

**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET
DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE MENTOURI CONSTANTINE
FACULTE DES SCIENCES EXACTES
DEPARTEMENT DE CHIMIE**

THESE

**Pour l'obtention d'un diplôme de doctorat en sciences
EN CHIMIE ANALYTIQUE ET PHYSIQUE**

OPTION : Chimie de l'environnement

Présentée par :

M^{me} BOUGHERARA Hassina épouse KEBABI

**LA DENITRIFICATION PAR L'UTILISATION D'UNE
CULTURE MIXTE**

Soutenue le 09 mars 2010

Devant le jury

Président :	HAOUAM Abdelkarim	Professeur	Université de Constantine
Rapporteur :	KEBABI Brahim	Professeur	Université de Constantine
Examineur :	MOUATS Chaabane	Professeur	Université de Constantine
	BELMOKRE Kamel	Professeur	Université de Skikda
	BOUZAHER Yacine	Professeur	Université de Batna
	DIBI Amar	Professeur	Université de Batna

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire Pollution et Traitement des Eaux de l'université de Constantine, dirigé par Monsieur le professeur B. KEBABI.

En premier lieu, je tiens à remercier particulièrement Monsieur le professeur B. KEBABI qui a su guider ce travail par ses conseils avisés et ses encouragements.

Je remercie Monsieur A. HAOUAM, professeur à l'université de Constantine pour son aide et de m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider le jury de ce magister

J'exprime toute ma gratitude à l'ensemble de jury, Monsieur C. MOUATS, professeur à l'université de Constantine, Monsieur K. BELMOKRE, professeur à l'université de Skikda, Monsieur Y. ABOUZAHHER professeur à l'université de Batna et Monsieur A. DIBI professeur à l'université de Batna d'avoir accepté de consacrer une partie de leur temps à l'examen de ce manuscrit et de participer au jury de cette thèse.

Je remercie plus particulièrement mon mari qui m'a accompagné tout au long de ce travail : merci pour ta gentillesse, pour l'attention et la confiance que tu m'as accordées et pour tous tes conseils qui m'ont permis de prendre les bonnes directions.

Enfin un grand merci à ma mère pour sa présence et son soutien conditions avec toute son affection ainsi que mes amies Hanene, Ouissaf, Leila pour les riches et merveilleux moments passés ensemble, sans oublier toute ma famille et ma belle famille.

A mon père

Liste des tableaux et des figures

I. Figures

Figure 1 : Le cycle de l'azote [Bothe et al, 2007].

Figure 2 : Mécanisme de la pollution des eaux par les nitrates.

Figure 3 : Carte de la pollution de l'eau par les nitrates en France [Wehbe N, 2008].

Figure 4 : Carte Telezza [Chabour N 2004].

Figure 5 : Réduction de la méthémoglobine par transfert d'un électron du NADH.

Figure 6 : Effets sanitaires des nitrates.

Figure 7 : L'eutrophisation dans le lac Tanga (w d'El Kala) aout 2009.

Figure 8 : Individus de grande dimension d' *Ulva armoricana*, en suspension dans l'eau.

Figure 9 : Evolution saisonnière typique d'une marée verte à ulves sur la plage de Saint-Efflam (Côtes d'Armor). Démarrage printanier (*en haut à droite*), apogée en juillet (*en haut à gauche*). [Mènesguen A., 2003].

Figure 10 : Schémas représentatifs de l'osmose inverse pour l'élimination des sels dissous [Wehbe N., 2008].

Figure 11 : Relation entre les différents paramètres influant la dénitrification [Groffman et al, 1989].

Figure 12 : Comparaison de la dénitrification en présence de différentes sources de carbones (Blasczyk, 1993). A : méthanol, B = acétate, C = éthanol, D = milieu riche (Δ = nitrate \square = nitrite, \circ = absorbance) [Patureau, 1995].

Figure 13 : Schéma de principe d'utilisation de la matière organique.

Figure 14 : Les phases de croissance établies par [Buchanan, 1918].

Figure 15 : Technique de traitement sur boîte de pétri.

Figure 16 : Technique turbidimétrique de mesure de la biomasse.

Figure 17 : Schéma reliant la croissance des micro-organismes à la température [Madigan M. 2000].

Figure 18 : Echelle de pH reliés à quelques environnements [Madigan M. 2000].

Figure 19 : Schéma de l'absorbance.

Figure 20 : Photographie des conditions de notre travail.

Figure 21 : Cinétique de la croissance bactérienne avec le méthanol comme source de carbone.

Figure 22 : Cinétique de la réduction des nitrates avec le méthanol comme source de carbone.

Figure 23 : Evolution du pH au cours de la dénitrification avec le méthanol comme source de carbone.

Figure 24 : Effet de l'oxygène sur la croissance bactérienne en fonction du temps.

Figure 25 : Effet de l'oxygène sur la dégradation du méthanol.

Figure 26 : Effet de l'oxygène sur la dégradation des nitrates.

Figure 27 : Cycle de Krebs [Liu D. et al, 2006].

Figure 28 : Cinétique de la croissance bactérienne avec le succinate de sodium comme source de carbone.

Figure 29 : Cinétique de la réduction des nitrates avec le succinate de sodium comme source de carbone.

Figure 30 : Variation du pH au cours de la réaction de la dénitrification avec le succinate de sodium comme source de carbone.

Figure 31 : Cinétique de la croissance bactérienne avec le mélange tampon d'acide acétique et d'acétate de sodium comme source de carbone.

Figure 32 : Cinétique de la réduction des nitrates avec le mélange tampon d'acide acétique et d'acétate de sodium comme source de carbone.

Figure 33 : Effet de la concentration initiale des nitrates sur la croissance bactérienne avec le mélange tampon d'acide acétique et d'acétate de sodium comme source de carbone.

Figure 34 : Effet de la concentration initiale des nitrates sur la dégradation du mélange tampon d'acide acétique et d'acétate de sodium.

Figure 35 : Cinétiques de réduction des nitrates avec le mélange tampon d'acide acétique et d'acétate de sodium comme source de carbone.

Figure 36 : Effet de la concentration initiale du mélange tampon d'acide acétique et d'acétate de sodium comme source de carbone sur la croissance bactérienne.

Figure 37 : Effet de la concentration initiale du mélange tampon d'acide acétique et d'acétate de sodium comme source de carbone sur la dégradation des nitrates.

Figure 38 : Cinétique de la croissance bactérienne avec la farine de datte comme source de carbone.

Figure 39 : Cinétique de la réduction des nitrates avec la farine de datte comme source de carbone.

Figure 40 : Variation du pH au cours de la réaction de la dénitrification avec la farine de datte comme source de carbone.

Figure 41 : Evolution des nitrites au cours de la dénitrification avec la farine de datte comme source de carbone.

Figure 42 : Effet de la biomasse sur la dénitrification avec la farine de datte comme source de carbone.

Figure 43 : Effet de la taille des grains de la farine de datte sur la dénitrification.

Figure 44 : Effet de la température sur la croissance des bactéries avec la farine de datte comme source de carbone.

Figure 45 : Effet de la température sur la dégradation des nitrates avec la farine de datte comme source de carbone.

Figure 46 : Effet du pH sur la croissance bactérienne avec la farine de datte comme source de carbone.

Figure 47 : Effet du pH sur la dénitrification avec la farine de datte comme source de carbone.

Figure 48 : Effet du rapport C/N sur la croissance bactérienne avec la farine de datte comme source de carbone.

Figure 49 : Effet du rapport C/N sur la dégradation des nitrates avec la farine de datte comme source de carbone.

Figure 50 : Effet des chlorures sur la croissance bactérienne avec la farine de datte comme source de carbone.

Figure 51 : Effet des chlorures sur la dégradation des nitrates avec la farine de datte comme source de carbone.

II. Tableaux

Tableau 1 : Principales origines des NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+ dans l'environnement [Ratel, 1992].

Tableau 2 : Teneurs en nitrates et activités ou occupation du sol [Ratel, 1992].

Tableau 3 : Avantages et inconvénients des différents procédés d'élimination des nitrates.

Tableau 4 : La concentration des nitrates dans différents sites en Algérie.

Tableau 5 : Composition du milieu de culture [Patureau D., 1995].

Tableau 6 : La composition de la solution de traces éléments [Patureau D., 1995].

Tableau 7 : Calculs du taux de croissance pour les deux cultures.

Tableau 8 : Valeur nutritive pour 100 g de datte.

Tableau 9 : Les concentrations équivalentes des différentes valeurs du rapport C/N.

LISTE DES ABREVIATIONS

Batch	:	Réacteur en discontinu
N-NO₃	:	Concentration des nitrates
N-NO₂	:	Concentration des nitrites
N_{org}	:	azote organique
DO	:	Densité optique
DCO	:	Demande chimique en oxygène
μ	:	Quantité de biomasse
ΔX	:	Quantité de la biomasse
Y	:	coefficient de production de la biomasse (masse de cellule formée /masse de substrat consommé)
[C]₀	:	Concentration initiale
NAR	:	nitrate réductase
NIR	:	nitrite réductase
NOR	:	oxyde nitrique réductase
N₂OR	:	oxyde nitreux réductase

Table des matières

I. Liste des tableaux et des figures	4
II. Tableaux	7
INTRODUCTION GENERALE	14
I. Introduction.....	18
II. Cycle de l'azote.....	18
II.1. La fixation	19
II.2. L'assimilation	20
II.3. L'ammonification.....	20
II. 4 La nitrification.....	20
II. 5. La réduction assimilatrice (ou dissimilatrice)	21
II. 6. La dénitrification.....	22
III. Nitrates	22
III.1. Sources	22
III.1.1. Dans l'organisme	22
III.1.2. Dans l'environnement	23
III. 2. Stabilité et toxicité des nitrates.....	25
III. 3. Origine de la pollution des eaux par les nitrates.....	25
III.4. Exemples des régions polluées par les nitrates.....	29
III.4.1. Dans le monde.....	29
III.4.2. En Algérie.....	30
III.5. Effets et nuisances de la pollution nitrique.....	32
III.5.1. Effets sanitaires	32
III.5.2. Effets environnementaux	35
IV. Traitement des nitrates.....	38
IV. 1. Les procédés physico-chimiques	38
IV. 1. 1. Echange d'ions.....	39
IV. 1. 2. Les procédés membranaires	39
IV. 1. 3. Procédés électrochimiques	42
IV. 2. Les procédés biologiques	42
IV. 3. Choix de notre traitement.....	43
V. Elimination biologique des nitrates	44
V. 1. La dénitrification biologique	44

V. 1. 1. La dénitrification autotrophe	45
V. 1.2. La dénitrification hétérotrophe.....	46
V. 2. Les lieux de dénitrification	47
V. 3. Facteurs biologiques de la biodégradation des nitrates	47
V. 3. 1. Les micro-organismes dénitrifiants	47
V. 3. 2. Les enzymes de la dénitrification	47
V. 4. Facteurs influençant la dénitrification	48
V. 4. 1. La concentration initiale des nitrates.....	49
V. 4. 2. Le carbone organique.....	50
V. 4. 3. L'oxygène dissous	51
V. 4. 4. La température	52
V. 4. 5. Le pH.....	52
V. 4. 6. Le rapport C/N.....	53
V. 4. 7. Le rôle du potentiel d'oxydo-réduction.....	53
V. 4. 8. Influence biologique.....	53
V. 4. 9. Substances toxiques	54
V. 5. Principes fondamentaux de la biodégradation dans les milieux aqueux.....	54
VI. Les communautés de micro-organismes	55
VI. 1. Structure.....	56
VI. 2. Croissance et métabolisme des micro-organismes.....	57
VI. 2. 1. Schéma de la croissance.....	57
VI. 2. 2. Les techniques classiques de la mesure de croissance	61
VI. 3. Les facteurs influençant la croissance des micro-organismes	62
VI. 3. 1. Facteurs nutritionnels	62
VI. 3. 2. Les facteurs physico-chimiques.....	64
VI. 3. 3. Les facteurs chimiques	67
I.1. Matériels.....	69
I.1.1. Microorganismes.....	69
I.1.2. Milieu de culture	69
I.1.3. Source de carbone.....	70
I.1.5. pH-métrie	71
I.1.6. Réacteur DCO	71
I.1.7. Incubation.....	71

I.1.8. Centrifugation.....	71
I.2. Méthodes analytiques.....	71
I.2.1. Mesure de la biomasse.....	71
I.2.2. Relation entre la densité optique et l'extrait sec.....	73
I.2.3. Dosage des métabolites.....	74
I.2.3.1. Dosage des nitrates.....	74
I.2.3.2. Dosage des nitrites.....	74
I.2.3.3. Dosage de la source de carbone.....	74
I.2.4. Adaptation des bactéries.....	75
I.2.5. Préparation de la farine de datte et de son extrait.....	75
I.2.6. Analyse chimique de la farine de datte.....	75
I.2.7. Préparation des solutions.....	76
I.2.8. Conservation des échantillons.....	76
I.2.9. Conditions de culture.....	77
I. Etude de la dénitrification en utilisant le méthanol comme source de carbone.....	80
I.1. Etude de la croissance bactérienne.....	80
I.2. Cinétique de la réduction des nitrates.....	83
I.3. Suivi du pH du milieu réactionnel au cours de la dénitrification.....	84
I.4. Influence de l'oxygène sur le processus de dénitrification.....	84
I.4.1. Sur la croissance bactérienne.....	84
I.4.2. Sur la dégradation du méthanol.....	86
I.4.3. Sur la dégradation des nitrates.....	86
II. Etude de la dénitrification en utilisant le succinate de sodium comme source de carbone.....	88
II.1. Etude de la croissance bactérienne.....	89
II.2. Cinétique de réduction des nitrates.....	90
II.3. Suivi du pH du milieu réactionnel au cours de la dénitrification.....	91
III. Etude de la dénitrification en utilisant un mélange tampon d'acide acétique et d'acétate de sodium comme source de carbone.....	92
III.1. Etude de la croissance bactérienne.....	92
III.2. Cinétique de réduction des nitrates.....	93
III.3. Effet de la concentration initiale des nitrates.....	94
III.3.1. Sur la croissance bactérienne.....	94
III.3.2. Sur la dégradation du mélange tampon.....	95

III.3.3. Sur la dégradation des nitrates	96
III.4. Effet de la concentration de la source de carbone	97
IV. Etude de la dénitrification en utilisant la farine de datte comme source de carbone et milieu nutritif.....	99
IV.1. Etude de la croissance bactérienne	100
IV.2. Cinétique de la réduction des nitrates.....	101
IV.3. Suivi du pH du milieu réactionnel au cours de la dénitrification	102
IV. 4. Evolution des nitrites lors de la dénitrification	103
IV.5. Effet de la biomasse sur la dénitrification.....	105
IV.6. Effet de la taille des grains sur la dénitrification.....	105
IV.7. Effet de la température sur la dénitrification	106
IV.7.1. Sur la croissance bactérienne	107
IV.7.2. Sur la réduction des nitrates	108
IV.8. Effet du pH initial sur la dénitrification	109
IV.8.1. Sur la croissance bactérienne	109
IV.8.2. Sur la dégradation des nitrates.....	110
IV.9. Effet du rapport C/N sur la dénitrification	111
IV.9.1. Sur la croissance bactérienne	111
IV.9.2. Sur la dégradation des nitrates	112
IV.10. Effet des chlorures sur la dénitrification.....	113
IV. 10.1. Sur la croissance bactérienne.....	113
IV. 10.2. Sur la dégradation des nitrates.....	114

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

L'eau est une ressource avec des applications dans des domaines très variés. Aujourd'hui, l'homme prend possession des milieux aquatiques pour satisfaire ses activités récréatives (baignade, pêche...) et convoite également grandement les ressources d'eau potable, pour son alimentation et son confort sanitaire. Les cours d'eau sont en outre utilisés depuis longtemps à des fins commerciales et économiques (transport fluvial, usines installées aux bords des rivières, génération d'énergie, irrigation des sols cultivés). Toutes ces activités humaines conduisent à l'artificialisation et à la pollution des cours d'eau, auxquelles s'ajoutent de multiples rejets domestiques et industriels ainsi que les apports par le lessivage des sols agricoles et miniers.

Les eaux souterraines destinées à l'alimentation humaine sont souvent sujet à d'innombrables sortes de pollution chimique. L'une des principales pollutions des eaux souterraines par les produits diffuse, d'origine notamment agricole, est la pollution par les nitrates. Au cours des dernières décennies un grand nombre d'observations ont conduit les autorités sanitaires de nombreux pays et l'O.M.S à considérer les nitrates des eaux d'alimentation et, sans doute leur augmentation progressive consécutive aux activités de l'homme, comme un danger potentiel pour la santé publique. Environ 70% des fertilisants azotés utilisés en agriculture sont perdus dans l'environnement sous forme de nitrates [Yapo O.B. et al, 2009] que l'on retrouve dans les eaux de surface et souterraines.

La pollution de l'eau par les nitrates à cause des pratiques agricoles est un problème croissant dans les principales zones agricoles du monde. Des études dans certaines régions de l'Algérie ont montrées que la concentration en nitrate est souvent au dessus de 50 mg/L, norme recommandée par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé). Sidi Bel-Abes, Birkhadem, Chlef, et la plaine de Mitidja sont des exemples concrets où la concentration en nitrates dépasse déjà en 1990 les 260Nmg/L [Salem Z. et al, 2007]. En 2004 la concentration atteint 570 mg/L à Oued Mazzouze (Collo, W de Skikda) [Chabour N., 2004]. Cette augmentation de la concentration est dû à l'utilisation des engrais azotés en quantité nettement supérieures aux besoins des plantes. En effet, nos agriculteurs

apportent de grandes quantités d'engrais azoté car pour eux un maximum d'engrais est équivalent à une production maximale.

Une concentration élevée des nitrates dans les eaux de récréation modifie l'équilibre biologique en provoquant le phénomène d'eutrophisation [Foglar L. et Vuković M., 2005]. La consommation d'une eau riche en nitrates peut provoquer la méthémoglobinémie aussi appelée la maladie des bébés bleus du fait de la transformation dans l'organisme humain des nitrates en nitrites et en nitrosamines cancérigènes.

Il existe plusieurs techniques physicochimiques et biologiques de traitement des nitrates. Les plus utilisés sont les procédés d'échanges d'ions et l'osmose inverse [Goodrich A. et al, 1991]. Récemment les processus biologiques se sont avérés les plus concurrentiels et les mieux adaptés au traitement des nitrates en raison de leur facilité, efficacité et de leur coût modéré. La dénitrification biologique permet la transformation de composés d'oxyde d'azote par des bactéries en azote gazeux.

Le travail présenté dans ce manuscrit porte sur le traitement biologique des nitrates en utilisant des micro-organismes en culture mixte prélevés dans la station d'épuration d'El Menia de Constantine. La technique que nous avons choisie nécessite l'apport d'une source de carbone extérieure dans un milieu nutritif approprié où les nitrates jouent le rôle d'un accepteur final d'électrons au lieu de l'oxygène

En premier lieu nous avons commencé par une étude bibliographique dont le but est de comprendre le rôle des nitrates dans le cycle de l'azote, leurs sources, l'origine de la pollution nitrique dans le monde et en Algérie ainsi que ses conséquences sur la santé humaine et sur l'environnement. Une fois que nous avons abordé les problèmes de la pollution par l'excès des nitrates dans les eaux, nous avons montré les avantages et les inconvénients des différentes techniques de traitement existantes. En fin de cette partie nous avons insisté sur le choix du traitement biologique que nous avons largement présenté dans ce travail.

Nous avons présenté dans le deuxième chapitre les protocoles de préparation et d'analyse des échantillons utilisés dans le cadre de cette thèse.

Le troisième chapitre est consacré à l'étude de l'effet de différents types de sources de carbone sur la dénitrification. Dans ce chapitre, nous avons testé le méthanol, le succinate de sodium, un mélange tampon (acide acétique, acétate de sodium) et finalement, une source naturelle de carbone, la farine de datte

Nous avons terminé notre travail par une conclusion générale où nous rassemblons les différents résultats obtenu avec toutes les sources de carbone utilisées.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

I. PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Introduction

Dans les écosystèmes l'azote est présent sous forme gazeuse, dissoute et liée à des solides. L'azote est majoritairement présent sous forme gazeuse dans l'atmosphère (80%), il est inutilisable que par certaines plantes (les légumineuses). Les autres apports se font sous forme d'engrais chimiques (généralement des nitrates NO_3^-) ou d'amendements organiques tels que fumier et lisier.

II. Cycle de l'azote

L'azote est un élément essentiel à tous les organismes, il est présent dans la constitution des protéines (acides aminés), des acides nucléiques, et divers polymères (pigments...). Toutes les étapes du cycle de l'azote sont effectuées par des populations microbiennes spécifiques (Figure 1), elles sont régulées par des contraintes environnementales déterminant en retour la distribution des différents composés azotés. Les nombreuses transformations de l'azote, permettent à cet élément de circuler entre le compartiment atmosphérique et les milieux terrestre et aquatique et de déterminer en partie la productivité écologique de ces habitats. On distingue plusieurs formes minérales : azote moléculaire (N_2), ammoniac (NH_3), nitrite (NO_2^-), nitrate (NO_3^-), ammonium (NH_4^+), oxyde nitrique (N_2O) et oxyde nitreux (NO) mais aussi des formes organiques très variées (acides aminés, urée, acide urique, protéines, etc.) ces différentes formes participent à la structure, au fonctionnement, à la reproduction des êtres vivants et ayant un rôle particulier dans l'écosystème.

L'azote est soumis à des cycles d'assimilation, minéralisation, oxydation, réduction modifiant le niveau de valence de l'atome azote qui sont le fait d'organismes animaux et végétaux, ainsi que de microorganismes [Heathwaite A.L, 1993].

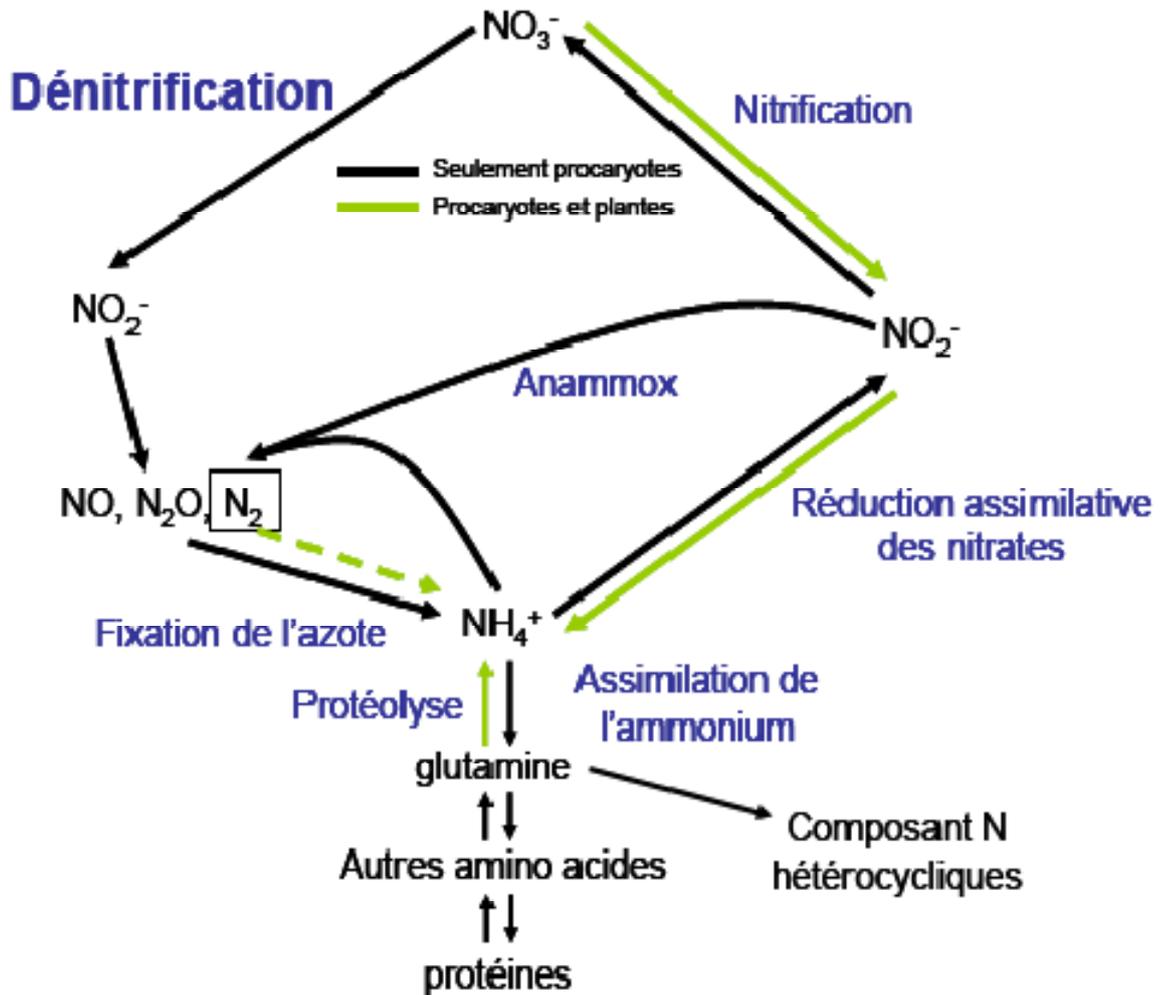
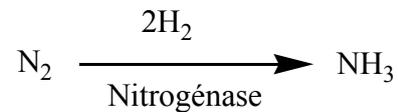


Figure 1 : Le cycle de l'azote [Bothe et al, 2007].

II.1. La fixation

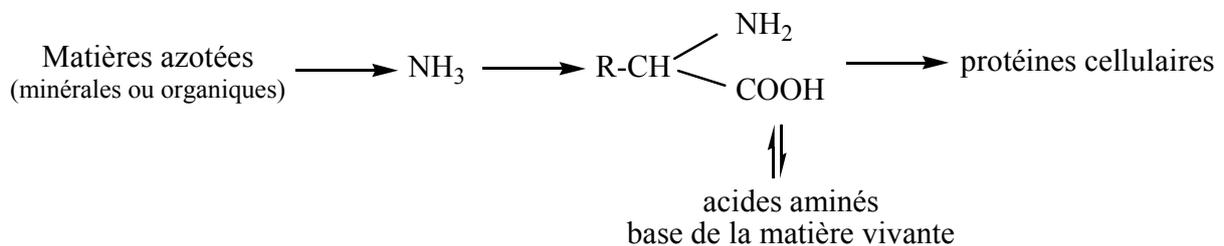
L'azote gazeux est composé de deux atomes d'azote reliés entre eux par une triple liaison qui lui confère une grande stabilité. La plupart des organismes vivants ne

peuvent donc pas utiliser l'azote sous cette forme mais sous des formes minérales solubles. La fixation de l'azote moléculaire est assurée par différents micro-organismes.



II.2. L'assimilation

L'assimilation est la transformation de la forme assimilable de l'azote ammoniacal (NH_3) ou organique inerte en matière vivante.



II.3. L'ammonification

Une seconde source d'ammonium est l'ammonification ou minéralisation de la matière organique azotée, effectuée par de nombreux animaux et microorganismes hétérotrophes. Ce processus contribue à la productivité de l'écosystème. La qualité de la matière organique va déterminer la rapidité avec laquelle elle sera minéralisée.

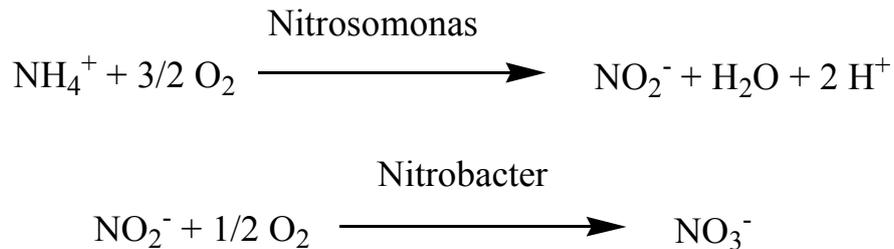
La réaction d'ammonification peut s'écrire de la façon suivante :



II. 4 La nitrification

La nitrification correspond à la transformation de l'ammonium en nitrate. Deux types de nitrification peuvent être distingués : la nitrification lithotrophe qui utilise un substrat

inorganique comme source de carbone, elle est encore assez mal connue et la nitrification hétérotrophe qui concerne différent groupe de bactéries. Elle s'opère en deux étapes : la nitritation qui est l'oxydation de l'ammoniac en nitrite et la nitratisation correspondant à l'oxydation du nitrite en nitrate [Daisy Bougard, 2004].



Ces deux réactions (nitritation et nitratisation) sont réalisées uniquement en présence d'oxygène.

II. 5. La réduction assimilatrice (ou dissimilatrice)

L'assimilation (ou réduction assimilatrice) du nitrate est réalisée, en présence d'oxygène, par un groupe hétérogène de bactéries. Ce processus implique plusieurs systèmes enzymatiques (nitrate et nitrite réductases) permettant la formation d'ammoniaque, ensuite incorporé rapidement sous forme d'azote organique (acides aminés). Comme nous l'avons évoqué, ce processus contribue à la production d'azote gazeux.

En conditions anaérobies dans des milieux fortement chargés en matières organiques, lors du processus de réduction dissimilatrice du nitrate ou respiration des nitrates, le nitrate peut devenir accepteur final d'électrons et être converti en ammonium, simultanément à l'oxydation de la matière organique, toutefois, aucune forme d'azote gazeux n'est produite.

II. 6. La dénitrification

La dénitrification est une réduction des nitrates (NO_3^-) en azote moléculaire gazeux (N_2) par un certain nombre d'intermédiaires dissous (nitrites) et gazeux (oxyde nitreux et protoxyde d'azote) selon la séquence suivante [Flaurence Curie, 2006] :



La dénitrification sera étudiée en détail pour la suite de cette thèse car ce processus est pris comme modèle du cycle de l'azote dans la partie expérimentale.

III. Nitrates

Les nitrates (NO_3^-) sont des composés chimiques incolores et inodores présents de façon naturelle dans tous les écosystèmes. Ils résultent du cycle de l'azote comme nous avons expliqué précédemment et se sont des substances nutritives indispensables à la vie végétale. Les nitrates sont très solubles dans l'eau, ne sont pas retenus par le sol et migrent aisément vers les eaux superficielles et souterraines lorsque les niveaux excèdent les besoins de la végétation [Santé Canada, 1992]. Ils figurent parmi les constituants majoritaires des engrais chimiques et naturels (fumiers) et aussi ils sont utilisés dans les explosifs, comme agents oxydants dans l'industrie chimique et comme agents de conservations.

III.1. Sources

III.1.1. Dans l'organisme

III.1.1.1. Source endogène

L'homme possède naturellement des nitrates dans son organisme. Les concentrations plasmiques des nitrates sont variable au cours de la journée et au long de l'existence.

Dès 1916 Mitchell a observé que la quantité de nitrate dans les urines était plus importante que celle ingérée [Lespine A., 2001], mettant ainsi en évidence la production endogène des nitrates. En 1981, la production de monoxyde d'azote (NO) est détectée dans l'organisme, sa durée de demi-vie est courte 3 à 5 secondes, il se trouve donc rapidement transformé en nitrate.

C'est à partir de 1985 avec les travaux de [Stuehr et Marletta] que de nombreuses études permirent d'expliquer la formation de monoxyde d'azote. Il s'agit d'une réaction biochimique intracellulaire qui consiste en la dégradation d'une molécule d'un acide aminé la L-arginine en L-citrulline entraînant la libération de monoxyde d'azote qui va réagir avec l'oxygène et former des molécules N_2O_3 et N_2O_4 donnant par hydrolyse les nitrates NO_3^- .

