnement),
2. la phase d'accélération de la croissance,
3. la phase de croissance quasi-exponentielle, dite aussi phase de croissance maximale ; cette phase de croissance est considérée en première approximation comme purement exponentielle.

La pente de la droite (lorsque la concentration bactérienne est exprimée en coordonnées semi-logarithmiques) correspond à la vitesse (ou taux) de croissance maximale,  $\mu_{\max}$  ( $\text{h}^{-1}$ ) :

$$\mu_{\max} = \frac{y_2 - y_1}{t_3 - t_2}$$

4. la phase de décélération ou phase de freinage, qui semble intervenir au fur et à mesure que le substrat s'épuise ou que des produits toxiques s'accumulent,
5. la phase stationnaire maximale,
6. la phase d'accélération de la décroissance,
7. la phase de décroissance exponentielle, qui apparaît lorsque le milieu devient fortement défavorable à la multiplication de cellules bactériennes.

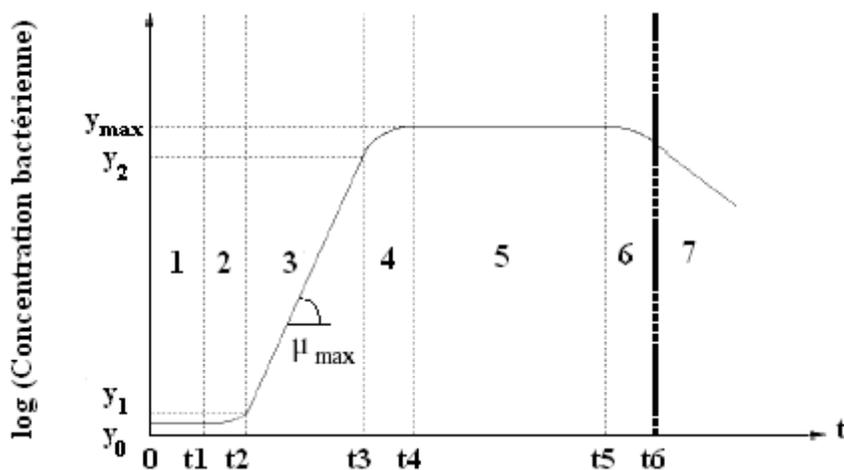


Figure 8 : Différentes phases de la croissance bactérienne en milieu liquide décrites par Buchanan (1918).

#### **IV.6.2. Suivi de la croissance bactérienne en cultures mixtes**

La mesure de la croissance bactérienne consiste à estimer, à un moment donné ou en cinétique de temps l'évolution de la population bactérienne (détermination du taux de croissance maximum  $\mu_{\max}$ ) ou sa biomasse. Mais comme ces deux paramètres sont proportionnels, la détermination de l'un permet aussi d'évaluer l'autre par corrélation. Il existe pour cela de nombreuses techniques reposant sur différents types de mesures :

#### IV.6.2.1. Les mesures directes du nombre de micro-organismes

Elles sont fondées sur les dénombrements sur boîtes de Petri ou la cytométrie en flux ou sur filtre (par analyse d'image) (Charles-Bajard, 1996).

##### IV.6.2.1.1. Dénombrements sur boîte de Petri

Parmi les techniques directes, le dénombrement sur boîtes de Petri constitue sans aucun doute la méthode la plus classique. Cette technique permet la mesure de densités de populations comprises entre  $10$  et  $10^9$  cellules/mL ou cellules/g de produit. Le principe repose sur l'hypothèse qu'une cellule viable déposée sur le gel nutritif de la boîte se divise jusqu'à l'obtention d'un amas de cellules issues de cette seule cellule mère : une colonie.

En conséquence, le dénombrement des colonies revient au dénombrement des cellules ou groupes de cellules déposés et viables (unités formant colonie ou ufc) à condition que la dilution de la solution ne conduise à aucun chevauchement des colonies (confluence). La méthode est très simple mais peut être coûteuse en temps et en matériel et peut conduire à l'obtention de cinétiques constituées d'un nombre limité de points expérimentaux (Cornu, 2000).

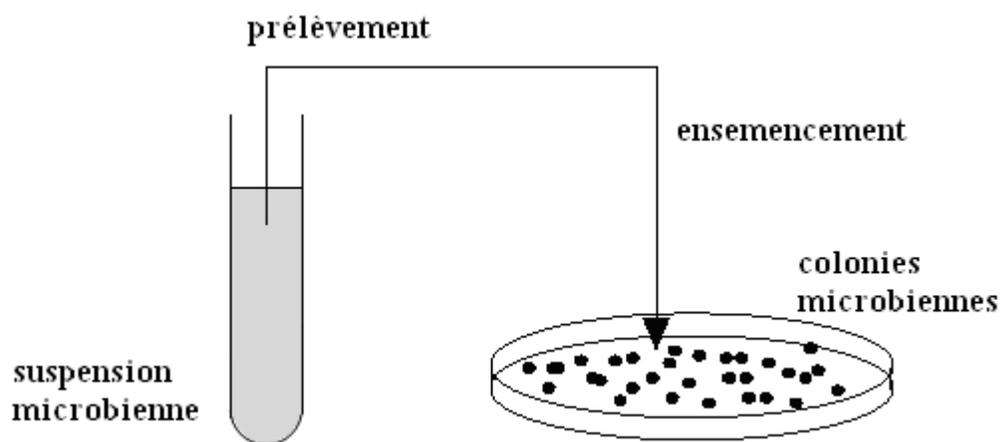


Figure 9 : Technique de dénombrement sur boîte de Pétri (Delignette-Muller, 1995)

#### **IV.6.2.1.2. Comptages au microscope**

Les cellules présentes dans un échantillon liquide peuvent également être dénombrées en microscopie en utilisant du matériel adapté. Un quadrillage gravé à la surface d'une lame de verre (cellule de Neubauer) permet de compter les cellules dans un volume connu d'échantillon.

Les techniques d'épifluorescence fondées sur l'utilisation de fluorochromes permettent un comptage direct plus spécifique en microscopie. Après coloration avec le 3,6-bis chlorure d'acridine (acridine orange) et le 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), l'identification des bactéries est possible sur la base de leur couleur, de leur forme et de leur taille (Kepner et Pratt, 1994).

Par ailleurs, les cellules peuvent être immobilisées sur une membrane après filtration de l'échantillon ; c'est le principe de la cytométrie sur filtre (Métézeau *et al.*, 1994).

#### **IV.6.2.1.3. Comptages en flux**

Le comptage peut être automatisé par la détection des cellules individuelles entraînées par un flux liquide.

Le compteur de Coulter (*Coulter Counter*), système de comptage automatisé de particules au cours de l'aspiration d'un échantillon liquide, existe depuis 1956. La détection des cellules repose sur les changements brutaux de conductivité lors de leur passage dans un orifice. Les micro-organismes peuvent être distingués à condition que leurs tailles diffèrent suffisamment.

La cytométrie de flux est un système similaire fondé sur l'émission ou la diffusion de photons par les cellules lors de leur passage devant un faisceau laser. La différenciation des bactéries peut reposer sur des fluorochromes (comme en épifluorescence) ou sur les paramètres morphologiques influant sur la diffusion de la lumière (Métézeau *et al.*, 1994).

#### **IV.6.2.2. Les mesures indirectes du nombre de micro-organismes**

Elle consiste à évaluer les variations de la densité bactérienne par le dosage de certains composés dont la synthèse est due au métabolisme bactérien (ATPmétrie, dosage du glucose, du CO<sub>2</sub>, etc.), ou par la mesure des variations d'une grandeur physique du milieu comme la densité optique (turbidimétrie) (Charles-Bajard, 1996).

#### IV.6.2.2. 1. Estimation des densités de biomasse

Au lieu de dénombrer les bactéries, il est possible d'estimer la biomasse (masse bactérienne) par unité de volume, c'est-à-dire la densité bactérienne (Meynell et Meynell, 1970). La pesée de la masse sèche est peu sensible, peu reproductible, et, par suite, peu utilisée. Mais il existe des méthodes rapides d'estimation de la densité bactérienne.

La turbidimétrie permet de suivre l'évolution de la densité optique, reliée à la densité bactérienne par la loi de Beer-Lambert. Il existe des systèmes de mesure automatisés autorisant des acquisitions très fréquentes au cours d'une culture en microcuvettes. Ces dispositifs permettent de coupler croissance et mesure en temps réel de la densité bactérienne. Pour toutes les autres méthodes de suivi de croissance, la mesure nécessite en revanche le prélèvement d'un échantillon de culture et son analyse extemporanée. L'avantage majeur de cette méthode est sa simplicité et sa rapidité (Cornu, 2000).

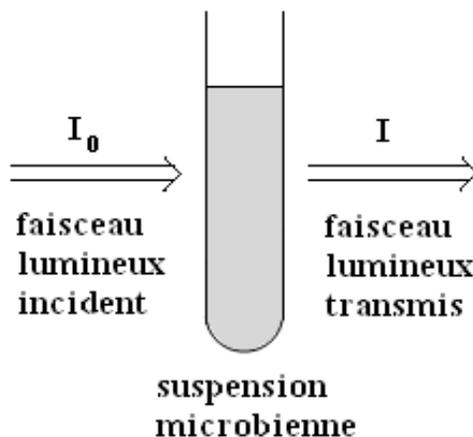


Figure 10 : Technique turbidimétrique de mesure de la biomasse (Delignette-Muller, 1995)

#### V. Elimination biologique des nitrates

Il est intéressant de rappeler dans un premier temps, que la réduction du nitrate ou du nitrite ne conduit pas toujours à la production d'azote moléculaire. En effet, deux autres réactions peuvent se produire et surtout interférer avec la dénitrification : les réactions de réduction assimilatrice et de réduction dissimilatrice en azote ammoniacal.

Les trois voies de réduction du nitrate sont présentées en Figure 11.

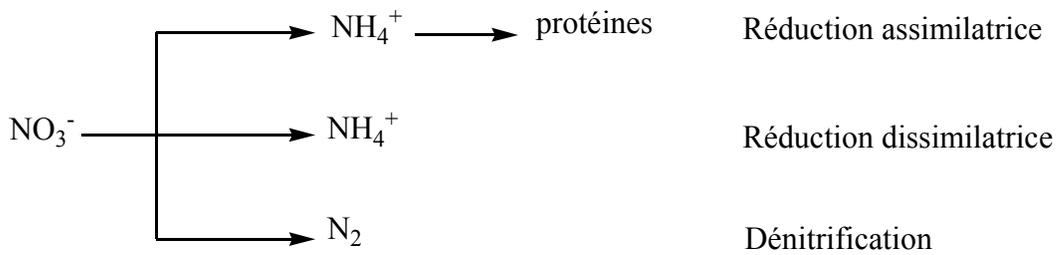


Figure 11 : les voies de la réduction du nitrate

### VI.1. Réduction assimilatrice

En absence d'azote ammoniacal dans le milieu, le nitrate ou le nitrite peuvent être utilisés comme sources d'azote. Cette réduction du nitrate en azote ammoniacal est une réaction endergonique indépendante de la concentration en oxygène et réalisée aussi bien par les Eucaryotes que les Procaryotes tels que des *Azotobacter* ou des *Pseudomonas* (Tiedje, 1988 ; Martin, 1979).

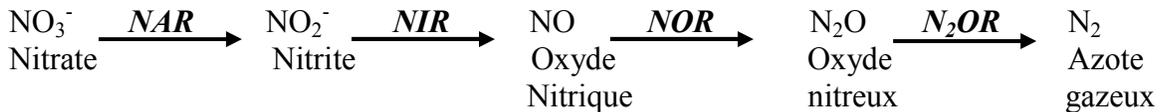
### VI.2. Réduction dissimilatrice en azote ammoniacal

Cette réaction implique la conversion du nitrate en azote ammoniacal qui n'est alors pas incorporé dans une molécule organique. Elle est généralement associée à des zones anoxiques. Cette réduction est réalisée par un nombre de bactéries beaucoup plus important que ce qui était supposé initialement (Stouthamer, 1988 ; Tiedje, 1988). Ces bactéries sont généralement fermentaires, anaérobies strictes comme *Clostridium*, *Desulfovibrio* sp. ou anaérobies facultatives comme *Escherichia coli*, *Klebsiella* ou encore aérobies avec des *Pseudomonas*, *Bacillus* (Tiedje, 1988). La plupart des études a porté sur la réduction du nitrite en azote ammoniacal. Des enzymes ont été purifiées chez *E.coli* (Coleman *et al*, 1978), chez *Desulfovibrio desulfuricans* (Liu et Peck, 1981) et leurs donneurs d'électrons respectifs ont été caractérisés (Steenkamp et Peck, 1980). Il existe également une autre voie de réduction dissimilatrice du nitrate en nitrite très commune chez de nombreux microorganismes. Si la concentration en nitrate est suffisamment faible, alors la réduction peut aboutir à l'azote ammoniacal (Tiedje, 1988).

### VI.3. Dénitrification (Réduction dissimilatrice en azote moléculaire)

#### VI.3.1. Définition

La dénitrification est définie comme étant la réduction du nitrate en azote gazeux avec pour intermédiaires le nitrite, l'oxyde nitrique et l'oxyde nitreux (ou protoxyde d'azote).



Chaque étape étant catalysée par une enzyme particulière (Schwartzbrod et Martin, 1985) : nitrate réductase (NAR), nitrite réductase (NIR), oxyde nitrique réductase (NOR) et enfin oxyde nitreux réductase (N<sub>2</sub>OR). Les micro-organismes responsables de la dénitrification sont des bactéries hétérotrophes anaérobies facultatives qui utilisent le nitrate et le nitrite (au lieu de l'oxygène) comme accepteurs finaux d'électrons dans des conditions anoxiques («respiration des nitrates»). Le procédé requiert un donneur d'électrons qui peut être soit un composé minéral réduit comme le soufre ou l'hydrogène soit un composé organique (glucose, méthanol, éthanol, etc....) (Bougard, 2004).

La dénitrification est un procédé anaérobie, qui utilise l'oxygène des nitrates, pour oxyder, soit la matière organique (dénitrification organotrophe), soit des substances minérales (dénitrification lithotrophe). La dénitrification organotrophe est également hétérotrophe, les bactéries intervenantes utilisent également du carbone organique pour leur synthèse cellulaire. Par contre, les bactéries de la dénitrification lithotrophe sont authotrophes, car elles consomment, pour la synthèse cellulaire, le CO<sub>2</sub> dissous dans l'eau, ou lié sous forme de bicarbonates.

#### VI.3.2. Bactéries de la dénitrification

##### VI.3.2.1 Hétérotrophie

Les bactéries possédant une enzyme (nitrate réductase), capable de transformer les nitrates en nitrites, en anaérobiose ou en anoxie, sont extrêmement nombreuses (les *Enterobacteriaceae*, par exemple), mais toutes ne sont pas capables d'intervenir dans le processus de dénitrification biologique hétérotrophe des eaux.

Les bactéries possédant une enzyme (nitrite réductase), ou un groupe d'enzymes capable de réduire les nitrites jusqu'au stade de l'azote gazeux, sont moins nombreuses, et surtout moins bien connues (un exemple en est *Alcaligenes faecalis*).

Enfin, il existe des germes, comme certaines espèces appartenant au genre *Pseudomonas*, qui possèdent un arsenal enzymatique suffisamment complet pour réduire les nitrates jusqu'au stade de l'azote moléculaire gazeux.

### **VI.3.2.2. Autotrophie**

Les germes dénitrifiants autotrophes, moins nombreux, sont mieux connus, que ce soient les bactéries oxydant le soufre (ou des composés soufrés, comme la pyrite), le fer ou l'hydrogène.

*Thiobacillus denitrificans* est le germe responsable de la dénitrification autotrophe utilisant le soufre, ou la pyrite de fer ( $\text{FeS}_2$ ), comme donneur d'électrons (réducteur). *Ferrobacillus ferrooxydans*, qui utilise le fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) comme donneur d'électron, a d'abord été soupçonné (Lind, 1977), puis identifié dans des essais en pilote de dénitrification par la pyrite (Haider *et al*, 1988). D'autres auteurs ont identifié *Gallionella* comme responsable de la dénitrification de certaines eaux ferrugineuses (Gouy, 1983 ; Gouy *et al.*, 1984).

