

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Ecole Nationale Polytechnique



المدرسة الوطنية المتعددة التخصصات
Ecole Nationale Polytechnique

Département du Génie de l'Environnement

MÉMOIRE

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE MAGISTER EN
GENIE-DE L'ENVIRONNEMENT

Option : Biotechnologie Environnementale

THÈME

**DENITRIFICATION D'UN CONCENTRAT
D'ELECTRODIALYSE PAR UNE BIOMASSE FIXEE
SUR DES ANNEAUX RASHIG EN CERAMIQUE**

Thème Proposé et dirigé par : **Dr.Ing N. ABDI**
Dr H. LOUNICI

Réalisé par :

ALOUACHE Souhila **Ingénieur d'Etat en Génie Biologique**

Soutenu le : 27 Septembre 2005

Devant le jury :

Président :	N. MAMERI	Professeur	ENP
Rapporteur :	N. ABDI	Chargé de cours	ENP
Co-rapporteur :	H. LOUNICI	M.C	UMMTO
Examineur :	R. BAKOUR	Professeur	USTHB
Examineur :	L.DJABRI-ADOUR	M.C	UMMTO
Examineur :	D. ABDESMED	M.C	USTHB

Année universitaire 2004-2005

ENP- 10 Avenu pasteur, Hacen Badi- El Harrach- ALGER

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Ecole Nationale Polytechnique



Département du Génie de l'Environnement

RÉSUMÉ

**EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE MAGISTER EN
GENIE-DE L'ENVIRONNEMENT**

Option : Biotechnologie Environnementale

THÈME

**DENITRIFICATION D'UN CONCENTRAT
D'ELECTRODIALYSE PAR UNE BIOMASSE FIXÉE
SUR DES ANNEAUX RASHIG EN CERAMIQUE**

Thème Proposé et dirigé par : **Dr-Ing N. ABDI**

Dr H. LOUNICI

Réalisé par : **ALOUACHE Souhila**

Année universitaire 2004-2005

ENP- 10 Avenu pasteur, Hacén Badi- El Harrach- ALGER

Résumé

L'eau potable est exposée à différents types de contamination spécialement celle due aux nitrates. Cette pollution est rencontrée essentiellement dans les zones à grande activité agricole ; où on trouve une utilisation intensive des fertilisants. Les nitrates présents en grande quantité, généralement dépassant la norme fixée par l'OMS (50mg/l), peuvent causer des méthémoglobinémies chez les nourrissons et des cancers provoqués par la formation des nitrosamines. Le but de ce travail consiste à étudier l'efficacité du traitement d'un concentrât d'électrodialyse par un procédé biologique à biomasse fixée sur deux types d'anneaux rashig. L'un d'eux est en céramique poreuse et l'autre en céramique non poreuse. Cette étude concerne la détermination de l'influence des plus importants paramètres qui affectent le fonctionnement d'un biofilm dénitrifiant, à savoir : le comportement hydrodynamique des supports en présence du biofilm, l'influence de la vitesse de passage qui varie entre (0,3 et 1m/h), ainsi que l'influence de la concentration initiale des nitrates (100-550mg/l). Enfin l'identification d'un modèle mathématique pour cette étude a été réalisée. En conclusion, nous avons constaté que le support poreux était performant à de faibles vitesses et faibles charges volumiques, alors que le support non poreux présentait une bonne résistance à ces deux paramètres mais avec accumulation de nitrates.

Mots clé : Nitrate ; nitrite ; dénitrification ; biofilm ; lit bactérien ; boues activées

Abstract

Drinking water is exposed to different types of contamination especially that of nitrate. This pollution exists essentially in area where high agriculture activity is emanated and one fertilizing were excessive used. Nitrate ions at concentrations exceeding OMS norms (50mg/l), can cause methemoglobinemia in nursing infants and developing cancer by a formation of nitrosamines. The purpose of this work is to study the efficiency of the treatment of the brine previously obtained by an electro dialysis by fixed bed on two types of ceramic rashig rings: porous rings and no porous rings. This study investigates the influence of the most important parameters that affect the fonctionnement of denitrifying biofilm as: the hydrodynamic comportment of the support, the effect of speed of passage (0.3-1ml/min) and nitrate initial concentration (100-550mg/l). Also, to establish a mathematical model of this survey. As conclusion of this work, the porous rings were more performing at low velocities and volumic charge. Therefore, the no porous rings presented the high résistance of these parameters but with nitrites accumulation.