III.1.1.2. Source exogène

Les nitrates exogènes proviennent de la nourriture et de l'eau, ce n'est pas l'eau qui apporte seule les nitrates mais aussi les légumes. Il a été estimé dans plusieurs études que les légumes apportent 70 à 80 % du nitrate ingéré [Boquillet C. et al, 2005]. Le reste correspond pour environ 10 % à l'eau et 10 % aux autres aliments. Tous les aliments n'apportent pas la même quantité des nitrates selon les saisons et les teneurs en nitrate utilisés comme engrais.

III.1.2. Dans l'environnement

III.1.2.1. Sources naturelles

En l'absence de toute fertilisation azotée, les nitrates présents dans les sols proviennent de la fixation de l'azote atmosphérique par certaines plantes qui le transforment en

matière organique azotée dans leurs racines. Après le cycle saisonnier la matière organique azotée est décomposée et transformée en nitrates.

Une autre source naturelle est due à l'urine des animaux contenant de l'ammoniac et de l'urée (contient de l'azote), qui peuvent être rapidement oxydés en nitrates. En général, cette source est négligeable.

Il en va de même les déjections humaines, qui contiennent aussi l'ammoniac et l'urée et si elles sont concentrées peuvent engendrer un excès de nitrates.

A ces processus naturels d'apport en nitrates dans les sols, est venu s'ajouter depuis quelques décennies un phénomène dû à la présence humaine.

III. 1.2.1. Sources anthropiques (humaines)

Les nitrates sont indispensables au développement des plantes, c'est pourquoi l'homme en apporte à ses cultures afin de favoriser leurs productions car lors d'une culture intensive, les réserves naturelles en nitrates ne sont pas suffisantes. La source majeure (55 %) des nitrates s'observe, soit dans les zones de culture 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 car l'homme ne cherche pas à mettre la quantité idéale pour favoriser sa production, il préfère mettre les engrais et donc les nitrates en excès afin d'être sûr que les plantes aient ce qu'il faut. Les nitrates en excès finissent donc par rejoindre les cours d'eau et les nappes souterraines. D'autre part, 35% concernent les activités domestiques avec principal acteur les déjections humaines et les fosses septiques. Enfin 10 % sont attribués aux activités industrielles avec notamment [Ruiz L et al, 2003]: l'industrie alimentaire, l'industrie lourde et l'industrie pharmaceutique.

III. 2. Stabilité et toxicité des nitrates

Les nitrates sont très stables à température et à pression ambiantes. Le temps de transfert du nitrate dans les sols est mal connu. Il est d'autant plus difficile à évaluer que le cycle de l'azote met en jeu plusieurs processus complexes, qui l'immobilisent en partie sous forme organique donc le temps de transfert est de l'ordre de quelques années sur l'amont des versants, tandis qu'il n'excède pas une année dans le bas-fond.

L'absorption des nitrates par voie orale est rapide et complète. Leur pénétration percutanée est vraisemblablement très faible. La pénétration respiratoire en milieu professionnel est négligeable compte tenu de la non volatilité de ces substances et de la taille de poussières qu'elles génèrent ; en revanche, il existe une absorption secondaire des poussières et microparticules inhalées. La majeure partie « 60 à 70 % » des nitrates ingérés est éliminée sous forme inchangée par voie urinaire, le reste est excrété dans la salive. Les glandes salivaires se comportent comme une pompe à nitrate qu'elles accumulent par transport actif. Une faible fraction des nitrates salivaires est réduite en ion nitrite par les bactéries buccales, l'acidité gastrique normale est favorable aux bactéries nitroréductrices surtout présent dans le colon.

Les nitrates posent des problèmes lorsqu'ils se transforment en nitrites, tandis que les aspects toxicologiques des NO_3^- et NO_2^- sont de connaissance relativement récente puisque le premier cas d'intoxication mortelle par les nitrites a été décrit en 1995.

III. 3. Origine de la pollution des eaux par les nitrates

Les concentrations des nitrates des eaux de surface et des eaux souterraines sont en augmentation depuis les années 1950. Les nitrates constituent aujourd'hui la cause

majeure de pollution des grands réservoirs d'eaux souterraines qui, par ailleurs, présentent en général une qualité chimique et bactériologique satisfaisante.

En absence de contamination la teneur en nitrate des eaux souterraines varie de 0,1 à 1 mg/L d'eau, elle dépasse souvent aujourd'hui 50 mg/L (norme retenue par l'Organisation Mondiale de la Santé pour les eaux potables) [Wehbe.N, 2008]. La progression de cette contamination est couramment de 0,5 à 1 mg/L/an et peut atteindre 2 mg/L/an, cela veut dire que la pollution actuelle des nappes souterraines provient d'une vingtaine d'années d'épandage d'engrais, une situation voisine se rencontre dans les eaux superficielles [Ratel, 2002].

Toutes les sources de nitrate citées précédemment vont à plus ou moins long terme être au contact du sol mais l'utilisation intensive des engrais azotés en agriculture est considérée comme la principale source de contamination des eaux car les engrais azotés épandus sur les sols contiennent des nitrates ou des composés qui seront transformés en nitrate par la faune microbienne du sol même s'ils sont indispensables aux productions végétales. Comme les nitrates sont très solubles dans l'eau, très mobiles et présentent une faible affinité aux échanges ioniques [Stimm. W, 1996] donc 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'eaux (figure 2) [Chantal G, 2001].

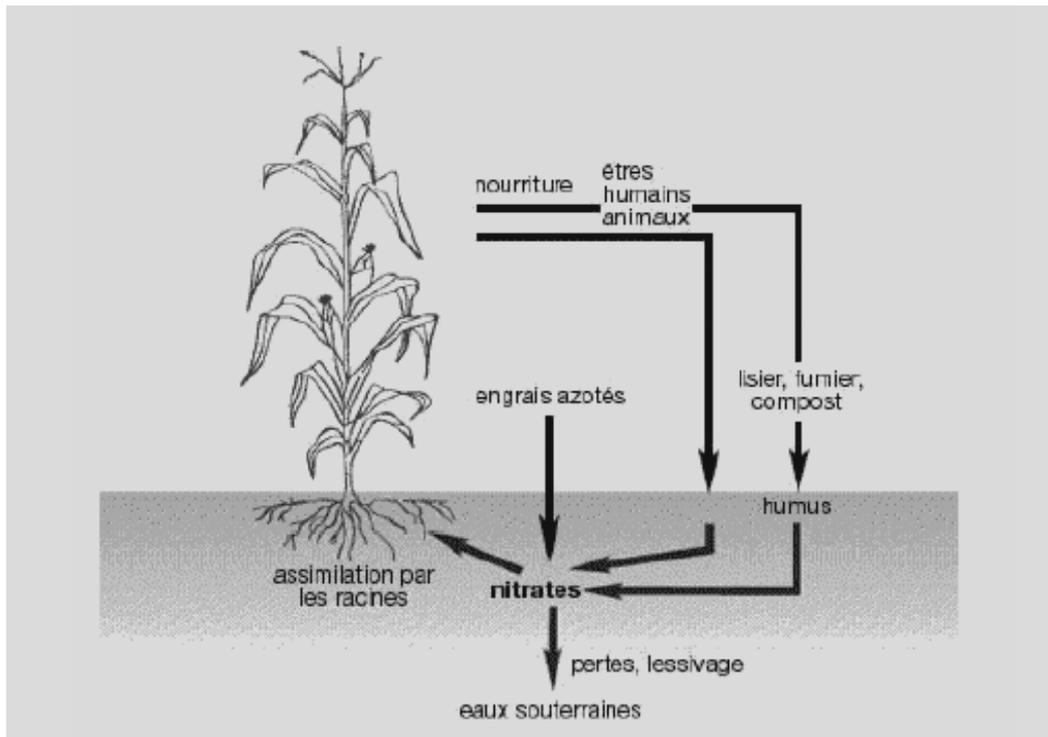


Figure 2 : Mécanisme de la pollution des eaux par les nitrates.

A ces engrais azotés il convient d'ajouter les nitrates d'origines animales. Un porc de moins de six mois et qui pèse 100 Kg évacue une quantité de lisier (mélange d'urine et de matières fécales) correspondant à 1m³/an [Stimm. W, 1996].

La troisième source de pollution par les nitrates est l'azote des eaux des égouts qui est rejeté dans le milieu naturel et s'oxyde en nitrate. Les rejets industriels et urbains ne sont qu'en partie épurée, avant d'être évacués dans le réseau hydrologique de surface.

Les différents sources de contamination liées aux activités humaines sont représenté dans le (tableau 1) et celles dû aux activités de surfaces (tableau 2)

Tableau 1 : Principales origines des NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+ dans l'environnement [Ratel, 1992].

Eaux	Composés azotés concernés	Type de pollution	Source de pollution
Eaux superficielles des rivières, canaux lacs, étangs	Ammonium Ammoniaque Azote organique	Ponctuelle	Rejets industriels et domestiques Rejets d'effluent d'élevage
	Nitrates Nitrites	Ponctuelle et diffuse	Alimentation des eaux superficielles par des nappes polluées
Eaux souterraines		Diffuse	«Fuites» des zones industrielles et habitées Activités agricoles intensives
	NO_3^- presque uniquement	Macroponctuelle ou macrodiffuse	Même source que ci-dessus Rejets industriels, domestique de l'agriculture ou des élevages

- ☐ D'origine diffuse : entraînement des nitrates provenant des engrais minéraux ou organiques non utilisés par les plantes.
- ☐ D'origine ponctuelle : rejets d'eaux usées domestiques, agricoles ou industrielles.

Tableau 2 : Teneurs en nitrates et activités ou occupation du sol [Ratel, 1992].

Teneurs	Activités et occupation des sols
Très élevées et croissantes	Occupation urbaine et industrielle dense et/ou agriculture intensive.
Moyennes	Agriculture traditionnelle moyennement intensive, habitat rural dispersé
Faibles	Forêt et zone d'élevage intensif avec des prairies permanente peu fertilisées

III.4. Exemples des régions polluées par les nitrates

III.4.1. Dans le monde

L'importance de la pollution des eaux a cru considérablement depuis le début des années soixante dans l'ensemble du monde. Certes, dans les pays industrialisés, de vastes programmes ont permis de ralentir la progression de la contamination des eaux.

En France, selon un rapport de l'institut français de l'environnement (EFEN), le taux de nitrates est en augmentation continue depuis 1970, avec un niveau presque stable les quatre dernières années. La figure 3 montre que la France apparaît être divisée en deux parties : dans le quart-nord-ouest, une partie avec une qualité d'eau polluée où le taux des nitrates est élevé et sur le reste du territoire français, une partie dont la qualité d'eau est bonne à l'exception des régions de culture intensive du Sud ouest.

En Bretagne 30,6 mg/L est la moyenne régionale du réseau de surveillance [Novince E, 2009].

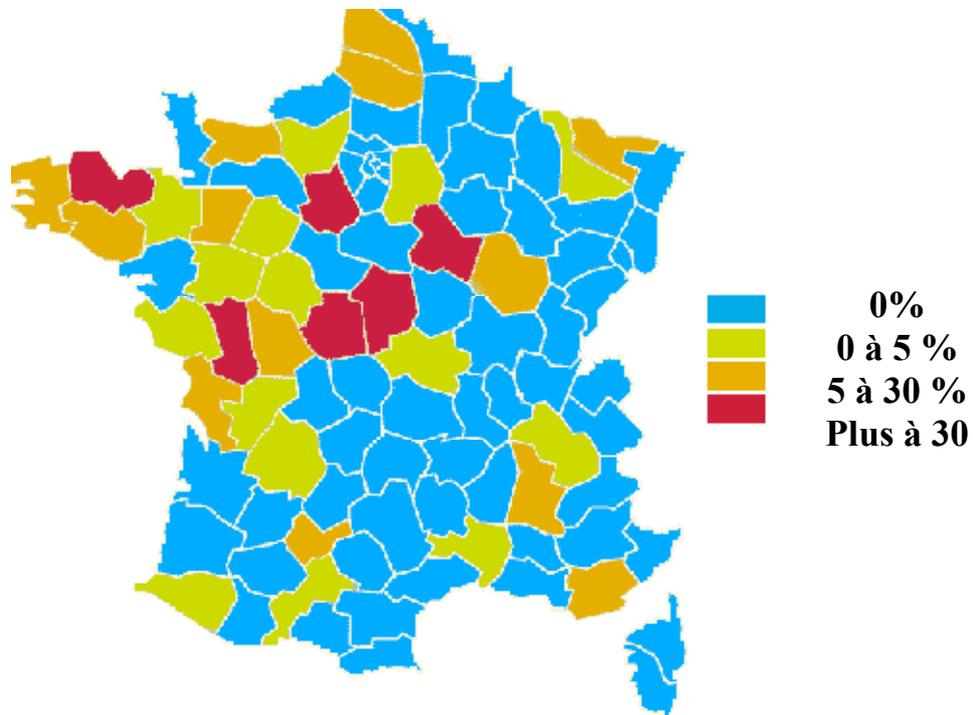


Figure 3 : Carte de la pollution de l'eau par les nitrates en France [Wehbe N, 2008].

III.4.2. En Algérie

L'Algérie, un pays en voie de développement voulant diminuer la facture des importations alimentaires, par une utilisation plus large et intense des terres agricoles, ce qui nécessite une utilisation accrue d'engrais entraînant une pollution progressive et continue des réserves d'eau par les nitrates.

Une étude réalisée sur le barrage Ghrib Ain Defla (Nord Ouest de l'Algérie) au cours de la période allant d'avril à octobre 2007 a montré que la concentration des nitrates en juillet est le double de celle trouvée en avril, ceci correspond à la période d'introduction des engrais dans les terres agricoles au voisinage de ce barrage [Hamaidi M.S, 2009].

Une autre étude réalisée à Skikda a montré que la concentration des nitrates a atteint 49,7 mg/L dans certains sites [Bordjiba O., 2009]. A la plaine de la Maitidja la concentration est passée de 130 mg/L en 2002 à 260 mg/L en 2004 [Salem Z, 2007] dépassant largement la norme O.M.S (50 mg/L). Une situation très alarmante est observée en 2004 à Oued Mezzouze Collo W de Skikda comme le montre la figure 5 [Chabour N, 2004] où la concentration atteint 570 mg/L. Des valeurs de 80 à 120 mg/L ont été obtenues dans de nombreux puits captant la nappe de Chéria [Baali F. et al, 2007]. Le tableau 3 montre l'intensité de la gravité de la pollution par les nitrates des ressources aquatiques Algériennes.

Tableau 3 : La concentration des nitrates dans différents sites en Algérie.

Villes	N-NO ₃ en mg/L	Année
La Maitidja	260	2004
Collo (Oued Mezzouze)	570	2004
Sidi Bel Abess	175	2004
Batna (Ain Jacer)	125	2006
Chéria	80-120	2007
Skikda	47,9	2008
Tlemcen	242	2008
Chleff	100	2008

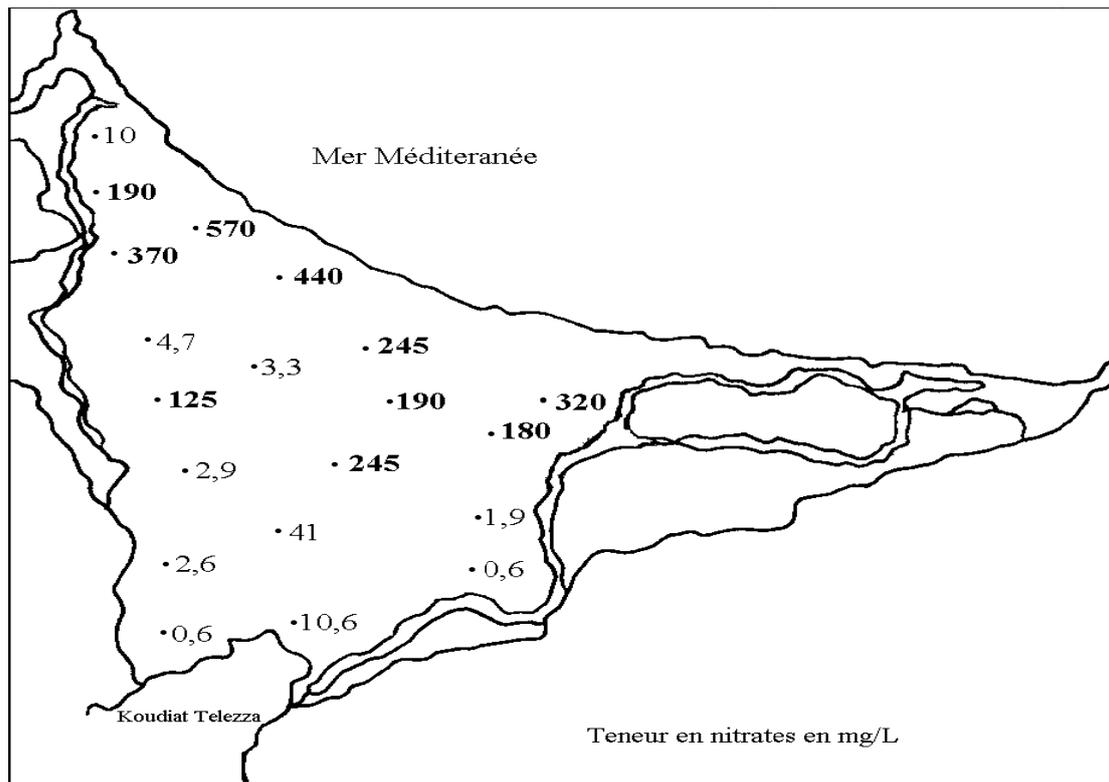


Figure 4 : Carte Telezza [Chabour N 2004].

III.5. Effets et nuisances de la pollution nitrique

La présence d'ion nitrate dans les eaux engendre deux principaux impacts :

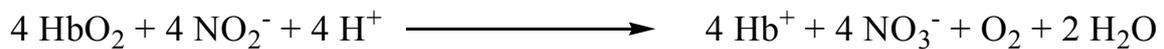
- sanitaire étant cause potentielle de méthémoglobinémie et source de nitrosamine.
- Ecologique en contribuant du phénomène d'eutrophisation.

III.5.1. Effets sanitaires

Les nitrates ne sont pas toxiques 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.5.1.1. La méthémoglobinémie

C'est le phénomène le plus anciennement connue et scientifiquement prouvé. L'hémoglobine assure le transport de l'oxygène dans l'organisme grâce à la présence de fer dans la molécule (à l'état bivalent : fer ferreux). Dans ce cas l'hémoglobine au contact de l'oxygène donne naissance à l'oxyhémoglobine qui assure la livraison d'oxygène aux divers tissus de l'organisme. Si le fer est oxydé à l'état trivalent en présence des nitrites, l'oxyhémoglobine libère son oxygène et se transforme en méthémoglobine (MetHb) incapable de fixer l'oxygène. Il s'agit d'une oxydation de l'hémoglobine.



Stœchiométrie de la réaction entre l'ion nitrite et l'oxyhémoglobine [L'hirondel, 1996].

Au-delà d'un certain taux d'approvisionnement d'oxygène, différents symptômes apparaissent. Lorsque la méthémoglobine atteint 10 % des premiers signes de cyanose, lorsque elle dépasse 20% des signes plus sérieux se font jour comme maux de tête et vertige. 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 six mois car leurs hémoglobine se transforme assez facilement en méthémoglobine en raison que les nourrissons de moins de six mois boivent plus d'eau relativement à leurs poids ainsi que leurs estomac est faiblement acide et contient une flore bactérienne capable de transformer les nitrates en nitrites.

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.

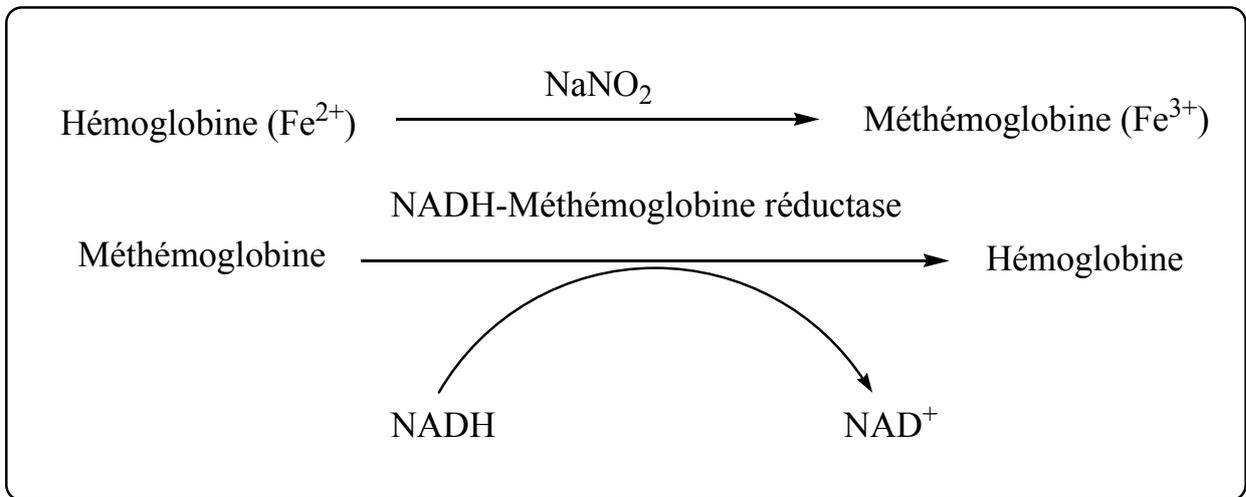


Figure 5 : Réduction de la méthémoglobine par transfert d'un électron du NADH.

III.5.1.2. Cancer des intestins et de l'estomac

Dans l'estomac, les nitrites s'associent aux amines secondaires ou tertiaires présents dans la viande et le poisson pour donner des nitrosamines. Ces composés N-nitrosés sont de puissants cancérigènes chez l'animal [Hathcock, 1982] donc peuvent provoquer le cancer des intestins [Wehbe N., 2008].

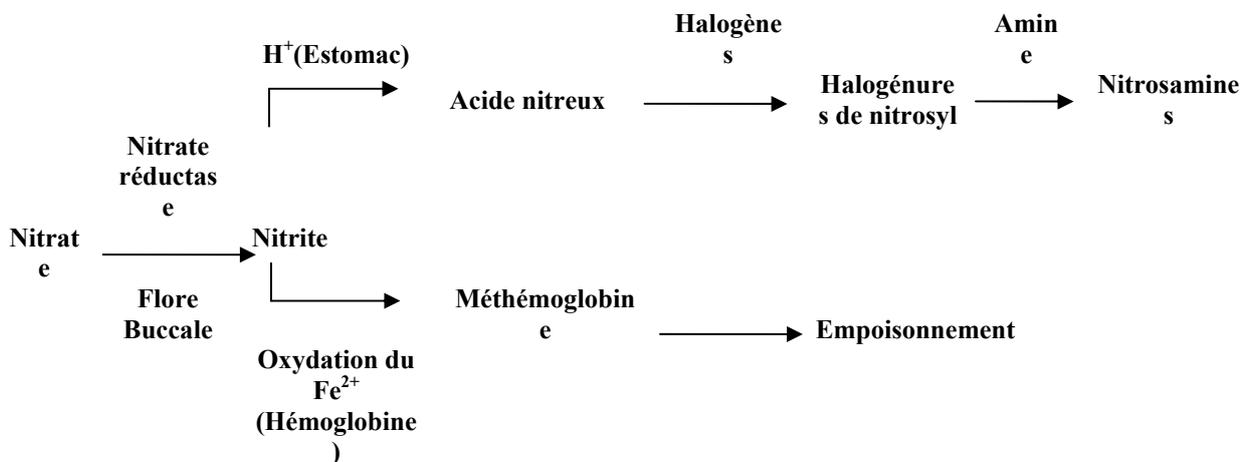


Figure 6 : Effets sanitaires des nitrates.

III.5.2. Effets environnementaux

En ce qui concerne l'environnement, l'augmentation des teneurs en nitrates dans les eaux et en présence des phosphates modifie l'équilibre biologique des milieux aquatiques [Jacques C, 2002].

III.5.2.1. L'eutrophisation

Les nitrates en excès dans les eaux de surfaces sont la principale cause de l'eutrophisation qui est une croissance excessive des micro-algues (phytoplanctons) et des macro-algues dans les rivières, les lacs et les zones littorales.

La matière organique présente dans le fleuve augmente démesurément (l'apparition et la prolifération des algues dans les eaux) et quand les algues meurent, cette matière organique se décompose en consommant tout l'oxygène de la colonne d'eau induisant ainsi l'anoxie, c'est à dire l'absence de l'oxygène dans l'eau et donc la mort de tous les poissons et invertébrés qui conduira par la suite à la mort de l'écosystème aquatique en quelques décennies voire même en quelques années. Cette anoxie ne se produit pas en général dans le réseau fluvial mais dans les estuaires turbides où le transit de l'eau est fortement ralenti et où la décomposition l'emporte sur la production algale. Le phénomène d'eutrophisation fluvial se produit principalement au printemps et en été où l'ensoleillement est fort, permettant la photosynthèse par les algues et la température est élevée.

Le problème d'eutrophisation s'est accentué en Algérie ces dernières années. La figure 7 montre une situation alarmante dans le lac tanga (El kala, Est Algérien) où une grande partie de la surface du lac est couverte par les algues et il est devenu inutilisable pour la récréation. Par le biais des oueds le barrage Ghrib à Ain Edafla reçoit d'une part les

rejets de plusieurs agglomérations et d'autre part les engrais agricoles qui a provoqué au cours de ces dernières années une eutrophisation croissante de cet écosystème

[Mamaidi M.S. et al, 2009].



Figure 7 : L'eutrophisation dans le lac Tanga (w d'El Kala) aout 2009. Parmi les conséquences de pollution humaine sur la faune et sur la flore, canards se baignant dans un lac eutrophié.

III.5.2.2. Les marées vertes

Il s'agit du phénomène de proliférations massives de certaines espèces d'algues, micro ou macroscopiques du genre *ulves*, suite à un enrichissement trop important des eaux en éléments nutritifs, il constitue donc un exemple typique d'eutrophisation du milieu marin côtier. Pour se développer, les *ulves* doivent trouver dans l'eau de mer des quantités suffisantes de sels nutritifs azotés et phosphorés. Depuis plus d'un siècle, les

scientifiques ont classé les algues vertes parmi les végétaux nitrophiles, c'est-à-dire particulièrement demandeurs en nitrates, entre autre pour constituer leur abondant équipement chlorophyllien.



Figure 8 : Individus de grande dimension d'Ulva armoricana, en suspension dans l'eau (Baie de Douarnenez, photo X.Caisey, IFREMER).

Démarrant en mars ou avril sous la forme de petits fragments de thalle en suspension dans l'eau du rivage, la prolifération s'accélère en mai et juin, pour aboutir en général à une biomasse maximale en début d'été, capable de recouvrir par temps calme la quasi-totalité de l'estran lors des marées descendantes. Le phénomène est apparu en Bretagne au début des années 70 [Boquillet et al, 2007], s'amplifiant rapidement pour atteindre maximum fluctuant depuis le milieu des années 80. La production de biomasse est plus ou moins importante et plus ou moins retardée dans l'année selon le régime des pluies, en particulier du printemps, qui influence les quantités de nitrate apportées à la bande côtière.

Le genre *Ulva* présente une très grande plasticité physiologique qui lui confère un avantage dans la compétition interspécifique. La minceur du thalle et l'importance du rapport surface/volume autorise des échanges importants avec le milieu ambiant [Menesguen, 2001]. Ce genre est capable de s'adapter à des éclaircements faibles ou élevés [Henley *et al*, 1991], ainsi qu'il peut supporter une température de -5°C durant

deux semaines à l'obscurité, et reprendre ensuite sa croissance lorsque les conditions redeviennent favorables [Kamermans *et al*, 1998] donc il peut passer l'hiver et reprendre sa croissance lorsque les conditions redeviennent plus favorable.



Figure 9 : Evolution saisonnière typique d'une marée verte à ulves sur la plage de Saint-Efflam (Côtes d'Armor). Démarrage printanier (en haut à droite), apogée en juillet (en haut à gauche). [Ménesguen A., 2003].

Vu les différents effets néfastes causés par la présence des nitrates dans les eaux (sur la santé et l'environnement) cités si dessus, il est temps pour lutter contre la pollution des eaux par les nitrates.

IV. Traitement des nitrates

Actuellement l'élimination des nitrates peut être classée en deux catégories :

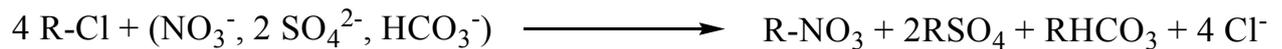
- Les procédés physico-chimiques : échange d'ions, procédés membranaires, procédés électrochimiques.
- Les procédés biologiques : dénitrification hétérotrophe ou autotrophe.

IV. 1. Les procédés physico-chimiques

On utilise le terme dénitratisation par opposition de la dénitrification qui correspond à une transformation biologique.

IV. 1. 1. Echange d'ions

Le traitement des eaux par échange d'ions est un procédé ancien largement répandu. Le principe de cette technique repose sur l'échange ionique entre les ions indésirables présents dans l'eau avec les ions chlorures contenus dans une résine en quantité équivalente selon la réaction suivante :



On distingue deux types de résines, des résines cationiques échangeurs d'ions électropositifs et des résines anioniques échangeurs d'ions électronégatifs. Dans le cas de l'élimination des nitrates on utilise les résines anioniques.

Les caractéristiques des résines jouent un rôle très important dans l'affinité entre les différents anions, car il existe des résines plus ou moins sélectives aux ions nitrates dont l'ordre est le suivant :



L'inconvénient de cette technique est que les résines possèdent une capacité d'échange limitée et doit être régulièrement régénérées par une solution fortement concentrée d'ions choisis. Ainsi selon l'ordre d'affinité ci dessus, une eau chargée par les sulfates pourra être gênante dans l'élimination des nitrates. Par cette technique, les nitrates sont donc déplacés mais pas éliminés, actuellement après régénération des résines les éluats sont rejetés en station d'épuration des eaux usées.

IV. 1. 2. Les procédés membranaires

Les procédés membranaires sont des procédés de traitement où on fait passer l'eau à purifier par une membrane poreuse spécifique afin d'arrêter le passage des molécules

dont la taille est supérieure à celle des pores de la membrane. Les membranes utilisés pour le traitement des nitrates sont des nanofiltres. L'osmose inverse est aussi connue pour le fait de pouvoir séparer les ions des sels dissous du solvant.

IV. 1. 2. 1. Osmose inverse

L'osmose inverse est l'application d'une pression supérieure à la pression osmotique de l'eau à traiter, riche en nitrates, en utilisant un film semi-perméable de faible épaisseur [Maurel A. 2006]. Sous l'action d'une certaine pression, la membrane laisse passer l'eau et s'oppose au passage des solutés (figure 10).

Cette technique est bien développée pour le dessalement de l'eau de mer et reste limitée pour la dénitrification [Balducchi, 94].