La dénitrification autotrophe, par l'hydrogène moléculaire gazeux  $\text{H}_2$ , met en jeu d'autres bactéries. *Hydrogenomonas* est la plus connue d'entre elles.

### **VI.3.3. Biochimie de la dénitrification**

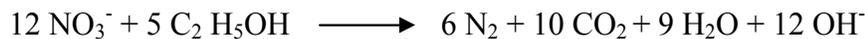
La réduction des nitrates est couplée à l'oxydation soit de composés minéraux comme le soufre ou l'hydrogène soit de composés carbonés organiques (Patureau, 1995).

#### **VI.3.3.1. Dénitrification hétérotrophe**

Ce processus de dénitrification est connu depuis fort longtemps. La dénitrification s'effectue en condition anoxique sous l'action de bactéries hétérotrophes qui utilisent l'oxygène des nitrates pour oxyder un substrat carboné organique. L'oxydation du carbone fournit l'énergie et des électrons. Ces derniers sont transférés le long d'une chaîne du type respiratoire jusqu'à l'accepteur final qui est l'oxygène des nitrates. L'énergie libérée est utilisée par une enzyme, la

nitrate réductase, par l'intermédiaire d'une phosphorylation : il s'agit donc d'un couplage, classique en biologie, oxydation/ phosphorylation.

Les composés organiques carbonés, donneurs d'électrons, sont aussi variés que les bactéries qui les utilisent. Pour le glucose, l'éthanol (Patureau, 1995), les réactions stoechiométriques sont les suivantes :



### VI.3.3.2. Dénitrification autotrophe

La dénitrification autotrophe est un phénomène rencontré parfois, de manière spontanée, dans les eaux souterraines. Elle est quasiment absente dans les eaux de surface, dont la richesse en matières organiques privilégie la dénitrification hétérotrophe.

Les réactions biochimiques sont, bien entendu, différentes, selon que le réducteur est le soufre, la pyrite, ou l'hydrogène gazeux :

- Avec le soufre :

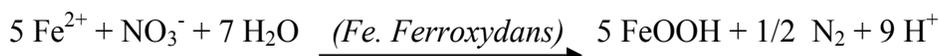


Elle est réalisée par des bactéries du type *Thiobacillus denitrificans* qui ont la capacité de réduire les nitrates en oxydant de nombreux composés soufrés comme  $\text{S}_2^-$ ,  $\text{S}$ ,  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ,  $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$ ,  $\text{SO}_3^{2-}$  et même  $\text{H}_2\text{S}$ .

- Avec la pyrite :



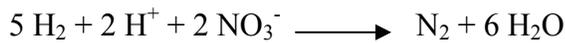
avec la réaction secondaire :



soit le bilan total :



- Avec l'hydrogène :



Elle est réalisée par des bactéries du type *Paracoccus denitrificans* et *Alcaligenes eutrophus* (Tiedje *et al.*, 1982 ; Tiedje, 1988).

### **VI.3.4. Facteurs influençant la dénitrification**

#### **VI.3.4.1. La température**

La dénitrification étant l'œuvre d'un grand nombre d'espèces bactériennes, les conditions optimales de température sont très variables et on rapporte dans la littérature des gammes de tolérance étendues de 5°C à plus de 75°C (Martin, 1979). Aux basses températures, les vitesses de dénitrification sont faibles mais mesurables jusqu'à 3°C (Sutton *et al.*, 1975). La température agit aussi sur la dénitrification via son rôle dans la solubilité et la diffusion de l'oxygène.

#### **VI.3.4.2. Le pH**

Le pH optimum se situe entre 7 et 8,5 (Bougard, 2004). Les variations de pH affectent les produits de la réaction. Aux pH acides (pH<5), il y'a accumulation d'oxydes nitrique et nitreux (Patureau, 1995). La réaction biologique étant consommatrice d'ions H<sup>+</sup>, elle provoque une élévation du pH qui peut devenir inhibitrice aux alentours de pH 9. Il est donc nécessaire de réguler le pH par un acide au cours de tout procédé de dénitrification biologique. Cependant, les travaux de Gee et Kim (2004) montrent que la dénitrification est possible à pH 9,5 dans un réacteur SBR accumulant le nitrite.

#### **VI.3.4.3. L'oxygène**

Les rendements de dénitrification sont affectés par la présence d'oxygène. En effet les bactéries dénitrifiantes n'utilisent le nitrate qu'en absence d'oxygène. Les étapes de la dénitrification sont graduellement inhibées lorsque la concentration en oxygène dissous augmente et c'est d'abord la réduction de l'oxyde nitreux ou protoxyde d'azote (N<sub>2</sub>O) qui est affectée puis celle du nitrite et

enfin celle du nitrate. Cependant, il existe quelques micro-organismes qui sont capables de dénitrifier en aérobiose.

#### **VI.3.4.4. La nature de la source de carbone**

La disponibilité en carbone organique est essentielle à l'activité des bactéries dénitrifiantes hétérotrophes car le substrat carboné fournit l'énergie nécessaire à leur métabolisme et constitue l'élément de base de leurs synthèses cellulaires. Les faibles performances de dénitrification biologique, résultant en général d'une limitation des eaux usées en carbone bioassimilable, imposent l'apport d'une source de carbone exogène afin d'améliorer les performances de traitement. Le méthanol et l'acétate de sodium sont les principaux substrats carbonés synthétiques ayant été utilisés dans le domaine de la dénitrification des eaux résiduaires (Foglar et Briski, 2003 ; Isaacs *et al.*, 1994 ; Louzeiro *et al.*, 2002 ; Nyberg *et al.*, 1992 ; Tam *et al.*, 1992 a et b).

La nature du substrat utilisé peut influencer la cinétique de dénitrification. Ainsi, Moser-Engeler *et al.* (1998) soulignent que les vitesses de dénitrification en présence d'acétate, de propionate ou de butyrate sont quatre fois plus importantes que celles observées avec le méthanol ou l'éthanol.

#### **VI.3.4.5. Le rapport C/N**

Quelle que soit la source de carbone utilisée, la détermination d'une concentration en carbone à fournir par rapport à la concentration en nitrate à éliminer (rapport C/N) est une étape préliminaire obligatoire à toute optimisation de traitement biologique par dénitrification. Lors du traitement de l'azote dans les eaux, le besoin global en DCO (demande chimique en oxygène) à partir du nitrate est de 2,86 mg DCO / mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> soit 1,15 mg DCO / mg N pour la réduction du nitrate en nitrite et 1,71 mg DCO / mg N pour la réduction du nitrite en azote moléculaire, sans prendre en compte les besoins en matière organique pour la croissance cellulaire. De nombreux auteurs (Skrinde et Bhagat, 1982 ; Nyberg *et al.*, 1992 ; Tam *et al.*, 1992 a et b) soulignent qu'indépendamment de la source de carbone utilisée, le rapport DCO/N doit être compris entre 3 et 6 pour avoir de bonnes performances de dénitrification biologique. En étudiant l'influence de la source de carbone sur la dénitrification des lixiviats, Carley et Mavinic (1991) ont observé que le rapport DCO/N minimum pour effectuer une dénitrification complète varie d'une source de carbone à l'autre : 5,9 pour l'acétate de sodium ; 6,2 pour le méthanol et 9 pour le glucose. Cette

variation peut être due à la diversité des rendements de conversion du substrat en biomasse par les micro-organismes.

## VII. Les procédés de traitement de l'azote

Le traitement biologique conventionnel de l'azote ammoniacal en station d'épuration se réalise en deux étapes : oxydation de l'azote ammoniacal par une flore nitrifiante aérobie et réduction du nitrate en azote moléculaire par une flore dénitrifiante en conditions anoxiques. Ces micro-organismes peuvent être utilisés soit en culture libre (système à boues activées), soit en culture fixée (procédés à biofilm).

### VII.1. Les procédés à biomasse libre

#### VII.1.1. Les configurations de base : les systèmes à boues activées

Les installations de traitement des eaux usées ont tout d'abord été conçues pour éliminer la pollution carbonée. La nitrification et la dénitrification se sont ensuite ajoutées aux installations au fur et à mesure de la maîtrise de ces procédés. L'un des premiers schémas proposés (Figure 12) était l'association de trois bassins permettant successivement d'éliminer les pollutions carbonée et azotée.

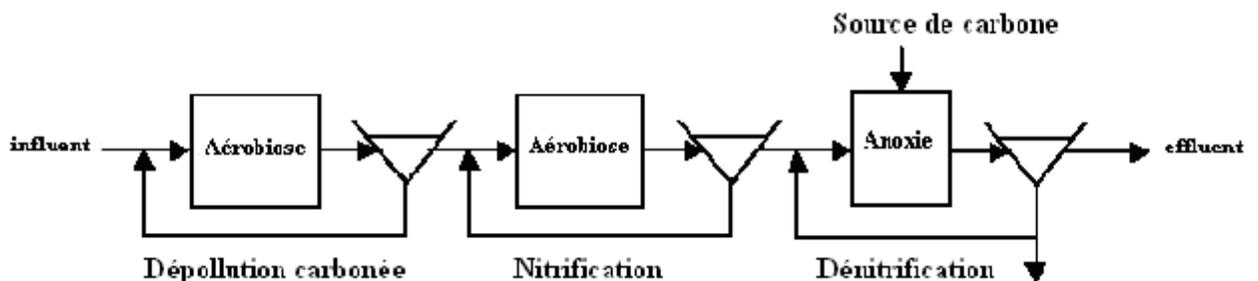


Figure 12 : Procédé classique à boues activées (d'après Barnard *et al.*, 1998)

Ce procédé nécessite l'ajout d'une source de carbone externe au niveau du bassin de dénitrification (méthanol ou acétate). Afin d'éviter l'ajout de carbone organique coûteux, Ludzack-Ettinger ont proposé un système où la dénitrification a lieu en tête et utilise le carbone présent dans l'effluent qui passe successivement dans le bassin anoxique et le bassin aérobie (Figure 13). Le nitrate produit dans la zone aérobie est recyclé pour être dénitrifié dans la zone anoxique.

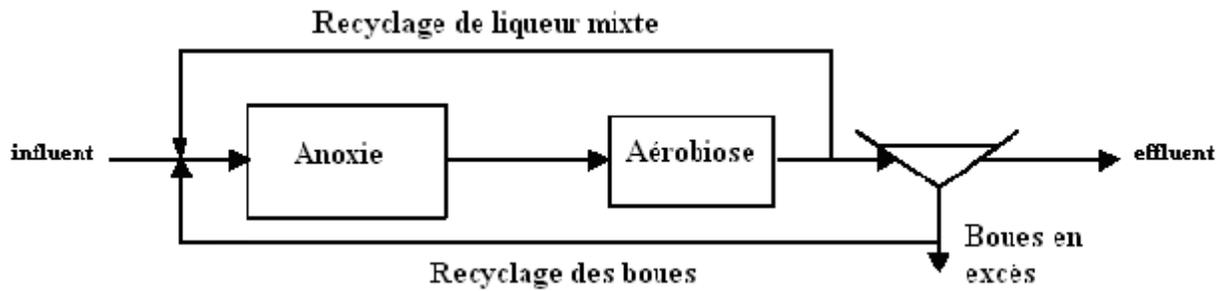


Figure 13 : Configuration de Ludzack-Ettinger modifiée

Cette configuration a l'avantage d'optimiser l'utilisation de la DCO contenue dans l'effluent et de limiter la déstabilisation de la flore nitrifiante par la croissance des hétérotrophes comme dans le modèle précédent. D'autres améliorations ont ensuite été apportées en vue du couplage avec la dépollution phosphorée. Tous ces modèles ont été largement utilisés avec des performances de 85 à 95% d'élimination de l'azote ammoniacal et des concentrations finales inférieures à 10 mg N.L<sup>-1</sup> (Cooper *et al.*, 1994).

Il existe également des systèmes où nitrification et dénitrification ont lieu dans un même réacteur soit dans des zones différentes (cas du chenal d'oxydation) soit en alternant des phases d'aération et de non aération dans une même zone (cas du SBR).

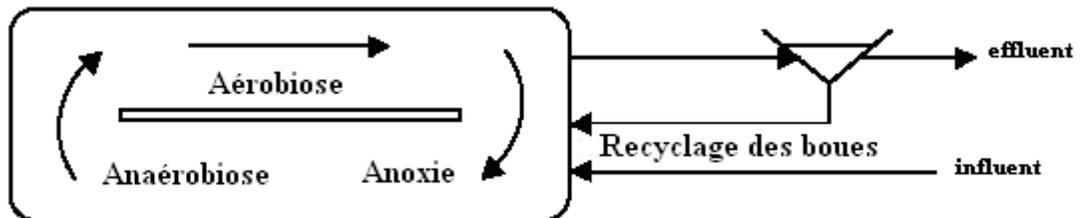


Figure 14 : Chenal d'oxydation

### VII.1.2. Le SBR

Le réacteur SBR (Sequencing Batch Reactor) est un réacteur à biomasse libre, infiniment mélangé dans lequel l'alimentation et le soutirage se font de manière séquentielle. Ce procédé fonctionne par répétition de cycles identiques, chaque cycle étant divisé en plusieurs étapes : l'alimentation, la réaction biologique, la décantation et la vidange (Figure 15).

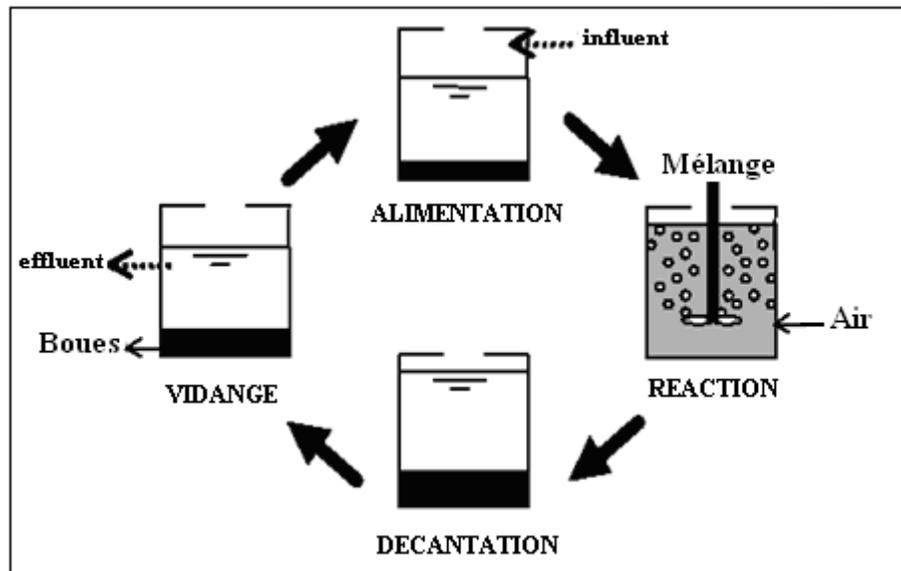


Figure 15 : Principe de fonctionnement du réacteur SBR (Torrijos *et al.*, 2000)

Pour permettre le couplage nitrification/dénitrification dans un même réacteur, l'étape de réaction peut être divisée en deux phases : une phase aérobie pendant laquelle l'azote ammoniacal est transformé en nitrate et une phase d'anoxie en arrêtant l'aération pour la dénitrification. Pour bénéficier au mieux de la DCO contenue dans l'effluent, la phase d'anoxie précède le plus souvent la phase d'aération. Les performances du SBR sont dépendantes de la durée de chaque phase et du volume relatif apporté à chaque cycle. Les débits d'alimentation journaliers permettent de fixer la charge appliquée ainsi que le temps de séjour hydraulique.

Le SBR peut être utilisé pour traiter l'eau en sortie de digesteur anaérobie de boues (dans laquelle il peut rester entre 800 et 1000 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> .L<sup>-1</sup>) avec des efficacités moyennes de 1 kg N.m<sup>-3</sup>.j<sup>-1</sup> (Mossakowska *et al.*, 1997). Il est également utilisé dans le traitement d'effluents industriels comme les lisiers de porc, les effluents d'abattoir et les lixiviats de décharge (Mace et Mata-Alvarez, 2002). Doyle *et al.* (2001) obtiennent une élimination de l'azote de 5,91 kg N .m<sup>-3</sup>.j<sup>-1</sup> dans un SBR traitant un lixiviat de décharge.