Key words: Nitrate; nitrite; denitrification; biofilm; paked bed; activated sludge.

ملخص

يتعرض الماء الصالح للشرب الى مختلف انواع التلوث خاصة تلك الناتجة عن النترات. يوجد هذا التلوث في المناطق ذات النشاط الزراعي الكبير حيث نجد الاستعمال المفرط للاسمدة. النترات الموجودة بكمية كبيرة تفوق عادة الكمية المحددة من طرف المنظمة العالمية للصحة (50مغ/ل) يمكن ان تحدث مرض الهيموغلوبين عند الرضع او احداث سرطان بتحويلها الى نترات امينية. الهدف من هذا العمل هو دراسة فعالية عملية علاج مركز الالكترودياليز بطريقة حيوية تعتمد على تثبيت البكتيريا المرجعة للنترات على حاملين من مادة الخزف. احدهما نفود و الآخر غير نفود. هذه الدراسة اهتمت بتحديد اثر اهم الشروط التي تمس بعمل الشريط الحيوي المرجع للنترات مثل التصرف الديناميكي المائي للحاملين بوجود الشريط الحيوي ، تأثير السرعة (0.3 م/سا و 1 م/سا) و كذلك تاثير التركيز الاولي للنترات (100-550مغ/ل). كذلك حاولنا انجز مثال رياضي لهذه الدراسة. كحلاصة لهذا العمل، استنتجنا ان الحامل النفود فعال عند استعمال سرعة ضعيفة وهذا مهما كان التركيز الاولي للنترات. بينما الحامل غير النفود اظهر مقاومة جيدة لهدين العاملين لكن مع تراكم النترات.

كلمات مفتاح : النترات، النترت، ارجاع النترات، شريط حيوي، سرير بكتيري، بكتيريا منشطة

Remerciements

Au terme de ce travail, je tiens à remercier l'équipe de Biotechnologie et Génie des procédés de m'avoir accueillie dans son laboratoire et pour l'attention et le suivi dont elle a fait preuve tout le long de la réalisation de ce projet.

Nous savons qu'il est difficile de citer ici toutes les personnes qui ont contribué avec dévouement à la réalisation de ce travail mais, je me reprocherais de laisser passer sous silence la bienveillance de :

Mr N. Mameri, Professeur et responsable de laboratoire de Biotechnologie et Génie des procédés (BioGep- ENP) pour son accueil et son intérêt pour le sujet ainsi que pour ses remarques pertinentes. Je le remercie également d'avoir pris la présidence de ce jury

Mme N. Abdi, Chargé de cours à l'ENP, qui malgré ses nombreuses occupations m'a fait l'honneur de bien vouloir encadrer et diriger ce travail : merci pour votre gentillesse, pour l'attention et la confiance que vous m'avez accordées et pour tous les conseils qui m'ont permis de prendre les bonnes directions.

Mr H Lounici, maître de conférence, qui a accepté de codiriger ce travail, pour sa disponibilité, sa gentillesse et pour ses précieuses suggestions qu'il m'a prodiguées tout au long de la réalisation de ce travail.

J'exprime toute ma gratitude à l'ensemble du jury, Mr R.BAKOUR Professeur à l'USTHB, Mr D.ABDESMED Maître de Conférence à l'USTHB et le Mme L.DJABRI-ADOUR Maître de Conférence à UMMTO, qui malgré leurs nombreuses occupations m'ont fait l'honneur de participer au jury en acceptant d'examiner ce travail.