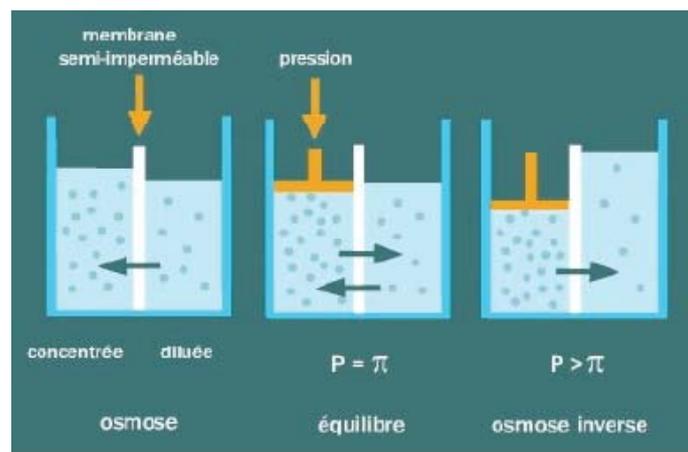


Figure 10 : schémas représentatifs de l'osmose inverse pour l'élimination des sels dissous [Wehbe N., 2008].

IV. 1. 2. 2. L'électrodialyse

L'électrodialyse est une technique électro-membranaire qui désigne le transfert des sels dissous d'une eau à travers une membrane, sous l'effet d'un champ électrique. Le principe de l'électrodialyse est l'application d'un courant continu entre les électrodes

d'une cellule constituée de succession de cellules à compartiment de membranes semi-perméables alternativement anioniques et cationiques. Lors de l'action du champ électrique, la membrane anionique autorise le passage des anions et la membrane cationique laisse passer les cations. Les cations sortant du premier compartiment, en franchissant la membrane cationique, sont bloqués dans le deuxième compartiment par la membrane anionique. Les anions sortant aussi du premier compartiment en migrant à travers la membrane anionique sont bloqués par la membrane cationique. Dans le cas des nitrates on a un compartiment sur deux riche en nitrates. La mise en œuvre de cette technique nécessite l'utilisation de membranes sélectives (à base de benzyl-4-pyridinium) qui permettent de retenir les nitrates. Le rendement obtenu pour l'élimination des nitrates peut atteindre 40 à 60%.

L'inconvénient majeur de cette technique est qu'elle est efficace pour les eaux fortement concentrées (environ 5000 ppm) et reste peu efficace pour les eaux de faibles concentrations, ainsi les nitrates sont extraits de l'eau et non éliminés. Ils se retrouveront donc sous forme de déchets.

IV. 1. 2. 3. La nanofiltration

La nanofiltration est une technique membranaire récente qui couvre un domaine de séparation intermédiaire entre l'ultrafiltration et l'osmose inverse, dans la famille des procédés membranaires sous pression [Santafé-Moros, 2005. Garcia F. et al, 2006]. Elle est basée sur l'utilisation d'une membrane à pores nanométriques (< 2 nm) porteuse de charges ioniques superficielles. La membrane peut être composée d'un matériau organique ou minéral.

La nanofiltration permet de retenir les molécules de masses moléculaires allant de 200 à 2000 g/mol) par effet physique et les ions sont retenus par effet électrostatique. Elle est donc utilisée principalement dans le domaine de la pharmacie, pour la séparation de petites molécules à forte valeur ajoutée (antibiotiques). Dans le cas des nitrates, la présence des sels a un effet marqué sur la rétention des nitrates. [Garcia et al, 2006] ont étudié l'influence de divers ions dans la solution de nitrates, et ont montré que la présence des ions sulfates divalents provoque une diminution de la rétention des nitrates à cause de leur taille et des répulsions électrostatiques (la membrane étant chargée négativement), les nitrates traversent alors la membrane pour assurer l'électroneutralité du perméat.

IV. 1. 3. Procédés électrochimiques

Cette méthode a été largement étudiée pendant les dernières années [Tada K., 2005]. Elle consiste à appliquer une tension sur une électrode de Pt (ou Pd) activée avec du germanium [Gootzen J. F. E. et al, 1997]. Les électrons libérés conduisent à la réduction des nitrates et engendrent des espèces intermédiaires NO_2^- , NH_3 ... L'inconvénient de cette technique est le fait que l'eau obtenue contient des concentrations assez élevées en métal dissous tel que l'étain Sn^{2+} [Katsounaros I., 2006] qui n'est pas admis pour la consommation humaine.

IV. 2. Les procédés biologiques

Les traitements biologiques occupent une place importante parmi les procédés mis en place pour éliminer les nitrates. La dénitrification biologique est un processus anoxique au cours duquel les bactéries hétérotrophes vont modifier leurs métabolismes pour utiliser les nitrates (NO_3^-) comme accepteur final d'électrons au lieu de l'oxygène

moléculaire. La réduction biologique du nitrate au cours de la dénitrification mènera à la production finale de N₂ (produit gazeux inerte). En France et à l'étranger, les eaux usées sont majoritairement traitées par voie biologique qui s'avère plus économique que par voie physico-chimique. Le coût de traitement des nitrates par voie biologique en couplant la nitrification et la dénitrification est estimé à 2,3 à 4,5 Euro/Kg alors que celui du traitement physico-chimique est de 4,5 à 11,3 [Van Dongen U. et al, 2001].

IV. 3. Choix de notre traitement

Tableau 4 : Avantages et inconvénients des différents procédés d'élimination des nitrates.

Procédé	Avantages	Inconvénients
biologique	Elimination totale des nitrates. Probabilité faible de formation de sous-produits toxiques. Spécifique des nitrates.	Faible à basses températures. Surveillance suivie.
Résines échangeuses d'ions	Fiable en toutes circonstances. Adaptable à un fonctionnement automatique peu sensible aux basses températures.	Complexité du cycle CO ₂ Dépend de la qualité de l'eau brute. Non spécificité des espèces retenues (SO ₂ ⁻ , Cl ⁻). Nécessité d'une régénération de résine. L'eau traitée peut être corrosive. Rejets très concentrés en nitrate.
Osmose inverse	Procédé bien maîtrisé fiable en toutes circonstances. Peut fonctionner en automatique. La composition de l'eau brute a peu d'importance.	Modifie la qualité de l'eau initiale (l'eau traitée peut être corrosive). Traitement non spécifique. Coût élevé. Problème d'évacuation des éluats riches en nitrates.

		Durée de service des membranes.
Electrodialyse sélective	Ne nécessite pas de régénération.	Spécificité moyenne pour des rendements limités Nécessité d'un prétraitement Ponctualité de rejets concentrés.

Le Tableau 3 ci-dessus résume les principaux avantages et inconvénients des méthodes utilisées pour l'élimination des nitrates de l'eau potable. On voit que chaque procédé physico-chimique présente des difficultés, soit sur le plan technique, soit sur le plan économique contrairement aux processus biologiques qui ont l'avantage de ne régénérer aucun déchet secondaire.

Vu la facilité, l'efficacité et le coût modéré de la dénitrification biologique elle semble donc être la mieux adaptée aux moyens de l'Algérie.

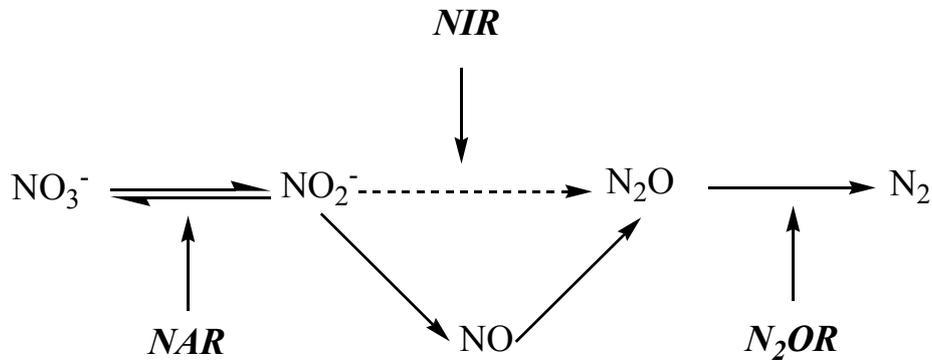
V. Elimination biologique des nitrates

Il est intéressant de rappeler dans un premier temps le principe de la dénitrification biologique ainsi que les différents paramètres affectant le processus.

V. 1. La dénitrification biologique

Nous détaillons la dénitrification dans la mesure où ce processus a été utilisé comme une solution pour l'élimination de la pollution nitrique dans la partie expérimentale de ce travail. La dénitrification est un processus respiratoire microbien au cours duquel des microorganismes sont capables de substituer à l'oxygène des formes oxydées de l'azote comme accepteur terminal d'électrons dans leur chaîne respiratoire. Les oxydes d'azote

solubles, nitrates (NO_3^-) ou nitrites (NO_2^-), sont transformés en composés gazeux : oxyde nitrique (NO), protoxyde d'azote (N_2O) et/ou azote (N_2) selon la chaîne de réactions suivante:



Chaque étape est catalysée par une enzyme particulière : nitrate réductase (NAR), nitrite réductase (NIR), oxyde nitrique réductase (NOR) et enfin oxyde nitreux réductase (N_2OR) [Cavigelli et al, 2001]. On distingue deux types de dénitrification : la dénitrification hétérotrophe (utilisation du carbone organique comme source d'énergie) et la dénitrification autotrophe.

V. 1. 1. La dénitrification autotrophe

La dénitrification autotrophe permet de réduire les nitrates en azote gazeux dans des conditions anoxiques par l'utilisation d'une source d'énergie inorganique. L'une des substances inorganiques utilisées est le soufre, ce qui donne son nom au procédé « procédé soufre/Chaux » ; le soufre jouant le rôle de donneur d'électrons la chaux servant à maintenir le pH.



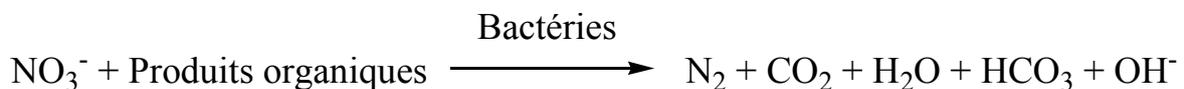
Cette réaction est catalysée par des bactéries autotrophes anaérobies du genre Thiobacillus qui ont la capacité de réduire les nitrates en oxydant de nombreux

composés soufrés comme S^{2-} , S , $S_2O_3^{2-}$, $S_4O_6^{2-}$, SO_3^{2-} et même H_2S . La dénitrification autotrophe se situe en profondeur souvent plus de 10 m sous la surface du sol, c'est pour cela qu'elle est rencontrée parfois d'une manière spontanée dans les eaux souterraines et elle est pratiquement absente dans les eaux de surfaces où la matière organique est dominante. En l'absence des composés soufrés les Thiobacillus peuvent utiliser la pyrite comme source d'énergie.



V. 1.2. La dénitrification hétérotrophe

La dénitrification hétérotrophe est la réaction la plus utilisée dans les procédés biologiques mis en œuvre à l'échelle industrielle. La réaction peut se schématiser comme suit :



La plupart des bactéries permettant la dénitrification sont hétérotrophes. Parmi les plus connues on trouve les Pseudomonas et Bacillus [Paynes, 1981]. En absence d'oxygène, ces bactéries dénitrifiantes, souvent anaérobies facultatives, vont utiliser l'oxygène des nitrates comme accepteur final d'électrons. Certaines de ces bactéries ne peuvent accomplir qu'une ou deux étapes de la dénitrification. La dénitrification hétérotrophe requiert un donneur d'électrons d'un composé organique (glucose, méthanol, éthanol,...) [Bougard, 2004].

Dans notre étude nous avons choisi la dénitrification hétérotrophe, donc nous allons parler des conditions optimales ainsi que des différents paramètres affectant ce processus.

V. 2. Les lieux de dénitrification

Les modèles globaux qui décrivent la distribution spatiale de la dénitrification au niveau des écosystèmes montrent que les sédiments des plateaux continentaux assurent la plus grande part de la dénitrification (44%) suivis par les sols (22%) et les zones océaniques en condition d'anoxie (12%) [Seitzinger et al, 2006]. Les systèmes d'eau douce (aquifères, lacs, rivières) réaliseraient 20% de la dénitrification totale et les estuaires 1% d'après [Seitzinger et al, 2006].

V. 3. Facteurs biologiques de la biodégradation des nitrates

V. 3. 1. Les micro-organismes dénitrifiants

Les micro-organismes dénitrifiants au sens strict sont des micro-organismes capables de réduire NO_3^- ou NO_2^- en N_2O et/ou N_2 et qui peuvent utiliser l'énergie libérée au cours de cette réduction pour se développer [Mahne et Tiedje, 1995]. Tous les micro-organismes dénitrifiants sont des micro-organismes aérobies pouvant s'adapter à une respiration sur NO_3^- , NO_2^- ou sur N_2O quand le milieu devient pauvre en O_2 (on parle de micro-organismes aérobies facultatifs). Les 2/3 de la microflore réduisent les NO_3^- en NO_2^- , mais seulement un faible pourcentage semble être de type *Pseudomonas* et *Bacillus* qui possèdent un arsenal enzymatique suffisamment complet pour réduire les nitrates jusqu'au stade de l'azote moléculaire et capable de réaliser toute la chaîne de réactions [Germon et Hénault, 1994].

V. 3. 2. Les enzymes de la dénitrification

Chacune des étapes de la chaîne de dénitrification est catalysée par une enzyme spécifique. Certains micro-organismes ne possèdent pas la totalité des enzymes et par

conséquent, ils ne peuvent réaliser qu'une seule partie de la chaîne de dénitrification. Deux principaux types de nitrate réductase ont été distingués : la nitrate réductase assimilatrice et dissimilatrice. Plusieurs nitrate réductases dissimilatrices ont été mises en évidence: deux sont des enzymes membranaires et sont inhibées par l'oxygène, une autre est périplasmique et peut fonctionner en présence d'oxygène dès qu'il y a du NO_3^- . La synthèse de NO_3^- réductase est régulée par des protéines qui ont pour rôle de réguler certaines fonctions bactériennes en fonction de la pression partielle en oxygène. [Unden et Schirawski, 1997].

La N_2O réductase (N_2OR) est une enzyme périplasmique soluble, sa complexité peut être due à la possibilité d'une compétition entre NO_3^- et N_2O comme accepteurs d'électrons [Cho et Sakdinan, 1978].

V. 4. Facteurs influençant la dénitrification

La dénitrification est le résultat complexe d'interactions entre des paramètres physiques, hydrologiques et chimiques, mais également biologiques.

Les conditions requises pour que la dénitrification ait lieu sont d'abord la présence de donneurs d'électrons, c'est à dire la source de carbone organique, ensuite une anaérobiose stricte ou modérée qui régule l'activité enzymatique, la présence de formes azotées oxydantes comme les nitrates, les nitrites et enfin la présence des bactéries capables de réaliser ce processus.

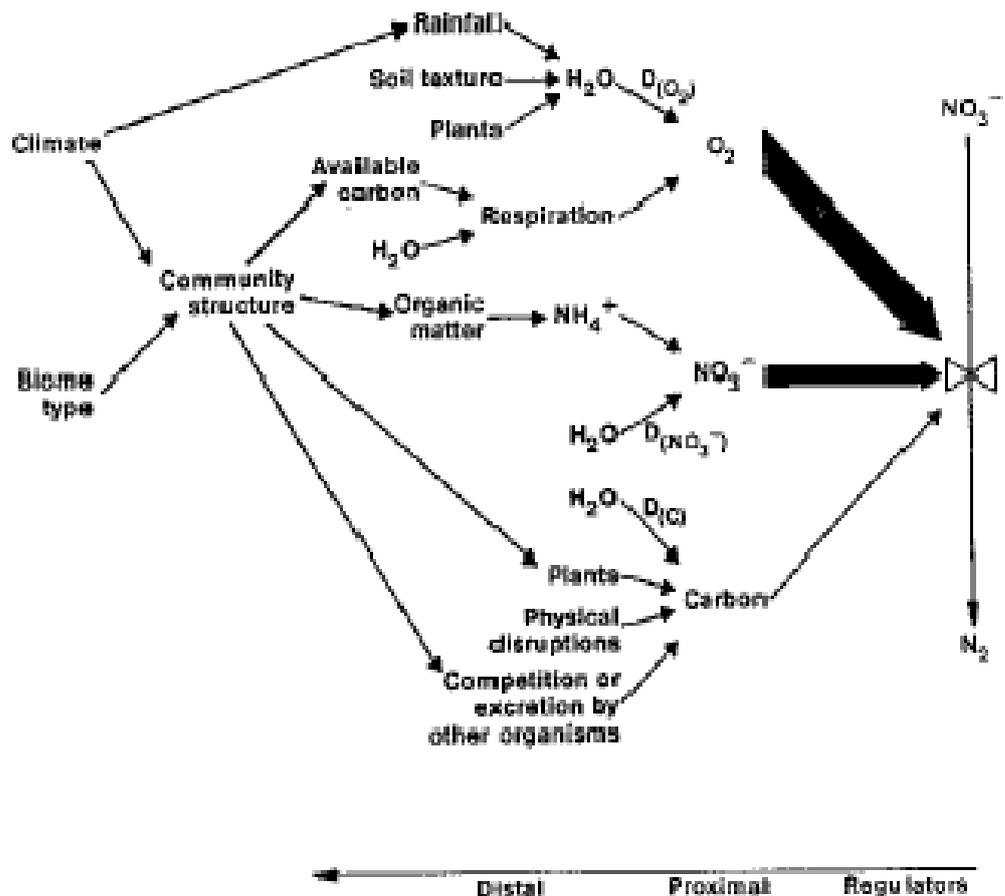


Figure 11 : Relation entre les différents paramètres influant la dénitrification [Groffman et al, 1989].

L'intensité de la dénitrification est donc susceptible d'être conditionnée par des variations de plusieurs facteurs chimiques et physico-chimiques comme décrit ci-dessous.

V. 4. 1. La concentration initiale des nitrates

En général, les nitrates sont nécessaires pour la synthèse des enzymes surtout la nitrate réductase. Selon Brayn 1981, le nitrate affecte la production du nitrate réductase. Sa présence déclenche la synthèse et sa concentration détermine la quantité d'enzyme synthétisé. Cette relation peut être décrite par une cinétique de Michaël-Menten qui se

caractérisée par une forte dépendance de la vitesse de dénitrification à la concentration des nitrates [Betlach M. R. et Tiedje J. M, 1981].

Un autre effet de la concentration initiale des nitrates pourrait être sur l'ordre de la réaction. [Bowman R. A. et Focht D. D, 1974] mettent en évidence une cinétique d'ordre 1 pour de faibles concentrations en nitrates tandis que pour de fortes concentrations la cinétique de la réaction serait d'ordre 0.

V. 4. 2. Le carbone organique

Comme la plupart des micro-organismes dénitrifiants sont hétérotrophes, la présence de carbone organique donc est indispensable à la réalisation du processus de dénitrification, car le substrat carboné fournit l'énergie nécessaire à leur métabolisme et constitue l'élément de base de leurs synthèses cellulaires. Le carbone organique favorise également le processus de dénitrification en accélérant la respiration aérobie. [Davidsson et Leonardson, 1996]. Tandis que les faibles performances de dénitrification biologique, résultant en général d'une limitation des eaux usées en carbone, imposent l'apport d'une source de carbone exogène afin d'améliorer les performances de traitement. Le méthanol et l'acétate sont les principaux substrats carbonés synthétiques ayant été utilisés dans le domaine de la dénitrification des eaux résiduaires [Louzeiro et al., 2002, Foglar et Briski., 2003].

La disponibilité en carbone organique facilement assimilable (biodégradable) peut être un facteur limitant de la dénitrification. [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 (figure 12), on peut dire alors que le processus de dénitrification est sensible à la qualité qu'à la

quantité de carbone organique présent dans l'eau et les sédiments [Groffman et al., 1991].

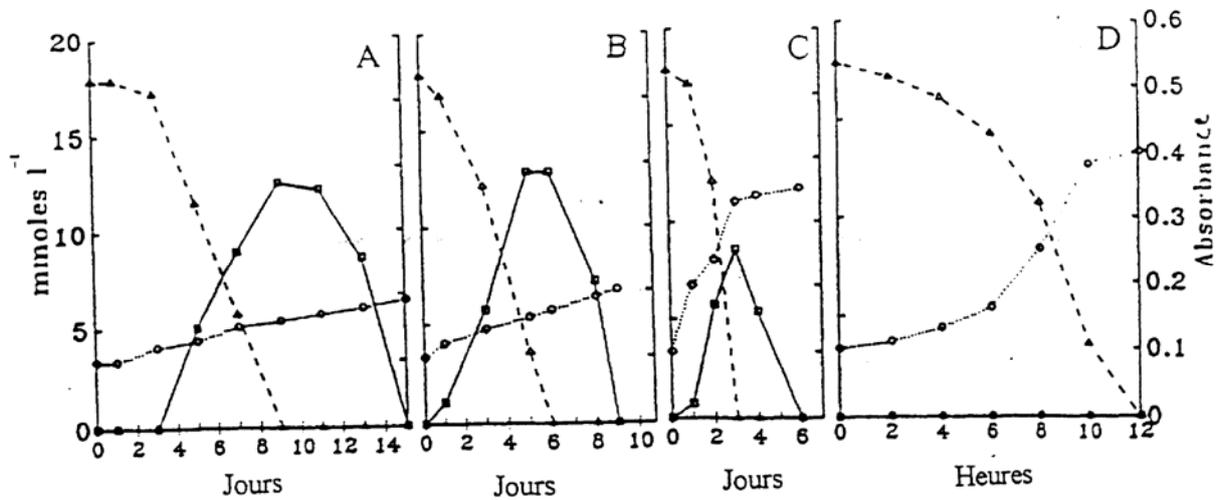


Figure 12 : Comparaison de la dénitrification en présence de différentes sources de carbones (Blasczyk, 1993). A : méthanol, B = acétate, C = éthanol, D = milieu riche (Δ = nitrate \square = nitrite, \circ = absorbance) [Patureau, 1995].

V. 4. 3. L'oxygène dissous

Les rendements de dénitrification sont affectés par la présence d'oxygène. En effet, les micro-organismes réalisant la dénitrification étant des aérobies facultatifs, ils consomment l'oxygène dissous avant l'oxygène des nitrates. Cependant, la dénitrification peut commencer en présence de faibles taux d'oxygène dissous [Mariotti, 1986]. Le taux limite d'oxygène dissous à partir duquel la dénitrification peut s'initier est compris entre 0,2 et 2 mg/L [Nakajima et al., 1984, Trevor., 1985]. Ceci peut être expliqué par l'existence de quelques micro-organismes qui sont capable de dénitrifier en aérobiose. En présence d'une forte concentration d'oxygène dissous, les étapes de la dénitrification sont graduellement inhibées, c'est d'abord la réduction de l'oxyde nitreux ou protoxyde d'azote (N_2O) qui est affectée puis celle du nitrite et enfin celle du nitrate.

V. 4. 4. La température

La température est un important facteur de contrôle de dénitrification [Hiscock K. M. et al, 1991] étant l'œuvre d'un grand nombre d'espèce de micro-organisme. Bien que la dénitrification puisse avoir lieu pour une très large gamme de températures, entre 0 et 60°C, celle-ci reste relativement faible entre 0 et 5°C [Smid A.E. et Beauchamp E.G, 1976]. Entre 2 et 25°C, la dénitrification augmente de manière continue et reste plus ou moins stable entre 25 et 60°C. Alors qu'à des températures supérieures à 60°C elle décroît [Knowles R, 1982]. Les pourcentages d'augmentation du taux de dénitrification en fonction de la température sont très variables d'un site à l'autre.

Il existe plusieurs équations qui relient la température et la dénitrification on peut citer par exemple la relation suivante [Knowles R, 1982] :

$$K_t = K_{20} \times \theta^{(t-20)}$$

Où K_t = taux de dénitrification à la température t

K_{20} = taux de dénitrification à 20°C

t = température en °C

θ = constante comprise entre 1,13 et 1,05

V. 4. 5. Le pH

Le pH optimum se situe entre 7 et 8,5 [Bougard, 2004]. Les variations de pH influencent surtout la nature des produits de la dénitrification. Pour les pH inférieurs à 6, la réduction de l'azote est incomplète et il y a production d'oxyde nitreux (N₂O), alors que pour des pH supérieurs à 6 la dénitrification est totale et le produit formé est essentiellement du N₂ [Knowles, 1982]. La réaction de dénitrification 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.

V. 4. 6. 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. Le rapport DCO/N pour une dénitrification complète est égal à 2,86 pour le nitrate et 1,71 pour le nitrite sans tenir compte de la croissance cellulaire. De nombreux auteurs [Skrinde J.R. et Bhagat S.K, 1982, Tam N. F. Y *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. Des études sur la dénitrification [Bernet N. *et al*, 1996] montrent que le rapport C/N minimal pour une réduction totale du nitrate en N₂ est de 3,4 et 1,08 pour une dénitrification totale du nitrite.

V. 4. 7. Le rôle du potentiel d'oxydo-réduction

Les réactions de respiration ou de dénitrification étant composées d'une succession de réactions d'oxydo-réduction, le potentiel d'oxydo-réduction global de chaque intermédiaire est un facteur important. La vitesse de dénitrification augmente lorsque le potentiel d'oxydo-réduction décroît [Lie E. et Wellander T, 1994]. [Kucera I. et al. 1983] ont montré que le nitrite et le protoxyde d'azote produits lors de la dénitrification ou ajouté au milieu, diminuaient le taux de réduction de nitrate en oxydant la chaîne respiratoire via les nitrites et l'oxyde nitreux réductases.

V. 4. 8. Influence biologique

La dénitrification est assurée par les communautés des microorganismes. Elles sont structurées sur le long terme par la disponibilité en carbone, le pH, la température

[Enwall K. et al 2005]. Leur composition reflète donc les conditions environnementales. Mais les tolérances ne sont pas les mêmes pour tous les types de bactéries [Wallenstein M. D. et al 2006]. La biodiversité offre une grande variété de microorganismes pouvant réaliser la dénitrification. Certains tolèrent des pH acides, contrairement à d'autres qui ont besoin de pH exclusivement neutres, ou certains supportent des degrés d'assèchement plus fort que d'autres. Le paramètre biologique influe donc lui aussi directement sur la dénitrification.

V. 4. 9. Substances toxiques

Mis à part les influences de l'oxygène et du pH, d'autres corps ou composés inhibent la dénitrification ; selon leur composition : ils peuvent agir au niveau des enzymes comme inhibiteurs compétitifs qui empêchent leur régénération [Martin G, 1979]. Parmi les substances toxiques pour la dénitrification, on peut citer :

- Les cyanures et le dinitriphénol qui inhibe la chaîne respiratoire des microorganismes.
- Les ions sulfures qui inhibent NOR et N₂OR.
- L'acétylène qui inhibe N₂OR.

V. 5. Principes fondamentaux de la biodégradation dans les milieux aqueux

Le mot biodégradation (ou dégradation biologique) désigne un phénomène naturel général dans le monde, tendant à transformer et minéraliser les déchets présents dans l'eau grâce à l'action des microorganismes, notamment des bactéries. L'homme peut aussi accélérer artificiellement ce processus en favorisant le développement des bactéries dans des stations d'épuration des eaux usées et d'effluents gazeux.

En présence de milieu riche en nutriments, les micro-organismes vont se développer rapidement et auront tendance à former des masses floconneuses plus ou moins

compactes. Le floc bactérien ainsi définie, permettra l'oxydation des matières biodégradables. En fait, le phénomène est plus complexe puisqu'une partie des matières organiques est assimilée et transformée en matériels cellulaires et une autre partie est dégradée par oxydation dont l'énergie récupérée sert à la synthèse cellulaire. Lorsque la nourriture est abondante, il ya alors un phénomène de stockage par les cellules qui l'utiliseront au fur et à mesure de leurs besoins (Figure 13) [Gaid A, 1984].

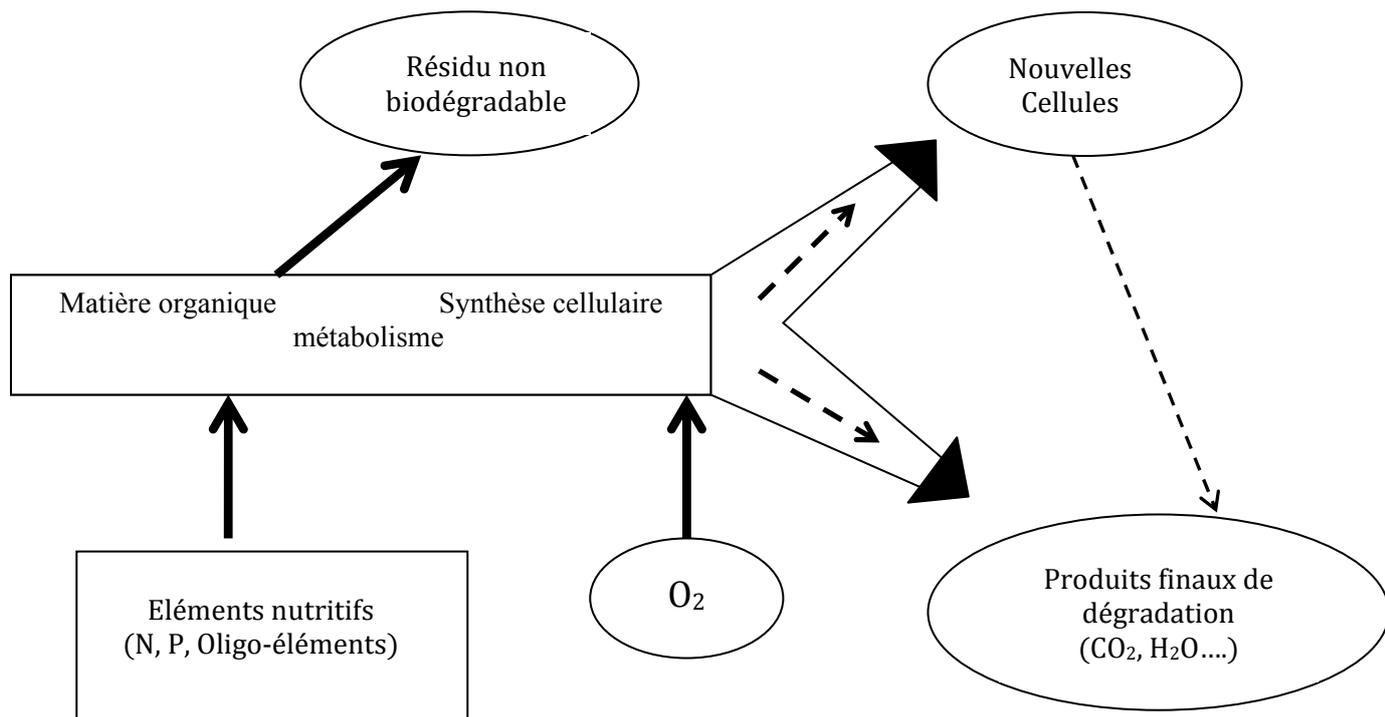


Figure 13 : Schéma de principe d'utilisation de la matière organique.

Bien que le procédé utilisé dans notre étude est un procédé biologique, une bonne connaissance des micro-organismes (caractéristique, énergétique, composition) ainsi que les différents facteurs influençant ces derniers est nécessaire à la compréhension du mécanisme de la biodégradation afin d'optimiser les conditions de notre travail.

VI. Les communautés de micro-organismes

La communauté est généralement définie comme un ensemble de populations. L'ensemble des micro-organismes recouvre donc un très large éventail d'entités,

caractérisé par une grande diversité taxonomique. Le seul critère d'unité serait la taille microscopique. En Ecologie microbienne, le terme micro-organismes peut désigner des assemblages d'espèces bactériennes qui sont en interaction dans un même écosystème ou milieu et qui partagent une même fonction. Dans notre manuscrit, le terme micro-organismes sera utilisé avec une connotation fonctionnelle en parlant par exemple des micro-organismes dénitrifiants qui rassemble la totalité des bactéries partageant la capacité à dénitrifier.