### VII.1.3. Les réacteurs à membranes

Pour limiter la perte de biomasse, les systèmes à boues activées peuvent être complétés par une unité de séparation membranaire qui permet de retenir et de recycler la biomasse. Le procédé fonctionne alors comme un réacteur à cellules immobilisées et les concentrations en biomasse dans ce type de système peuvent atteindre 120 kg.m<sup>-3</sup> (Dos Santos *et al.*, 1998). Il peut

fonctionner en aérobiose ou en anaérobiose et est utilisé en nitrification et en dénitrification. En utilisant une configuration avec aération intermittente sur un lixiviat de décharge, Van Dijk et Roncken (1997) ont obtenu des performances d'élimination de l'azote de  $0,7 \text{ kg N.m}^{-3}.\text{j}^{-1}$ .

Afin de combiner les avantages des technologies membranaires (rétention et séparation de la biomasse) et ceux des procédés à cellules immobilisées (concentration élevée en biomasse, grande surface d'échange), un nouveau concept de réacteur a été développé dans lequel les membranes sont le lieu même de la biodégradation. En utilisant des membranes en silicone ou en Teflon, Hirasa *et al.* (1991) et Suzuki *et al.* (1993) rapportent des taux d'élimination de l'azote de l'ordre de  $0,05 \text{ kg N.m}^{-3}.\text{j}^{-1}$ . Cette valeur est faible mais ce concept de réacteurs à membranes est innovant et peut présenter un certains potentiel si la surface spécifique des membranes est augmentée.

Le principal inconvénient des procédés à membranes est le coût élevé de fonctionnement. En effet, il requiert plus d'énergie que les procédés classiques à boues activées notamment pour assurer la recirculation de l'effluent et la perméation à travers la membrane. Le colmatage des membranes est également un frein à cette technologie puisqu'il entraîne à nouveau un surcoût. C'est pourquoi ce type de procédé est peu utilisé dans le traitement de l'azote en station d'épuration.

#### **VII.1.4. Conclusions sur les procédés à biomasse libre**

Les procédés classiques utilisés, de type boues activées, mettent en œuvre des micro-organismes maintenus en suspension sous forme de floccs. Pour respecter le temps de séjour de la biomasse, ces procédés nécessitent des installations très encombrantes et ne peuvent traiter que de faibles charges. Ainsi, ce type de réacteur connaît un certain nombre de limitations liées notamment :

- à une concentration admissible en biomasse peu élevée ( $5 \text{ à } 7 \text{ g.L}^{-1}$ ),
- à une capacité de transfert de l'oxygène vers l'ensemble des bactéries limitée en raison de la taille des floccs,
- à la séparation biomasse-eau traitée par décantation statique qui nécessite des clarificateurs de surface importante.

Il s'est donc avéré nécessaire de développer de nouveaux procédés plus performants, répondant aux nouvelles normes d'assainissement fixées par la communauté européenne. On est ainsi passé,

au cours de ces dernières années, des procédés à cultures floculées vers des procédés à cultures fixées de type lit fixe ou lit mobile. L'utilisation de ces bioréacteurs par rapport aux boues activées présente un certain nombre d'avantages. Ils peuvent notamment travailler à des charges volumiques élevées avec une occupation au sol plus faible dans le cas d'une géométrie colonne. De plus, ils permettent de dissocier le temps de séjour de la phase liquide de celui de la biomasse dans le réacteur puisque celle-ci est fixée. La fixation de bactéries sur le support a aussi pour effet de concentrer la biomasse, d'augmenter son activité, et de diminuer la production de boues.

## VII.2. Les procédés à biomasse fixée

Le principe est basé sur l'utilisation de la capacité naturelle des microorganismes à se fixer sur un support solide, granulaire, fixe ou mobile, immergé ou non (Figure 16).

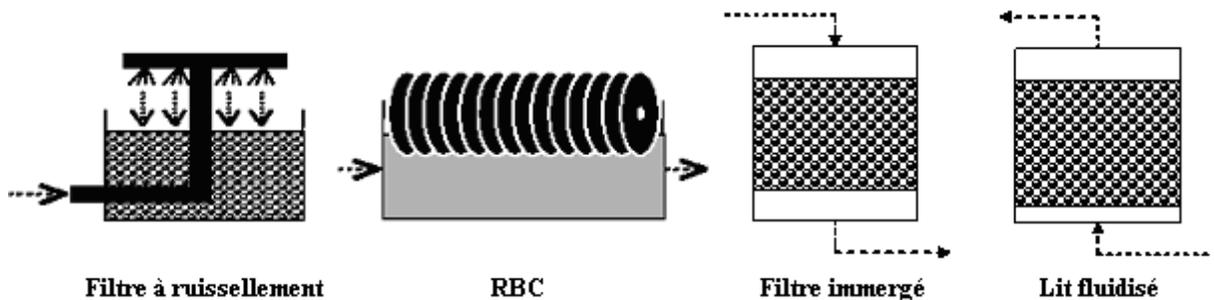


Figure 16 : les principaux modèles de traitement de l'azote par immobilisation de la biomasse

### VII.2.1. Le filtre à ruissellement ou lit bactérien

C'est le système à cellules immobilisées le plus largement utilisé. Dans ce type de réacteur, la biomasse est fixée sur un support solide circulaire surmonté d'un distributeur rotatif. L'effluent à traiter est introduit par le haut et s'écoule par gravité sur le lit bactérien (Figure 16). Les matériaux supports ont tout d'abord été constitués de gros morceaux de pierre avec une surface relative assez limitée ( $50-100 \text{ m}^2 \cdot \text{m}^{-3}$ ). Des supports en plastique à faible densité (polystyrène ou PVC) sont couramment utilisés et offrent des surfaces relatives jusqu'à  $300 \text{ m}^2 \cdot \text{m}^{-3}$  (Chen *et al.*, 1993 ; Capdeville et Rols, 1992 cités par Dos Santos *et al.*, 1998). L'injection d'air pour la nitrification se fait par le fond du lit. Ce procédé permet d'éliminer jusqu'à  $0,6 \text{ kg N} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$  (Andersson *et al.*, 1994).

### **VII.2.2. Les contacteurs biologiques rotatifs (RBC) ou biodisques**

Les procédés à biodisques sont constitués d'une succession de disques (en bois, en matière plastique) plus ou moins immergés (40-60%) dans un réservoir à flux continu, tournant à une vitesse d'environ 1 rpm et sur lesquels s'est développée la biomasse. Le biofilm est donc successivement en contact avec l'air et avec l'effluent à traiter. Ces réacteurs ont une surface d'échange de 150 à 300 m<sup>2</sup>. m<sup>-3</sup> et la concentration en biomasse peut atteindre 30 kg. m<sup>-3</sup>. Ces installations sont surtout conçues pour des procédés aérobies comme la nitrification mais ils peuvent être également utilisées pour la dénitrification par immersion totale des disques. Les rendements d'élimination de l'azote observés dans ce type de procédé sont de l'ordre de 0,2 à 0,5 kg N. m<sup>-3</sup>. j<sup>-1</sup> (Masuda et al., 1991 ; Watanabe et al., 1994 ; Gupta et al., 1994).

### **VII.2.3. Les réacteurs immergés ou biofiltres**

Les réacteurs immergés se composent d'un milieu réactionnel rempli d'un solide sur lequel vont se fixer les bactéries. Le garnissage est un support inerte de nature variée (roche, verre, plastique) et de forme diverse (sphères, cubes, grillage, lamelles). La fixation sur un support poreux granulaire immergé de la biomasse active permet de combiner à la fois la filtration dans la masse et la capacité épuratoire des micro-organismes. Dans ces procédés, la hauteur du filtre varie entre 2 et 4 m et la surface spécifique entre 200 et 1 000 m<sup>2</sup>.m<sup>-3</sup> suivant le type et la taille du support utilisé (Pujol *et al.*, 1992). Ces réacteurs peuvent fonctionner avec flux ascendant ou descendant en aérobie ou anaérobie en injectant ou non de l'air par le bas du réacteur. Le couplage nitrification/dénitrification est souvent réalisé en utilisant deux biofiltres en série avec ajout d'une source de carbone dans le réacteur de dénitrification. Les taux de nitrification et de dénitrification obtenus entre 10 et 25°C avec ce type de procédé vont respectivement de 0,4 à 1,6 kg N. m<sup>-3</sup>. j<sup>-1</sup> et de 0,5 à 3 kg N. m<sup>-3</sup>. j<sup>-1</sup> avec une efficacité globale d'élimination de l'azote de 80-90% (Wang *et al.*, 1992 ; Sagberg et al., 1992 ; Pujol et al., 1992 ; Ceçen et Gönenc, 1995 ; Rogalla et Bourbigot, 1990 ; Han et al., 2001).

La deuxième génération de réacteurs immergés fait intervenir un support flottant (polystyrène, polypropylène, ou polyéthylène) et porte le nom de réacteur à lit flottant. Différentes études ont reporté de meilleures performances d'élimination de l'azote avec ces réacteurs qu'avec les biofiltres classiques (Meaney et Strickland, 1994 ; Daamen *et al.*, 1996 ; Mann *et al.*, 1998).

Garrido et al. (2001) obtiennent un taux de nitrification de  $1,1 \text{ kg N} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$  avec un effluent à  $50 \text{ mg N- NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$ .

#### **VII.2.4. Les réacteurs à lit fluidisé**

La tendance actuelle est à la mise en place de système à lit fluidisé. Les particules support, de taille plus petite qu'en lit fixe (généralement du sable), fluidisées par recirculation continue de l'effluent ou par ajout de gaz, permettent la fixation d'une quantité de biomasse supérieure et la diminution de la fréquence des lavages. Par exemple, la fréquence des lavages pour le lit fluidisé à flux ascendant de la société Anglian Water est de une heure tous les cinq jours. Ces lavages sont réalisés par prélèvement du sable sur les 50 cm supérieurs du lit, lavage et réinjection en haut du lit. Les performances de ces types de procédés peuvent aller jusqu'à 90-95% de dénitrification avec des fréquences de lavage réduites à trois lavages par mois.

#### **VII.2.5. Conclusions sur les procédés à cellules fixées**

Malgré un démarrage lent nécessaire à la colonisation des particules (60 à 100 jours), les procédés à biofilm présentent un grand nombre d'avantages résumés ci-dessous :

- temps de séjour hydraulique découplé de l'âge des boues,
- concentration élevée en biomasse,
- meilleures capacités de traitement,
- réacteurs plus petits,
- séparation de la biomasse plus facile et indépendante de l'efficacité de la sédimentation ou de la centrifugation.

Des études complémentaires ont également montré que les cellules organisées en biofilm sont moins sensibles aux faibles températures (Wijffels et Tramper, 1995 ; Tanaka *et al.*, 1996 cités par Dos Santos *et al.*, 1998) et plus tolérantes aux agents inhibiteurs (Tsai *et al.*, 1986 ; Hunik *et al.*, 1992).

# *Matériels et Méthodes*

# Matériels et Méthodes

---

## **I. Matériel**

### **I.1. Micro-organismes**

Les micro-organismes que nous avons utilisé pour l'inoculation de notre réacteur ont été prélevés des fonds des bassins de dénitrification de la « station d'épuration des eaux usées d'El Menia Constantine » car il est connu que les micro-organismes dénitrifiants sont en concentration appréciable dans les zones des solutions aqueuses où la concentration en oxygène est faible ou nulle.

### **I.2. Milieu de culture**

Pour favoriser la croissance des micro-organismes dénitrifiants, nous avons utilisé un milieu de croissance synthétique qui apporte aux micro-organismes tous les éléments nécessaires au développement cellulaire, sa composition pour 1 litre d'eau bidistillée est la suivante :

Tableau 3 : composition du milieu de culture

Composés	Concentrations
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	$1 \text{ g.L}^{-1}$
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	$1 \text{ g.L}^{-1}$
$\text{KNO}_3$	$1 \text{ g.L}^{-1}$
$\text{NaCl}$	$1 \text{ g.L}^{-1}$
$\text{MgSO}_4$	$0.2 \text{ g.L}^{-1}$
$\text{CaCl}_2$	$0.02 \text{ g.L}^{-1}$
Elements traces	$1 \text{ mL.L}^{-1}$

Tableau 4 : composition de la solution d'éléments traces

Composés	Concentrations
HCl 37%	$6.76 \text{ mL.L}^{-1}$
$\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	$1.5 \text{ g.L}^{-1}$
$\text{H}_3\text{BO}_3$	$0.06 \text{ g.L}^{-1}$
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	$0.1 \text{ g.L}^{-1}$
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$0.12 \text{ g.L}^{-1}$
$\text{ZnCl}_2$	$0.07 \text{ g.L}^{-1}$
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$0.025 \text{ g.L}^{-1}$
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$0.015 \text{ g.L}^{-1}$
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$0.025 \text{ g.L}^{-1}$
EDTA	$5.2 \text{ g.L}^{-1}$

### I.3. Source de carbone et d'énergie

Comme il est déjà mentionné dans la première partie, la dénitrification est réalisée par des bactéries hétérotrophes, qui ont besoin d'un apport de carbone organique pour leur métabolisme.

Le méthanol (MeOH) ou le succinate de sodium, unique source de carbone et d'énergie, sont ajoutés séparément dans le milieu de dénitrification ce qui permet leur métabolisme et une production de biomasse, avec le nitrate de potassium (KNO<sub>3</sub>) comme source oxydée unique d'azote.

Tableau 5 : les caractéristiques physico-chimiques du MeOH

Source de carbone	MeOH
Formule chimique	CH <sub>3</sub> OH
État physique	Liquide fluide
Poids moléculaire	32 g.mol <sup>-1</sup>
Densité	0.791 g.cm <sup>-3</sup> à 20°C
Point d'ébullition	64.5°C
Point de fusion	- 97.8°C
Concentration de saturation	166 g.m <sup>-3</sup>
Pression de vapeur	128 mbar à 20°C
Mobilité	COV : 100 %

Tableau 6 : les caractéristiques physico-chimiques du succinate de sodium

Source de carbone	Succinate de sodium
Formule moléculaire	$C_4H_4Na_2O_4$
Formule structurale	$NaOOCCH_2CH_2COONa$
État physique	Poudre blanc
Point d'ébullition	$\geq 400^\circ C$
Point de fusion	$\geq 400^\circ C$
Densité	$1.886 \text{ g.cm}^{-3}$ à $25^\circ C$
Tension de vapeur	$<0.00015 \text{ hPa}$ à $100^\circ C$
Solubilité dans l'eau	$>100 \text{ g.L}^{-1}$ à $25^\circ C$

#### I.4. Préparation des solutions

L'eau utilisée pour la préparation des solutions et pour les dilutions est de l'eau bidistillée.

#### I.5. Conservation des échantillons

Certaines mesures doivent être effectuées in situ (la mesure de la température, du pH) ou aussitôt que possible (Nitrates, Carbone organique). Les échantillons sont prélevés dans des flacons en polyéthylène (paramètres chimiques).

Entre le prélèvement et l'analyse, de nombreuses transformations physiques, chimiques ou microbiologiques, peuvent avoir lieu. Donc pour stabiliser un échantillon ou du moins ralentir les réactions éventuelles, il est recommandé de prendre pour chaque analyses des précautions particulières et parfois d'ajouter des agents chimiques afin d'éviter certaines transformations ou certaines interférences au moment de l'analyse.

Généralement, il est bon de réfrigérer l'échantillon à  $4^\circ C$  notamment pour limiter l'activité biologique.

## **I.6. pH-métrie**

Les mesures du pH ont été réalisées à l'aide d'un pH-mètre «HANNA instruments» muni d'une électrode de verre. Le pH-mètre est préalablement étalonné avec des solutions tampons (pH = 4, 7 et 10).