Mes remerciements s'adressent également à :

- Mr R.Madi, de l'Institut Pasteur d'Algérie pour son aide précieuse et ses encouragements.
- Mr Mechtaoui directeur d'exploitation de l'ADE pour son aide précieuse qui a permis le bon déroulement de ce travail.

- Mme F Larbi, du CRD Sonatrach et Mr K Taibi enseignant à l'USTHB et membre du CRAPC pour la réalisation des observations au Microscope électronique à balayage, qu'ils trouvent ici toute ma reconnaissance.

- Mr IKACHA Chargé de cours à ENP, pour son aide précieuse dans la réalisation de la partie modélisation : merci pour toute votre aide et disponibilité.

J'adresse une pensée amicale à toutes les personnes qui ont rendu ces trois années agréables à savoir : les étudiants de Biotechnologie qui m'ont aidée, et soutenue durant tous mon travail à Hassiba, Rym, Djaber, Leila, Wassila, Soraya et Samira sans oublié Benhabiless, Hassina, Hanane et Malaya. Aux étudiantes de laboratoire d'environnement pour leur aide et leur soutien moral.

Je remercie également Hamida, secrétaire au département d'Environnement pour sa gentillesse et son aide sur le plan administratif. Et Ami Kissili, magasinier à l'ENP, pour son aide sur le plan matériel.

Enfin, cette liste n'est bien évidemment pas exhaustive, que tous ceux qui ont contribué de près ou de loin (et dans les noms n'ont pu être mentionnés) à la réalisation de ce mémoire trouvent ici l'expression de ma gratitude.

Sommaire

Introduction	01
Partie bibliographiques	
I. Les nitrates	03
I.1. Origines des nitrates	03
I.1.1. Cycle de l'azote sur la terre	03
I.1.2. Cycle à l'échelle d'une parcelle	04
I.1.3. Les pertes d'azote	06
I.2. Impact des nitrates sur l'environnement	08
I.3. Impact des nitrates sur la santé de l'homme	08
I.3.1. Métabolisme des nitrates chez l'homme	09
I.3.2. La méthémoglobinémie	10
I.3.3. Les nitrosamines	12
I.3.4. Autres effets	12
I.4. Les nitrates en Algérie	13
I.5. La législation	14
I.5.1. L'eau potable	14
I.5.2. Prévention de la pollution	15
II Moyens d'action contre les nitrates	16
II.1. Actions préventives	16
II.1.1. Fertilisation raisonnée	16
II.1.2. Gérer l'interculture et les rotations de culture	16
II.1.3. Gérer les autres apports	17
II.1.4. Jouer sur le drainage	18
II.2. Actions curatives	18
II.2.1. Procédés physico-chimiques	18
II.2.1.1. Echange d'ions	18
II.2.1.2. Réduction des nitrates	19
II.2.1.3. Procédés membranaires	20

II.2.1.3.1. Electrodialyse.....	20
II.2.1.3.2. Osmose inverse.....	21
II.2.1.3.3. Ultrafiltration associée au surfactant.....	22
II.2.2. La dénitrification biologiques.....	22
II.2.2.1. La dénitrification autotrophe.....	23
II.2.2.1.1. Procédé à hydrogène.....	23
II.2.2.1.2. Procédé au soufre.....	23
II.2.2.1.3. Procédé au fer.....	25
II.2.2.2. La dénitrification hétérotrophe.....	25
II.2.2.2.1. Paramètres influençant la dénitrification hétérotrophe.....	27
II.2.2.2.2. Inhibition de la dénitrification.....	30
II.2.2.2.3. Technologie de la dénitrification.....	30
II.2.2.2.4. Dénitrification <i>in situ</i>	31
II.2.3. Procédés de couplage.....	32
II.2.3.1. Association de l'électrodialyse avec la dénitrification.....	32
II.2.3.2. Association de l'échange d'ion à la dénitrification.....	32
II.2.3.3. Association de la dialyse à la dénitrification.....	32
II.2.3.4. Filtration associée à la dénitrification.....	33
II.2.3.5. Dénitrification électrolytique.....	34