VI. 1. Structure

Selon un critère strictement morphologique, trois formes prédominantes sont observées dans la nature :

- les micro-organismes sphériques ou coccoïdes
- les micro-organismes cylindriques dites en bâtonnet
- les micro-organismes spiralés.

Mais il peut y avoir d'autres variantes, telles que les micro-organismes pédonculés et les formes filamenteuses.

Dans certaines conditions de stress : température excessive ou trop basse, pH inapproprié, carence nutritive... certains micro-organismes sont capables de développer des formes de résistance appelées spores. Ces formes, d'origines diverses, endospores, spores hyphales ou kystes, permettent la survie des micro-organismes durant de longs laps de temps. Des conditions favorables et notamment un milieu humide (la spore contient seulement 20% d'eau) sont nécessaires à sa germination et à la reprise de cycles végétatifs.

VI. 2. Croissance et métabolisme des micro-organismes

L'étude de la croissance des micro-organismes en présence d'un mélange de substrats est un des domaines les plus riches de la biologie expérimentale. Ce phénomène présente aussi un grand intérêt écologique et technologique. Dans la nature ou dans plusieurs environnements engendrés par les activités humaines tels que les systèmes de traitement des eaux usées et les fermenteurs commerciaux, les microorganismes se développent en présence de divers mélanges de substrats [Narang A. et al, 1997].

Pour pouvoir suivre la cinétique de croissance il a fallu à l'origine modéliser cette croissance dans un milieu non renouvelé, ce qui correspond à l'analyse «*des cultures en batch*» [Lobry J. R, 1991]. Ce mode de croissance est obtenu en culture sur milieu liquide, réalisée en flacon (tube à essais, erlens,...) ou en bioréacteur pour mener des cultures en conditions contrôlées. Le milieu n'est pas renouvelé et sa capacité d'utilisation se limite à ses ressources initiales.

Tous les micro-organismes cultivés se développent d'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.

VI. 2. 1. Schéma de la croissance

Comme précisé précédemment, la culture en batch permet de suivre tout le cycle d'une population de micro-organismes. Ce cycle est également représenté sous forme d'une courbe de croissance correspondant au suivi de la population (densité de population N) ou au suivi de la biomasse (densité de la biomasse X), éventuellement après transformation logarithmique, en fonction du temps.

Depuis la première description de [Buchanan, 1918], il est classique de distinguer plusieurs phases dans la croissance des cultures des micro-organismes. Ces phases sont caractérisées par certaines valeurs ou variations de la vitesse de multiplication de la culture. On reconnaît classiquement les sept phases successives suivantes (Figure. 14) :

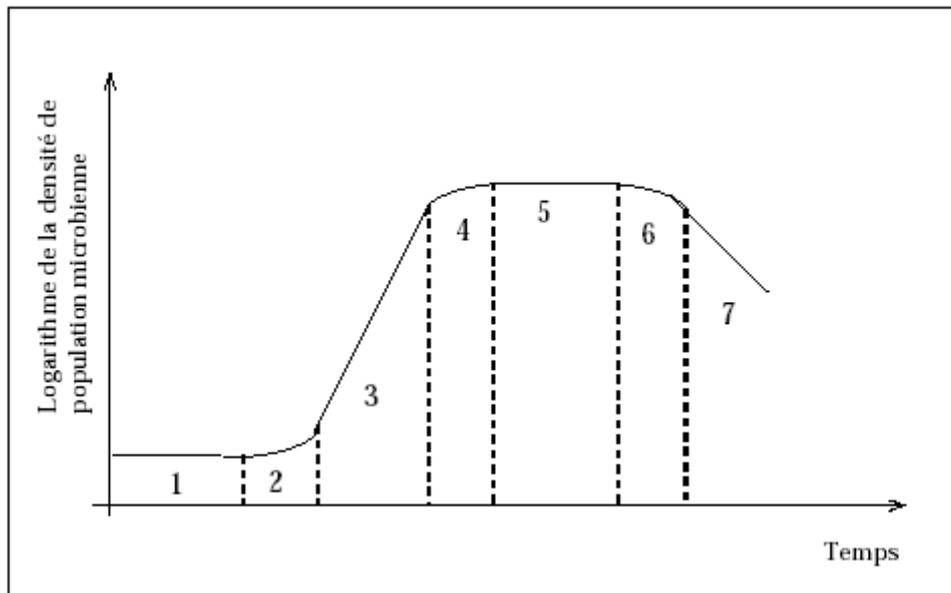


Figure 14 : les phases de croissance établies par [Buchanan, 1918].

a. La phase de latence

Il s'agit d'une période d'adaptation au cours de laquelle la cellule synthétise en particulier les enzymes qui lui sont nécessaires pour métaboliser le substrat présent [Reatz et Bauer, 2001]. Au cours de cette phase, il n'y a pas de reproduction cellulaire :

$$X = \text{cte} = X_0$$

X: la concentration cellulaire (nombre de cellule ou concentration en biomasse bactérienne par unité de volume de culture).

X_0 : la concentration cellulaire au temps $t = 0$.

La vitesse de croissance ($dX/dt = 0$).

b. La phase d'accélération de croissance

Lorsque la phase d'adaptation précédente est terminée, on assiste au démarrage de la croissance proprement dite : la reproduction cellulaire commence.

c. La phase exponentielle de croissance

Pendant cette phase, les microorganismes se divisent et doublent leur nombre à un intervalle de temps régulier d'où la population est presque uniforme en termes de propriétés chimiques et physiologiques. Au cours de cette phase, la vitesse de croissance dX/dt augmente proportionnellement à X . D'où l'allure logarithmique (ou exponentielle) du phénomène.

En coordonnées semi-logarithmique, ($\text{Log}X = f(t)$), cette phase a l'allure d'une droite :

$$dX/dt = \mu X$$

On peut modéliser simplement la phase exponentielle de croissance par :

$$\text{Log}X = \text{Log}X_0 + \mu t$$

$$X = X_0 \cdot e^{\mu t}$$

Le taux de croissance est quant à lui constant et maximal, il est défini par l'équation différentielle suivante :

$$\mu = dX/dt \cdot 1/X = \mu_{\max}$$

Pour cette phase :

$$\text{Log}X_2 - \text{Log}X_1 = \mu_{\max} (t_2 - t_1)$$

$$\mu_{\max} = (\text{Log}X_2 - \text{Log}X_1) / (t_2 - t_1)$$

d. La phase de ralentissement

La vitesse de taux de croissance régresse. Il y a un épuisement du milieu de culture du fait de la disparition d'un ou plusieurs composés nécessaires à la croissance et à une

accumulation des produits inhibiteurs résultants du métabolisme bactérien, il existe un début d'autolyse des micro-organismes.

e. La phase stationnaire

Dans cette période, il n'y a aucune augmentation du nombre de micro-organismes. Le taux de croissance par organisme est nul.

f. Phase de mort accélérée

Durant cette période, le nombre de micro-organismes décroît, d'abord lentement puis de plus en plus vite, jusqu'à l'établissement d'une phase de mortalité logarithmique. Le taux de mortalité par organisme augmente jusqu'à un certain maximum

g. la phase de déclin (décroissance)

Un changement nuisible de l'environnement comme la carence en nutriment et l'accumulation de déchets toxiques conduisent à la diminution du nombre de cellules viables et une lyse cellulaire sous l'action des enzymes protéolytiques endogènes, caractéristique de la phase de mortalité. La mort d'une population de micro-organismes, comme sa croissance durant la phase exponentielle, est habituellement logarithmique. La cinétique de croissance des micro-organismes est donc essentiellement composée d'une phase de latence suivie d'une phase exponentielle puis d'une phase stationnaire.

VI. 2. 2. Les techniques classiques de la mesure de croissance

Les deux méthodes de mesure de la croissance d'une population de microorganismes les plus couramment utilisées sont [Mc Meeking T. A et al, 1993] :

Le dénombrement de cellules viables sur boîte de pétrie.

La mesure de la biomasse par turbidimétrie. [Delignette-Kuller M.L, 1995].

La première technique nécessite l'ensemencement par un échantillon de la suspension bactérienne d'une boîte de pétrie et une culture au terme de laquelle sont comptées les colonies (figure 15.). Cette technique suppose qu'à un microorganisme déposé au départ de pétrie correspond après culture exactement une colonie. La croissance est ainsi mesurée en *unités formant colonie (UFC)*.

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.

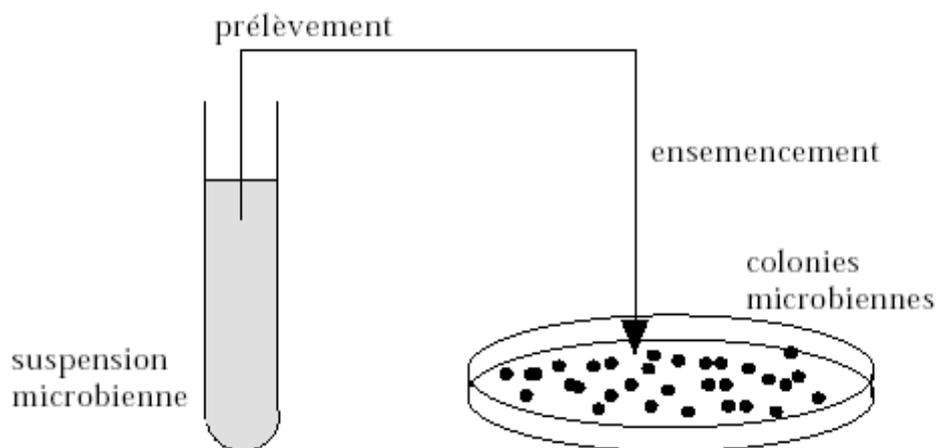


Figure 15 : technique de traitement sur boîte de pétri.

La deuxième technique ne consiste pas à compter directement les cellules mais à mesurer la biomasse bactérienne. C'est-à-dire la masse cellulaire sèche totale [Meynell G. G. et al, 1970].

L'augmentation de la biomasse bactérienne accompagnant la croissance d'une population de

microorganismes entraîne l'opacification du milieu de culture, les techniques turbidimétriques permettent de suivre l'évolution de la biomasse bactérienne par la mesure de la *densité optique (DO)*. Cette variable définie comme logarithme du rapport entre l'intensité I_0 du faisceau incident et l'intensité I du faisceau transmis, caractérise l'opacité d'un milieu (figure 16).

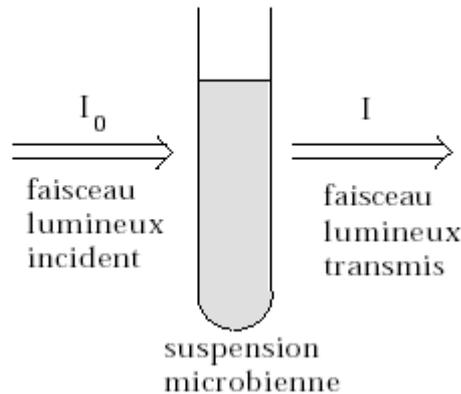


Figure 16 : technique turbidimétrique de mesure de la biomasse.

VI. 3. Les facteurs influençant la croissance des micro-organismes

VI. 3. 1. Facteurs nutritionnels

Les besoins nutritifs requis par les cellules peuvent être classés en deux catégories : les macroéléments et les microéléments.

VI. 3. 1. 1. Les macroéléments

Les besoins des micro-organismes de macroéléments sont en concentrations supérieures à 10^{-4} M

- Le carbone qui peut être d'origine organique (micro-organismes hétérotrophes) ou provenir du CO_2 (micro-organismes autotrophes). Le

carbone est le constituant majeur de la cellule d'un microorganisme, représentant approximativement 50% [Rubio C., 2002].

- L'azote dont l'origine peut être variée. Certains micro-organismes sont capables d'assimiler l'ammoniac, les nitrates, l'azote atmosphérique et d'autres vont assimiler des acides aminés. Le poids sec d'un micro-organisme est constitué en moyen de 12 % d'azote [Rubio C., 2002].
- Le phosphate P constitue 3 % du poids sec et il est nécessaire pour synthétiser les acides nucléiques. Les sels inorganiques de phosphate tels que KH_2PO_4 et K_2HPO_4 sont les plus utilisés comme sources de phosphates.
- Le soufre constitue 1 % du poids sec et il est nécessaire aux micro-organismes pour synthétiser les acides aminés. Les sels soufrés sont principalement d'origine inorganique [Rubio C., 2002] tels que $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

VI. 3. 1. 2. Les microéléments

Les éléments traces sont essentiels à la nutrition des micro-organismes. Les plus utilisés sont le fer (Fe), le zinc (Zn) et le manganèse (Mn). Certains ions tels que Mg^{2+} , Fe^{3+} et PO_4^{3-} peuvent précipiter dans le milieu nutritif et devenir inutilisables par les cellules. Des agents chimiques permettent la formation des composés solubles avec les ions précipités. L'acide citrique, l'EDTA, les polyphosphates, l'histidine, la tyrosine et la cystéine sont les agents les plus utilisés [Schuler M. L. et Kargi F, 1992]. La croissance dépendra parfois de la présence dans le milieu de composés organiques dont la synthèse est impossible : il y a *auxotrophie* et les molécules incriminées telles que les vitamines, les acides aminés, les acides gras et les nucléotides sont appelées *facteur de croissance* [Scriban R, 1993].

VI. 3. 2. Les facteurs physico-chimiques

Outre les exigences nutritives, le développement des micro-organismes est sous la dépendance de différentes conditions physico-chimiques dont les plus importants sont :

VI. 3. 2. 1. La température

Cinq catégories de micro-organismes sont différenciées sur la base de leurs températures de croissance pour déterminer le type, comme indiqué sur la Figure 17

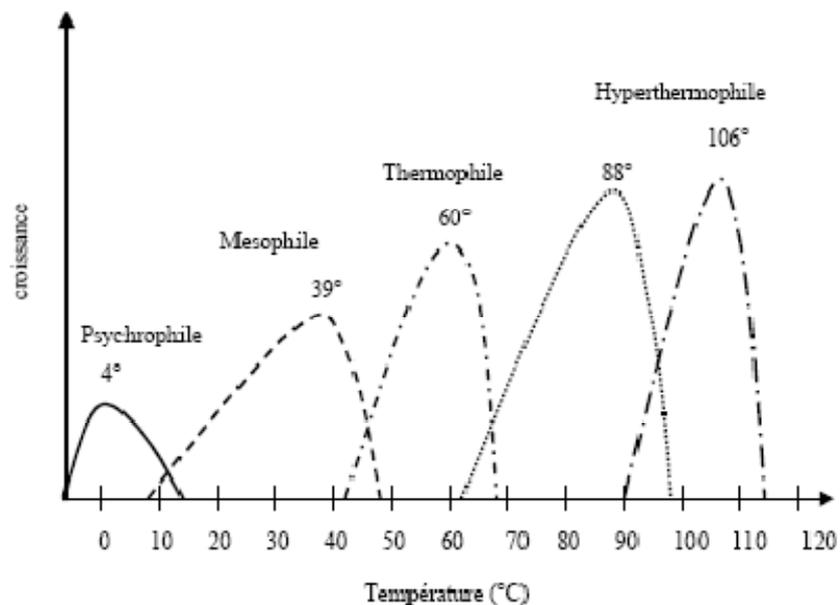


Figure 17 : Schéma reliant la croissance des micro-organismes à la température

[Madigan M. 2000].

Les micro-organismes psychrophiles poussant de -15 à 10°C, on les trouve dans des environnements très froids, comme les glaces polaires. Les micro-organismes mésophiles dont la croissance est possible entre 10 et 45°C, mais la température optimale est comprise entre 30 et 37°C. On les trouve dans les environnements agro-alimentaires, médicaux et environnementaux. Entre ces familles de micro-organismes, il existe les micro-organismes dits psychrotrope dont la température optimale de

croissance est de 20°C mais qui sont capables de se développer entre 0 et 40°C. Ces micro-organismes se trouvent dans les eaux, la terre des climats tempérés et dans certains produits réfrigérés. Les micro-organismes thermophiles et hyperthermophiles sont présents dans les sources hydrothermales, le long du gradient de température.

VI. 3. 2. 2. Le pH

Il influence les réactions enzymatiques, les milieux de culture doivent avoir un pH correspondant avec l'espèce recherchée c'est pour cela qu'on utilise des tampons et des indicateurs de pH qui ont la propriété de changer de couleur avec le pH du milieu.

La plupart des micro-organismes se développent à pH neutre, mais certains micro-organismes ont besoin d'un milieu acide de pH < 6 (bactéries acidophiles) ou d'un milieu basique de pH >8 (bactéries alkaliphiles) pour se développer, comme indiqué sur la Figure 18.

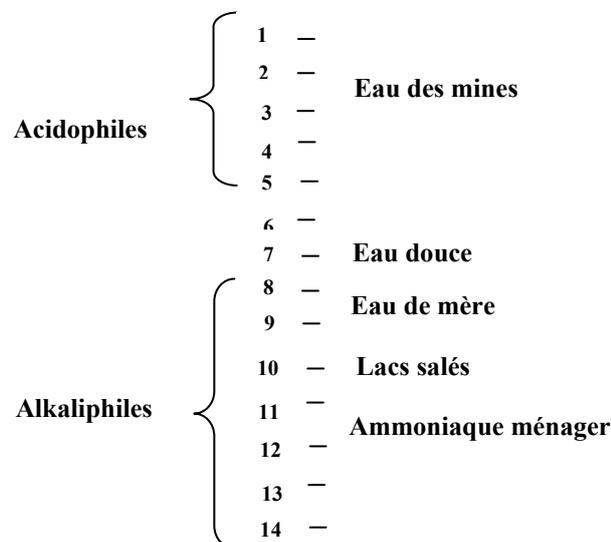


Figure 18 : Echelle de pH reliés à quelques environnements [Madigan M. 2000].

VI. 3. 2. 3. L'oxygène

Les micro-organismes possèdent des modes respiratoires variés : certains nécessitent de l'oxygène pour leur croissance alors que, pour d'autres, l'oxygène peut être délétère

[Marchandin H, 2007]. On distingue selon ces modes respiratoires différents groupes de micro-organismes :

- Les micro-organismes aérobies stricts : ne sont pas capables de se développer en absence d'oxygène.
- Les micro-organismes anaérobies stricts : ne sont pas capables de se développer en présence d'oxygène.
- Les micro-organismes aéro-anaérobies facultatifs : sont capables de se développer en présence et en absence d'oxygène.
- les micro-organismes microaérophiles : se développent uniquement lorsque la teneur en oxygène est réduite.

VI. 3. 2. 4. La pression osmotique

Les micro-organismes peuvent supporter des variations de pression osmotique à l'extérieur de la cellule. Quand ils sont cultivés en milieu hypotonique certains micro-organismes peuvent se développer. La tolérance osmotique des micro-organismes est décrite ainsi : micro-organismes non-halophiles (micro-organismes qui n'ont pas besoin de NaCl pour leurs croissance), les formes halophiles (micro-organismes qui ont besoin de 0,1% de NaCl), les micro-organismes halophiles modérés (micro-organismes qui ont besoin de 2 à 20% de NaCl), et les micro-organismes halophiles extrêmes (micro-organismes qui ont besoin de 5 à 36% de NaCl).

VI. 3. 2. 5. Radiations

Elles proviennent du soleil sous forme de photons dont la longueur d'onde est comprise entre 200 et 800 nm. Ces radiations déterminent un spectre électromagnétique dont une partie constitue la lumière visible perçue sous forme de couleur allant du pourpre au rouge. Certains micro-organismes ont la propriété d'absorber, grâce à leurs pigment,

certaines radiations dans le bleu ou le rouge et peuvent transformer l'énergie lumineuse en énergie chimique.

VI. 3. 3. Les facteurs chimiques

De nombreux produits chimiques sont des agents toxiques pour les micro-organismes.

Ils peuvent agir de différentes manières :

Soit ils arrêtent la croissance des micro-organismes mais ne les tuent pas, ils sont appelés bactériostatiques. Soit ils détruisent les cellules des micro-organismes, ce sont dans ce cas des agents bactéricides.

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

MATERIELS ET METHODES

II. MATERIELS ET METHODES

I.1. Matériels

I.1.1. Microorganismes

D'après la littérature, les germes dénitrifiant existent dans les zones où la concentration en oxygène dissout devient insuffisante ou nulle, pour cette raison nous avons choisi une source de prélèvement « station d'épuration des eaux usées d'El Menia Constantine ». Les échantillons sont prélevés au niveau du bassin de décantation secondaire, car ce dernier, en plus de la faible concentration en oxygène dissout, assure l'existence d'un ou plusieurs germes dénitrifiant et facilite l'adaptation de ces germes dans le milieu synthétique.

Après avoir effectué un prélèvement qui a étéensemencé dans un milieu nutritif contenant auparavant une source de carbone comme source d'énergie. Pendant l'incubation nous avons suivi la croissance bactérienne en mesurant la densité optique et le pH de cette culture.

I.1.2. Milieu de culture

Un premier essai de mise en culture des micro-organismes en présence des nitrates a été lancé avec un milieu nutritif dont la composition est reprise au Tableau 5. Ce milieu liquide constitué de macroéléments et microéléments apporte aux micro-organismes tous les éléments nécessaires au développement cellulaire, à part la source de carbone. qui est dans notre cas le méthanol, le succinate de sodium et le mélange tampon d'acide acétique et d'acétate de sodium successivement. Dans le cas de la farine de datte cette dernière est utilisée comme source de carbone et milieu nutritif en même temps.

La composition pour un litre d'eau bidistillée du milieu nutritif est la suivante :

Tableau 5 : Composition du milieu de culture [Patureau D., 1995].

Elements	Concentrations
KH ₂ PO ₄	1,00 g/L
K ₂ HPO ₄	1,00 g/L
KNO ₃	1,00 g/L
NaCl	1,00 g/L
MgSO ₄	0,20 g/L
CaCl ₂	0,02 g/L
Solution TE	1,00 ml/L
pH	Ajusté à 4,2

La composition de la solution d'éléments trace (TE) est donnée au tableau 6.

Tableau 6 : La composition de la solution de traces éléments [Patureau D., 1995].

Eléments	Concentrations
HCl 37%	6,76 ml/L
FeCl ₂ 4H ₂ O	1,5 g/L
H ₃ BO ₃	0,06 g/L
MnCl ₂ 4H ₂ O	0,1 g/L
CoCl ₂ 6H ₂ O	0,12 g/L
ZnCl ₂	0,07 g/L
NiCl ₂ 6H ₂ O	0,025 g/L
CuCl ₂ 2H ₂ O	0,015 g/l
NaMoO ₄ 2H ₂ O	0,025 g/L
EDTA	5,2 g/L

I.1.3. Source de carbone

Comme il a été déjà mentionné dans la partie bibliographique, la technique que nous avons choisi d'utiliser nécessite l'apport d'une source de carbone extérieure dans un milieu nutritif approprié car les micro-organismes hétérotrophes ont besoin d'un apport de carbone organique pour leur métabolisme.

Le méthanol, le succinate de sodium, l'acide acétique et l'acétate de sodium comme mélange tampon et la farine de datte, 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_3) comme source oxydée unique d'azote.

I.1.5. 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).

I.1.6. Réacteur DCO

Pour assurer le chauffage de nos échantillons afin d'oxyder le maximum de la matière organique, un DCO mètre « Hach » à 16 postes a été utilisé durant nos expériences.

I.1.7. Incubation

Une étuve de marque « Memmert » a été utilisé pour l'incubation de nos échantillons et la vaporisation totale de l'eau contenue dans ces dernières.

I.1.8. Centrifugation

Les échantillons sont au préalable centrifugé à 7000 t/min par une centrifugeuse « sigma 1-15 » à température ambiante pendant 10 mn. Le surnageant récupéré est dilué si nécessaire selon les méthodes de dosage.

I.2. Méthodes analytiques

I.2.1. Mesure de la biomasse

Avant de parler de la méthode que nous avons utilis é pour la mesure de la biomasse, nous allons voir tout d'abord le principe de la spectrophotométrie afin de bien comprendre le choix de notre méthode.

Spectrophotométrie

C'est la turbidimétrie, procédé simple, rapide et actuellement très utilisé. Cette technique permet d'évaluer la concentration cellulaire en utilisant un spectrophotomètre à 600 nm. Plus il y a de micro-organismes, plus la lumière est réfléchiée et plus l'intensité du faisceau restant est faible, plus la valeur d'absorbance est grande. 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,

$$A = \log \frac{I_0}{I_2} - \log \frac{I_0}{I_1} = \log \frac{I_1}{I_2} = \alpha \cdot d \cdot B$$

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 α un coefficient de proportionnalité.

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

$$DO = \left(\frac{1}{d}\right) \log \frac{I_1}{I_2} = \alpha B$$

L'absorbance ou la turbidité d'une culture est souvent déterminée 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 choisit une longueur d'onde bien déterminée le taux de la lumière transmise par l'échantillon sera proportionnelle à la quantité des microorganismes présents dans l'échantillon.

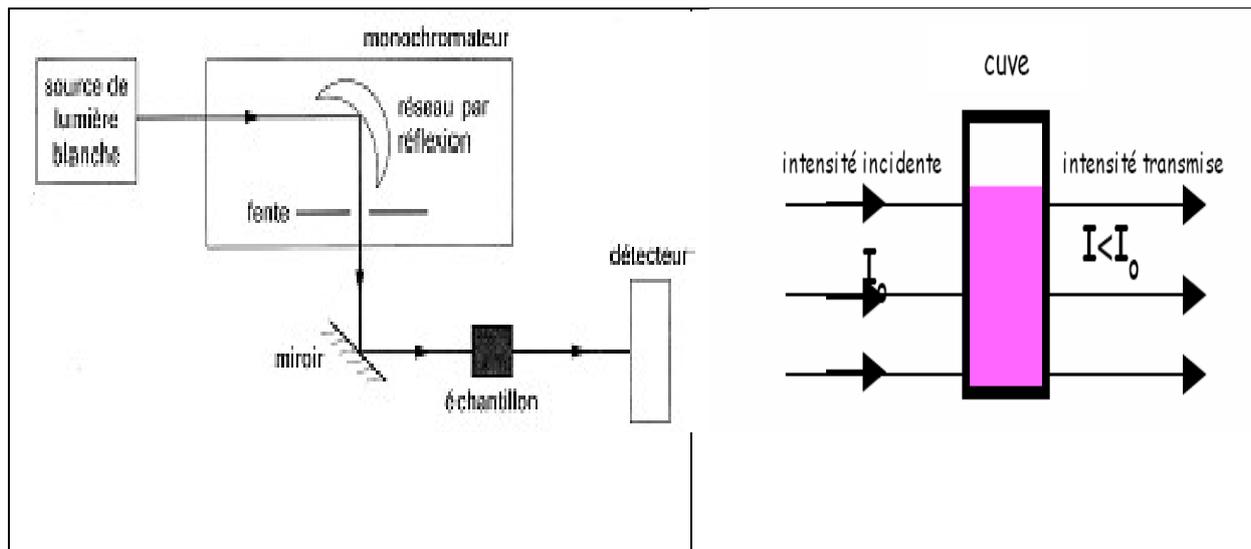


Figure 19 : Schéma de l'absorbance.

L'absorbance de notre culture est généralement mesurée à une longueur d'onde autour de 600 nm [Jianlong W. et al, 1999]. Rappelant que pour les milieux très concentrés (absorbance > 2), 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 des cultures cellulaires est mesurée par l'absorbance à une longueur d'onde de 600 nm avec un spectrophotomètre « Safas Monaco».

I.2.2. Relation entre la densité optique et l'extrait sec

L'augmentation du nombre de 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.

L'extrait sec de biomasse produite a été corrélé avec la densité optique ($DO_{600\text{ nm}}$), d'où l'équation de la courbe d'étalonnage donnée en *Annexe 8*.

I.2.3. Dosage des métabolites

Pour les analyses chimiques, les échantillons liquides ont été pris avec une seringue et préalablement, centrifugés à 7000 rpm (SIGMA 1-15), à température ambiante pendant 10 min [Chen K. et al, 1998]. Le surnageant récupéré est dilué si nécessaire selon les méthodes de dosages des substrats.

I.2.3.1. Dosage des nitrates

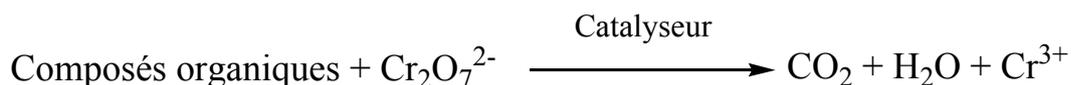
Les nitrates sont dosés par colorimétrie. En présence de salicylate de sodium, les nitrates donnent du paranitro-salicylate de sodium, coloré en jaune et susceptible d'un dosage colorimétrique : méthode au salicylate de sodium [Rodier J., 1978]. Le protocole expérimental est présenté en *Annexe 9*.

I.2.3.2. Dosage des nitrites

Les nitrites sont dosés aussi par colorimétrie. L'acide sulfanilique en milieu chlorhydrique, en présence d'ion ammonium et de phénol forme avec des ions NO_2^- un complexe coloré jaune dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en nitrites. [Rodier J., 1978]. Le protocole expérimental est présenté en *Annexe 10*.

I.2.3.3. Dosage de la source de carbone

Le suivi de la source de carbone au cours de la dénitrification est effectué par l'intermédiaire d'une oxydation chimique (DCO) dont le principe repose sur l'oxydation à chaud en milieu sulfochromique pendant 2 heures en présence d'ions Ag^+ comme catalyseur d'oxydation et d'ions Hg^{2+} permettant de complexer les ions chlorures. Dans ces conditions 95 à 97 % des composés organiques sont oxydés



Le protocole expérimental est présenté en *Annexe 11*

I.2.4. Adaptation des bactéries

Pour réduire le temps de latence de nos expériences, les boues prélevées dans la station d'épuration sont dissoutes par agitation dans de l'eau bidistillée. La solution récupérée après filtration est mélangée à une solution de milieu de culture contenant 1 g/L de méthanol, succinate de sodium, le mélange tampon acide acétique et acétate de sodium séparément comme source de carbone et une solution contenant 1 g/L de la farine de datte comme milieu nutritif et source de carbone en même temps et 1 g/L de nitrate de potassium. Le mélange est introduit à 35°C dans un réacteur de 500 ml contenant 200 ml de solution. La croissance bactérienne est suivie par des mesures de la densité optique (à 600 nanomètres) à des intervalles réguliers de temps. Au stade de la croissance exponentielle (24 h), les microorganismes sont récupérés par centrifugation et sont de nouveau introduits dans une solution contenant les différentes sources de carbone et le nitrate de potassium aux concentrations précédentes. Le cycle précédent est repris trois fois avant l'utilisation des microorganismes pour notre étude.

I.2.5. Préparation de la farine de datte et de son extrait

Dattes déclassées (var. Mech-Degla, en provenance de la région de Biskra) Dénoyautées séchées à 45° C pendant 4 jours dans une étuve hermétiquement fermée en présence de gel de Silice granulé pour absorber l'excès de l'humidité. Ecrasées, broyées et tamisées ($d < 0,025$ mm), la farine ainsi préparée est conservée dans des flacons hermétiquement fermés pour limiter au maximum les réactions d'hydrolyse enzymatique.

Pour la préparation de l'extrait soluble de farine de datte; différentes concentrations (g/L) de farine sont préparées dans de l'eau bidistillée dans des flacons fermés et agités à la température ambiante pendant 3 heures; la solution est ensuite centrifugée pendant 1 heure à 3000 t/m. Le surnageant forme l'extrait soluble de farine de dattes.