## **II. Méthodes d'analyses**

### **II.1. Mesure de la biomasse**

#### **II.1.1. Spectrophotométrie**

La mesure de l'opacification du milieu de culture est une technique très prisée pour mesurer la biomasse, c'est-à-dire la masse bactérienne sèche présente par unité de volume ( $ML^{-3}$ ). Il est en effet possible d'utiliser une loi, analogue à celle de Beer-Lambert, exprimant la proportionnalité entre la contribution bactérienne à l'absorbance du milieu A et la biomasse B présente en solution,

$$A = \text{Log} (I_0 / I_2) - \text{Log} (I_0 / I_1) = \text{Log} (I_1 / I_2) = \alpha d B$$

Où :  $I_0$  représente l'intensité lumineuse du rayon incident,

$I_1$  l'intensité du rayon transmis en l'absence de biomasse,

$I_2$  l'intensité du rayon transmis en présence de biomasse,

d la longueur du trajet optique, et  $\alpha$  un coefficient de proportionnalité.

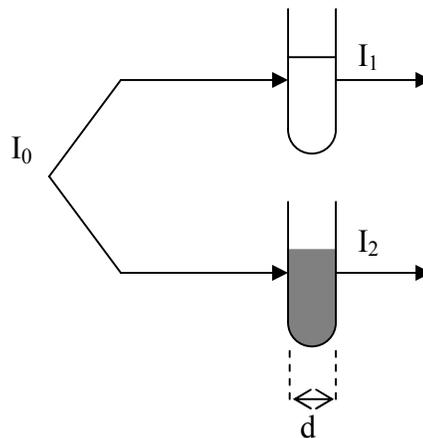


Figure 17 : Schéma pour définir la densité optique du milieu (Lobry J, 1991).

L'absorbance est rapportée conventionnellement à un trajet optique de 1 cm pour définir la densité optique (DO) du milieu :

$$DO = (1/d) \text{Log} (I_1 / I_2) = \alpha B$$

L'absorbance ou la turbidité d'une culture est souvent déterminé par spectrophotométrie, l'échantillon est placé dans une cuvette ensuite on place la cuvette dans le spectrophotomètre, les micro-organismes jouent le rôle d'une barrière physique pour la lumière. Si on choisi une longueur d'onde bien déterminée le taux de la lumière transmise par l'échantillon sera proportionnel à la quantité des microorganismes présents dans l'échantillon.

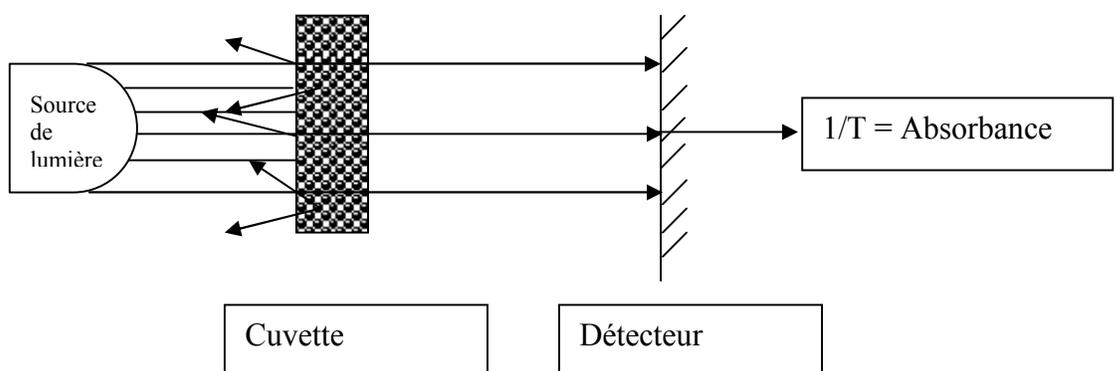


Figure 18 : Schéma de l'absorbance

L'absorbance de la culture est généralement mesurée à une longueur d'onde autour de 600 nm. Il faut faire attention dans le cas où le milieu est très concentré (absorbance > 2) dans ce cas, la courbe qui relie la masse cellulaire avec l'absorbance est non linéaire, donc il faut faire une dilution de l'échantillon.

La densité optique d'une culture cellulaire est mesurée par l'absorbance à une longueur d'onde de 600 nm avec un spectrophotomètre UV-Visible 320 « safas monaco ».

### **II.1.2. dosage de la biomasse**

L'augmentation du nombre des microorganismes dans la solution entraîne une augmentation de la turbidité de la solution. Ce nombre est proportionnel à la densité optique de la solution. Les mesures des densités optiques pour la détermination de la concentration des microorganismes sont réalisées à 600 nanomètres. Plusieurs solutions de différentes concentrations en microorganismes sont préparées. Après mesure de leurs densités optiques à 600 nanomètres, elles sont introduites dans une étuve à 105 °C jusqu'à l'évaporation totale de l'eau contenue dans les échantillons. Une droite d'étalonnage est réalisée reliant la densité optique de la solution (à 600 nanomètres) à la masse des microorganismes présents dans la solution (annexe 1).

### **II.2. Dosage des nitrates**

Les échantillons sont au préalable centrifugés à 7000 rpm par une centrifugeuse de marque « SIGMA 1 - 15 », à température ambiante pendant 10 minutes. Le surnageant récupéré est dilué si nécessaire selon les méthodes de dosage.

Les nitrates sont dosés par colorimétrie avec la méthode de salicylate de sodium (Rodier, 1978). Le protocole expérimental est présenté en annexe 2.

### **III. Les conditions opératoires**

Les cultures sont réalisées en réacteurs batch (bouteilles en verre scellées d'un volume totale de 500 mL) contenant 200 mL du milieu nutritif et chargées avec différentes concentrations de méthanol ou de succinate de sodium comme source unique de carbone et d'énergie. Elles ont été

par la suite inoculées par 5 mL de consortium provenant d'un mélange de boues activées prélevées dans la station d'épuration d'El Menia-Constantine.

Les réacteurs sont ensuite hermétiquement fermés et maintenus à 35°C.

Des prélèvements horaires d'échantillons liquides sont effectués à partir des réacteurs, à l'aide d'une seringue sans les ouvrir, afin de réaliser le suivi de la croissance bactérienne, les concentrations en nitrates et le pH.

Ces prélèvements d'un volume de 5 mL, sont répartis dans deux tubes comme suit :

- 3,5 mL de volume total permet la lecture de la densité optique suivie de la mesure du pH.
- Le volume restant (1,5 mL) est injecté dans un tube fermé, il subit alors une centrifugation à 7000 rpm pendant 10 min afin d'obtenir un surnageant exempt de cellules microbiennes. Les échantillons conservés dans des flacons à 4°C permettent ainsi la mesure de la concentration en nitrates par la méthode de salicylate de sodium.



Figure 19 : Photographie d'un réacteur « batch ».

## *Résultats et Discussion*

## Résultats et Discussion

### I. Suivi de la réaction de dénitrification par l'utilisation d'une culture mixte en présence du méthanol comme source de carbone

Dans cette partie nous avons suivi l'évolution de la croissance bactérienne et la concentration des nitrates en fonction du temps en choisissant  $500 \text{ mg.L}^{-1}$  du méthanol comme source unique de carbone et d'énergie avec le nitrate comme accepteur final d'électrons ( $\text{N-NO}_3^- = 138.5 \text{ mg.L}^{-1}$ ). Le bioréacteur est maintenu à  $35^\circ\text{C}$ .

Au cours de l'incubation nous avons observé :

- L'augmentation de l'opacité du milieu qui s'explique par la multiplication des microorganismes.
- L'apparition de bulles de gaz qui s'explique par la réaction suivante :



Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 20. Elle montre la production de la biomasse (D.O à 600 nm) en fonction du temps d'incubation.

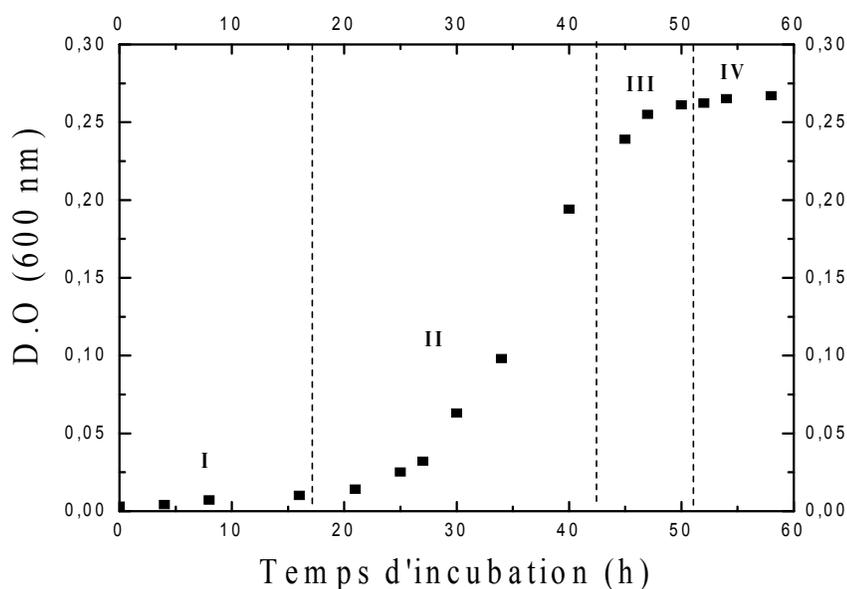


Figure 20 : Cinétique de la croissance bactérienne en présence du méthanol comme source de carbone.

La figure 20 montre que la cinétique de croissance suit quatre phases principales :

I- La phase de latence durant laquelle le nombre de bactéries reste constant, elle correspond à une période où les bactéries inoculées dans le milieu s'adaptent à leur nouvel environnement et synthétisent les enzymes nécessaires à la métabolisation des substrats disponibles.

II- La phase de croissance exponentielle, dite aussi phase de croissance maximale; où le taux de croissance par organisme reste constant, en d'autres termes, le temps de génération moyen est maintenu à son minimum tout au long de cette période.

III- La phase de décélération ou phase de freinage, l'insuffisance de nutriment entraîne un ralentissement de la croissance bactérienne. Le taux de croissance par organisme décroît, c'est-à-dire que le temps de génération moyen augmente. On observe alors un début de plafonnement de la masse cellulaire.

IV- La phase stationnaire, il n'y a aucune augmentation du nombre de bactéries. Elle signifie qu'à ce moment, les bactéries utilisent les réserves accumulées précédemment. Le taux de croissance par organisme est nul et le temps de génération moyen infini.

La croissance bactérienne est accompagnée d'une consommation proportionnelle d'ions nitrates comme la montre la figure 21 qui représente la variation de la concentration des nitrates en fonction du temps.

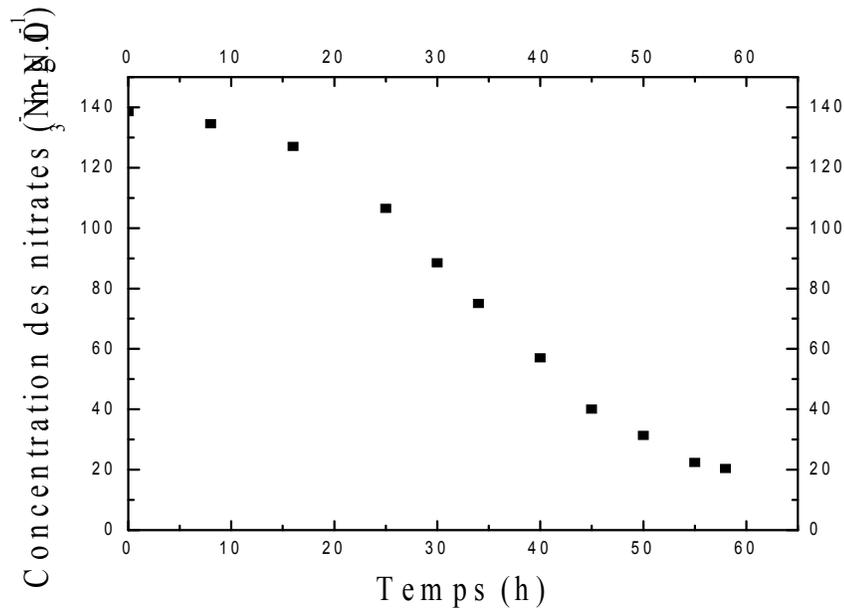


Figure 21 : Cinétique de la réduction des nitrates en présence du méthanol comme source de carbone.

La croissance bactérienne s'arrête après la consommation presque totale des nitrates. Ceci montre que la dénitrification n'est qu'une alternative à la respiration classique de l'oxygène. Ainsi les nitrates sont utilisés comme accepteurs finaux d'électrons qui sont transférés le long de la chaîne respiratoire (Tiedje, 1988).

La vitesse moyenne de disparition des nitrates durant la phase de croissance exponentielle est :  $V_{\text{moy}} = 3,50 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ .

Une concentration en nitrates inférieure à  $50 \text{ mg.L}^{-1}$  (concentration tolérée par l'Organisation Mondiale de la Santé) est obtenue après 45 heures de traitement.

La dénitrification s'arrête après 58 heures de traitement. La concentration des nitrates est alors de  $20.4 \text{ mg.L}^{-1}$ , ce qui donne un taux de dénitrification de 85.27 %.

### I.1. Suivi du pH du milieu réactionnel au cours de la dénitrification

Au cours de la réaction de dégradation nous avons observé une très légère augmentation du pH dans notre réacteur qui est de 7.01 à 7.18 car la réaction biologique est consommatrice de protons.

Ceci s'explique par l'utilisation d'un milieu nutritif suffisamment tamponné.

La variation du pH au cours de la réaction de dégradation est présentée sur la Figure 22.

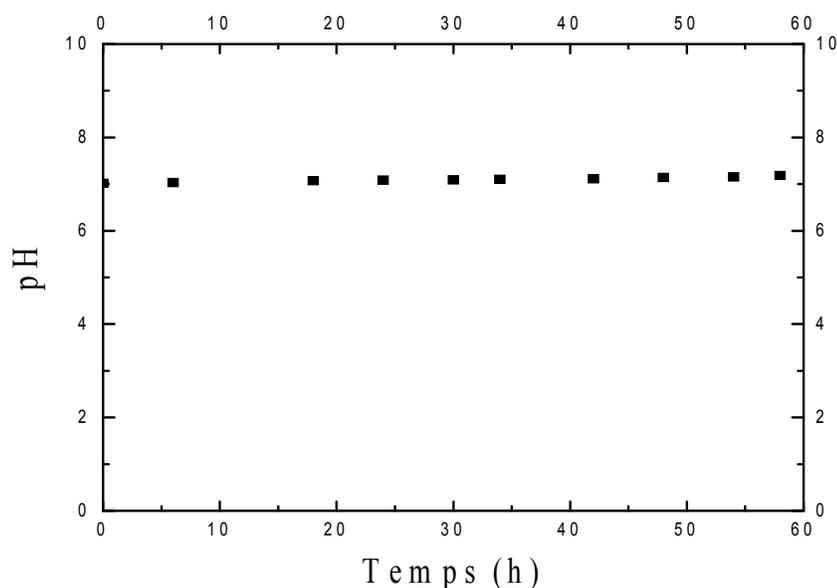


Figure 22 : Evolution du pH au cours de la dénitrification en présence du méthanol comme source de carbone.

### I.2. Influence de la concentration initiale de nitrate

Afin de déterminer l'effet de l'accepteur d'électrons sur la croissance bactérienne et la vitesse de la réaction de dénitrification, les bactéries ont été inoculées et cultivées dans des milieux de cultures contenant différentes concentrations initiales en  $N-NO_3^-$  de 0, 138.5, 415.4 et 692.4  $mg.L^{-1}$ . Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 23.