III. Dénitrification sur un lit fixé

III.1. Le biofilm.....	35
III.1.1. Définition du biofilm.....	35
III.1.2. Formation du biofilm.....	35
III.1.2.1. La phase de latence.....	36
III.1.2.1.1. Conditionnement d'une couche organique sur le support.....	36
III.1.2.1.2. Adhésion des cellules à la surface.....	36
III.1.2.2. Croissance, colonisation.....	37
III.1.2.3. La phase d'équilibre.....	38
III.1.2.4. Le détachement.....	38
III.1.3. Activité du biofilm.....	39
III.1.4. Intérêt des procédés utilisant les biofilm.....	39
III.1.5. Facteurs d'influence sur la formation du biofilm.....	39
III.2. Démarrage d'un réacteur anaérobie à biomasses fixées.....	40

III.2.1. Définition.....	40
III.2.2. Facteurs influençant le démarrage.....	40
III.2.2.1. Les types d'effluents à traiter.....	41
III.2.2.2. Le support.....	41
III.2.2.2.1. L'état de la surface du support.....	42
III.2.2.2.2. La nature chimique de la surface solide.....	42
III.2.2.2.3. La taille et la surface disponible.....	42
III.2.2.2.4. Matériaux support pour les bactéries dénitrifiantes.....	43
III.2.2.3. L'inoculation.....	44
III.2.2.3.1. Origine et la qualité des boues.....	44
III.2.2.3.2. La quantité de boues.....	45
III.2.2.3.3. La stratégie d'inoculation.....	45
III.2.3. Influence du biofilm sur le milieu.....	45
III.2.4. Accumulation de matière organique, colmatage.....	45
III.2.4.1. Colmatage physique : accumulation de MES.....	45
III.2.4.2. Colmatage biologique : surproduction de boue.....	46
III.2.4.3. Facteurs influençant le colmatage.....	46

Partie expérimentale

I. Matériels et méthodes.....	47
I.1. Description du dispositif.....	47
I.2. Supports utilisés.....	48
I.2.1. Analyses de la surface.....	49
I.2.2. Traçage du réacteur en régime permanent.....	52
I.3. Fonctionnement du réacteur.....	54
I.3.1. Sélection des bactéries dénitrifiantes.....	54
I.3.2. Ensemencement du réacteur.....	57
I.4. Méthodes d'analyse physico-chimique.....	58
I.5. Observation au microscope électronique à balayage.....	58
II. Résultats et discussion.....	59
II.1. Traçage en régime permanent en milieux colonisés.....	59
II.2. Influence de la vitesse de passage.....	61
II.3. Influence de la concentration initiale des nitrates.....	72

II.4. Influence de la vitesse de passage sur le rendement de la dénitrification.....	78
II.5. Influence de la concentration initiale en nitrate sur le rendement de la dénitrification...	80
II.6. Observation microscopique.....	80
III. Modélisation.....	85
Conclusion.....	91
Références bibliographiques.....	93