I.2.6. Analyse chimique de la farine de datte

Détermination de l'humidité

5 g de la farine de dattes sont pesés dans un récipient taré muni de couvercle et repartis uniformément. Ils sont ensuite étuvés à 130° C, sans couvercle pendant 2 heures. Le récipient est retiré de l'étuve après remise du couvercle et refroidit (40 min dans le dessiccateur) puis pesé. La teneur en humidité (h) en pourcentage de l'échantillon est donnée par la formule suivante :

$$h (\%) = (E-m) * 100/E$$

Où E est la masse initiale en gramme de la prise d'essai, et m est la masse en gramme de la prise d'essai sèche.

I.2.7. Préparation des solutions

Toutes les solutions sont préparées avec de l'eau bidistillée.

Pour simuler la pollution par les nitrates, nous avons utilisé l'eau de synthèse préparée avec une solution de KNO_3

I.2.8. 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.

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 analyse des précautions particulières

Dans presque tous les cas, il est bon de réfrigérer l'échantillon à 3°C notamment pour limiter l'activité biologique.

I.2.9. Conditions de culture

Les cultures sont réalisées en réacteur batch (bouteilles en verre scellées d'un volume total de 500 ml) contenant 200 ml de notre milieu chargé avec différentes concentrations des différentes sources de carbone utilisées. Elles sont par la suite inoculées par 5 ml de boues activées prélevées dans la station d'épuration d'El Menia-Constantine. Rappelons que l'inoculation est effectuée grâce à une préculture adaptée (comme mentionné précédemment) à nos sources de carbone et au nitrate afin de réduire le temps de latence.

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 6 ml, sont répartis dans deux tubes comme suit :

- 2 ml de volume total permet la lecture de la densité optique suivie de la mesure du pH.
- Le volume restant (4 ml) est injecté dans un tube fermé, il subit alors une centrifugation à 7000 t/mn pendant 10 min afin d'obtenir un surnageant exempt de cellules microbienne. Les échantillons conservés dans des flacons à 3°C permettent ainsi la mesure de la concentration en nitrates par la méthode de salicylate de sodium.





Figure 20 : Photographie des conditions de notre travail.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

III. RESULTATS ET DISCUSSIONS

I. Etude de la dénitrification en utilisant le méthanol comme source de carbone

Avant de commencer notre étude il est très utile de s'assurer si nos microorganismes prélevés dans la station d'épuration d'El Menia Constantine sont capables de dégrader les nitrates. Pour cela nous avons choisi de commencer par une source de carbone déjà utilisé dans la littérature pour que nous puissions comparer les résultats.

La biodégradation du méthanol a été étudiée sous une large variété de conditions et de milieux, y compris les eaux usées, les eaux de surfaces, les eaux souterraines, les dépôts et les microsomes du sol. Le méthanol est complètement dégradé et sa dégradation ne produit pas d'intermédiaires persistants [Howard P.H., 1990]. Des études plus approfondies ont montré qu'à des concentrations de méthanol inférieures à 3000 mg/L, le méthanol se dégrade facilement et rapidement dans différents environnements aquatiques. IL est dégradé par une large variété de bactéries aérobies et anaérobies.

Il a été montré que la nature de la source de carbone a une grande influence sur la voie de réduction du nitrate. [Purtschert I. et al 1996, Foglar L. et al 2003, Maneesha P. et al, 2009] ont utilisé le méthanol comme une source de carbone dans la dénitrification. Foflar L. a trouvé un taux de dénitrification de 97 % pendant 63 heures de traitement. [Bilanovic D. et al, 1999] ont trouvé que l'ajout du méthanol améliore le taux de dénitrification dans la station d'épuration en printemps.

Nous allons commencer par l'utilisation du méthanol comme seule source de carbone et d'énergie dans notre procédé de dénitrification pour voir les capacités de nos microorganismes à dégrader le méthanol et les nitrates en même temps.

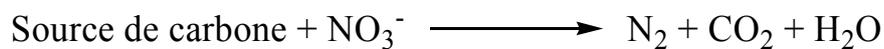
I.1. Etude de la croissance bactérienne

Initialement nous avons suivi l'évolution de la croissance bactérienne et la concentration des nitrates en fonction du temps en choisissant 500 mg/L du Méthanol comme source

unique de carbone et d'énergie avec le nitrate comme accepteur final d'électron ($\text{N-NO}_3^- = 138,5 \text{ mg/L}$) afin d'étudier l'adaptation physiologique d'une culture mixte incubée dans un milieu synthétique. Le bioréacteur est maintenu à 35°C .

Au cours d'incubation nous avons observé :

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



Les résultats sont illustrés sur le graphe suivant :

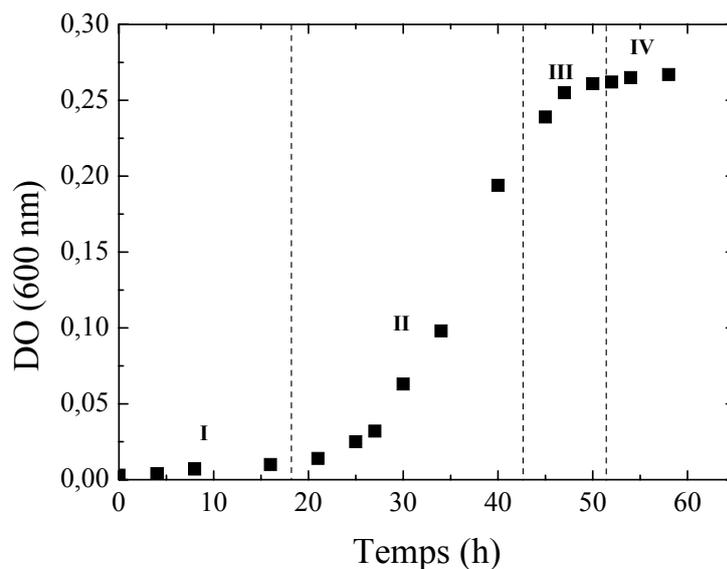


Figure 21 : Cinétique de la croissance bactérienne avec le méthanol comme source de carbone.

La figure 21 montre que la cinétique de croissance suit quatre phases principales :

La première phase qui est la phase de latence durant laquelle le nombre de bactéries reste constant, 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.

Durant cette phase, il n'y a pas de division cellulaire : $X = X_0 = \text{cte}$

La vitesse de croissance $\frac{dx}{dt}$ est également nulle.

Au cours de la seconde phase (phase exponentielle), la croissance est maximale et constante. Le nombre de cellules en culture et leur masse augmentent proportionnellement au temps, selon une progression géométrique; c'est-à-dire exponentiellement.

Le taux de croissance μ et la quantité de la biomasse produite ΔX [Guiraud. J.P., 1998] sont calculés à partir des deux relations suivantes :

$$\mu = (\ln X_{\max} - \ln X_0) / (t_{\max} - t_0)$$

$$\Delta X = X_f - X_i$$

Les calculs montrent que :

$$\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$$

$$\Delta X = 1124,2 \text{ mg. L}^{-1}$$

Au cours de la troisième phase (phase dite de croissance ralentie ou la phase de décélération), l'insuffisance de nourriture entraîne un ralentissement de la croissance bactérienne. On observe alors un début de plafonnement de la masse cellulaire.

La quatrième phase correspond à une phase stationnaire qui signifie qu'à ce moment il n'y a aucune augmentation du nombre de bactéries et ces dernières utilisent les réserves accumulées précédemment. Le taux de croissance par organisme est nul.

I.2. Cinétique de la réduction des nitrates

Nous avons suivi l'évolution de la concentration des nitrates en fonction du temps en choisissant 150 mg/L des nitrates comme accepteur final d'électron. Le bioréacteur est maintenu à 35° C.

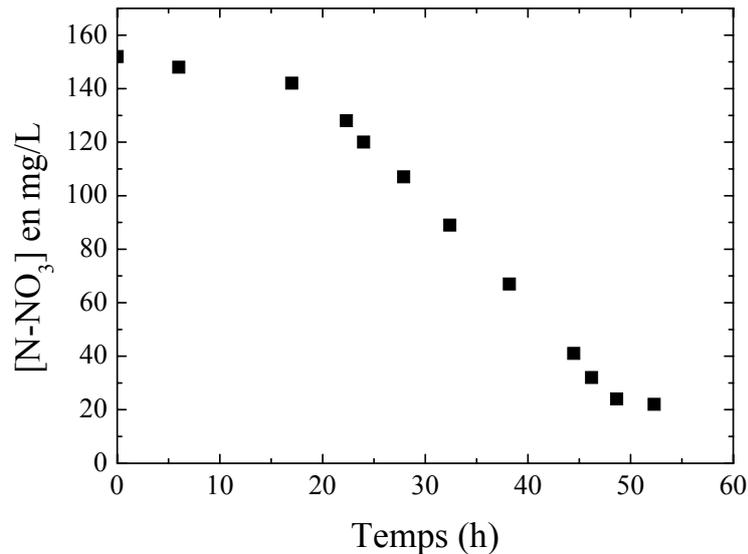


Figure 22 : Cinétique de la réduction des nitrates avec le méthanol comme source de carbone.

La croissance bactérienne s'arrête après 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 J. M., 1988].

La vitesse moyenne de disparition des nitrates durant la phase de croissance exponentielle est:

$$V_{\text{moy}} = 3,97 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}.$$

Une concentration en nitrates inférieure à 50 mg/L (la norme de l'Organisation Mondiale de la Santé (O.M.S) est obtenue après 45 heures de traitement.

La dénitrification s'arrête après 58 heures de traitement. La concentration des nitrates est alors de 22 mg L^{-1} , ce qui donne un taux de dénitrification de 85,5 %.

I.3. Suivi du pH du milieu réactionnel au cours de la dénitrification

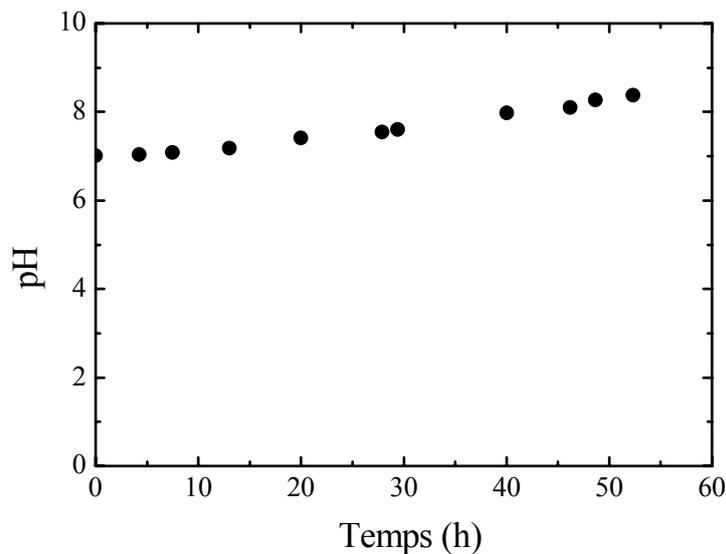


Figure 23 : Evolution du pH au cours de la dénitrification avec le méthanol comme source de carbone.

Au cours de la réaction de dégradation nous avons observé une augmentation du pH dans notre réacteur car la réaction biologique est consommatrice de protons. Dans notre cas il passe de 7,00 à 8,38 (figure 23).

I.4. Influence de l'oxygène sur le processus de dénitrification

I.4.1. Sur la croissance bactérienne

Pour optimiser les conditions opératoires affectant le processus de dénitrification nous avons étudié le rôle de l'oxygène sur le mécanisme de dégradation du méthanol et de la capacité de dénitrification de nos microorganismes. Pour cela nous avons utilisé deux types de culture:

- Une culture anoxie par barbotage d'azote
- Une culture aérobie par barbotage d'oxygène

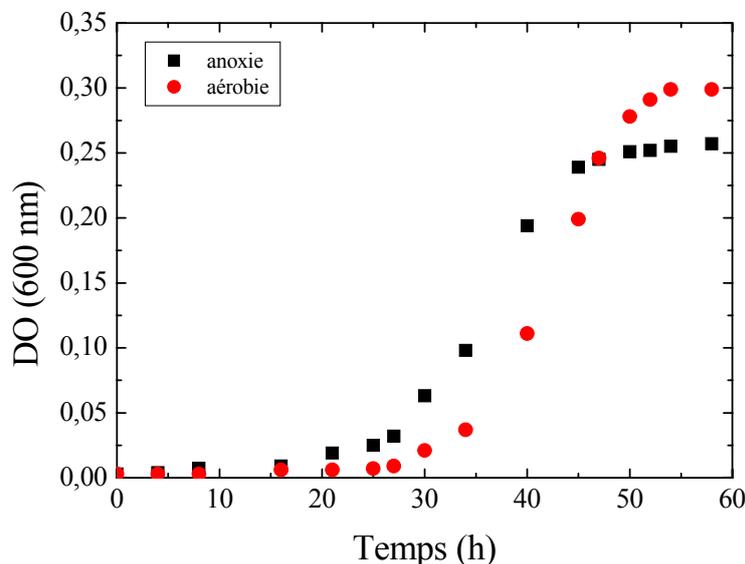


Figure 24 : Effet de l'oxygène sur la croissance bactérienne en fonction du temps.

La figure 24 montre l'évolution de la croissance bactérienne en absence et en présence d'oxygène en utilisant le méthanol comme source de carbone. La phase de latence des micro-organismes dans le milieu aérobie est plus importante que celle dans le milieu anoxie ce qui explique que les micro-organismes anoxiques s'adaptent à leurs nouvel environnement (présence d'oxygène), une fois que les micro-organismes anoxiques synthétisent les enzymes aérobioses, le taux de croissance en présence d'oxygène et de nitrate est supérieur à celui observé avec le nitrate seul (anoxie).

Tableau 7 : Calculs du taux de croissance pour les deux cultures.

	ΔX (g/L)	μ_{\max} (h ⁻¹)	Y
Aérobie	3,6259	0,059	7,5263
Anoxie	2,8241	0,051	6,1263

I.4.2. Sur la dégradation du méthanol

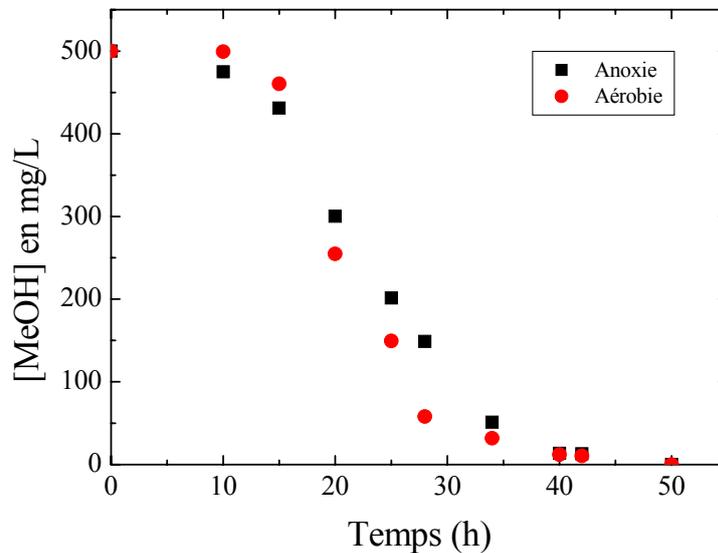


Figure 25 : Effet de l'oxygène sur la dégradation du méthanol.

La figure 25 montre que la présence de l'oxygène a une légère influence sur la dégradation du méthanol. Une dégradation complète de ce dernier a été observée pour le milieu anoxique au bout de 40 heures avec une vitesse moyenne de $0,028 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Alors que pour le milieu aérobie la dégradation se fait au bout de 45 heures avec une vitesse moyenne de $0,019 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Nous pouvons dire que la dégradation du méthanol est plus rapide au milieu anoxique.

I.4.3. Sur la dégradation des nitrates

La dénitrification est un processus respiratoire qui se produit essentiellement en milieu anaérobie et qui produit de l'énergie. La présence de l'oxygène limite la dénitrification mais le rendement de la dénitrification anaérobie est beaucoup plus importante. Il semble que l'oxygène ait un rôle prépondérant sur l'activation ou l'inactivation des enzymes dénitrifiantes [Knowles R., 1982, Parsons L. et al, 1991]. On pensait que le milieu devait être strictement anaérobie [Hutchinson K. et al, 1993], mais des expériences [Knowles R., 1982; Lloyd D., 1993] ont démontré qu'il pouvait y avoir

dénitrification même avec une certaine pression partielle en O_2 . Certaines bactéries peuvent en effet tolérer un faible taux d' O_2 et réaliser la dénitrification; elles sont ubiquitaires, c'est-à-dire qu'elles utilisent à la fois l' O_2 et les nitrates comme accepteur final d'électrons.

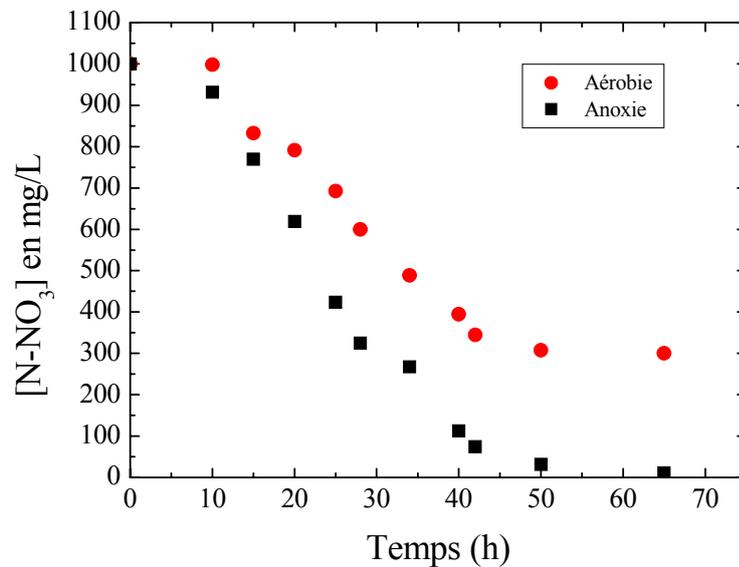


Figure 26 : Effet de l'oxygène sur la dégradation des nitrates.

Dans notre cas le taux de dénitrification dans les conditions aérobie est de 74 % alors qu'il est 98,87 % dans les conditions anoxiques.

Conclusion

Nous avons atteint un taux de dénitrification de 98,87 % en conditions anoxiques et en utilisant le méthanol comme source de carbone, qui est comparable à celle de [Foglar L.2003].

Selon le taux élevé de dénitrification atteint dans nos expériences en utilisant le méthanol comme source de carbone et d'énergie, nous pouvons conclure que nos micro-organismes prélevés de la station d'épuration d'El Menia Constantine dénitrifie bien en condition anoxique.

Pour cela nous allons travailler dans des conditions désoxygénés pour le reste de nos expériences en cherchant d'optimiser les différents paramètres affectant la dénitrification vus précédemment

II. Etude de la dénitrification en utilisant le succinate de sodium comme source de carbone

Après que nous nous sommes rassurés de l'efficacité de dénitrification en utilisant les micro-organismes prélevés dans la station d'épuration d'El Menia Constantine, nous allons essayer par la suite d'optimiser les conditions nécessaires pour la dénitrification.

Les bactéries dénitrifiantes ont besoin d'une source de carbone organique pour fournir l'énergie nécessaire à leur métabolisme indispensable au processus de dénitrification. La nature de cette source donc sera un facteur limitant du processus. Les cinétiques de dénitrification déjà étudiées sont différentes et dépendent de la nature de la source de carbone utilisée et placent le glucose comme meilleur substrat pour la dénitrification, puis l'amidon et enfin la cellulose. En raison de biodégradabilité facile ils seront préférés par les micro-organismes.

La dégradation de la source de carbone suit une série de réactions biochimiques dont la finalité est de produire des intermédiaires énergétiques qui serviront à la production d'ATP dans la chaîne respiratoire des micro-organismes. Il s'agit d'un cycle car le dernier métabolite, l'acide oxaloacétique, est aussi impliqué dans la première réaction. Le cycle peut se résumer dans l'oxydation de 2 carbones en CO_2 , l'énergie dégagée par ces réactions génère du GTP (ou de l'ATP), des électrons, du NADH et du QH₂, qui pourront être métabolisés par la chaîne respiratoire pour former de l'ATP. En utilisant le succinate de sodium comme source de carbone dans la dénitrification nous avons l'avantage de réduire le temps de la biodégradation de cette dernière car la formation du succinate est une des étapes du cycle de Krebs donc on aura une élimination de certaines étapes. [Liu D. et al, 2006] ont trouvé que l'utilisation du succinate de sodium dans la dénitrification du sol a doublé le rendement de dénitrification par rapport à celui trouvé en utilisant le glucose, alors que [Kim M. et al, 2008] ont trouvé que le temps de latence avec le succinate est beaucoup plus court qu'avec l'acétate et le glucose.

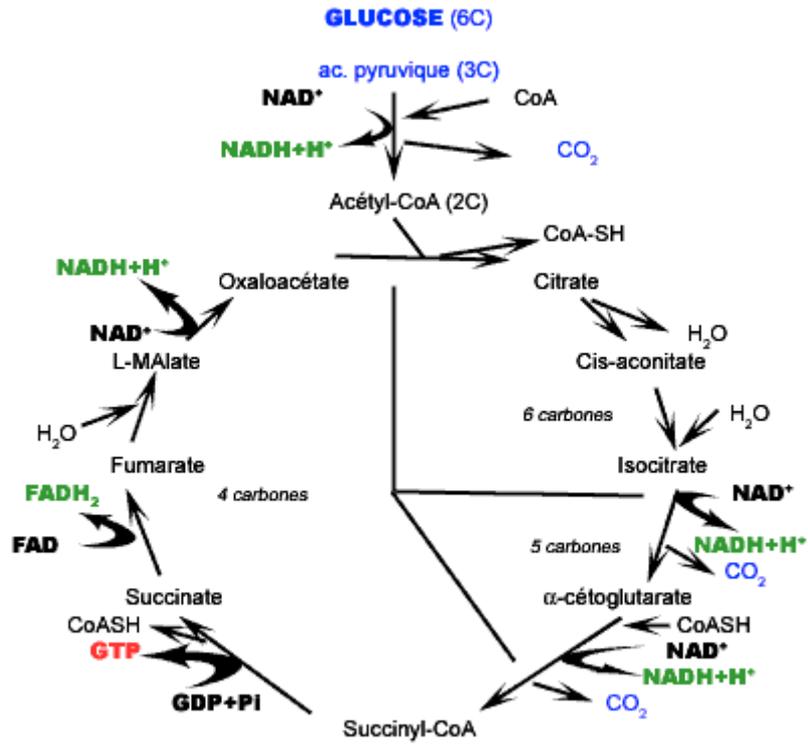


Figure 27 : Cycle de Krebs [Liu D. et al, 2006].

II.1. Etude de la croissance bactérienne

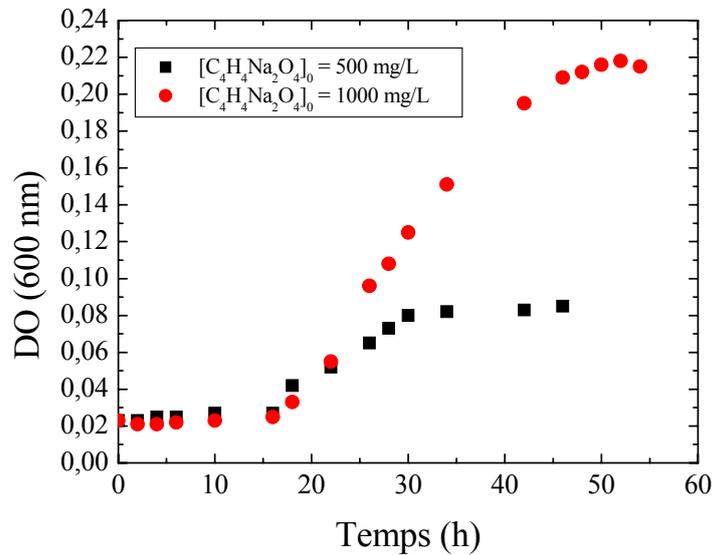


Figure 28 : Cinétique de la croissance bactérienne avec le succinate de sodium comme source de carbone.

Nous avons suivi l'évolution de la croissance bactérienne en fonction du temps en choisissant 500 et 1000 mg/L de succinate de sodium comme source unique de carbone et d'énergie avec le nitrate comme accepteur final d'électron ($\text{N-NO}_3 = 150 \text{ mg/L}$) afin que nous puissions déterminer la concentration optimale pour la dénitrification.

Pour les deux concentrations du succinate de sodium testés nous avons une augmentation de la biomasse, cependant l'augmentation est beaucoup plus importante pour 1000 mg/L (figure 28).

II.2. Cinétique de réduction des nitrates

Nous avons une élimination complète des nitrates au bout de 75 heures lorsque la concentration est de 1000 mg/L. Alors qu'elle est de 50 % pour 500 mg/L.

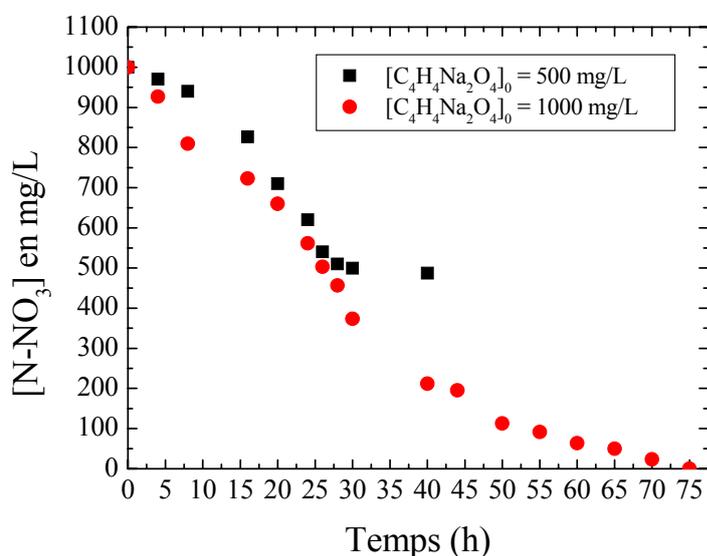


Figure 29 : Cinétique de la réduction des nitrates avec le succinate de sodium comme source de carbone.

La concentration de la source de carbone organique influe à deux niveaux : sur la capacité de dénitrification, compte tenu de son rôle énergétique [Lowrance R. et Smittle D., 1988], mais aussi sur le développement de la population bactérienne [Myrold D. et Tiedje J.M., 1985] car la densité bactérienne augmente à des concentrations plus élevées de carbone. Le carbone contribue aussi, par stimulation de l'activité bactérienne, à la diminution du taux d'O₂, ce qui favorise encore plus la dénitrification, et met encore en évidence les interactions croisées de tous les paramètres.

La concentration de la source de carbone est souvent un paramètre limitant. En effet, dans la plupart des expériences, l'ajout de cette dernière augmente fortement la dénitrification comparée à l'effet des autres paramètres [Weier K. L. et al, 1993]. De même, les milieux les plus riches en matières organiques ont un meilleur potentiel de dénitrification [Ambus P. et Lowrance R., 1991].

II.3. Suivi du pH du milieu réactionnel au cours de la dénitrification

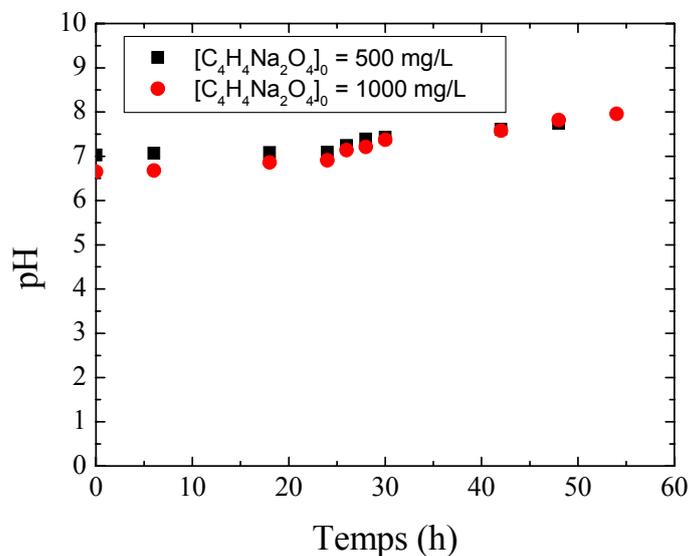


Figure 30 : Variation du pH au cours de la réaction de la dénitrification avec le succinate de sodium comme source de carbone.

En utilisant le succinate de sodium dans la dénitrification nous avons une augmentation du pH qui passe dans ce cas de 6,65 à 7,96.

Conclusion

En utilisant le succinate de sodium comme source de carbone dans la dénitrification nous avons obtenu un taux de dénitrification important en réduisant le temps de traitement à 70 heures pour dégrader 1000 mg/L des nitrates alors qu'il a été 70 heures pour 150 mg/L avec le méthanol. L'utilisation d'une source de carbone facile à dégradé par les micro-organismes est un facteur important pour améliorer la dénitrification.

Cependant au cours de la réaction de dénitrification avec deux sources de carbone précédente nous avons une augmentation du pH qui peut être nuisible pour le processus de dénitrification.

III. Etude de la dénitrification en utilisant un mélange tampon d'acide acétique et d'acétate de sodium comme source de carbone

Le pH optimal pour une réaction de dénitrification est généralement compris entre 7 et 8. Afin d'éviter l'acidification ou la basicité de notre milieu réactionnel nous avons utilisé un mélange tampon d'acide acétique et d'acétate de sodium comme source de carbone.

III.1. Etude de la croissance bactérienne

En utilisant le mélange tampon d'acide acétique et d'acétate de sodium comme source de carbone nous avons une croissance bactérienne importante après un court temps de latence (figure 31) qui s'arrête après consommation presque totale de la source de carbone. Nous avons alors une amélioration de la quantité de la biomasse qui va avoir un effet sur la dégradation des nitrates.

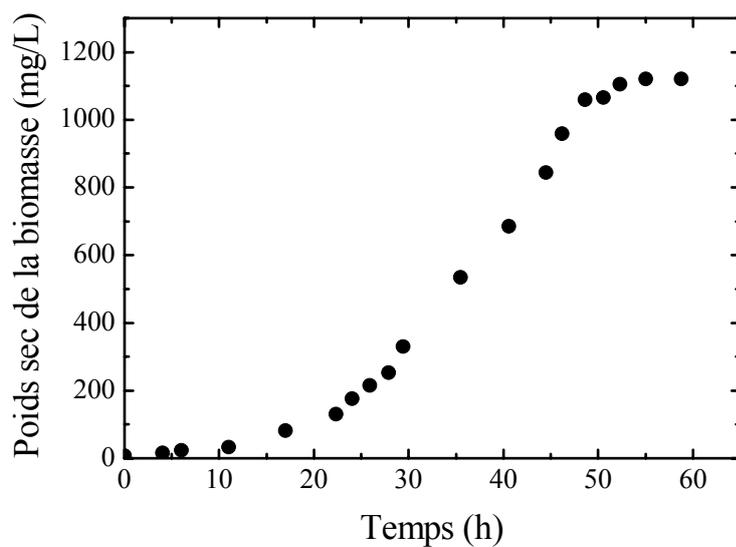


Figure 31 : Cinétique de la croissance bactérienne avec le mélange tampon d'acide acétique et d'acétate de sodium comme source de carbone.