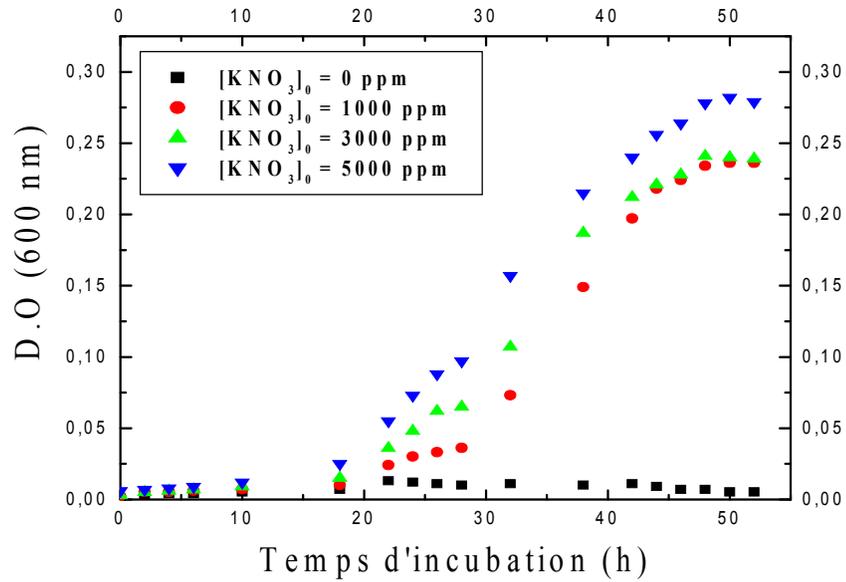


Figure 23 : Influence de la concentration initiale des nitrates sur la croissance bactérienne en présence du méthanol comme source de carbone.

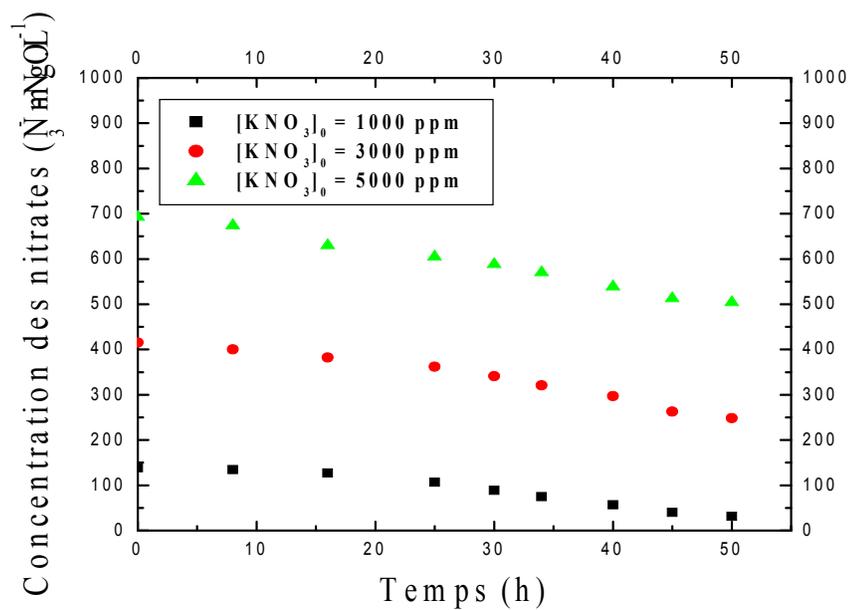


Figure 24 : Influence de la concentration initiale des nitrates sur la cinétique de dénitrification en présence du méthanol comme source de carbone.

La figure 23 montre et avec toutes les concentrations initiales testées des nitrates que la croissance bactérienne évolue dans des étapes similaires. Cependant, l'absence des nitrates n'a entraîné aucune croissance ou synthèse des cellules.

La figure 24 montre le suivi de l'évolution de la concentration des nitrates en fonction du temps pour les différentes concentrations testées, 27.21 % seulement de disparition ont été notés pour  $[KNO_3]_0 = 5 \text{ g.L}^{-1}$  avec une vitesse moyenne de  $4.40 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  alors qu'avec les autres concentrations : 3 et  $1 \text{ g.L}^{-1}$ , les taux étaient : 40.18 %, 77.4 % avec des vitesses de dénitrification de  $4.34$  et  $3.30 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  respectivement.

Nous concluons que l'efficacité d'élimination des nitrates en présence du méthanol comme source de carbone repose sur une concentration de  $[KNO_3]_0 = 1 \text{ g.L}^{-1}$ .

## **II. Suivi de la réaction de dénitrification par l'utilisation d'une culture mixte en présence du succinate de sodium comme source de carbone**

### **II.1. Suivi de la réaction de dénitrification en présence de 500 ppm du succinate de sodium comme source de carbone**

Dans un premier temps, nous avons jugé utile de montrer la capacité de nos microorganismes (boues activées) à réduire les nitrates dans un milieu synthétique.

Pour cela nous avons suivi l'évolution de la croissance bactérienne et la concentration des nitrates en fonction du temps en choisissant  $500 \text{ mg.L}^{-1}$  du succinate de sodium comme source unique de carbone et d'énergie avec le nitrate comme accepteur final d'électron ( $N-NO_3^- = 150 \text{ mg.L}^{-1}$ ).

Les résultats obtenus sont représentés sur les figures 25 et 26 respectivement.

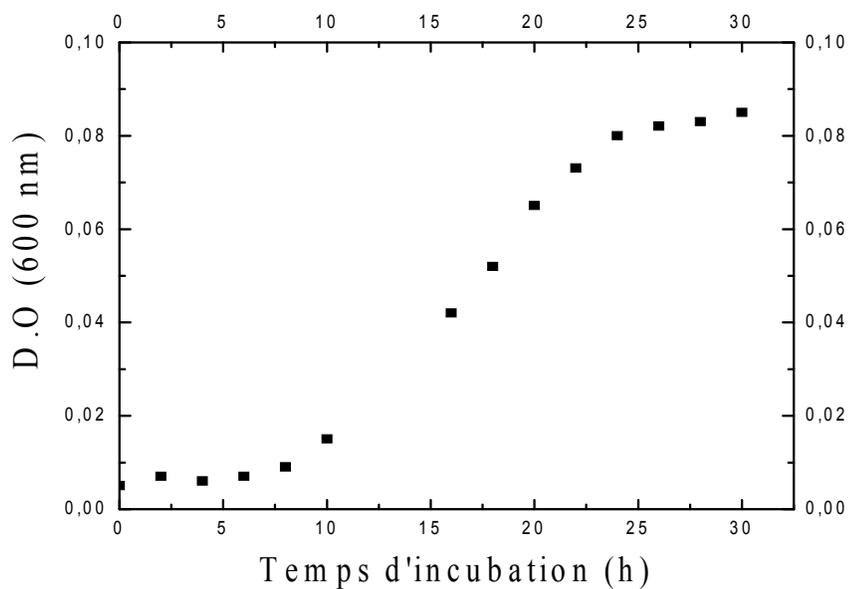


Figure 25 : Cinétique de la croissance bactérienne en présence de 500 ppm du succinate de sodium comme source de carbone.

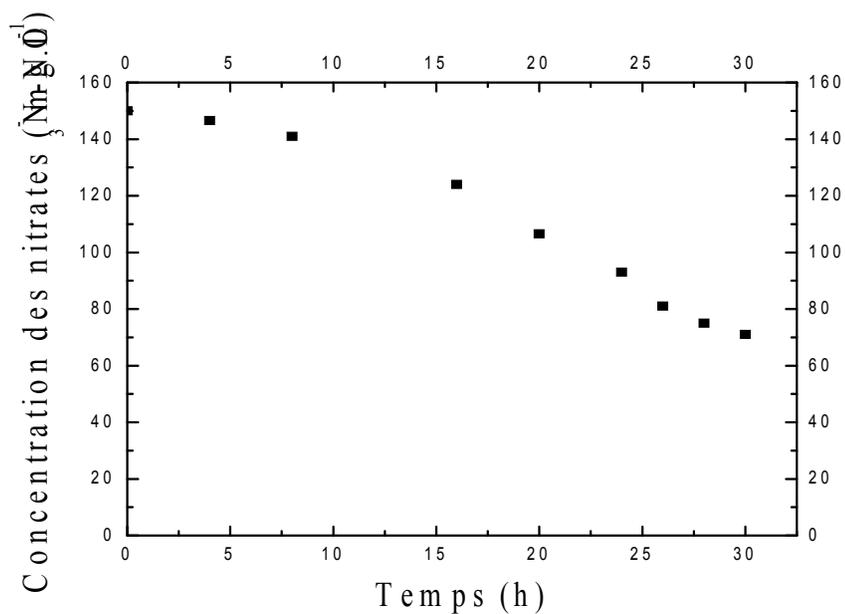


Figure 26 : Cinétique de la réduction des nitrates en présence de 500 ppm du succinate de sodium comme source de carbone.

D'après la Figure 26 on a observé une inhibition de dénitrification avec une concentration de 71mg/l de  $\text{NO}_3^- > 50 \text{ mg/l}$  (la concentration toléré par l'Organisation Mondiale de la Santé) et un taux de réduction des nitrates égale à 52.67 %.

Le pH évolue peu au cours du traitement (Figure 27).

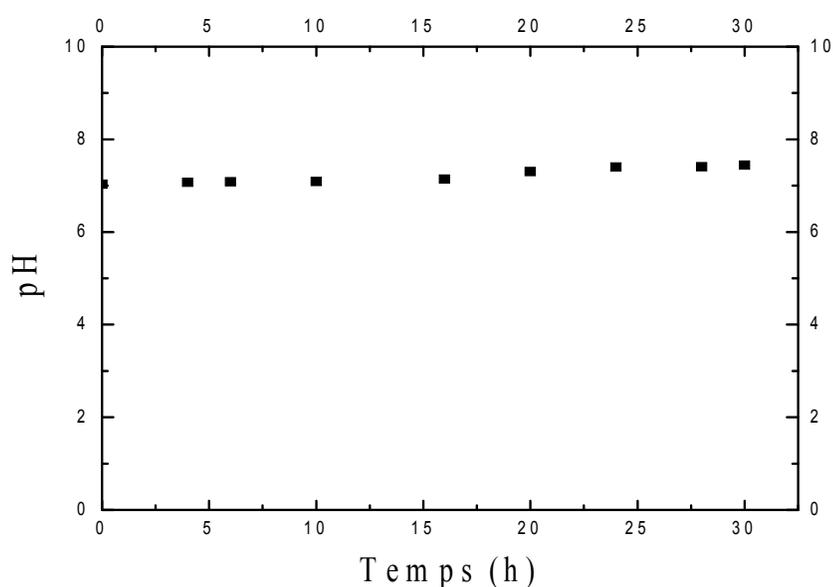


Figure 27 : Variation du pH au cours de la réaction de la dénitrification en présence de 500 ppm du succinate de sodium comme source de carbone.

## **II.2. Suivi de la réaction de dénitrification en présence de 1000 ppm du succinate de sodium comme source de carbone**

Pour augmenter le rendement de la réaction de dénitrification, nous avons augmenté la concentration de la source de carbone et d'énergie à 1000 mg/l. Les résultats sont représentés ci dessous.

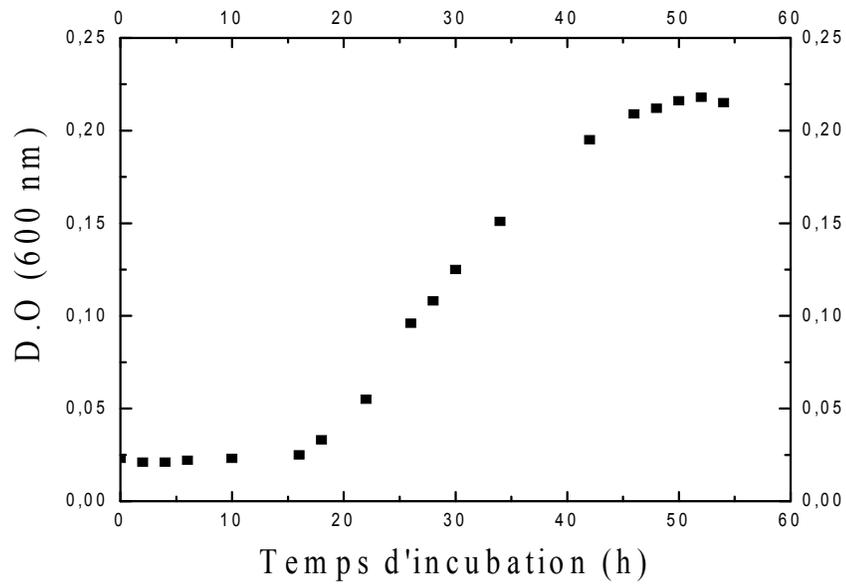


Figure 28 : Cinétique de la croissance bactérienne en présence de 1000 ppm du succinate de sodium comme source de carbone.

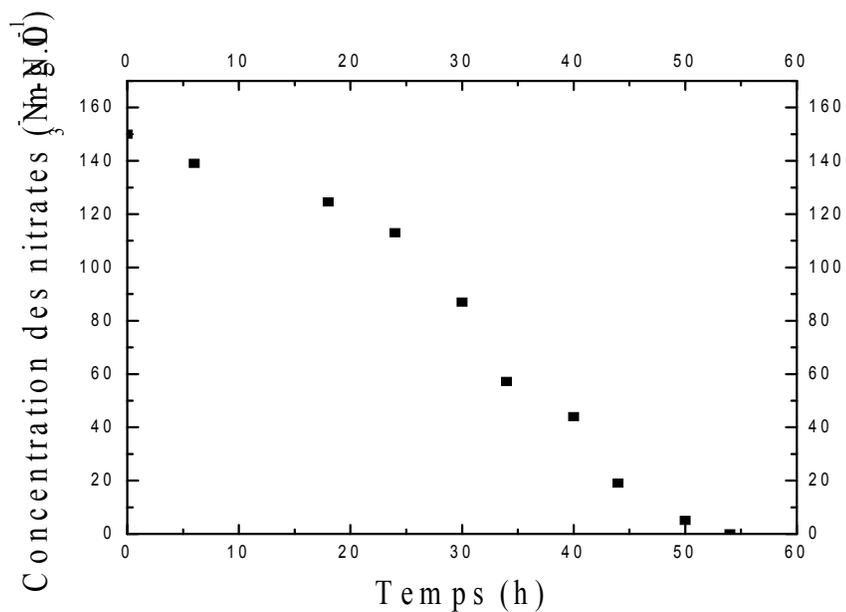
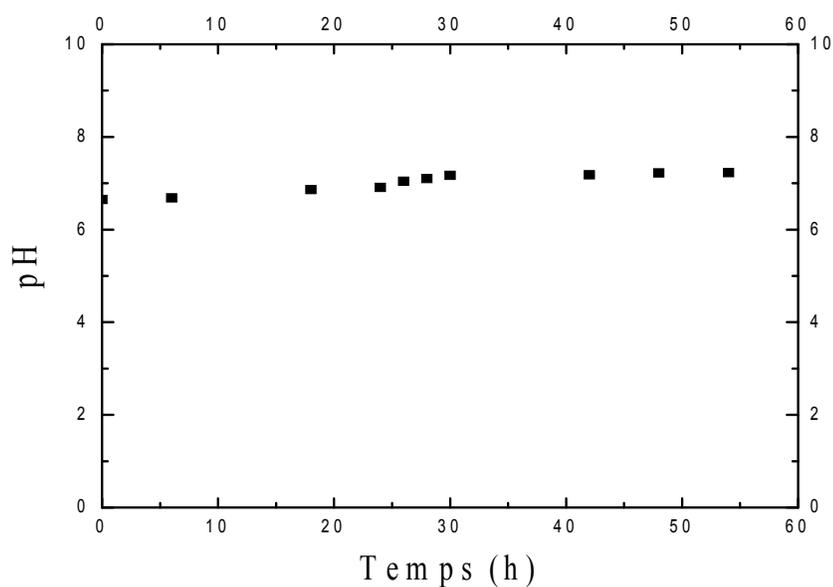


Figure 29 : Cinétique de la réduction des nitrates en présence de 1000 ppm du succinate de sodium comme source de carbone.

Après 54 heures de traitement, une quantité élevée de biomasse a été observée (Figure 28) suivie d'une élimination complète des nitrates (Figure 29) avec une vitesse moyenne de dénitrification égale à  $7.45 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ .

Nous avons remarqué une légère augmentation du pH du milieu. Dans notre cas il passe de 6.65 à 7.23 (Figure 30).



**Figure 30** : Variation du pH au cours de la réaction de la dénitrification en présence de 1000 ppm du succinate de sodium comme source de carbone.

Dans un second temps, nous avons étudié les paramètres de contrôle de la dénitrification (concentration initiale de la source de carbone, rapport C/N, concentration en chlorure).

### II.2.1. Influence de la concentration initiale de la source de carbone

Plusieurs expériences ont été menées afin d'évaluer dans nos conditions opératoires l'influence de la concentration initiale de la source de carbone sur le phénomène de la dénitrification. Les autres paramètres étant fixes.