Annexe

Liste des figures

Figure 1 : Cycle d'azote.....	03
Figure2 : Cycle à l'échelle de parcelle.....	05
Figure 3 : Principaux processus impliqués dans la transformation de l'azote contenus dans les effluents et déchets.....	07
Figure 4 : Métabolisme des nitrates chez l'homme.....	10
Figure5 : Schéma du mécanisme de la réduction catalytique des nitrates.....	20
Figure6 : Principe de l'élimination des nitrates par électrodialyse.....	21
Figure 7 : Schéma du mécanisme de transport des ions dans un bioréacteur à membrane échangeuse d'ions.....	33
Figure 8 :Schéma de la réaction de dénitrification effectuée dans le biofilm.....	34
Figure 9 :Dispositif d'une colonne de dénitrification.....	48
Figure 10 : Observation de la surface des supports au MEB.....	50
Figure 11 : Analyse de la composition chimique de la surface des deux supports en céramique.....	51
Figure 12 : Traçage en régime permanent des deux supports vierges.....	53
Figure 13 : Dispositif de la sélection des bactéries dénitrifiantes en réacteur discontinu.....	55
Figure 14 : Dispositif de la culture en continue des boues dénitrifiantes.....	55
Figure 15 : Traçage en régime permanent- Comparaison de l'évolution de la concentration en chlorure en sortie du réacteur pour le support non poreux.....	59
Figure 16 : Traçage en régime permanent - Comparaison de l'évolution de la concentration en chlorure en sortie du réacteur pour le support poreux.....	60
Figure 17 : Traçage en régime permanent - Comparaison de l'évolution de la concentration en chlorure en sortie du réacteur pour les deux supports colonisés.....	60
Figure 18 : Evolution des nitrates et nitrites le long de la colonne (1et2) à une vitesse $V= 0,3\text{m/h}$ et $C_0= 100\text{mg/l}$	62
Figure 19 : Evolution des nitrates et nitrites le long de la colonne à une vitesse $V=0,45\text{m/h}$ et $C_0= 100\text{mg/l}$	62
Figure 20 : Evolution des nitrates et nitrites le long de la colonne à une vitesse $V=0,6\text{m/h}$ et $C_0= 100\text{mg/l}$	63
Figure 21 : Evolution des nitrates et nitrites le long de la colonne à une vitesse $V=0,8\text{m/h}$ et $C_0= 100\text{mg/l}$	63
Figure 22 : Evolution des nitrates et nitrites le long de la colonne à une vitesse $V=1\text{m/h}$ et $C_0= 100\text{mg/l}$	64
Figure 23 : Variation des rendements de la dénitrification en fonction de la hauteur à différentes vitesses pour le support non poreux et le support poreux. Pour $C_0= 100\text{mg/l}$	65
Figure 24 : Variation des rendements de la dénitrification en fonction des variations de la vitesse dans les deux phases du réacteur.....	65
Figure 25 : Profils de l'évolution des nitrites à différentes vitesses dans la colonne 1 et la colonne2.....	68
Figure 26 : Evolution de la DCO en fonction de la hauteur dans la colonne 1(support non poreux) pour différentes vitesses de passage.....	69
Figure 27 : Evolution de la DCO en fonction de la hauteur dans la colonne 2(support poreux) pour différentes vitesses de passage.....	70
Figure 28 : Rendement de l'élimination de la DCO en fonction de la vitesse de passage dans la colonne 1(non poreux) et la colonne 2 (support poreux).....	70
Figure 29 : Evolution du pH en fonction de la hauteur de la colonne à différentes vitesses de passage.....	71
Figure 30 : Evolution de la concentration des nitrates et nitrites le long de la colonne à $V= 0,45\text{m/h}$ et $C_0= 100\text{mg/l}$	73
Figure 31 : Evolution de la concentration des nitrates et nitrites le long de la colonne à $V= 0,45\text{m/h}$ et $C_0= 200\text{mg/l}$	73