III.2. Cinétique de réduction des nitrates

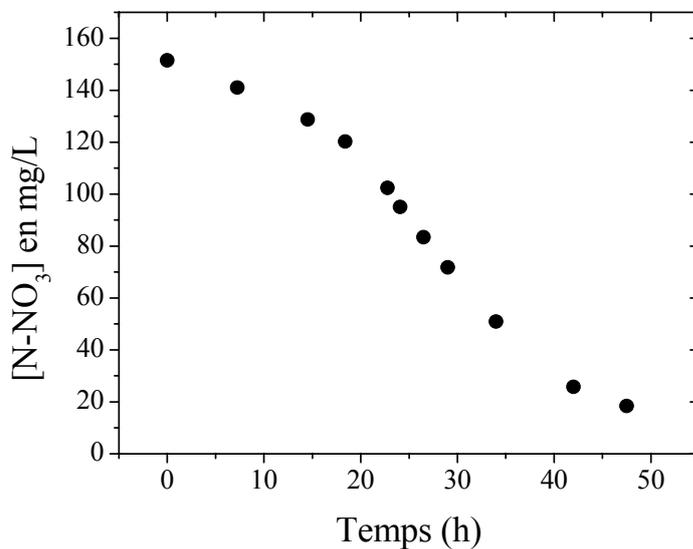


Figure 32 : Cinétique de la réduction des nitrates avec le mélange tampon d'acide acétique et d'acétate de sodium comme source de carbone.

La figure 32 montre que la dénitrification avec le mélange tampon comme source de carbone est plus rapide pendant les premières heures de traitement car l'effet tampon est maintenu. Ainsi que nous avons une réduction du temps de traitement

III.3. Effet de la concentration initiale des nitrates

La teneur en nitrates est logiquement un des paramètres limitant la dénitrification, étant donné qu'il s'agit là du substrat de la réaction. Dans la plupart des expériences, un apport en nitrates augmente effectivement le taux de dénitrification [Ullah S. et Faulkner S. P, 2006], indiquant un lien positif entre le taux de N_2O dégagé, soit la dénitrification, et la teneur en nitrate [Zhu G. J. et al, 2003].

Des milieux de cultures contenant différentes concentrations initiales des nitrates (0, 1000, 2000, 5000 mg/L) ont été inoculés avec une culture mixte afin que nous puissions voir l'influence de la concentration initiale des nitrates sur la dégradation de ces derniers ainsi que sur la croissance bactérienne.

III.3.1. Sur la croissance bactérienne

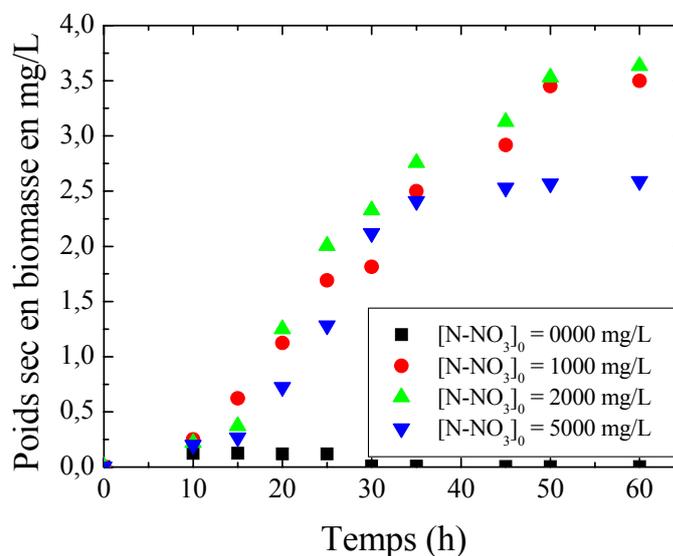


Figure 33 : Effet de la concentration initiale des nitrates sur la croissance bactérienne avec le mélange tampon d'acide acétique et d'acétate de sodium comme source de carbone.

La figure 33 montre qu'avec toutes les concentrations des nitrates initiales testées nous avons une croissance bactérienne significative et la croissance augmente avec l'augmentation des nitrates. Cependant, l'absence des nitrates n'a entraîné aucune croissance.

L'augmentation de la teneur en nitrate seule n'est pas un facteur limitant de la croissance bactérienne car les micro-organismes ont besoin d'autre paramètres adéquates pour réaliser les métabolismes nécessaires à la croissance [Lowrance R. et Smittle D, 1988].

III.3.2. Sur la dégradation du mélange tampon

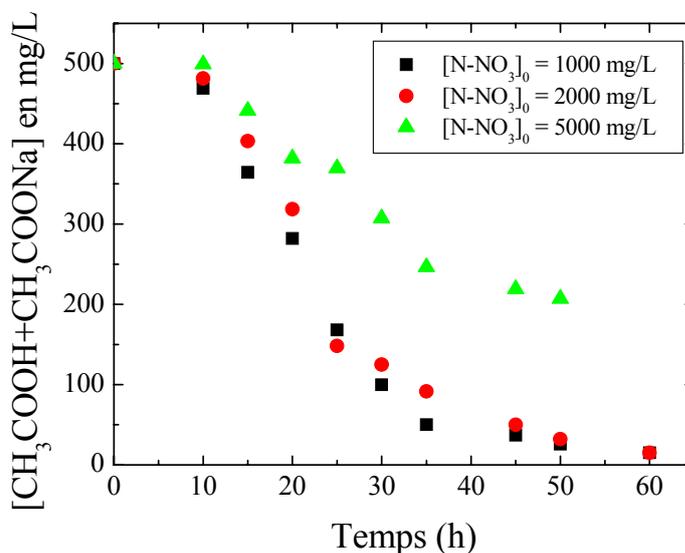


Figure 34 : Effet de la concentration initiale des nitrates sur la dégradation du mélange tampon d'acide acétique et d'acétate de sodium.

Nous avons une dégradation de la source de carbone (le mélange tampon) avec toutes les concentrations initiales de nitrates testées. Une disparition complète de la source de carbone est remarquée avec les concentrations 1000 et 2000 mg/L alors que la dégradation est partielle avec 5000 mg/L. Ceci est expliqué par la contribution de la source de carbone par stimulation de l'activité bactérienne, à la diminution du taux d'O₂, ce qui favorise encore plus la dénitrification donc la consommation des nitrates par les bactéries au lieu de la source de carbone.

III.3.3. Sur la dégradation des nitrates

Une élimination complète des nitrates est observée (figure 35) pour les deux premières concentrations 1000 et 2000 mg/L avec un taux de dénitrification de 93,15 %, alors que la dégradation n'est pas complète pour la concentration en nitrates de 5000 mg/L car la concentration des nitrates est beaucoup plus élevée que celle de la source de carbone (500 mg/L), la dégradation des nitrates donc s'arrête après la consommation presque totale de la source de carbone [Ullah S. et Faulkner S. P, 2006].

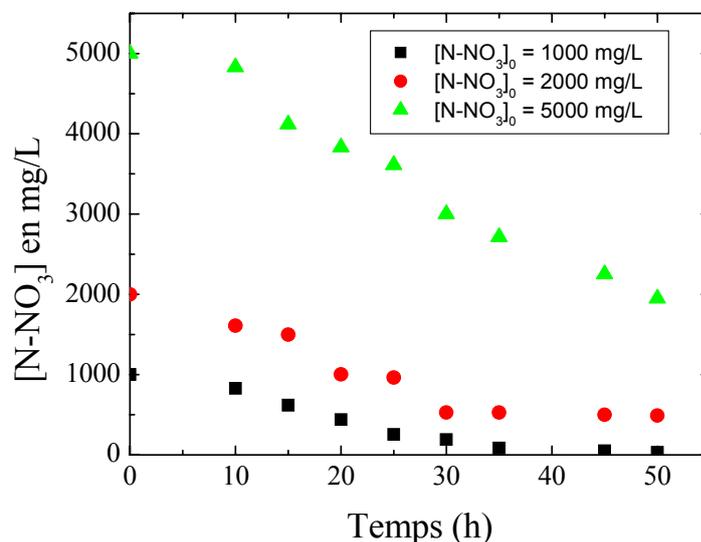


Figure 35 : Cinétiques de réduction des nitrates avec le mélange tampon d'acide acétique et d'acétate de sodium comme source de carbone.

III.4. Effet de la concentration de la source de carbone

Pour étudier l'effet de concentration initiale du mélange tampon sur la croissance bactérienne, nous avons préparé trois milieux de culture avec des concentrations différentes (500, 1000 et 1500 mg/L).

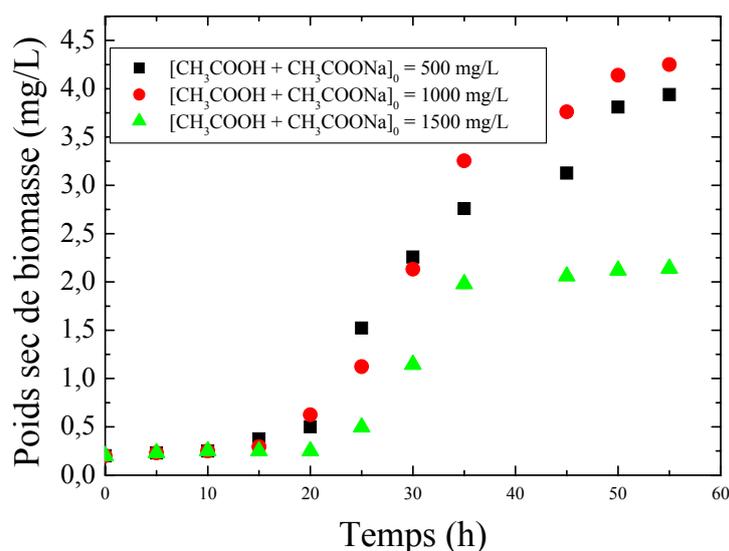


Figure 36 : Effet de la concentration initiale du mélange tampon d'acide acétique et d'acétate de sodium comme source de carbone sur la croissance bactérienne.

La croissance bactérienne évolue avec les trois concentrations testées (figure 36), Cependant qu'elle est moins importante pour la concentration la plus élevée (1500 mg/L) avec une augmentation du temps de latence qui peut être expliqué par la difficulté que trouvent les micro-organismes à métaboliser les enzymes nécessaires à dégrader les fortes concentrations de la source de carbone.

La croissance bactérienne étant consommatrice de la source de carbone pour fournir l'énergie nécessaire à la biodégradation est accompagnée d'une dégradation du mélange tampon utilisé (figure 35). Pour les deux premières concentrations (500 et 1000 mg/L) nous avons une dégradation complète du mélange au bout de 35 et 50 heures respectivement. Alors que nous avons accumulation du mélange avec la concentration 1500 mg/L

L'excès de la source de carbone organique est un facteur qui limite la dénitrification [Caley B. N., 1985] et peut être toxique pour les micro-organismes.

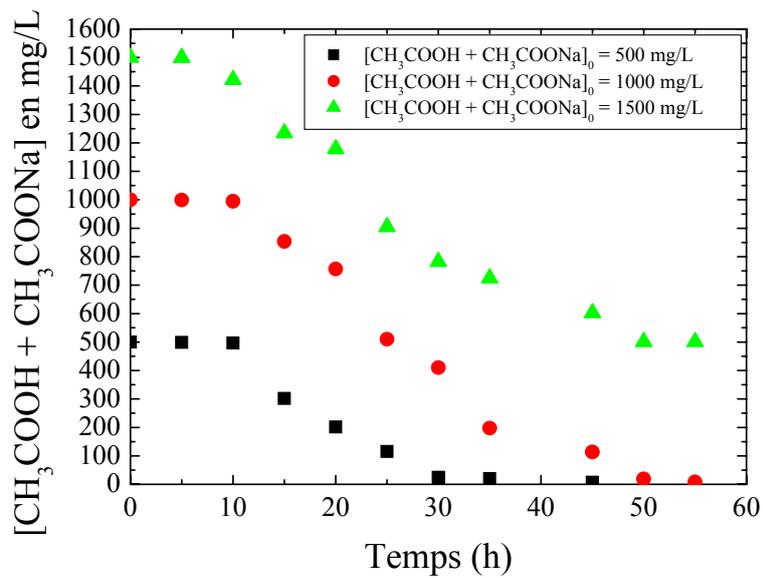


Figure 37 : Effet de la concentration initiale du mélange tampon d'acide acétique et d'acétate de sodium comme source de carbone sur la dégradation des nitrates.

Conclusion

L'utilisation d'un mélange tampon (dans notre cas l'acide acétique et l'acétate de sodium) améliore la dénitrification en diminuant le temps de traitement mais l'excès de la source de carbone organique non complètement dégradé a comme inconvénient l'intoxication du milieu récepteur et par conséquent ça sera un facteur inhibiteur de la dénitrification.

IV. Etude de la dénitrification en utilisant la farine de datte comme source de carbone et milieu nutritif

L'inconvénient d'intoxication du milieu de dénitrification par l'utilisation d'une source de carbone synthétique sera évité dans notre étude par le remplacement de la source de carbone conventionnelle par de la farine de datte dont l'excédent est biodégradable. Ceci a aussi comme avantage la réduction du coût du traitement par l'inutilité de l'utilisation d'un milieu nutritif car la farine de datte contient un mélange de saccharose, de glucose, et de fructose. Les autres éléments présents dans la farine de datte sont représentés dans le tableau 7.

La datte a toujours été un élément très important de l'alimentation, tant pour les humains que pour les animaux. Les dattes que nous allons utiliser dans ce travail sont des dattes sèches et contiennent 15 à 25 % d'eau.

Chimiquement, les travaux de Cook and Furr (1953) ont abouti à la classification des dattes en : dattes à invertase correspondant aux dattes molles, dattes à peu d'invertase représentant les dattes demi molle et datte sans invertase correspondant aux dattes sèches. Les variétés riches en invertase contiennent particulièrement des sucres réducteurs. Par contre, plus la teneur en invertase est faible, plus la quantité de saccharose augmente. En effet, les dattes sèches contiennent une quantité importante de saccharose et une quantité faible de sucres réducteurs [Muzino and Mikaim, 1958]. Une autre classification, basée sur la composition chimique en sucres : la première classe contient 40 à 65 % de saccharose, 20 à 40 % de glucose et de fructose et 15 à 25 % d'eau. La deuxième classe renferme 10 à 35 % de saccharose, 40 à 75 % de glucose et de fructose et de 10 à 30 % d'eau. La troisième classe compte 0 à 10 % de saccharose, 65 à 90 % de glucose et de fructose et de 10 à 35 % d'eau. La dernière classe contient 0 % de saccharose, de 35 à 75 % de glucose et de fructose et de 35 à 65 % d'eau.

Tableau 8 : Valeur nutritive pour 100 g de dattes.

	Calories	306
	Glucides	72,93 g
	Eau	20 g
	Protéines	2,13 g
	Lipides	0,2 g
	Fibres	1,6 g
Vitamines	Vitamine B ₁	0,08 mg
	Vitamine B ₂	0,053 mg
	Vitamine pp	2,31 mg
	Carotènes	0,031 mg
Elément minéraux et oligo-éléments	Potassium	649,33 mg
	Calcium	70,66 mg
	Phosphore	49,33 mg
	Sodium	1 mg
	Chlore	249,33 mg
	Magnésium	62,66 mg
	Soufre	60 mg
	Fer	2,13 mg
	Manganèse	0,164 mg
	Zinc	0,346 mg
Cuivre	0,4 mg	

IV.1. Etude de la croissance bactérienne

Avant de s'intéresser au suivi des différents paramètres contrôlant la dénitrification (concentration en nitrates, suivi de la dégradation du polluant au cours du temps...) en utilisant la farine de dattes comme milieu nutritif et source de carbone, il s'est avéré nécessaire de rappeler d'une manière générale l'évolution d'une masse bactérienne en présence de notre source de carbone et milieu nutritif naturel.

Initialement nous avons utilisé la farine de datte comme source de carbone à une concentration de 1 g/L, afin d'étudier l'adaptation physiologique de la culture mixte incubée dans un milieu contenant les nitrates.

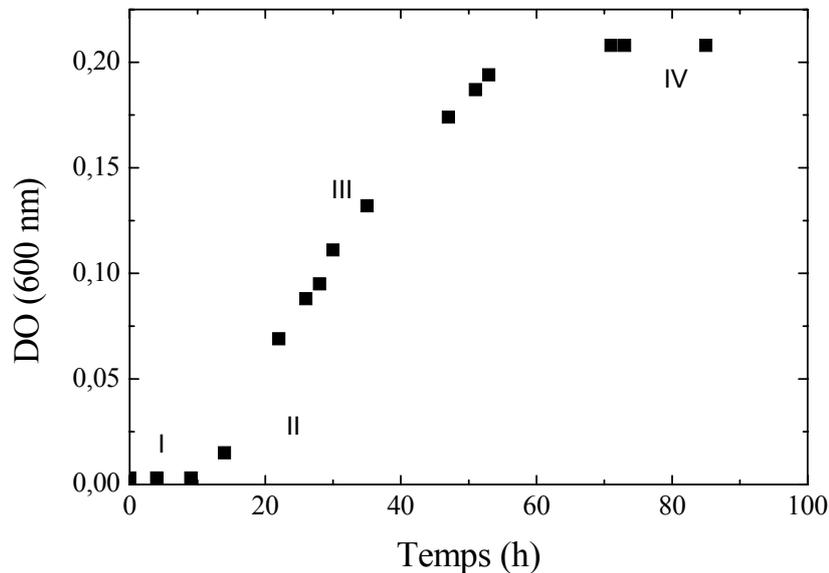


Figure 38 : Cinétique de la croissance bactérienne avec la farine de datte comme source de carbone.

La figure 38 montre qu'avec l'utilisation de la farine de datte la croissance bactérienne suit les quatre phases principales décrite précédemment. Ceci s'explique par la capacité des micro-organismes à métaboliser notre substrat carboné.

IV.2. Cinétique de la réduction des nitrates

Nous avons jugé utile de montrer la capacité de dénitrification de nos microorganismes à notre milieu naturel. Pour cela nous avons suivi l'évolution de la concentration des nitrates en fonction du temps en choisissant 1g/L de la farine de datte avec le nitrate comme accepteur final d'électron ($N-NO_3 = 1 \text{ g/L}$). Le bioréacteur est toujours maintenu à 35° C.

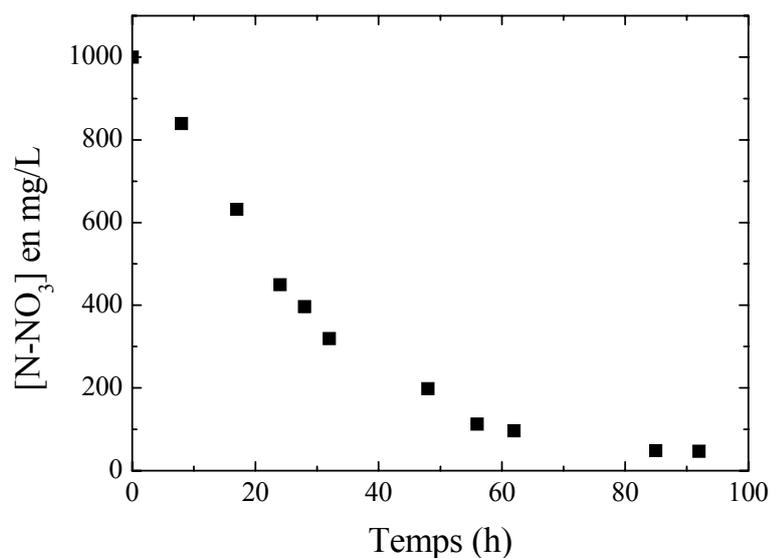


Figure 39 : Cinétique de la réduction des nitrates avec la farine de datte comme source de carbone.

Une teneur en nitrate inférieure à la norme O. M. S (50 mg/L) est observé en moins de 100 heures (figure 39) avec un taux de dénitrification de 95,29 % ce qui prouve la facilité à métaboliser la farine de datte par les micro-organismes

IV.3. Suivi du pH du milieu réactionnel au cours de la dénitrification

Au cours de la de dégradation des nitrates nous avons observé une légère augmentation du pH, il passe de 7,00 à 7,69 (figure 40) qui reste près du pH optimal pour la réaction de dénitrification, qui est généralement compris entre 7 et 8 [Casey T. J., 1997].

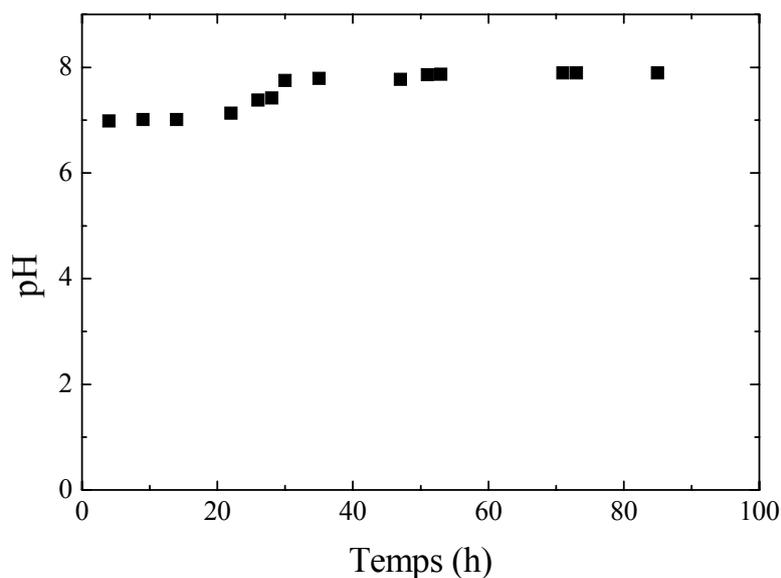


Figure 40 : Variation du pH au cours de la réaction de la dénitrification avec la farine de datte comme source de carbone.

Dans un second temps, nous avons étudié les facteurs physicochimiques ayant une influence sur la dénitrification (Température, pH, C/N, concentration des chlorures,...) et le suivi de quelques paramètres de contrôle de la dénitrification.

IV. 4. Evolution des nitrites lors de la dénitrification

Avant de terminer nos expériences, il faut s'assurer que la dégradation des nitrate est complète et ne s'arrête pas au stade nitrite parce que, s'il y a accumulation des nitrites même à des petites quantités le processus n'est pas intéressant (si la norme O.M.S du nitrate est de 50 mg/L celle de nitrite est de 0,1 mg/L, ce qui explique le danger représenté par les nitrites).

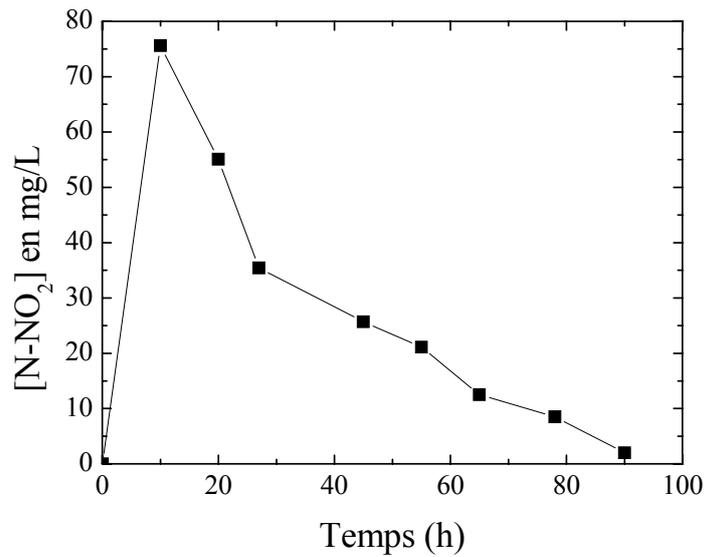
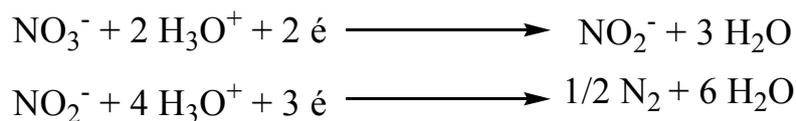


Figure 41 : Evolution des nitrites au cours de la dénitrification avec la farine de datte comme source de carbone.

La concentration des nitrites est représentée dans la figure 41. La concentration des nitrites augmente pendant la dénitrification et atteint une valeur maximale après environ 20 heures de traitement puis elle diminue graduellement. Après 80 heures la dénitrification est pratiquement complète. Le dosage des nitrites a prouvé que les points des concentrations ont suivi le modèle typique de la dénitrification biologique [Salem Z. et al, 2007] et que l'augmentation de cette dernière est passagère.

L'apparition des nitrites est lié à la réduction des nitrates selon la première réaction, par conséquent, la formation des nitrites est seulement une étape intermédiaire de la dénitrification. Le processus se poursuit par une réduction des nitrites en azote gazeux selon la deuxième réaction.



IV.5. Effet de la biomasse sur la dénitrification

Afin d'optimiser la concentration de la biomasse, la quantité a été variée de 0 à 22 g/L tout en conservant les autres paramètres constants. La Figure. 42 représente l'élimination des nitrates en fonction de la concentration de la biomasse. Une augmentation proportionnelle de l'élimination des nitrates a été constaté jusqu'à la valeur 18 g/L, au-delà de cette concentration l'augmentation de la quantité de la biomasse n'a pas d'incidence sur le taux de dénitrification. Du fait que les nitrates sont des accepteurs d'électrons et la matière organique est un donneur d'électrons, il est nécessaire que la quantité de la matière organique devienne suffisamment complète pour la dénitrification. Si l'un de ces deux facteurs est limité, la dénitrification s'arrête. Pour une concentration initiale de $[N-NO_3] = 1\text{g/L}$, la concentration optimale de la biomasse est de 20 g/L.

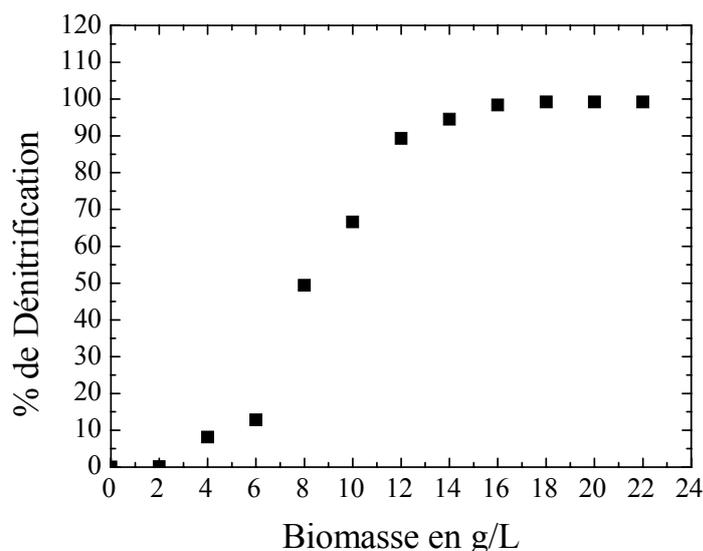


Figure 42 : Effet de la biomasse sur la dénitrification avec la farine de datte comme source de carbone.

IV.6. Effet de la taille des grains sur la dénitrification

L'effet de la taille des grains sur la dénitrification a été étudié pour trois tailles : 0,16 - 0,08, 0,08 - 0,025 et < 0,025 millimètres.

De la figure 43 nous avons observé que la dénitrification est beaucoup plus rapide pour la petite taille ($< 0,025$ mm). Pour une dimension fine de taille, la surface de l'échange est plus développée, ce qui facilite la consommation de l'appui organique par les bactéries; ainsi, le procédé de dénitrification est accéléré. En outre, une particule fine de dimension est liée directement sur la surface du biofilm développé sur l'appui matériel.

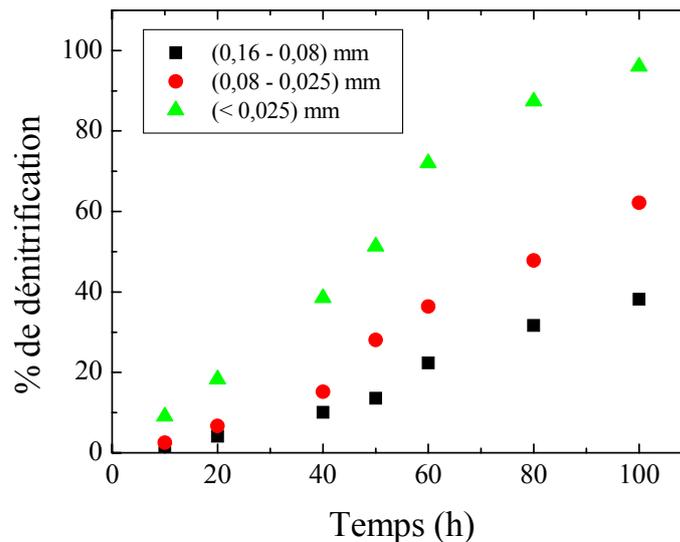


Figure 43 : Effet de la taille des grains de la farine de dattes sur la dénitrification.

IV.7. Effet de la température sur la dénitrification

Comme n'importe quel facteur influençant la diffusion des gaz et la solubilité des substrats, la température affecte le taux de dénitrification. Elle est également un paramètre très influant sur les processus biologiques et l'activité microbienne [Ullah S. et Faulkner S.P. 2006].

IV.7.1. Sur la croissance bactérienne

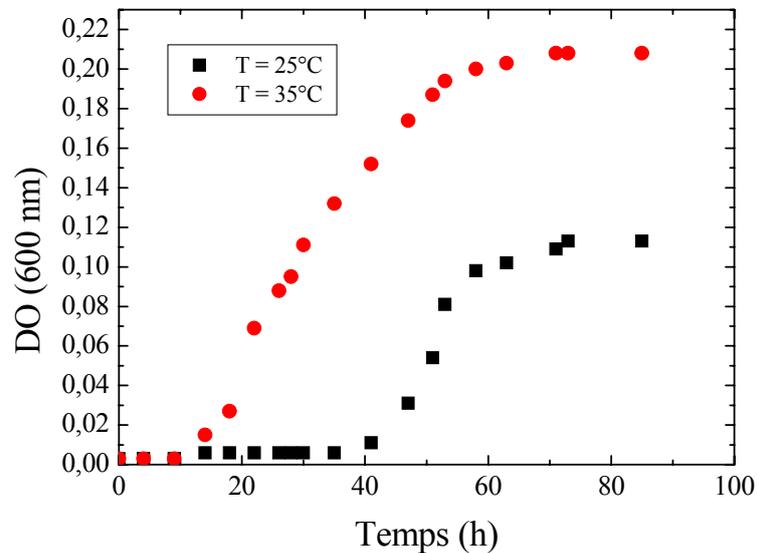


Figure 44 : Effet de la température sur la croissance des bactéries avec la farine de datte comme source de carbone.

Nous avons réalisé la dénitrification à deux températures différentes 25°C et 35°C. A 25°C nous avons remarqué une augmentation du temps de latence jusqu'à 40 heures alors qu'à 35°C il est de 10 heures. La variation de température donc influence directement le temps de latence. Un minimum temps de latence signifie une phase de croissance à atteindre rapidement un taux maximum de dénitrification. Cela a été confirmé par la relation suivante :

$$\mu_{\max,D,T} = \mu_{\max,D,20^\circ} Y^{(T-20^\circ)}$$

Où Y est le coefficient de température

IV.7.2. Sur la réduction des nitrates

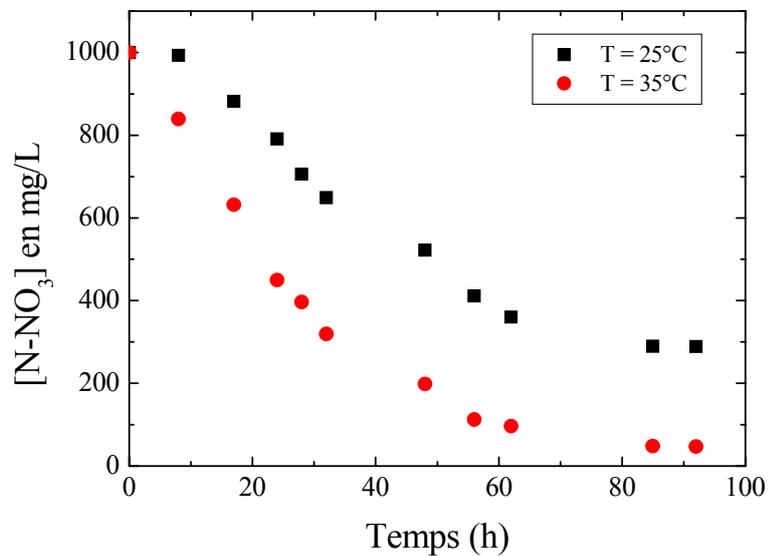


Figure 45 : Effet de la température sur la dégradation des nitrates avec la farine de datte comme source de carbone.