Durant nos expériences, nous avons mesuré en concomitance la réduction des nitrates, le pH et la croissance bactérienne en fonction du temps. Les expériences ont été réalisées avec les concentrations initiales en Succinate de sodium de 1000, 2000 et 3000 ppm. Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 31.

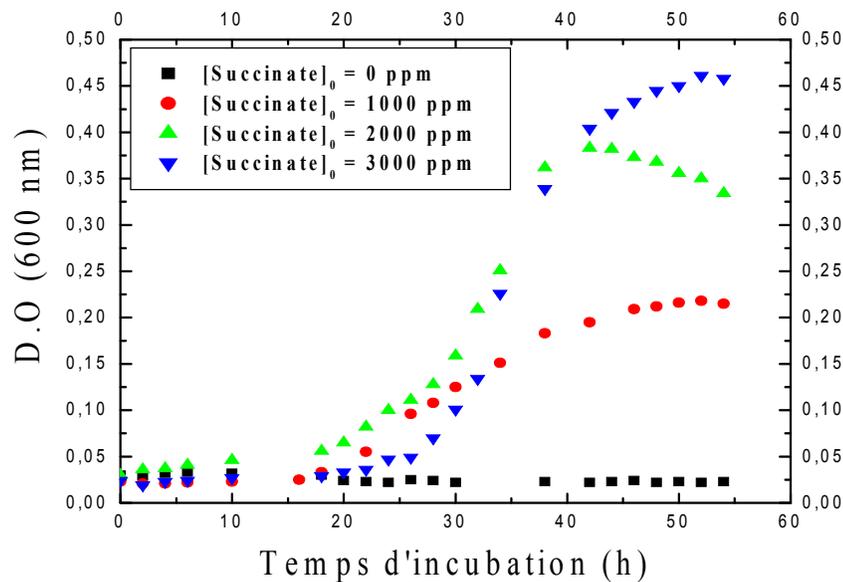


Figure 31 : Influence de la concentration initiale du succinate de sodium sur la croissance bactérienne.

L'augmentation de la concentration initiale de succinate de sodium induit un meilleur rendement de conversion de ce dernier en biomasse et une réduction concomitante significative du temps nécessaire pour l'élimination totale des nitrates, cependant il y a une augmentation du temps de latence, alors qu'en leur absence, aucune croissance n'est observée.

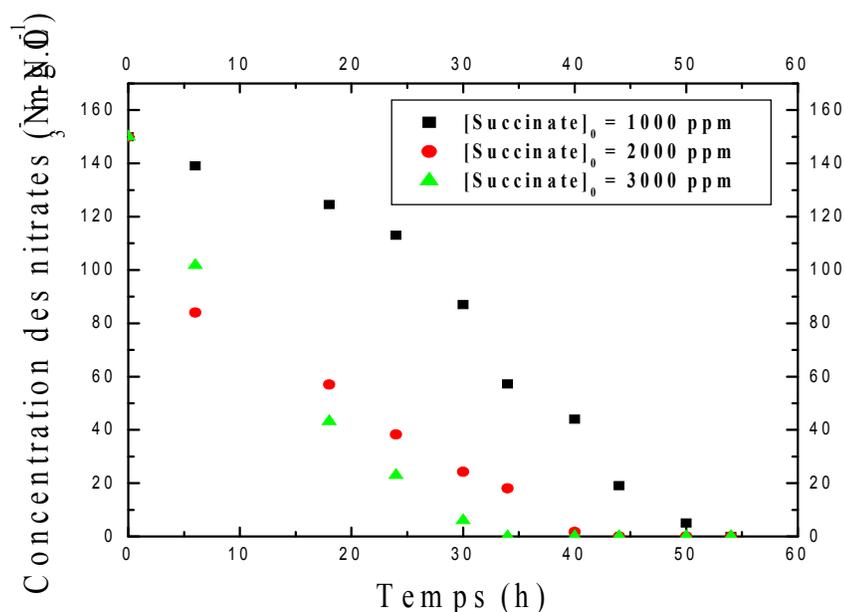


Figure 32 : Influence de la concentration initiale du succinate de sodium sur la réduction des nitrates.

La réaction de dénitrification étant consommatrice d'ions  $H^+$ , le pH a tendance à remonter (légère basicité) (Figure 33).

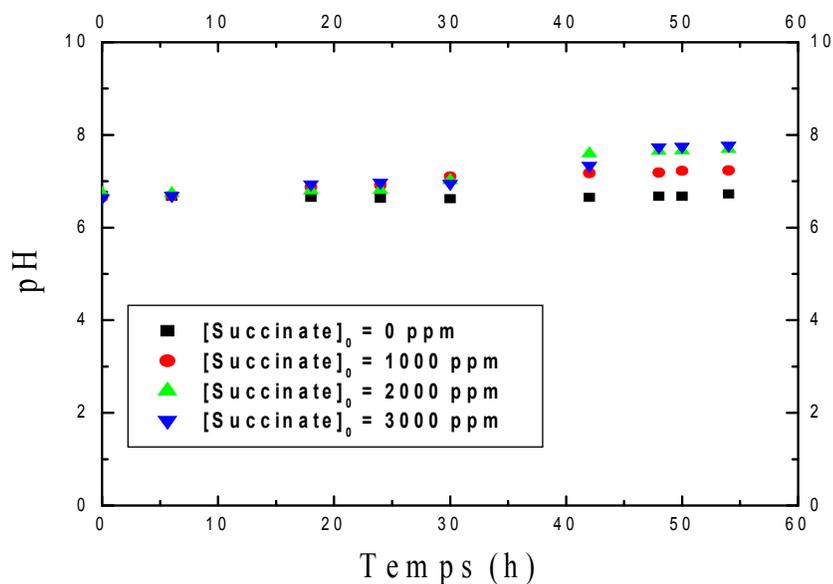


Figure 33 : Influence de la concentration initiale du succinate de sodium sur le pH.

### II.2.2. Influence du rapport C/N

Pour évaluer l'influence du rapport C/N, nous avons fait varier le rapport ( $\text{Substrat}_{\text{entrée}} / \text{Nitrate}_{\text{entrée}}$ ) : la quantité du nitrate est ajustée en fonction de celle de carbone = 177.78 ppm selon le Tableau 7.

Tableau 7 : Les concentrations équivalentes des différentes valeurs du rapport C/N.

C/N	KNO <sub>3</sub> (ppm)
1.3	1000
0.4	3000
0.3	5000

Les résultats sont représentés sur la figure 34.

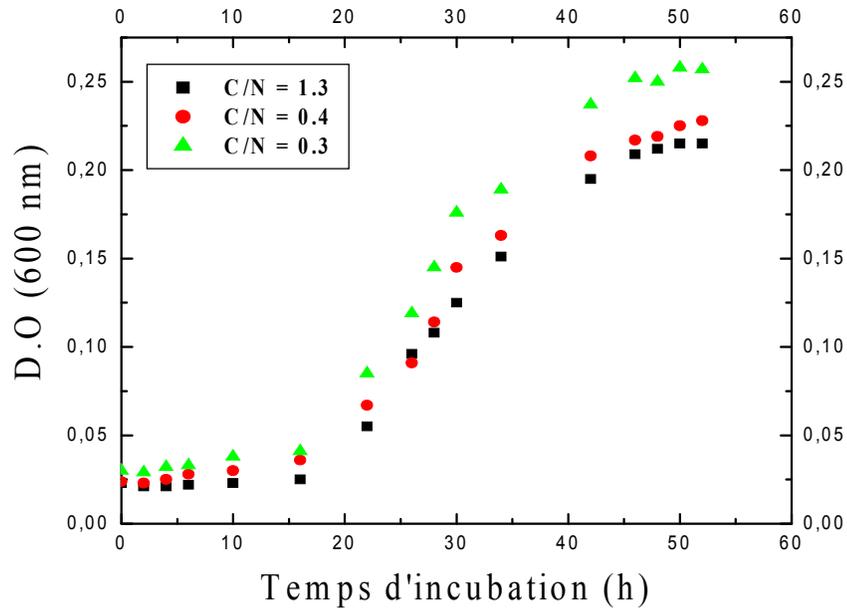


Figure 34 : Influence du rapport C/N sur la croissance bactérienne.

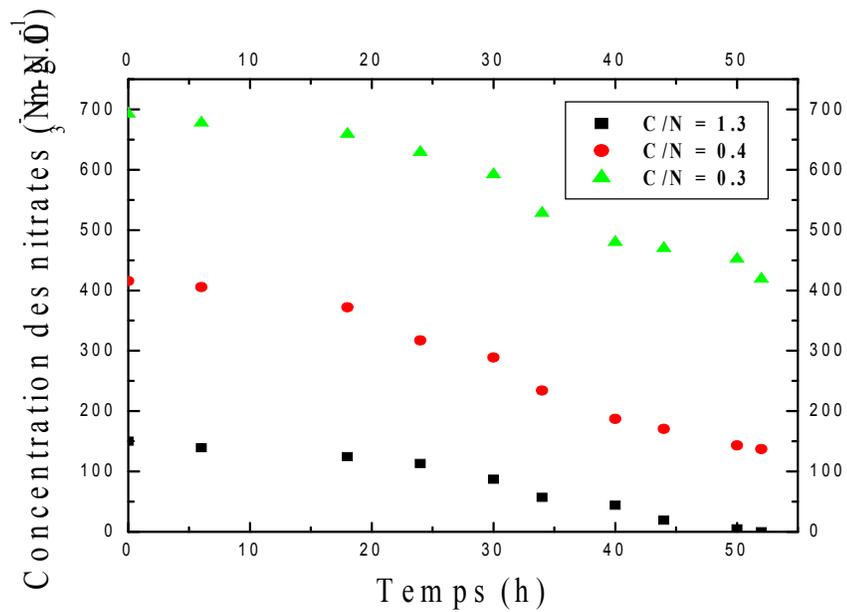


Figure 35 : Influence du rapport C/N sur la réduction des nitrates.

La figure 34 montre que le rapport C/N influe inversement sur la cinétique de croissance bactérienne, c'est-à-dire plus le rapport est élevé plus la production de la biomasse est faible.

La Figure 35 montre et avec un rapport C/N = 1.3, une élimination complète des nitrates au bout de 52 heures. Cependant, une inhibition de dénitrification a été remarquée avec les autres rapports (C/N= 0.4, 0.3). Les taux de réduction des nitrates étaient : 67 %, 39.5 % respectivement.

Nous concluons qu'un rapport pondéral égale à 1.3 est optimal pour réaliser une meilleure dénitrification.

### **II.2.3. Influence des chlorures**

Notre travail consiste à un traitement biologique des eaux usées ou eaux souterraines qui peuvent être salées. Afin de s'assurer de l'efficacité de notre méthode, il faut étudier l'influence des chlorures (contenants dans les eaux salées) sur la croissance bactérienne.

La figure 36 montre le suivi de la cinétique de croissance en présence de différente concentration de NaCl.

Les micro-organismes présentent des capacités de croissance en absence des chlorures. En effet, la plus forte concentration testée, 2 % (m/v) NaCl du milieu de culture, diminue d'une façon remarquable la cinétique de croissance (les micro-organismes peuvent se développent après un temps de latence de 34 heures).

En ce qui concerne l'influence des chlorures sur le pH (Figure 37), nous avons observé peu de variation des valeurs du pH, cependant pour la concentration la plus élevée en chlorures (20g/l), les valeurs du pH sont les plus basses ce qui confirme le résultat obtenu sur la figure 36, c'est-à-dire que la croissance bactérienne est lente pour cette valeur, donc il y a moins de consommation d'ions H<sup>+</sup>.

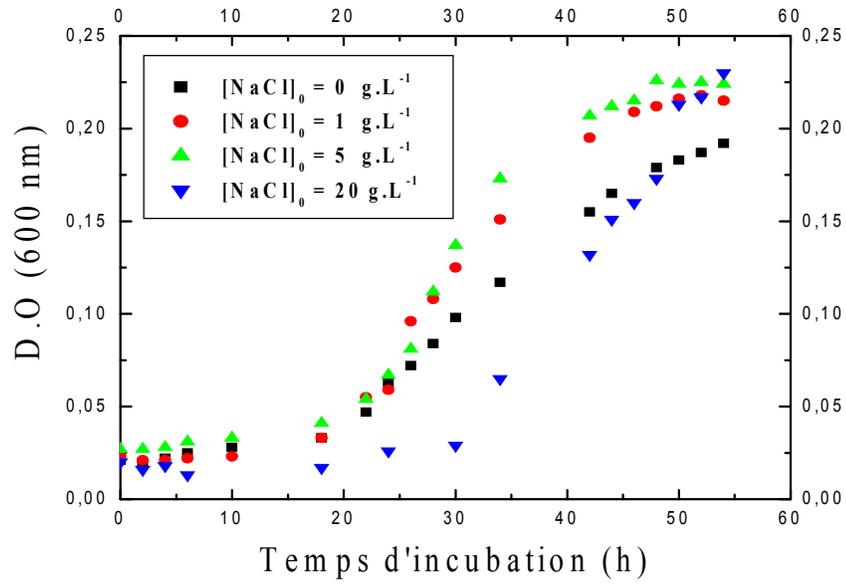


Figure 36 : Influence des chlorures sur la croissance bactérienne.

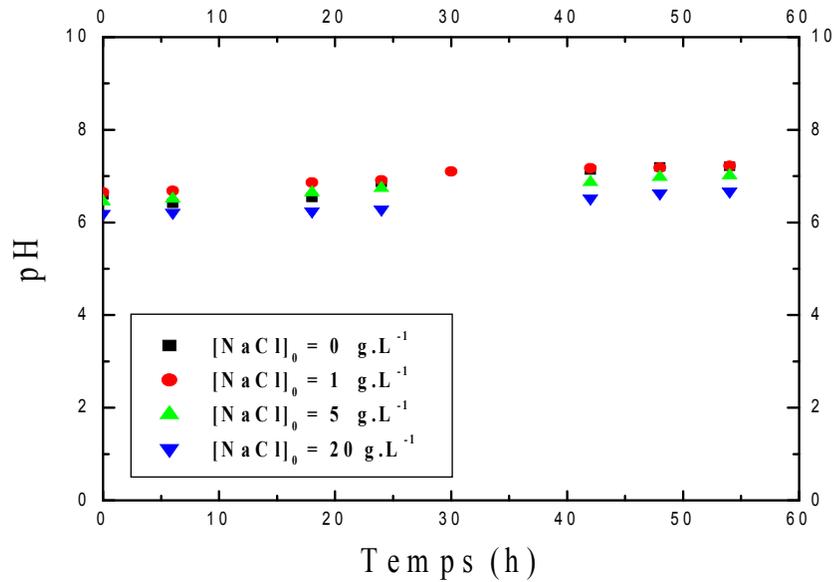


Figure 37: Influence des chlorures sur le pH.

# *Conclusion Générale*

## Conclusion Générale

---

Les nitrates sont des nutriments pour les végétaux. L'utilisation d'engrais azotés (élément constitutif des nitrates) inadaptée aux conditions locales et l'exploitation inappropriée des sols provoquent des concentrations excessives de nitrates dans les eaux.

La pollution des eaux par les nitrates présente un double risque. Ingérés en trop grande quantité, les nitrates ont des effets toxiques sur la santé humaine. Par ailleurs, ils contribuent avec les phosphates à modifier l'équilibre biologique des milieux aquatiques en provoquant des phénomènes d'eutrophisation.

Ce travail nous a permis, d'étudier les possibilités d'élimination des nitrates dans les eaux à l'aide d'un processus biologique simple et efficace « la dénitrification », basé sur l'utilisation d'une culture mixte et bien entendu d'une source de carbone.

Le travail présenté a porté à la fois sur l'étude des cinétiques de croissance des bactéries et de la dénitrification. Nous avons également étudié l'influence de quelques paramètres physico-chimiques qui peuvent avoir un effet accélérateur ou inhibiteur sur la réaction de dénitrification.