Figure 32 : Evolution de la concentration des nitrates et nitrites le long de la colonne à $V= 0,45\text{m/h}$ et $C_0= 300\text{mg/l}$	74
Figure 33 : Evolution de la concentration des nitrates et nitrites le long de la colonne à $V= 0,45\text{m/h}$ et $C_0= 400\text{mg/l}$	74
Figure 34 : Evolution de la concentration des nitrates et nitrites le long de la colonne à $V= 0,45\text{m/h}$ et $C_0= 550\text{mg/l}$	75
Figure 35 : Evolution des rendements de la dénitrification en fonction de la hauteur à différentes concentrations et à une vitesse $V= 0,45\text{m/h}$	75
Figure 36 : Evolution des nitrites le long de la colonne pour différentes concentrations initiales de nitrate pour les deux supports.....	76
Figure 37 : Evolution de la DCO en fonction de la hauteur dans la colonne 1 (support non poreux) pour différentes concentrations.....	77
Figure 38 : Evolution de la DCO en fonction de la hauteur dans la colonne 2(support poreux) pour différentes concentrations.....	77
Figure 39 : Rendement de l'élimination de la DCO en fonction de la concentration initiale de nitrate dans les deux colonnes.....	78
Figure 40 : Variation du rendement de la dénitrification en fonction des vitesses de passage.....	79
Figure 41 : Variation du rendement de la dénitrification en fonction des concentrations initiales de nitrate appliquées.....	80
Figure 42 : Observation microscopique du support non poreux vierge.....	81
Figure 43 : Observation microscopique du support non poreux colonisé.....	82
Figure 44 : Observation microscopique du support poreux vierge.....	83
Figure 45 : Observation microscopique du support poreux colonisé.....	84
Figure 46 : Evolution du modèle mathématique en fonction des valeurs expérimentales lors de la variation des vitesses.....	90
Figure 47 : Evolution du modèle mathématique en fonction des valeurs expérimentales lors de la variation de la concentration initiale C_0	90

Liste des tableaux

Tableau n°1 : Différents facteurs influencent la formation du bio film.....	40
Tableau n°2 : Caractéristiques des supports utilisés.....	49
Tableau n°3 : La composition des alimentations en continu et discontinu.....	57
Tableau n°4 : Valeurs expérimentales de ρ et C_v pour différentes vitesses appliquées.....	87
Tableau n°5 : Valeurs expérimentales de ρ et C_v pour une vitesses constante et C_0 variable..	8

Dédicaces

Je n'aurais eu ni le courage ni la force de réaliser ce travail sans l'aide précieuse de ma famille, ainsi je le dédie tout naturellement à :

Mes parents qui m'ont tant soutenus et encouragés ; je ne saurais leur exprimer ma gratitude

Mon défunt frère et à toute ma famille.

Je voudrais également dédier ce modeste travail à l'équipe de Génétique de l'USTHB, particulièrement Melle Y. Messai, qui m'a poussée dans la voie de la connaissance et du savoir en m'inculquant les bonnes bases d'un travail scientifique.

Enfin, à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire

Alouache Souhila

Nomenclature

t_s : temps de séjour (h)

V : Volume (l)

Q : Débit d'alimentation (l/h)

v : vitesse de passage (m/h)

C : Concentration des nitrates (mg/l)

r : Vitesse de dénitrification

z : la cote dans le réacteur (m)

$X(z)$: Biomasse à la cote z ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$)

X_0 : constante de biomasse ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-2}$)

H : Hauteur de la colonne (m)

S : Section de la colonne (m^2)

C_v : Charge volumique ($\text{kg}/\text{m}^3\text{J}$)

INTRODUCTION

La pureté de l'eau ne va pas de soi, des substances nuisibles peuvent être lessivées dans les eaux souterraines et polluer ces dernières pour des années, voire des décennies. Ceci est particulièrement vrai pour les nitrates, qui sont peu dégradables dans l'eau.

Une teneur élevée en nitrates dans l'eau est le produit d'une utilisation intensive des fertilisants agricoles, ainsi qu'à l'augmentation des rejets domestiques et industriels. Elle indique souvent la présence de substances nuisibles telles que les pesticides ou d'autres résidus. Elle engendre une eutrophisation des milieux aquatiques.

Leur effet sur la santé est lié à leur transformation en nitrite et éventuellement en nitrosamine au niveau du tube digestif. Chez l'homme les nitrites sont responsables des risques de méthémoglobinémie aigue qui s'observe principalement chez les nourrissons. Les risques liés à la formation de nitrosamines, à savoir la survenue de cancers, sont actuellement moins bien établis. La norme de qualité de l'eau destinée à la consommation humaine de 50mg/l de nitrates est essentiellement basée sur le risque de méthémoglobinémie aigue.