La température idéale pour la dénitrification est de 35°C [Foglar L. et Vuković M, 2005]. A de faibles températures, l'activité bactérienne est en effet ralentie. A 5°C, la dénitrification est complètement inhibée [Bailey L. D, 1976].

La relation entre dénitrification et température reste assez complexe à étudier car la température agit sur de nombreux facteurs : l'activité microbienne totale, la solubilité de l'oxygène, la diffusion des espèces chimiques.

Le plus important c'est l'influence particulière de la température sur l'oxygène. Pour des fortes températures, la solubilité de l'oxygène diminue et de ce fait augmente le taux de dénitrification et inversement [Hiscock K. M. et al, 1991].

IV.8. Effet du pH initial sur la dénitrification

IV.8.1. Sur la croissance bactérienne

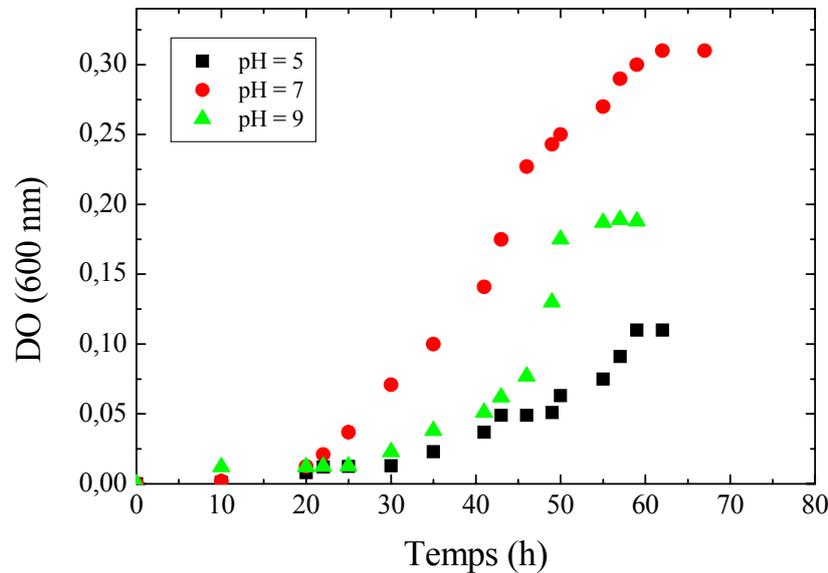


Figure 46 : Effet du pH sur la croissance bactérienne avec la farine de dattes comme source de carbone

Comme nous avons déjà mentionné précédemment le pH est un facteur important qui limite la dénitrification. En premier lieu nous avons suivi la croissance bactérienne dans trois milieux de culture ayant des pH initiaux différents (5, 7, 9) ceci a été réalisé en ajoutant HCl (1M) pour assurer l'acidité et NaOH (1M) pour la basicité.

Dans notre cas nous avons un taux maximum de dénitrification au pH neutre ceci s'explique du fait que la plupart des enzymes ont un groupe basique ou un groupe acide implicite dans l'action catalytique. Donc l'association de l'ion d'hydrogène (présent dans le milieu acide) avec la base a produit une perte de l'activité catalytique des micro-organismes [Lykiardopol A. et al, 1999].

IV.8.2. Sur la dégradation des nitrates

Des pH initiaux plus précis (5,5, 5,85, 6, 6,5, 7, 8, 9) ont été utilisés pour la dégradation des nitrates afin que nous puissions déterminer les valeurs du pH où la dénitrification peut avoir lieu.

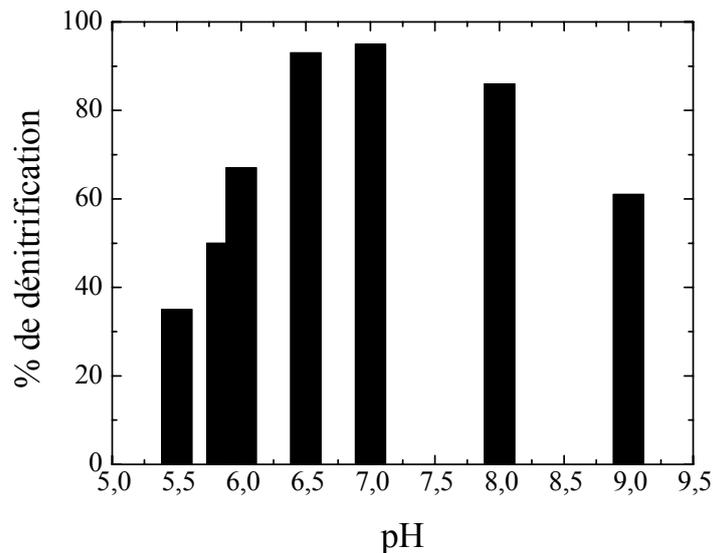


Figure 47 : Effet du pH sur la dénitrification avec la farine de dattes comme source de carbone.

Le pH optimal pour la dénitrification est compris entre 7 et 8. Cependant, les réactions de nitrifications et dénitrifications sont possibles dans un intervalle étendu 5,8 et 10,2 mais la cinétique de réaction n'est significative que pour des pH compris entre 7 et 8.

La principale influence du pH pendant la dénitrification semble être son effet sur la concentration en NH_3 et HNO_2 qui peuvent être des inhibiteurs. Les pH acides provoquent une accumulation de NO et N_2O . Dans notre cas, la dénitrification augmente avec le pH (figure 47) et le pH optimal est dans la marge neutre entre 6,5 et 7,5 où nous avons un taux de dénitrification de 95 %.

IV.9. Effet du rapport C/N sur la dénitrification

Quelle que soit la source de carbone utilisée, la détermination de la concentration de la source à fournir par rapport à la concentration des nitrates à éliminer (rapport C/N) est une étape préliminaire obligatoire à toute optimisation de traitement biologique par dénitrification.

IV.9.1. Sur la croissance bactérienne

Pour évaluer l'influence du rapport C/N, nous avons fait varier le rapport ($\text{Substrat}_{\text{entré}} / \text{Nitrate}_{\text{entrée}}$) : la quantité du nitrate est ajustée en fonction de celle du $\text{KNO}_3 = 1\text{g/L}$ selon le Tableau 8.

Tableau 9 : Les concentrations équivalentes des différentes valeurs du rapport C/N.

C/N	N-NO ₃ (g/L)
1	0,614
2	1,228
2,5	1,535
3	1,842

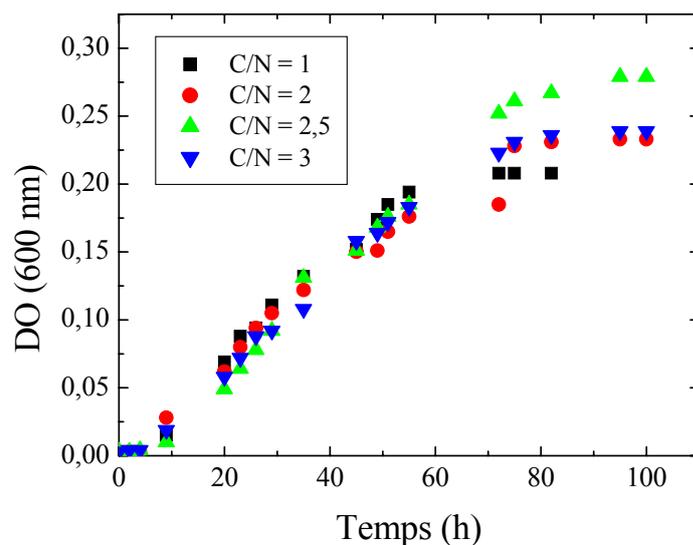


Figure 48 : Effet du rapport C/N sur la croissance bactérienne la farine de datte comme source de carbone.

L'évolution bactérienne proposée sur la figure 48 montre que la différence entre la croissance de C/N = 1 et celle de C/N = 3 n'est pas large ceci s'explique par la capacité des microorganismes à métaboliser le substrat utilisé. Le rapport C/N n'a pas donc un grand effet sur la cinétique de croissance.

IV.9.2. Sur la dégradation des nitrates

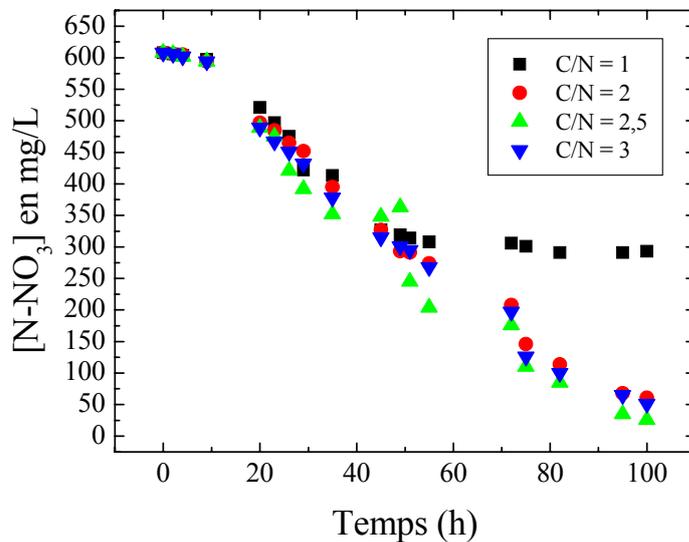


Figure 49 : Effet du rapport C/N sur la dégradation des nitrates avec la farine de datte comme source de carbone.

Dans le cas de la réduction des nitrates (figure 49), et avec un rapport C/N = 2,5, on a observé une quantité élevée de biomasse suivi d'une élimination complète des nitrates au bout de 85 heures avec une vitesse moyenne de réduction des nitrates égale à 0,0392 grammes de nitrates par heure et par litre de milieu de culture ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$) alors qu'avec les autres rapports (C/N = 2 et 3) et après les premiers 15 heures (phase de latence), les vitesses étaient relativement proches mais moins rapides : $0,0314 \text{ g L}^{-1} \text{h}^{-1}$, $0,0328 \text{ g L}^{-1} \text{h}^{-1}$ respectivement. Cependant nous avons remarqué une faible vitesse $0,0121 \text{ g L}^{-1} \text{h}^{-1}$ avec le rapport C/N = 1 et un taux de réduction égale à 49,34%.

Nous concluons qu'un rapport pondéral égal à 2,5 est optimal pour réaliser une meilleure dénitrification avec la farine de datte comme source de carbone.

IV.10. Effet des chlorures sur la dénitrification

Comme il a été cité précédemment, dans beaucoup d'applications de biofiltres, une solution d'éléments nutritifs est périodiquement ajoutée à la structure de milieu pour fournir des nutriments (par exemple, source de carbone et phosphore) nécessaires à la croissance bactérienne. Parmi les sels fréquemment présents dans certaines des solutions d'éléments nutritifs utilisées de cette manière, on trouve les chlorures. Il est donc intéressant de connaître leur effet sur la croissance bactérienne et le processus de dénitrification.

IV. 10.1. Sur la croissance bactérienne

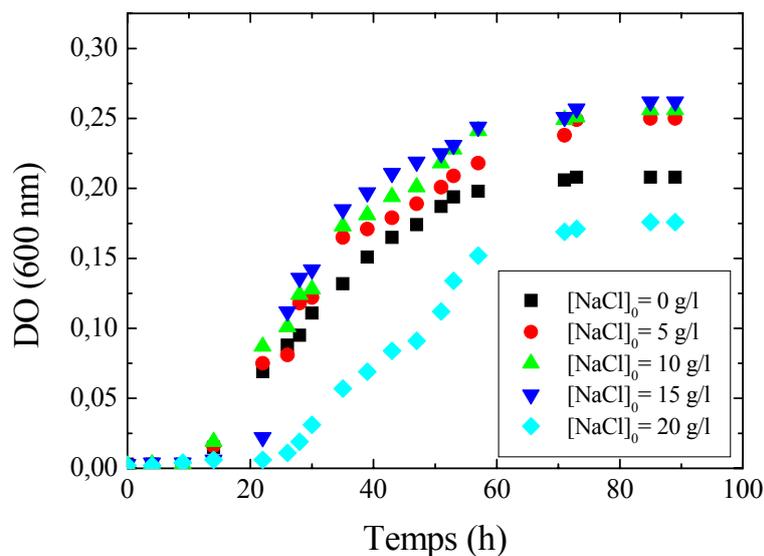


Figure 50 : Effet des chlorures sur la croissance bactérienne avec la farine de datte comme source de carbone.

Le chlorure de sodium peut influencer les bactéries dénitrifiantes soit par la toxicité des ions Na⁺, Soit comme une substance capable d'imposer au milieu une pression

osmotique nuisible. [Steinmuller V.W. et Kutzner J., 1980] trouvent que chez les bactéries *Thiobacillus denitrificans* l'activité enzymatique est complètement inhibée dans un milieu comportant 50 g/L de NaCl. Alors que [Claus G. et Kutzner J., 1985] relèvent que l'action inhibitrice du chlorure de sodium est observée à partir de 20 g/L.

Dans notre cas la figure 50 montre que les micro-organismes présentaient des capacités de croissance en absence des chlorures. En effet, la plus forte concentration testée, 20 g/L du NaCl diminue la cinétique de croissance (les micro-organismes peuvent se développer après un temps de latence de 25 heures).

IV. 10.2. Sur la dégradation des nitrates

En principe l'inhibition de la dénitrification par NaCl est non compétitive car la compétition entre le chlorure de sodium et l'ion nitrate pour un même site actif d'enzyme n'est pas convenable puisque les structures de ces molécules sont différent.

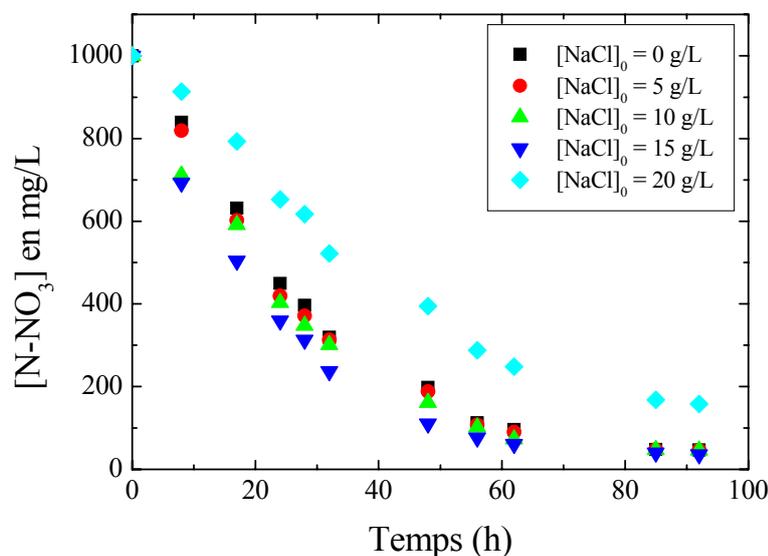


Figure 51 : Effet des chlorures sur la dégradation des nitrates avec la farine de datte comme source de carbone.

En ce qui concerne nos résultats, les cinétiques d'élimination des nitrates à différentes concentrations de NaCl présentées sur la figure 51 montrent qu'effectivement il y a une

faible interférence du chlorure de sodium sur la dénitrification. Le rendement de dénitrification baisse de 10 % lorsque la concentration en chlorure de sodium passe de 0 à 20 g/L ce qui confirme les résultats de [Claus G. et Kutzner J., 1985].

Conclusion

L'utilisation de la farine de datte a comme avantage l'inutilité de l'utilisation d'un milieu nutritif ce qui diminue le temps de dénitrification ainsi que l'excès de la datte non dégradés n'est pas toxique pour les micro-organismes. Nous avons atteint un taux de dénitrification de 95,25 % au bout de 82 heures.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

La pollution des eaux par les nitrates en Algérie est un problème alarmant, ceci est due à l'utilisation intensive des engrais azotés ainsi que la mal formation de nos agriculteurs qui utilisent les engrais en excès des besoins des plantes. Le long des années, cet excès non absorbé va se trouver soit dans les cours d'eaux (rivières, lacs,...) soit dans les eaux souterraines.

La pollution des eaux par les nitrates provoque des nuisances sur la nature (eutrophisation) et plus particulièrement sur la santé humaine (méthémoglobinémie).

Notre travail a été porté sur l'étude de la dénitrification par l'utilisation d'une culture mixte des micro-organismes prélevés dans la station d'épuration d'El Menia Constantine en réacteur batch en utilisant plusieurs sources de carbone organique. Nous avons étudié l'influence des différents paramètres physicochimiques qui peuvent avoir un effet inhibiteur ou accélérateur sur la biodégradation des nitrates.

- L'élimination des nitrates peut être réalisée soit par traitement biologique (dénitrification hétérotrophe ou autotrophe) soit par traitement physicochimique (échange d'ions, procédés membranaires). Cette étude nous montre que l'élimination biologique semble être la mieux adapté aux moyens de l'Algérie
- Les micro-organismes prélevés dans la station d'épuration d'El Menia Constantine sont capable d'éliminer les nitrates avec toutes les sources de carbone utilisées et leurs cinétique de croissance commence par une phase de latence, suivie d'une phase de croissance exponentielle et se termine par une phase de stagnation après la consommation de la source de carbone et du polluant.
- Les micro-organismes utilisés présentent une capacité de dénitrification en présence et en absence d'oxygène. Cependant, le taux de dénitrification en milieu anoxique (98,87 %) est plus important qu'en milieu anaérobie (74 %).

- La nature de la source de carbone a un grand effet sur la réaction de dénitrification.
- L'utilisation du méthanol comme source de carbone et d'énergie dans la dénitrification donne un bon rendement de dénitrification qui est comparable aux résultats trouvés dans la littérature. Notre processus donc est fiable pour la dénitrification.
- En utilisant le succinate de sodium comme source de carbone dans la dénitrification nous avons obtenu un taux de dénitrification important en réduisant le temps de traitement à 70 heures pour dégrader 1000 mg/L des nitrates alors qu'il a été 70 heures pour 150 mg/L avec le méthanol. L'utilisation donc d'une source de carbone facile à dégradé par les micro-organismes est un facteur important pour améliorer la dénitrification.
- L'utilisation des deux sources de carbone précédentes a entraîné une augmentation du pH du milieu réactionnel, sachant que la dénitrification se fait préférentiellement dans un milieu neutre.
- En utilisant le mélange tampon d'acide acétique et d'acétate de sodium nous avons évité le changement du pH. Ceci a eu comme influence une amélioration de la quantité de la biomasse qui va avoir un effet sur la dégradation des nitrates.
- L'augmentation de la teneur en ion nitrate seule n'est pas un facteur limitant de la croissance bactérienne et la dénitrification car les micro-organismes ont besoin d'autre paramètres adéquates pour réaliser les métabolismes nécessaires à la croissance.
- L'augmentation de la concentration initiale du mélange tampon est un facteur inhibiteur de la dénitrification, ceci est dû à l'intoxication du milieu récepteur.
- L'intoxication du milieu de dénitrification est évitée dans notre étude par l'utilisation d'une source de carbone naturelle qui est la farine de datte comme source de carbone dont l'excédent est biodégradable.
- L'utilisation de la farine de datte a comme avantage la réduction du coût de traitement par l'inutilité d'utilisation d'un milieu nutritif approprié.
- Nos micro-organismes sont capables à métaboliser la farine de datte avec un taux de dénitrification 95,25 % au bout de 80 heures.

- La dégradation des nitrates en utilisant la farine de datte est complète est ne s'arrête pas au stade nitrite dont la formation de ce dernier est seulement une étape intermédiaire.
- L'étude de l'effet de la taille des grains de la farine de datte sur la dénitrification nous a montré que cette dernière est plus importante avec la plus petite taille en raison de la facilité de consommation par les micro-organismes.
- La baisse de température augmente le temps de latence. Un minimum temps de latence signifie une phase de croissance a attein rapidement et un taux maximum de dénitrification.
- Le rapport C/N est un paramètre affectant la dénitrification alors qu'un rapport pondéral égal à 2,5 est optimal pour réaliser une meilleure dénitrification avec la farine de datte comme source de carbone.
- Une concentration élevée des chlorures diminue la cinétique de croissance de nos micro-organismes ainsi que leur capacité de dégradation.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Ambus, P., Lowrance, R. (1991). Comparison of denitrification in two riparian soils. Soil Science Society of America Journal 55: pp 994-997.

Baali F., Rouabhia A, Kherici A., Djabri L., Bouchaou L., Hani A. (2007). Qualité des eaux souterraines et risque de pollution en milieu semi-aride. Cas de la cuvette de Chéria (NE Algerien). Estudios Geológicos, 63 (2) julio-diciembre 2007, pp 127-133.

Bailey, L. D. (1976) Effects of temperature and root on denitrification in a soil. Canadian. Journal of Soil Science 56: 79-87.

Balducchi F. (dir. Lacroix A.), (1994). Le traitement des nitrates dans l'eau potable. Bilan technico-économique. INRA R&A, Grenoble, 31 pages.

Bernet, N., Delgenèse, N., Moletta R. (1996). Denitrification by anaerobic sludge in piggery wastewater. Environmental Technology. 17 (3): 293-300.

Betlach, M. R. et Tiedje, J. M. (1981). Kinetic explanation for accumulation of nitrite, nitric oxide and nitrous oxide during bacterial denitrification. Applied and Environmental Microbiology. 42(6). pp 1074-1084.

Boquillet C., Lany Y. You M. (2007). Le nitrate et traitement des eaux. U.C.O. Bretagne Nord.

Blasczyk M. (1993). Effect of medium composition on the denitrification of nitrate by *Paracoccus denitrificans*. Appl. Environ. Microbiol. 59, pp 3951-3953.

BorDjiba O., Bekhouche F., Hassine A. et Djenidi R. (2009). Impact de la pollution par les hydrocarbures sur la qualité des eaux usées dans la région de skikda (Nord-Est Algérien). European Journal of Scientific Research ISSN 1450-216X Vol.26 No.1 (2009). pp 87-97.

Bowman, R. A. et Focht, D. D. (1974). The influence of glucose and nitrate concentrations upon denitrification rates in sandy soils. Soil Biology and Biochemistry. 6. pp 297-301.

- Bryan L.E., Nicas T., Holloway B. W, and Crowther C. (1981).** Aminoglycoside-Resistant Mutation of *Pseudomonas aeruginosa* Defective in Cytochrome c_{552} and Nitrate Reductase. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, Jan. 1981, p. 71-79.
- Buchanan R.E. (1918).** Life phases in a bacterial culture. *J. Infect. Dis.* 98, 1271-1273.
- Carley B. N. (1985).** The effect of excess carbon in the anoxic basin of biological pre-denitrification system for treatment of landfill leachate. Thèse de doctorat. Université British Columbia.
- Casey T.J. (1997).** Unit Treatment Processes in Water and Wastewater Engineering, John Wiley & Sons, Chichester (1997) pp. 166-170.
- Cavigelli M.A. et Robertson G.P. (2001).** Role of denitrifier diversity in rates of nitrous oxide consumption in a terrestrial ecosystem. *Soil Biology and Biochemistry*, 33. pp 297-300.
- Chabour N. (2004).** La surexploitation des eaux souterraines dans les plaines littorales : nappe de Telezza dans la région de Collo (Nord-Est Algérien). *Sciences & technologie B-N°22*. Décembre 2004. pp 127-132.
- Chantal G. (2001).** Nitrate pollution of ground water: the response time of ground water. *Journal of bioscience and bioengineering*. Vol. 108, No. 7, pp 423-435.
- Chen K., Lee S. et Hwang J. (1998).** Simultaneous carbon-nitrogen removal in waste water using phosphorilated PVA-immobilised microorganisms. *Enzyme and Microbial Technology* 23: 311-320.
- Claus G. et Kutzner J. (1985).** Physiology and kinetics of autotrophic denitrification by *Thiobacillus denitrificans*. *Appl Microbiol Biotechnol* 22 : pp 283-288.
- Cook. J.A et Furr. J.R.I, (1953).** Cité par Maatallah, 1970, in : Contribution à la valorisation de la datte Algérienne. Thèse ing INA El Harrach, 103 p.
- Cosbybj (2003).** The Nitrogen Cascade. *Bioscience*, 53: pp 341-356.

Daizy Bougard. (2004). Traitement biologique des effluents azotés avec arrêt de la nitrification au stade nitrite. Thèse de doctorat. Ecole doctorale : science et procédé biologiques et industriels.

Davidsson, T. E. et Leonardson, L. G. (1996). Effects of nitrate and organic carbon additions on denitrification in two artificially flooded soils. *Ecological Engineering*. 7(2). pp 139-149.

Dellignette Kuller M. L., Rosso L. et Flandrois, J. P. (1995). Accuracy of microbial growth prediction with square root and polynomial models. *International Journal of Food Microbiology*. 27, 139-146.

Enwall K., Philippot L., Hallin S. (2005). Activity and composition of the denitrifying bacterial community respond differently to long-term fertilization. *Applied and Environmental Microbiology* 71: pp 8335-8343.

Flaurence Curie (2006). Rétention de nitrate dans les zones humides riveraines. Thèse de doctorat. Université Paris IV.

Foglar L, Briski F.(2003). Wastewater denitrification process - the influence of methanol and kinetic analysis. *Process Biochemistry*. 2003; 39(1). pp 95-103.

Foglar L. and Vuković M. (2005). High nitrate removal from synthetic wastewater with mixed bacterial culture. *Biores. Technol.*, 96 (2005) pp 879-888.

Galoway J.N., Aber J.D., Erisman J.W., Seitzinger S.P., Howarth R.W., Cowling E.B., Henley W. J., Levavasseur G., Franklin, L. A., Lindley, S. T., Ramus J., et Osmond C. B. (1991). Diurnal responses of photosynthesis and fluorescence in *Ulva rotundata* acclimated to sun and shade in outdoor culture. *Marine Ecology Progress Series*, 75,pp 19-28.

Garcia F., Ciceron D., Saboni A. and Alexandrova S. (2006). Nitrate ions elimination from drinking water by nanofiltration: Membrane choice. *Separation and Purification technology*, 2006. 52(1). pp 196-200.

Goodrich A., Lykins W., Klark M. (1991). Drinking water from agriculturally contaminated groundwater. *J Environ Qual* (1991);20:707-17.

Gootzen J. F. E., Peeters P. G. J. M., Dukers J. M. B., Lefferts L., Visscher W. and van Veen J.A. R. (1997). The electrocatalytic reduction of NO_3^- on Pt, Pd and Pt + Pd electrodes activated with Ge. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 1997. 434(1-2). pp. 171-183.

Groffman, P. M., Axelrod, E. A., Lemunyon, J. L. et Sullival, W. M. (1991). Denitrification in grass and forest vegetated filter strips. *Journal of Environmental Quality*. 20(3). pp 671-674.

Guiraud. J.P. (1998). Microbiologie alimentaire. (DUNOD) 422 p.

Hallberg GR. (1987). Agricultural chemicals in groundwater: extent and implications. *Am J Altern Agric* 1987; 2(1): pp 3-15.

Hamaidi M.S. Hmaidi F., Zoubiri A., Bouaklil F. et Dhan Y. (2009). Etude de la Dynamique des Populations Phytoplanctoniques et Résultats Préliminaires sur les Blooms Toxiques à Cyanobactéries dans le Barrage de Ghrib(Ain Defla-Algérie). *European Journal of Scientific Research* ISSN 1450-216X Vol.32 No.3 (2009). pp 369-380.

Hathcock M. C., Hazards J. N. (1982) Nitrate, nitrite and. N-nitroso compounds. *Nutr. Toricol*. 1982,1, pp 327-380.

Heathwaite A. L. (1993). Nitrogen cycling in surface waters and lakes. Processes, patterns and management, pp 99-140.

Hénault, C. and Germon J. C. (1995). Quantification de la dénitrification et des émissions de protoxyde d'azote (N_2O) par les sols. *Agronomie* 15. pp 321-355.

Hiscock, K. M., Lloyd, J. W. et Lerner, D. N. (1991). Review of natural and artificial denitrification of groundwater. *Water Research*. 25 (9). pp 1099-1111.

Howard P.H. (1990). Handbook of environmental fate and exposure data for organic chemicals. Ed. Lewis Publishers, Chelsea.Michigan.

Jianlong W., Ping, L. et Yi, Q. (1999). Microbial metabolism of di-butyl phthalate (DBP) by a denitrifying bacterium. *Process Biochemistry* 34: pp 745-749.

Kamermans, P., Malta, E.J., Verschuure, J. M., Lentz, L. F., et Schrijvers, L. (1998). Role of cold resistance and burial for winter survival and spring initiation of an *Ulva spp.* (Chlorophyta) bloom in a eutrophic lagoon (Veerse Meer lagoon, The Netherlands). *Marine Biology*, 131, pp 45-51.

Katsounaros I., Ipsakis D., Polatides C. and Kyriacou G. (2006). Efficient electrochemical reduction of nitrate to nitrogen on tin cathode at very high cathodic potentials. *Electrochimica Acta*, 2006. 52 (3) pp 1329-1338.

Kim M., Jeong S., Yoon S., Ja -Cho, Kim Y.H., Kim M.J., Ryu E.Y., and Lee S.J. (2008). Aerobic Denitrification of *Pseudomonas putida* AD-21 at Different C/N Ratios. *Journal of bioscience and bioengineering*. Vol. 106, No. 5, pp 498–502.

Knowles R. (1982). Denitrification, Dissimilatory Reduction of Nitrate to Ammonium, and Nitrification in a Bioturbated Estuarine Sediment as Measured with ¹⁵N and Microsensor Denitrification. *Microbiol Techniques Rev.*, 46. pp 43-70.

Kucera, I., Dadak, V. et Dobry, R. (1983). The distribution of redox equivalents in the anaerobic respiratory chain of paracoccus denitrificans. *European*.

Lespine A. et Periquet A. (2001). Nitrate alimentation et santé. *TTCF*. Paris 24 p.

L'hirondel J. (2004). Les nitrates et l'homme, le mythe de leur toxicité. Les éditions de l'institut de l'environnement, 142 p.

Lie E. et Wellander T. (1994). Influence of dissolved oxygen and oxydation-reduction potential on the denitrification rate of activated sludge. *Water science and technology*, 30 (6), 91-100.

Liua D., Zhanga S., Zhenga Y., Shoun H. (2006). Denitrification by the mix-culturing of fungi and bacteria with shell. *Microbiological Research* 161 (2006) pp 132-137.

Lloyd D. (1993). Aerobic denitrification in soils and sediments - From falacies to facts.

Trends in Ecology and Evolution 8: pp 352-356.

Lobry J.R. (1991). Réévaluation 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 N. R., Mavinic D. S., Oldham W. K., Meisen A. and Gardner I. S. (2002). Methanol-induced biological nutrient removal kinetics in a full-scale sequencing batch reactor. Water Research. 2002; 36 (11). pp 2721-2732.