Les expériences réalisées ont prouvé que :

- Des cinétiques de croissance et de dénitrification différentes selon la source de carbone utilisée par les microorganismes.
- La cinétique de croissance commence par une phase de latence suivie d'une phase de croissance exponentielle et se termine par une stagnation après la disparition du polluant.
- La réaction de dénitrification étant consommatrice d'ions  $H^+$ , le pH a tendance à remonter.

- Nos microorganismes présentent des capacités de dénitrification et peuvent croître en présence d'oxygène.
- L'augmentation de la concentration initiale de la source de carbone a eu une influence sur le temps de latence.
- La vitesse de dénitrification varie avec la nature de la source de carbone et la capacité des microorganismes à métaboliser cette source de carbone avec une efficacité d'élimination des nitrates.
- Le succinate de sodium et le méthanol sont des sources de carbone facilement assimilable par les microorganismes.
- Le succinate de sodium est consommé préférentiellement au méthanol pour réduire les nitrates.
- L'augmentation de la concentration initiale des nitrates avec le méthanol comme source de carbone a un effet secondaire sur la dénitrification.
- Les micro-organismes présentent des capacités de croissance en absence et en présence des chlorures.

Le travail réalisé montre que des études complémentaires s'avèrent nécessaires pour mieux comprendre certains résultats qui nous permettent d'optimiser les conditions de dénitrification afin de faciliter cette technique de traitement sur le site industriel.

# *Références Bibliographiques*

## Références Bibliographiques

---

- Addiscott TM, Whitmore AP, Powlson DS.** (1991) Farming, Fertilizers and the Nitrate Problem. C. International. Wallingford, UK. 170 pp.
- Andersson B, Aspegren H, Parker DS, Lutz MP.** High rate nitrifying trickling filters. *Water Science and Technology*. 1994; 29(10-11):47-52.
- Barnard JL, Morgenroth E, Pitman T, Cooper P, Chapman A, Ching DWK.** The development of nutrient-removal processes (abridged) - Discussion. *Journal of the Chartered Institution of Water and Environmental Management*. 1998; 12(5):330.
- Bougard, D.** (2004) Traitement biologique d'effluents azotes avec arrêt de la nitrification au stade nitrite. Thèse de doctorat, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier.
- Calvet, R.** (1990) Nitrate-Agriculture-Eau (I.N.R.A).
- Capdeville B, Rols JL.** Introduction to biofilms in water and wastewater treatment. In: Melo LF, Bott TR, Fletcher M, Capdeville B, eds. *Biofilms-Science and Technology*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic; 1992:13-20.
- Carley BN, Mavinic DS.** The effects of external carbon loading on nitrification and denitrification of a high-ammonia landfill leachate. *Research Journal of the Water Pollution Control Federation*. 1991; 63(1):51-59.
- Casellas M, Dagot C, Baudi M.** (2002) Stratégie d'élimination de l'azote d'un effluent urbain dans un réacteur discontinu séquentiel (SBR). *Revue des sciences de l'eau*, 749-765.

- Ceçen F, Gönenc IE.** Criteria for nitrification and denitrification of high strength wastes in two upflow submerged filters. *Water Environment Research*. 1995; 67(2):132-142.
- Chabour, N.** La surexploitation des eaux souterraines dans les plaines littorales : la nappe de Télizza dans la plaine de Collo (Nord-Est algérien). *Sciences et Technologie B-N° 22*, Décembre (2004), pp. 127-132.
- Charles-Bajard, S.** (1996) Modélisation à visée prévisionnelle de la cinétique de croissance d'une population de *Listeria monocytogenes*. Thèse de doctorat n°312-96 présentée devant l'Université Claude Bernard-Lyon I.
- Chen JM, Lim BS, Al-Ghusain IA, et al.** Biological fixed-film processes. *Water Environment Research*. 1993; 65(4):336-344.
- Cole J.** Controlling environmental nitrogen through microbial metabolism. *Trends in Biotechnology*. 1993; 11(8):368-372.
- Coleman KJ, Cornish-Bowden A, Cole JA.** Purification and properties of nitrite reductase from *Escherichia Colis* K 12. *Biochemical Journal*. 1978; 175, 483-493.
- Cooper AB.** Coupling wetland treatment to land treatment - An innovative method for nitrogen stripping. *Water Science and Technology*. 1994; 29(4):141-149.
- Cornu, Marie.** (2000) Dynamique des populations bactériennes en cultures mixtes. Thèse de doctorat n°213-2000 présentée devant l'Université Claude Bernard-Lyon I.
- Daamen EJ, Delgorte FH, Van Loosdrecht MCM, Heijnen JJ.** The biogenerator : a new biofilm concept without backwash requirements. 3<sup>rd</sup> International IAQW special conference on biofilm systems. Copenhagen, Denmark; 1996.
- Delignette-Muller, M.L.** (1995) Méthodes de prédiction des aptitudes de croissance des populations de micro-organismes. Thèse de doctorat n°118-95 présentée devant l'Université Claude Bernard-Lyon I.

- Dos Santos VAPM, Tramper J, Wijffels RH.** Integrated nitrogen removal in compact systems by immobilized microorganisms: new-generation bioreactors. In: Elgewely MR, ed. *Biotechnology Annual Review, Vol 4*. Sara Burgerhartstraat 25/PO Box 211/1000 AE Amsterdam/Netherlands: Elsevier Science Publ B V; 1998:321-394.
- Doyle J, Watts S, Solley D, Keller J.** Exceptionally high-rate nitrification in sequencing batch reactors treating high ammonia landfill leachate. *Water Science and Technology*. 2001; 43(3):315-322.
- Dupin, S.** (1992) Dénitrification biologique hétérotrophe appliqué au traitement des eaux d'alimentation : conditions et fonctionnement et mise au point d'un procédé. Thèse de doctorat de Microbiologie de l'Université de Claude Bernard, Lyon I, p281.
- Edeline, F.** (1993) L'épuration biologique des eaux édition CEBEDOC. Sprl. Liège.
- Foglar L, Briski F.** Wastewater denitrification process - the influence of methanol and kinetic analysis. *Process Biochemistry*. 2003; 39(1):95-103.
- Garrido JM, Omil F, Arrojo B, Mendez R, Lema JM.** Carbon and nitrogen removal from a wastewater of an industrial dairy laboratory with a coupled anaerobic filter-sequencing batch reactor system. *Water Science and Technology*. 2001; 43(3):249-256.
- Gee CS, Kim JS.** Nitrite accumulation followed by denitrification using sequencing batch reactor. *Water Science and Technology*. 2004; 49(5-6):47-55.
- Gouy J.L, Berge P, Labroue L.** (1984) "Gallionella ferruginea", Facteur de dénitrification dans les eaux pauvres en matières organiques, C. R. Acad. Sci. Paris, 298, III, 6, pp. 153-156.
- Gouy J.L.** (1983) Contribution à la connaissance des ferrobactéries et de leur rôle dans l'environnement. Application à l'aménagement, Thèse Doct. 3<sup>o</sup> Cycle, Toulouse, France.
- Gupta SK, Raja SM, Gupta AB.** Simultaneous nitrification-denitrification in a rotating biological contactor. *Environmental Technology*. 1994; 15(2):145-153.

- Haider N, Morvan J, Martin G.** (1988) dénitrification en sous-sol, rôle des sulfures et des sels ferreux, water supply, 6, Bruxelles, pp. 71-75.
- Han DW, Yun HJ, Kim DJ.** Autotrophic nitrification and denitrification characteristics of an upflow biological aerated filter. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2001; 76(11):1112-1116.
- Hirasa O, Ichijo H, Yamauchi A.** Preparation of a new support for immobilization of activated sludge. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 1991; 71(5):376-378.
- Hunik JH, Meijer HJG, Tramper J.** Kinetics of *Nitrosomonas europaea* at extreme substrate, product and salt concentrations. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1992; 37:802-807.
- Isaacs SH, Henze M, Soeberg H, Kummel M.** External carbon source addition as a means to control an activated sludge nutrient removal process. *Water Research*. 1994; 28(3):511-520.
- Jacques Capblancq et al.** (2002) Eutrophisation des eaux continentales.
- Jorddan T. E. and Weller D. E.** Human contribution to terrestrial nitrogen flux : assessing the sources and fates of anthropogenic fixed nitrogen, *BioScience*, n° 46, (1996).
- Kepner RL, Pratt JR.** Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: past and present. *Microbiological reviews*. 1994; 58:603-615.
- L'hirondel J. et J-L.** (1996) Les nitrates et l'homme, le mythe de leur toxicité, les éditions de l'institut de l'environnement, 142 p.
- Le Clech, B.** (1995) Environnement et agriculture. Synthèse Agricole 1995. 290 pp.
- Lind A.M.** (1977) Nitrate reduction in the subsoil, *Progr. Wat. Techn.*, 8, pp. 119-128.

- Liu MC, Peck HD.** The isolation of a hexaheme cytochrome from *Desulfovibrio desulfuricans* and its identification of a new type of nitrite reductase. *Journal of Biological Chemistry*. 1981; 256, 13159-13164.
- Lobry, J.R.** (1991) Ré-évaluation du modèle de croissance de Monod. Effet des antibiotiques sur l'énergie de maintenance. Thèse de Doctorat n°134-91 présentée devant l'Université Claude Bernard-Lyon I.
- Louzeiro NR, Mavinic DS, Oldham WK, Meisen A, Gardner IS.** Methanol-induced biological nutrient removal kinetics in a full-scale sequencing batch reactor. *Water Research*. 2002; 36(11):2721-2732.
- Mace S, Mata-Alvarez J.** Utilization of SBR technology for wastewater treatment: An overview. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2002; 41(23):5539-5553.
- Mann A, Mendoza-Espinosa L, Stephenson T.** A comparison of floating and sunken media biological aerated filters for nitrification. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 1998; 72(3):273-279.
- Martin, G.** (1979) Le problème de l'azote dans les eaux (Techniques et Documentation ed.)
- Masuda S, Watanabe Y, Ishiguro M.** Biofilm properties and simultaneous nitrification and denitrification in aerobic rotating biological contactors. *Water Science and Technology* 23. 1991:1355-1363.
- Meaney BJ, Strickland JET.** Operating experiences with submerged filters for nitrification and denitrification. *Water Science and Technology*. 1994; 29(10-11):119-125.
- Metcalf, Eddy.** (2003) Wastewater Engineering. McGraw-Hill, New-York.
- Metezeau P, Miglierina R, Ratinaud MH.** (1994) La cytométrie en flux. Presses de l'Université de Limoges, Limoges.

- Meynell GG, Meynell E. (1970).** Theory and practice in experimental bacteriology. Cambridge University Press, Cambridge.
- Moser-Engeler R, Udert KM, Wild D, Siegrist H.** Products from primary sludge fermentation and their suitability for nutrient removal. *Water Science and Technology*. 1998; 38(1):265-273.
- Mossakowska A, Reinius LG, Hultman B.** Nitrification reactions in treatment of supernatant from dewatering of digested sludge. *Water Environment Research*. 1997; 69(6):1128-1133.
- Nemeth, I. (2001)** Devenir de l'azote sous irrigation gravitaire. Application au cas d'un périmètre irrigué au Mexique. Thèse de doctorat. Université de Montpellier II Sciences et techniques du languedoc.
- Nyberg U, Aspegren H, Andersson B, la Cour Jansen J, Villadsen IS.** Full-scale application of nitrogen removal with methanol as carbon source. *Water Science and Technology*. 1992; 26(5/6):1077-1086.
- Patureau, D. (1995)** Etude cinétique et physiologique d'une bactérie dénitrifiante en conditions aérobie, suivi d'un réacteur aéré, parfaitement mélangé, en culture pure et en culture mixte associée à une flore nitrifiante. Thèse de doctorat, Université de Toulouse.
- Portejoie S, Martinez J, Landmann G. (2002)** L'ammoniac d'origine agricole : impacts sur la santé humaine et animale et sur le milieu naturel. *INRA Prod. Anim.*, 15, 151-160.
- Pujol R, Canler JP, Iwena A.** Biological aerated filters : an attractive and alternative biological process. *Water Science and Technology*. 1992; 26(3-4):693-702.
- Rodier, J. (1978)** L'analyse de l'eau, sixième édition, © BORDAS, Paris 061 878 0212 ISBN 2-04-010037-7.
- Rogalla F, Bourbigot MM.** New developments in complete nitrogen removal with biological aerated filters. 1990:287-294.

- Sagberg P, Dauthuille P, Hamon M.** Biofilm reactors : a compact solution for the upgrading of wastewater treatment plants. *Water Science and Technology*. 1992; 26(3-4):733-742.
- Schwartzbrod J et Martin G.** (1985) Les micro-organismes, agents biogéochimiques, In : Point sur l'épuration et le traitement des effluents (Martin G. Coordon.), Tec. & Doc. Lavoisier Ed., Paris, France, Vol.2-1, pp. 1-45.
- Skrinde JR, Bhagat SK.** Industrial wastes as carbon sources in biological denitrification. *Journal of the Water Pollution Control Federation*. 1982; 54(4):370-377.
- Stouthamer, AH.** (1988) Dissimilatory reduction of oxidized nitrogen compounds. In A. J. B. Zehnder (Eds.), *Biology of anaerobic Microorganisms* (pp. 245-303). New-York, John Weiley and sons.
- Sutton PM, Murphy KL, Dawson RN.** Low-temperature Biological denitrification of wastewater. *Journal of the Water Pollution Control Federation*. 1975; 47 (1), 122-134.
- Suzuki Y, Miyahara S, Takeishi K.** Oxygen supply method using gas-permeable film for wastewater treatment. *Water Science and Technology*. 1993; 28(7):243-250.
- Tam NFY, Wong YS, Leung G.** Effect of exogenous carbon sources on removal of inorganic nutrient by the nitrification-denitrification process. *Water Research*. 1992a; 26(9):1229-1236.
- Tam NFY, Wong YS, Leung G.** Significance of external carbon sources on simultaneous removal of nutrients from wastewater. *Water Science and Technology*. 1992b; 26(5-6):1047- 1055.
- Tanaka K, Sumino T, Nakamura H, Ogasawara T, Emori H.** Application of nitrification by cells immobilized in polyethylene glycol. In: Wijffels RH, Buitelaar RM, Bucke C, Tramper J, eds. *Immobilized Cells : Basic and Applications*. Amsterdam: Elsevier Science; 1996:718-724.

- Tiedje, J. M.** (1988) Ecology of Denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. In A.J.B. Zehnder (Eds.), *Biology of anaerobic Microorganisms* (pp. 179-244). New-York, John Wiley and sons.
- Torrijos M, Vuitton V, Moletta R.** Le procédé SBR : une solution efficace et économique pour dépolluer les eaux usées des petites fromageries du massif jurassien. In: nuisances Adpdtdeed, Poitiers ESdId, eds. 14èmes Journées Information Eaux (JIE 2000). Poitiers, 13- 15 septembre; 2000: 45-1 à 11 (communication orale, texte intégral).
- Tsai YL, Schlasner SM, Tuovinen OH.** Inhibitor evaluation with immobilized *Nitrobacter agilis* cells. *Applied and Environmental Microbiology*. 1986; 52:1231-1235.
- Van der Hoek K, W.** Nitrogen efficiency in global animal production. *Environmental Pollution*. 1998; 102, 127-132.
- Van Dijk L, Roncken G.** Membrane bioreactors for wastewater treatment : the state of the art and new developments. *Water Science and Technology*. 1997; 35(10):35-41.
- Wang B, Li G, Yang Q, Liu R.** Nitrogen removal by a submerged biofilm process with fibrous carriers. *Water Science and Technology*. 1992; 26(9-11):2039-2042.
- Watanabe Y, Bang DY, Itoh K, Matsui K.** Nitrogen removal from wastewaters by a bioreactor with partially and fully submerged rotating biofilms. *Water Science and Technology*. 1994; 29(10-11):431-438.
- Wijffels RH, Tramper J.** Nitrification by immobilized cells. *Enzyme and Microbial Technology*. 1995; 17(6):482-492.