Lowrance R., Smittle D. (1988). Nitrogen cycling in a multiple-crop vegetable production system. Journal of Environmental Quality 17: pp 158-162.

Lykiardopol A., Zeimes P., Renard A., Montmollin G.D. and Humbert S. (1999). The Nitrification and the Denitrification in the Activated Sludge Systems, Lausanne, 1999.

Madigan, M., J. Martinko, and J. Parker. (2000). Biology of microorganisms. ninth edition ed. 2000: Prentice hall Inc.

Mahne I., Tiedje J. M., (1995). Criteria and methodology for identifying respiratory denitrifiers. Appl. Environ. Microbiol. 61, pp 1110-1115.

Maneesha P., Ginige Jocelyn C., Bowyer Leah F., Jürg K., Zhiguo Y.(2009). A comparative study of methanol as a supplementary carbon source for enhancing denitrification in primary and secondary anoxic zones. Biodegradation (2009) 20: pp 221-234.

Marchandin H. (2007). Physiologie bactérienne. Thèse de doctorat. Faculté de médecine Montpellier - Nîme.

Mariotti A. (1986). La dénitrification dans les eaux souterraines, principes et méthodes de son identification : une revue. Journal of Hydrology. 88: 1-23.

Martin G. (1979). Le problème de l'azote dans les eaux. Technique et documentation.

Maurel A. (2006). Osmose inverse et ultrafiltration, considérations théoriques. Techniques de l'ingénieur. J 2 790. pp 1-19.

McMeekin T. A., Olley J. N., Ross T. et Ratkowsky D. A. (1993). Data collection and analysis. P: 28-54. In Predictive microbiology: Theory and application, Research Studies Press LTD. Taunton.

Menesguen A. (2001). Les marées vertes en Bretagne. La responsabilité du nitrate Bretagne environnement (2001) pp 118-124.

Menesguen A. (2003). Les « marées vertes » en Bretagne, la responsabilité du nitrate. IFREMER/Centre de Brest, Direction de l'Environnement et de l'Aménagement du Littoral.

Meynell G.G. et Meynell E. (1970). Quantitative aspects of microbiological experiments. Cambridge University press, Cambridge.

Moser-Engeler R, Udert KM, Wild D, Siegrist H. (1998). Products from primary sludge fermentation and their suitability for nutrient removal. Water Science and Technology. 1998;38(1). pp265-273.

Myrold D. D., Tiedje J. M. (1985). Establishment of denitrification capacity in soil: effects of carbon, nitrate and moisture. Soil Biology and Biochemistry 17: pp 819-822.

Nakajima M., Hayamizu, T. et Nishimura H. (1984). Effect of oxygen concentration on the rates of denitrification and denitrification in the sediments of an eutrophic lake. Water Research. 18. pp 335-338.

Narang A., Konopka A., Ramkrishna D. (1997). The Dynamics of microbial Growth on Mixtures of substrates in Batch Reactors. J. theor. Biol. 184, 301-317.

Novince E. (2009). Guihi M. Nitrate dans les eaux de surface. Direction régionale de l'environnement de Bretagne. L'eau en Bretagne. Bilan 2008-2009.

Parsons L. L., Murray R. E., Smith M. S. (1991). Soil denitrification dynamics–spatial and temporal variations of enzyme-activity, populations, and nitrogen gas loss. Soil

Science Society of America Journal 55: pp 90-950

Patureau D. (1995). Etude cinétique et physiologique d'une bactérie dénitrifiante en conditions anaérobies. Thèse de doctorat, université. Toulouse.

Paynes, W. J. (1985). Diversity of denitrifiers and their enzymes. In H. L. Golterman (Ed.) Denitrification in the nitrogen cycle. Plenum Press, New York. pp 47-65.

Peterson B., Tobias C. et Drecht G. V. (2006). Denitrification across landscapes and waterscapes: a synthesis. Ecological Applications, 16. pp 2064-2090.

Protejoie 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., 2002, 15 (3), pp 151-160.

Purtschert I., Siegrist H. and Gujer W. (1996). Enhanced denitrification with methanol as carbon source. Water science and Technology. Volume 33, issue 12, 1996 pp 117-126.

Ratel (1992). Elimination des nitrates de l'eau potable. Document technique.

Reatz, E. et Bauer, W. (2001). Fermentations et Technologie Enzymatique. Science Alimentaire.

Rodier J. (1978). L'analyse de l'eau, 6^{ème} édition.

Rubio C. (2002). Compréhension des mécanismes d'adhésion des biofilms en milieu marin en vue de la conception de nouveaux moyens de prévention. Thèse de doctorat. Université Paris 6.

Ruiz L. (2003). Transferts et transformations d'azote dans les bassins versants : de l'azote lessivable au nitrate dans les rivières et dans les nappes. Thèse de doctorat Rennes I.N.R.A.

Salem Z. (2007). Lebig H., Cherafa W. K. et Allia K. Valorisation of olive pits using denitrification. *Desalination* 204 (2007). pp 72-78.

Santafé-Moros A., Gozávez-Zafrilla J.M. and Lora-García J. (2005). Performance of commercial nanofiltration membranes in the removal of nitrate ions. *Desalination*, 2005. 185 (1-3). pp 281-287.

Santé Canada (1992). Le nitrate et le nitrite. Recommandation de l'eau potable au Canada. Document technique.

Schuler M. L., Kargi F. (1992). Bioprocess Engineering: Basic concepts. Edition Prentice Hall PTR.

Scriban R. (1993). Biotechnologie (4^{eme} edition) Ed. Technique et documentation Lavoisier.

Seitzinger S. P., Harrison J. A., Bohlke J. K., Bouwman A. F., Lowrance R. R.(2006) Denitrification in freshwater and coastal marine ecosystems: Ecological and geochemical significance *Limnol. Oceanogr.*, 33(4, part 2), 2006, pp 702-724.

Skrind J.R., Bhagat S.K. (1982). Industrial wastes as carbon sources in biological denitrification. *Journal of the Water Pollution Control Federation*.54 (4): pp 370-377.

Smid A. E. et Beauchamp E. G. (1976). Effects of temperature and organic matter on denitrification in soil. *Canadian Journal of Soil Science*. 56. pp 385-391.

Steinmuler V. W. et Kutzner H. J. (1980). Nitrate Elimination aus vorwiegend anorganisch belasteten industry-abwasern durch authotrophe denitrification. *Landwirsch forsch* 37 : pp 527-450.

Tada K. and Shimazu K. (2005). Kinetic studies of reduction of nitrate ions at Sn-modified Pt electrodes using a quartz crystal microbalance. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2005. 577(2). pp 303-309.

Tam N.F.Y., Wong Y.S., Leung G. (1992a). Effect of exogenous carbon sources on removal of inorganic nutrient by the nitrification-denitrification process. *Water Research*; 26 (9): pp 1229-1236.

Tam N.F.Y., Wong Y.S., Leung G. (1992b). Significance of external carbon sources on simultaneous removal of nutrients from wastewater. *Water Science and Technology*: 26 (5-6): pp 1047-1055.

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.

Trevor J. T. (1985). The influence of oxygen concentrations on denitrification in soils. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 23. pp 152-155.

Ullah S., Faulkner S. P. (2006). Denitrification potential of different land-use types in an agricultural watershed, lower Mississippi valley. *Ecological Engineering* 28: pp 131-140.

Van Dongen U., Jetten M. S. M. and Van Loostrecht M. C. M. (2001). The sharon-anammox process for treatment of ammonium rich wastewater. *Water Science and Technology*. 44 (1). PP 153-160.

Walenstein M. D., Myrold D. D., Firestone M. K., Voytek M. A. (2006). Environmental controls on denitrifying communities and denitrification rates : insights from molecular methods. *Ecological Applications* 16: 2143-2152.

Wehbe N. (2008). Dénitrification de l'eau potable en réacteur catalytique membranaire et photocatalytique. Thèse de doctorat. Université Claude bernard Lyon.

WEIER K. L., DORAN J. W., POWER J. F., WALTERS D. T. (1993). Denitrification and dinitrogen/nitrous oxide ratio as affected by soil water, available carbon, and nitrate. *Soil Science Society of America Journal* 57: pp 66-72.

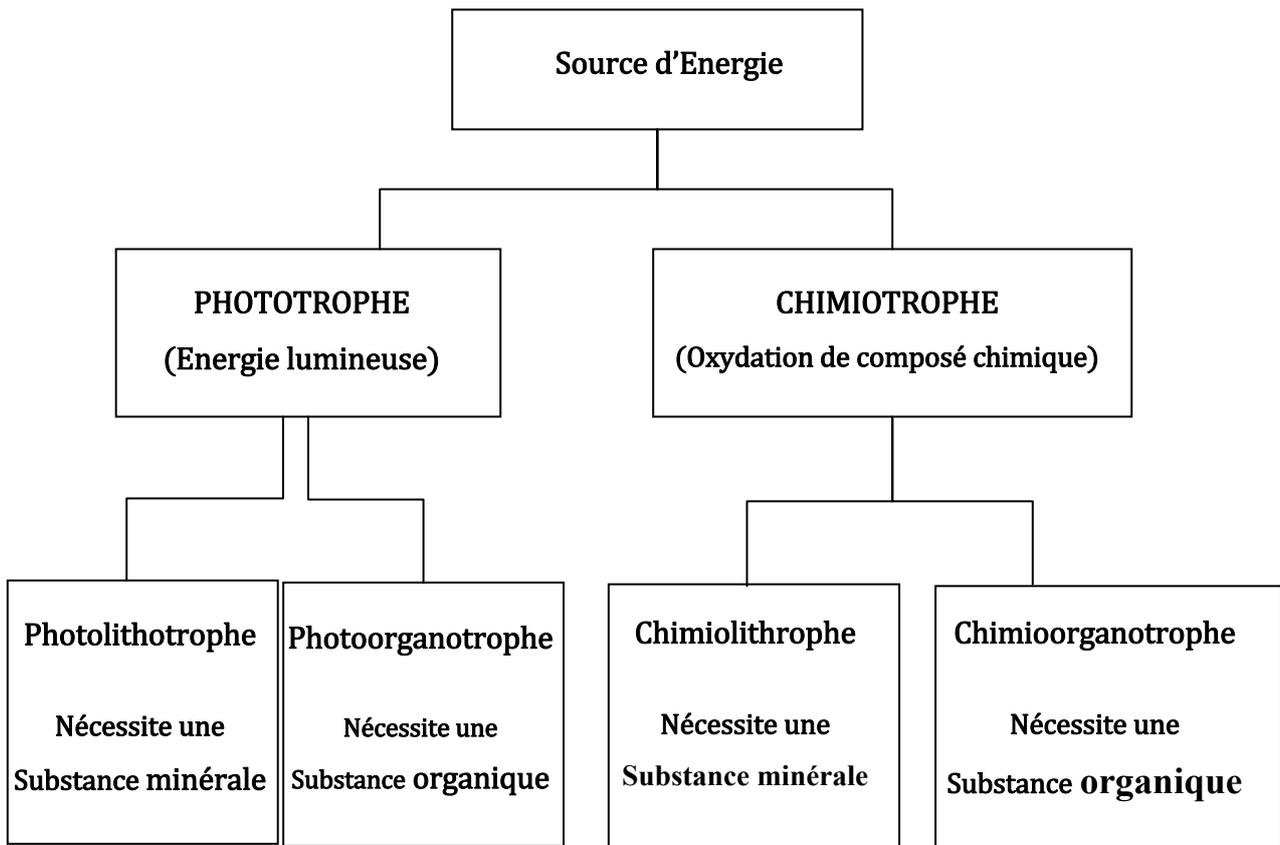
Yapo O. B, Mambo V., Meledje Djedjess E. J-C., Ohou M J., Seka A. (2009). Searching for parameters optimising the biological Denitrification of nitrate-and ammonium-rich well

waters by private slow sand filtration reactors. *European Journal of Scientific Research* ISSN 1450-216X Vol.26 No.4 (2009), pp.565-576.

Zhu J. G., Liu G., Han Y., Zhang Y. L., Xing G. X. (2003). Nitrate distribution and denitrification in the saturated zone of paddy field under rice/wheat rotation. *Chemosphere* 50: pp 725-732.

ANNEXES

Annexe 1 : Classement des microorganismes selon leurs type d'énergie



Annexe 2: Fonctions physiologiques des principaux éléments constitutifs des cellules microbiennes.

ELEMENTS	FONCTION METABOLIQUE
Carbone	Constituant des composés organiques
Oxygène	Constituant des composés organiques et de l'eau
Hydrogène	Constituant des composés organiques et de l'eau
Azote	Constituant des protéines, des acides nucléiques, des coenzymes
Soufre	Constituant des protéines et de quelques coenzymes
Phosphore	Constituant des acides nucléiques, des phospholipides, des coenzymes
Potassium	Constituant de plusieurs enzymes et intervenant dans la synthèse protéique
Calcium	Cofacteur d'enzymes extracellulaires (protéases)
Magnésium	Cofacteur de nombreuses réactions enzymatiques (ATP)
Fer	Constituant de cytochromes, cofacteur de certaines enzymes et des protéines transporteuses d'électrons.
Manganèse	Cofacteur de quelques enzymes
Cobalt	Constituant de la vitamine B 12
Molybdène Nickel Zinc Cuivre	Constituant de certaines enzymes

Annexe 3: Les caractéristiques physico-chimiques du méthanol

Source de carbone	MeOH
Formule moléculaire	CH ₄ O
Synonyme	Alcool méthylique
État physique	Liquide fluide
Poids moléculaire	32 g /mol
Densité	0,791 g/cm ³ à 20°C
Point d'ébullition	64,5°C
Point de fusion	- 97,8°C
Point d'eclair	12°C
Concentration de saturation	166 g/m ³
Viscosité	0,5513 à 25°C
Conductivité thermique	190,16 mWm ⁻¹ K ⁻¹ à 25°C
Conductivité électrique	5.10 ⁻⁹ Ω ⁻¹ cm ⁻¹ à 25°C

Annexe 4: 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 blanche
Point de fusion	$\geq 400^\circ C$
Densité	1.886 g/cm^3 à $25^\circ C$
Tension de vapeur	$< 0.00015 \text{ hPa}$ à $100^\circ C$ $1.16E-7 \text{ hPa}$
Solubilité dans l'eau	$> 100 \text{ g/l}$ à $25^\circ C$

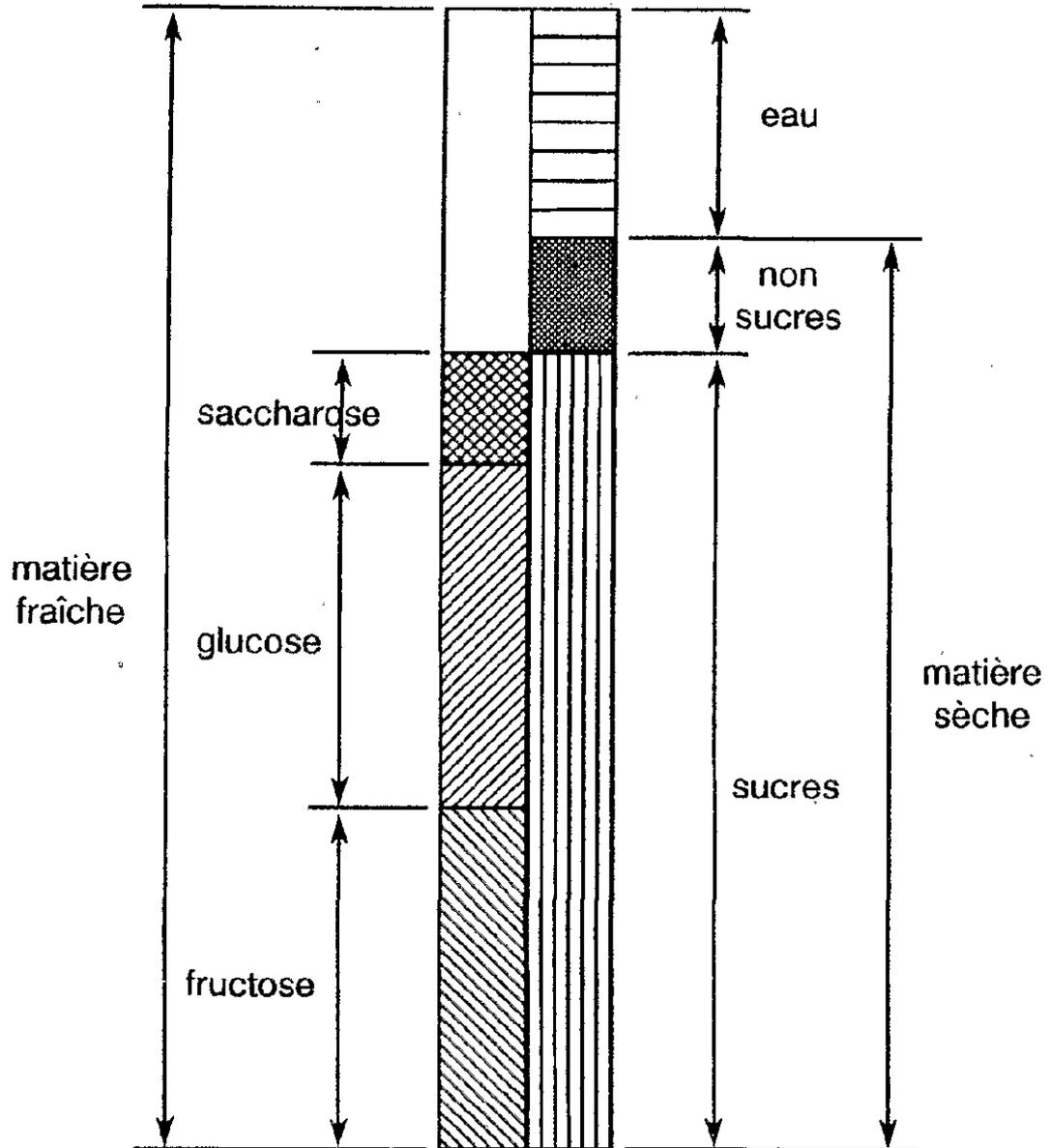
Annexe 5: Les caractéristiques physico-chimiques de l'acide acétique

Formule brute	$C_2H_4O_2$
Synonyme	Acide éthylique
Masse molaire	60 g/mol
Apparence	Liquide incolore d'odeur âcre
pKa	4,76
Point de fusion	16,7°C
Point d'ébullition	118°C
Point d'éclair	39°C
Pression de vapeur	1,5 Kpa à 20°C
Solubilité	<ul style="list-style-type: none">- Miscible dans l'eau- Totalement miscible à l'éthanol, l'acétone, l'hexane et au toluène- Insoluble dans le disulfure de carbone
Indice de réfraction	1,375
Viscosité	1,22 mpa à 20°C
Cp	63,4 J/mol K (état gazeux) 123,1 J/mol K (état liquide)

Annexe 6: les caractéristiques physico-chimiques de l'acétate de sodium

Formule brute	$C_2H_3NaO_2$
Masse molaire	82 g/mol
Apparence	Poudre cristalline blanche hygroscopique
Point de fusion	58°C
Point d'ébullition	Décomposition à 324°C en Na_2O
Point de solubilité	365 g/L (eau, 25°C)
Masse volumique	1,52 g/cm ³ (anhydre, 20°C) 1,42 g/cm ³ (trihydrate, 20°C)
Température d'auto-inflammation	607°C
Point d'éclair	>250°C

Annexe 7: Composition de la datte

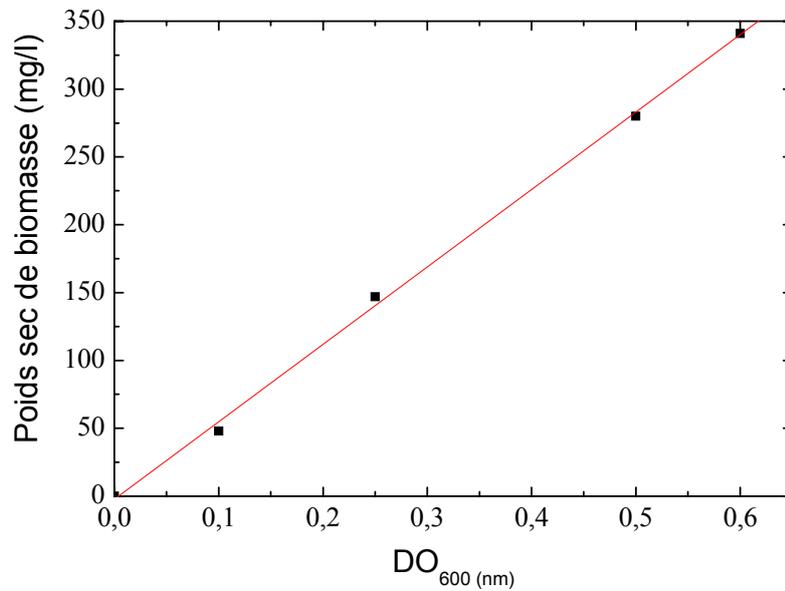


Annexe 8: Relation entre la densité optique et l'extrait sec

La relation entre la $DO_{600\text{ (nm)}}$ et le poids sec correspondant de la biomasse suspendue :

$$\text{Extrait sec (mg/l)} = 0,00318 + 492,615 DO_{(600\text{ nm})}$$

Coefficient de corrélation $R = 0,0996$



Annexe 9: Protocole de dosage des nitrates par la colorimétrie

Méthode au salicylate de sodium

Principe

En présence de salicylate de sodium, les nitrates donnent du paranitro-salicylate 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	1000 ml

Faire dissoudre les sels dans 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 g/l :

Nitrate de potassium anhydre	0,722 g
Eau distillée	1000 ml
Chloroforme (pour conserver)	1 ml

-solution fille étalon d'azote nitrique à 0,005 g/L.

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 de capsules	T	I	II	III	IV
Solution étalon d'azote nitrique à 0.005 g/l (ml)	0	1	2	5	10
Eau distillée (ml)	10	9	8	5	0
Correspondance en mg/l 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 supérieures à 10 mg, opérer une dilution). Alcaliniser faiblement avec la solution d'hydroxyde de sodium. Ajouter 1 ml de solution de solution de salicylate de sodium puis poursuivre le dosage comme 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 (figure 23).

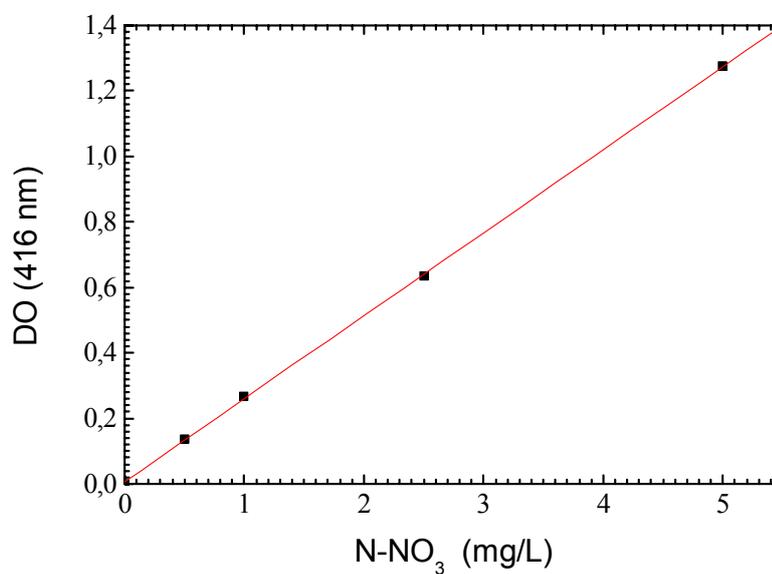
Expression des résultats

Pour une prise d'essai de 10 ml, la courbe donne directement la teneur en azote nitrique exprimé en milligrammes par litre d'eau. Pour obtenir la teneur en nitrate (NO_3^-), (KNO_3), multiplier ce résultat par 4,43 et 7,22 respectivement.

Droite d'étalonnage du dosage des nitrates

$$Y = 0,00624 + 0,25353 X$$

Coefficient de corrélation $R = 0,9998$



Droite d'étalonnage.

Annexe 10: Protocole de dosage des nitrites par la colorimétrie

Méthode au réactif de Zambelli

Principe

L'acide sulfanilique en milieu chlorhydrique, en présence d'ion ammonium et de phénol, forme avec les ions NO_2^- un complexe coloré jaune dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en nitrites.

Réactifs

- Ammoniaque pure ($d = 0,925$).
- Réactif de Zambelli :
 - Acide chlorhydrique pur ($d = 1,19$) 260 ml
 - Acide sulfanilique5 g
 - Phénol cristallisé7,5 g
 - Chlorure d'ammonium135 g
 - Eau distillée625 ml

Introduire dans une fiole jaugée d'un litre, l'acide chlorhydrique et l'eau distillée. Puis y dissoudre l'acide sulfanilique et le phénol en chauffant légèrement au bain-marie. Après dissolution complète ajouter le chlorure d'ammonium et agiter jusqu'à dissolution. Après refroidissement ajuster s'il ya lieu le volume de la solution à 1 litre avec de l'eau distillée.

- Solution mère étalon de NO_2^- à 0,25 g/L :
 - Nitrite de sodium0,345 g
 - Eau fraîchement distillée1000 ml

Cette solution se conserve mieux si l'on prend la précaution d'y ajouter 1 ml de chloroforme.

- Solution fille étalon d'ions NO_2^- à 0,0023 g/L

A mener 1 ml de la solution mère à 100 ml avec l'eau distillée.

Etablissement de la courbe d'étalonnage

Dans une série de fioles jaugées à 50 ml numérotées introduire successivement en agitant après chaque addition :

Numéro des fioles	T	I	II	III	IV	V
Solution fille étalon à 0,0023 g/L de NO_2^- (ml)	0	1	5	10	15	20
Eau distillée (ml)	50	49	45	40	35	30
Réactif de Zambelli (ml)	2	2	2	2	2	2

Attendre 10 minutes et ajouter

Ammoniaque pure (ml)	2	2	2	2	2	2
Correspondance en mg/L de NO_2^-	0	0,046	0,23	0,46	0,69	0,92

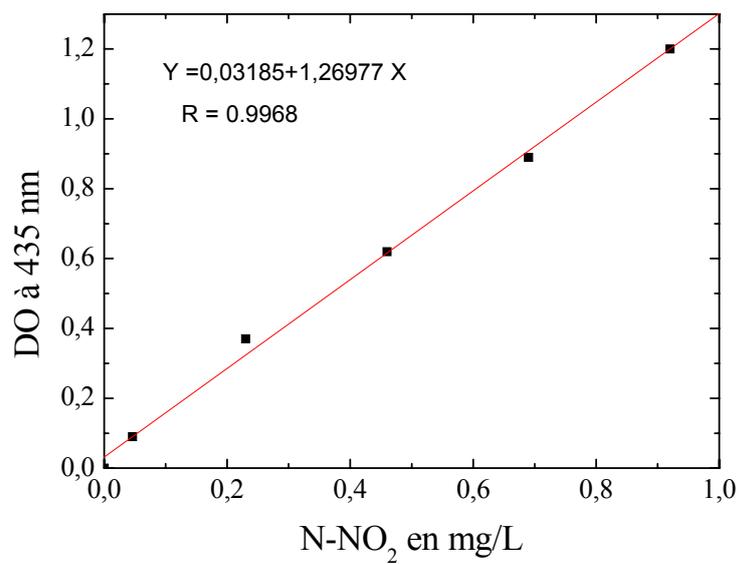
Effectuer les lectures à la longueur d'onde de 435 nm. Construire la courbe d'étalonnage.

Mode opératoire

Prélever 50 ml d'eau à analyser, ajouter 2 ml de réactif de Zambelli. Agiter et laisser au repos 10 minutes. Ajouter ensuite 2 ml d'ammoniaque pur ; effectuer la lecture au spectromètre à la longueur d'onde de 435 nm et tenir compte de la valeur pour le témoin. Se reporter à la courbe d'étalonnage.

Expression des résultats

Pour une prise d'essai de 50 ml, la courbe donne directement la teneur en NO_2^- , exprimée en milligrammes par litre d'eau. Cette valeur multipliée par 0,305 donne la teneur en azote nitreux, exprimée en milligrammes par litre d'eau.



Droite d'étalonnage du dosage des nitrites

$$Y = 0,03185 + 1,26977 X$$

Coefficient de corrélation $R = 0,9968$

Annexe 11 : La mesure de la demande chimique en oxygène

Introduction

Mode opératoire

La demande chimique en oxygène ou DCO est une mesure de toutes les matières organiques d'une eau résiduaire ou naturelle. Son principe repose sur l'oxydation à chaud en milieu sulfochromique concentré des matières organiques de l'échantillon et sur le dosage du chrome hexavalent résiduel.

Principe

Les méthodes proposées reposent sur l'oxydation énergétique en milieu sulfochromique, cette oxydation permet une dégradation plus poussée de la matière organique, suivant un protocole d'oxydation plus reproductible.

Appareillage

Bloc chauffant à 150°C à 25 postes, capable de recevoir des tubes à vis.

Spectromètre double faisceau et cuve.

Réactifs

- H₂SO₄ concentré (d=1.83) contenant AgSO₄ (6,6g/L)
- HgSO₄ purifié en poudre.
- K₂Cr₂O₇ à 8,333 10⁻³ mol/L (2,4518 g/l)

Protocole

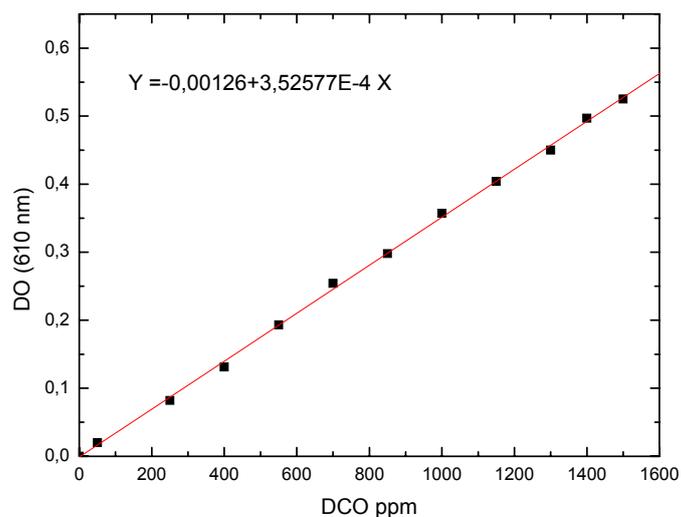
Introduire dans un tube, 3 ml de la solution acide, 0.1g de sulfate de mercure, 2 ml d'échantillon (ou d'eau distillée pour le blanc) et un ml de la solution de dichromate de potassium.

Après fermeture hermétique et homogénéisation, le tube est placé dans le réacteur pendant 2 mn suivant la concentration en oxydant choisie.

La concentration en dichromate de potassium est de $4,167 \cdot 10^{-2}$ mol/l, le dosage final se fait par absorptiométrie à 610 nm : cette longueur d'onde correspond au "pic" d'apparition de la forme réduite Cr^{3+} . La concentration mesurée doit être retranchée de la valeur correspondant au blanc avant d'obtenir la DCO par l'utilisation d'une courbe d'étalonnage.

Etalonnage

L'étalonnage a été effectué à partir d'une solution mère d'acide benzoïque (183 mg/L pour un DCO 360mg/L) : La DCO des différentes solutions a été traitée suivant le protocole établi et a permis la construction de la droite d'étalonnage $\text{DO} = f(\text{DCO})$.



Courbe d'étalonnage de la DCO