# *Annexes*

# Annexes

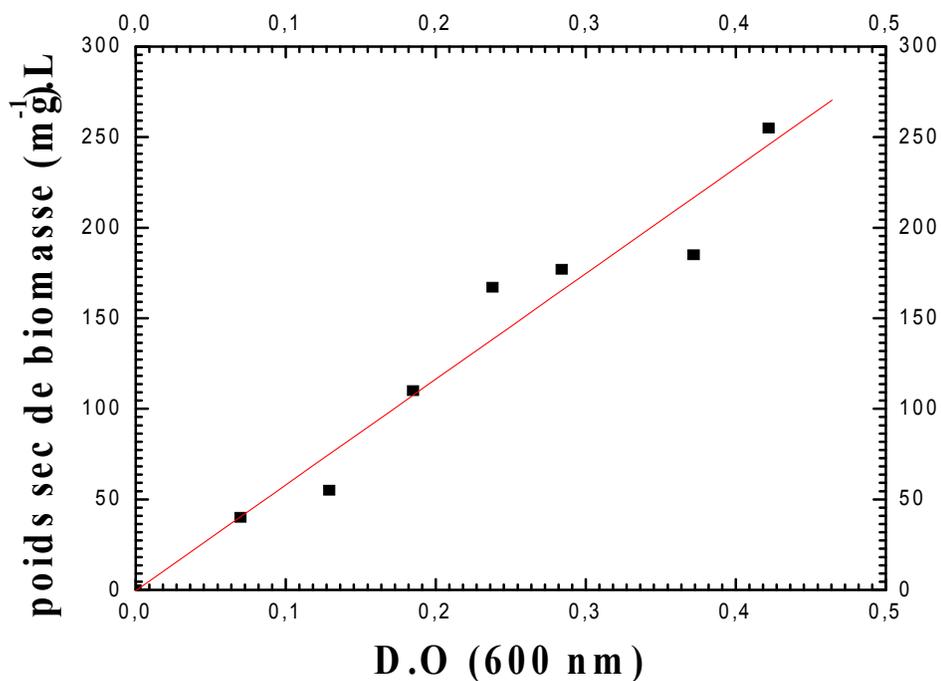
## *Annexe 1 : Relation entre la densité optique et l'extrait sec*

La relation linéaire entre la D.O<sub>(600 nm)</sub> et le poids sec correspondant de la biomasse suspendue :

$$\text{Poids sec (mg.L}^{-1}\text{)} = -0.37274 + 583.51879 \text{ D.O}_{(600 \text{ nm})}$$

Coefficient de corrélation R = 0.97731

### **Droite d'étalonnage de la biomasse**



## *Annexe 2 : protocole de dosage des nitrates par colorimétrie*

### **Méthode au salicylate de sodium**

#### **Principe**

En présence de salicylate de sodium, les nitrates donnent du paranitrosalicylate de sodium, coloré en jaune et susceptible d'un dosage colorimétrique.

#### **Réactifs**

- Solution de salicylate de sodium à 0,5%, à renouveler toutes les 24 heures.
- Acide sulfurique concentré. ( $d = 1,84$ )
- Solution d'hydroxyde de sodium et de tartrate double de sodium et de potassium :

hydroxyde de sodium.....	400	g
tartrate double de sodium et de potassium.....	60	g
eau distillée.....	<i>q.s.p.</i>	1000 mL

Faire dissoudre les sels dans de l'eau. Laisser refroidir et compléter à 1000 mL

A conserver dans un flacon en polyéthylène.

- solution mère étalon d'azote nitrique à  $0,1 \text{ g.L}^{-1}$  :

nitrate de potassium anhydre.....	0,722	g
eau distillée.....	<i>q.s.p.</i>	1000 mL
chloroforme (pour conserver).....	1	mL

- Solution fille étalon d'azote nitrique à  $0,005 \text{ g.L}^{-1}$ .

Amener 50 mL de la solution mère à 1000 mL avec de l'eau distillée.

### Etablissement de la courbe d'étalonnage

Dans une série de capsules de 60 mL, introduire successivement :

Numéro des capsules	T	I	II	III	IV
Solution étalon d'azote nitrique à 0,005 g.L <sup>-1</sup> (mL)	0	1	2	5	10
Eau distillée (mL)	10	9	8	5	0
Correspondance en mg.L <sup>-1</sup> d'azote nitrique	0	0,5	1	2,5	5
Solution de salicylate de sodium (mL)	1	1	1	1	1

Evaporer à sec au bain-marie ou dans une étuve portée à 75-80°C (ne pas surchauffer, ni chauffer trop longtemps). Laisser refroidir. Reprendre le résidu par 2 mL d'acide sulfurique concentré en ayant soin de l'humecter complètement. Attendre 10 minutes, ajouter 15 mL d'eau bidistillée puis 15 mL de la solution d'hydroxyde de sodium et de tartrate double de sodium et de potassium qui développe la couleur jaune. Effectuer les lectures au spectromètre à la longueur d'onde de 420 nm. Soustraire des densités optiques lues pour les étalons, la valeur relevée pour le témoin. Construire la courbe d'étalonnage.

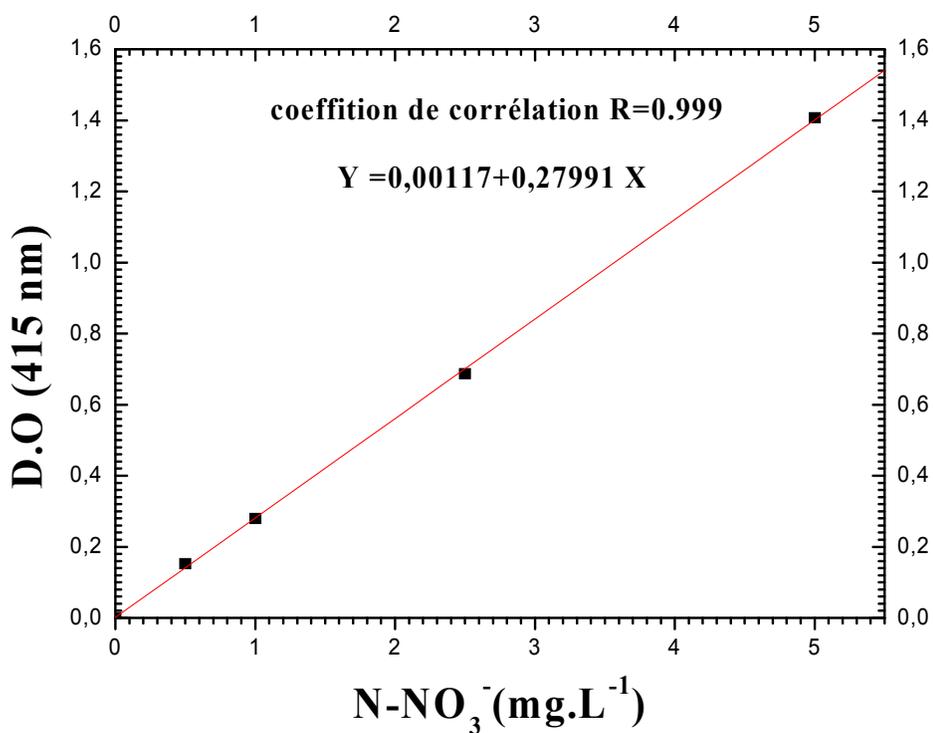
### Mode opératoire

Introduire 10 mL d'eau dans une capsule de 60 mL (pour des teneurs en azote nitrique supérieurs à 10 mg.L<sup>-1</sup>, opérer une dilution). Alcaliniser faiblement avec la solution d'hydroxyde de sodium. Ajouter 1 mL de solution de salicylate de sodium puis poursuivre le dosage comme pour la courbe d'étalonnage. Préparer de la même façon un témoin avec 10 mL d'eau bidistillée. Effectuer les lectures au spectromètre à la longueur d'onde de 415 nm et tenir compte de la valeur lue pour le témoin. Se reporter à la courbe d'étalonnage.

### Expression des résultats

Pour une prise d'essai de 10 mL, la courbe donne directement la teneur en azote nitrique exprimée en milligrammes par litre d'eau. Pour obtenir la teneur en nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ), multiplier ce résultat par 4,43.

### Droite d'étalonnage du dosage des nitrates



### *Annexe 3 : produits chimiques utilisés*

#### **Le méthanol**

Le méthanol est un liquide incolore d'odeur agréable, miscible à l'eau en toutes proportions. Il fut découvert par Boyle en 1661. Le méthanol est également connu sous les noms d'alcool méthylique, d'hydrate de méthyle, de carbinol, d'alcool des bois ou d'esprit-de-bois. Il est utilisé dans de nombreuses synthèses chimiques et ses dérivés sont largement utilisés pour la production de produits de teinturerie, de résines, de produits pharmaceutiques et de parfums synthétiques. Le méthanol est aussi utilisé comme combustible, pour dénaturer l'alcool éthylique, comme antigel, dans l'industrie des vernis, des colorants et de certaines matières plastiques.

Le méthanol est aussi un poison violent. Par ingestion, il provoque des atteintes hépatiques graves. De plus c'est un dépresseur du système nerveux central (comme l'éthanol) mais il s'élimine très lentement et ses effets sont cumulatifs.

Par contacts prolongés avec la peau des dermatoses peuvent survenir suite à la destruction du revêtement lipidique de la peau. Les projections sur les yeux sont irritantes (conjonctivite). Par inhalation prolongée, on obtient une ivresse avec nausées puis cyanose, oedème pulmonaire, agitation, fureur et mort!

On observe également des troubles oculaires majeurs avec diminution de l'acuité visuelle, dilatation des pupilles, photophobie puis évolution vers la cécité.

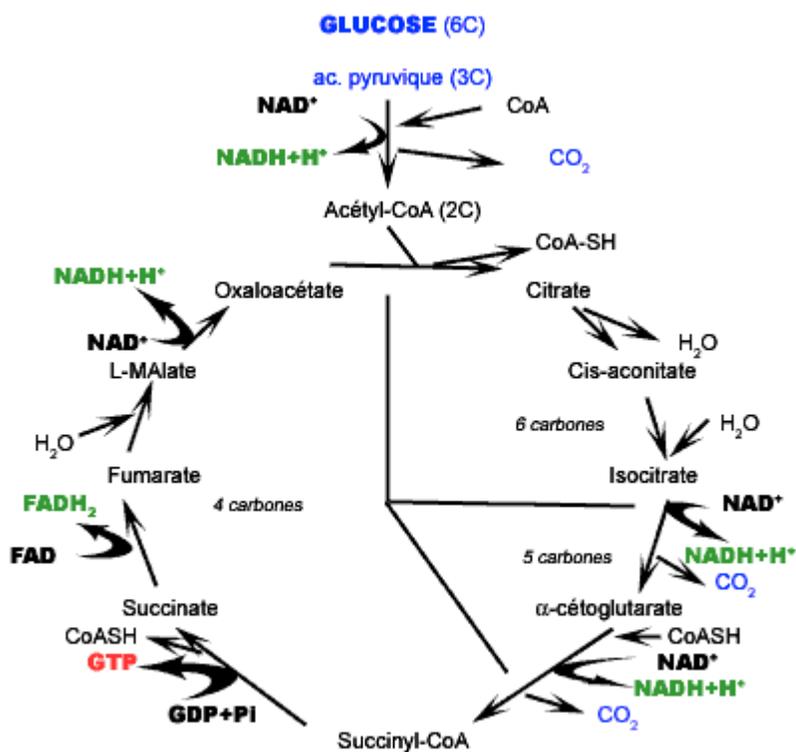
Dans un domaine de traitement par voie biologique, dans lequel les processus physiques tel que la dilution et la dispersion provoquent une baisse des concentrations, la biodégradation semble être facilitée.

En outre, le méthanol est utilisé dans des programmes de développement pour la dénitrification de l'eau usée. Le procédé de dénitrification convertit des oxydes d'azote en gaz d'azote par le processus métabolique normal de certains micro-organismes. Fondamentalement, le méthanol agit en tant que source de nourriture pour les micro-organismes qui dénitrifient à leur tour efficacement l'eau usée. De récentes études scientifiques ont prouvé que le méthanol se prête bien comme agent idéal de croissance bactérienne pour ce processus.

## Le succinate de sodium

Le succinate de sodium est stable comme hexahydraté ( $C_4H_4O_4Na_2 \cdot 6 H_2O$ ). Beaucoup d'études de toxicité ont été entreprises en utilisant le succinate de sodium hexahydraté comme substance d'essai, parce qu'il ne devrait y avoir aucune différence entre le succinate de sodium et le succinate de sodium hexahydraté en termes de comportement environnemental, la toxicité aquatique, et la toxicité mammifère.

Ce produit est facilement biodégradable et il appartient au cycle de Krebs.



Cycle de Krebs

## ***RESUME***

La présente étude contribue à la compréhension des phénomènes biologiques qui contrôlent la dénitrification et montrent la capacité d'une culture mixte prélevée dans la station d'épuration d'El Menia Constantine à réduire les nitrates dans une série de réacteurs en mode batch. Pour cela nous avons testé à 35°C dans un milieu approprié, le succinate de sodium ou le méthanol, comme source unique de carbone et d'énergie.

L'effet de l'accroissement de la concentration initiale en nitrate en utilisant le méthanol comme source unique de carbone s'avère favorable aux cinétiques de croissance et a un effet secondaire sur la dénitrification.

L'élimination des nitrates en présence du succinate de sodium comme source de carbone est rapide et complète, cependant, en présence du méthanol cette élimination est partielle.

L'augmentation de la concentration initiale de succinate de sodium induit un meilleur rendement de conversion de ce dernier en biomasse et une réduction concomitante significative du temps nécessaire pour l'élimination totale des nitrates, cependant il y a une augmentation du temps de latence, alors qu'en son absence, aucune croissance n'est observée.

Les micro-organismes présentent des capacités de croissance en absence et en présence des chlorures.

### **Mots clés :**

Dénitrification, succinate de sodium, méthanol, source de carbone, culture mixte.

## ***ABSTRACT***

The present study contributes to the comprehension of the biological phenomena which control the denitrification and to show the capacity of a mixed culture taken in the station of purification of El Menia Constantine to reduce nitrates in a series of engines in batch mode. For that we tested with 35°C in an adapted medium, the disodium succinate or methanol, as sole carbon source and energy.

The effect of the increase in the initial concentration of nitrate by using methanol as sole carbon source proves to be favorable to the kinetics of growth and has a side effect on denitrification.

The elimination of nitrates in the presence of disodium succinate as carbon source is fast and complete; however, in the presence of methanol this elimination is partial.

The increase in the initial concentration of disodium succinate induces a better yield of conversion of succinate into biomass and a significant concomitant reduction of time necessary for the complete elimination of nitrates, however there is an increase in the latency time, whereas in its absence, no growth is not observed.

The micro-organisms have capacities of growth in absence and in the presence of chlorides.

### **Mots clés :**

Denitrification, disodium succinate, methanol, carbon source, mixed culture.

## ملخص

إن هذه الدراسة تهدف إلى فهم الظواهر البيولوجية التي تتحكم في عملية تفكك النتراة و مدى قدرة بكتيريا مستخرجة من مركز المعالجة البيولوجية للمياه القذرة بالمنية قسنطينة على إزالة النتراة في مجموعة من المفاعلات من نوع batch. من أجل هذا استعملنا سوكسينات الصوديوم أو الميثانول كمصدر وحيد للكربون و الطاقة. التجارب انجزت في درجة حرارة 35 م. تأثير ارتفاع التركيز الأولي للنتراة باستعمال الميثانول كمصدر للكربون يعتبر إجابي عند دراسة حركيات نمو الكائنات الحية و له تأثير ثانوي على إزالة النتراة.

عملية إزالة النتراة في الوسط الذي يحتوي على سوكسينات الصوديوم كمصدر للكربون كانت سريعة و أدت إلى الإزالة التامة، أما مع الميثانول فالإزالة كانت جزئية.

ارتفاع التركيز الأولي لسوكسينات الصوديوم يؤدي إلى أكبر قدر من التحول لهذا الأخير إلى مادة حية مع انخفاض المدة الزمنية اللازمة لإزالة النتراة و كذا زيادة وقت تاقلم البكتيريا مع الوسط المغذي، في حين في غيابه لم نشهد أي تطور للبكتيريا.

الخليط البكتيري له القدرة على النمو في وسط خال أو يحوي كمية معتبرة من ملح NaCl.

### الكلمات الدالة :

إزالة النتراة، سوكسينات الصوديوم، الميثانول، مصدر للكربون، خليط بكتيري.