En Algérie, une étude réalisée entre 1990-1993 par l'Agence Nationale des Ressources Hydrique (ANRH) et l'Université de Blida, révèle la présence d'un niveau critique de contamination des eaux par les nitrates dans la zone du haut Cheliff et la zone de Mitidja. La concentration des nitrates dans ces eaux atteint parfois une valeur de 200-270mg/l. Ce qui dépasse largement la valeur fixée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS).

De nombreuses actions préventives sont mises en œuvre mais les résultats ne sont apparents qu'au bout de plusieurs années. De nouvelles technologies plus simples pour éliminer les nitrates ont été proposés à savoir les procédés physicochimiques, membranaires et biologiques.

Les procédés physico-chimique (tel que l'échange d'ion) et les procédés membranaires présentent tous l'inconvénient d'extraire les nitrates de l'eau à traiter mais sans les éliminées. Ils se retrouveront donc sous forme de déchet. Le procédé biologique permet une dépollution complète par la réduction des nitrate en azote gazeux et ceci en présence de bactéries dénitrifiantes dans des conditions d'anoxie. L'avantage de ce procédé et sa faisabilité et son aspect économique. Par contre il présente un risque de contamination bactérienne des eaux traitées.

Afin d'éviter les inconvénients de chacun des procédés, des systèmes de couplages ont été mis en œuvre. Notre travail rentre dans le cadre d'un projet de couplage électrodialyse – dénitrification. Il consiste à étudier la faisabilité de la dénitrification par culture fixée d'un concentrât d'électrodialyse fortement chargée en nitrates

L'efficacité de ce procédé dépend non seulement des conditions opératoires (origine des boues, pH, T°) mais surtout du type de support utilisé pour fixer les bactéries.

L'objectif de notre travail, consisté à étudier les performances de la dénitrification d'un concentrât d'électrodialyse en présence de deux supports en céramique : l'un est poreux l'autre est non poreux.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'influence de la formation du biofilm sur le comportement hydrodynamique du support.

Par la suite, nous avons déterminé les paramètres d'exploitation du procédé à savoir les conditions du démarrage, la vitesse de passage et la concentration initiale en nitrate.

Enfin, nous avons tenté d'identifier un modèle mathématique et de le simuler avec nos valeurs expérimentales.

I.1. ORIGINE DES NITRATES

I.1.1. Cycle de l'azote sur la terre

L'azote a une très grande importance dans la vie sur terre. C'est l'un des principaux nutriments qui permet la multiplication des algues, des bactéries et des plantes. Il est aussi en grande partie responsable des phénomènes d'eutrophisation.

Sur terre la majeure partie de l'azote est présente dans l'atmosphère (78% en volume). Il entre également dans la composition des sols (10^{10} à 10^{11} tonnes) mais aussi des océans ($5 \cdot 10^{11}$ tonnes). Dans la composition des êtres vivants, il est associé aux molécules organiques.

Les combinaisons chimiques, organiques ou minérales sont impliquées dans des réactions biochimiques différentes mais étroitement liées entre elles et qui participent au cycle de l'azote tel que décrit dans la Figure 1 (Welté, 1999).

Figure 1 : Cycle d'azote (Martin, 1979)

Les nitrates sont des composants naturels du cycle de l'azote. Ils sont issus de la décomposition ou la déjections des végétaux, des animaux et des hommes. Les végétaux assimilent (ils transforment la matière azotée minérale ou organique inerte en matière vivante) les nitrates présents dans le sol, pour leur croissance mais, lorsque cette capacité d'absorption est dépassée, que le cycle biologique naturel est aussi rompu, les nitrates en excédent rejoignent les ressources d'eaux superficielles (rivières, fleuves, lacs..) par ruissellement ou s'infiltrent dans le sol et menacent les ressources souterraines. Les eaux sont alors polluées par cet excédent de nitrates, qui constituent l'une des causes majeures de la dégradation des eaux naturelles à long terme (<http://perso.wanadoo.fr/hydroland>, Martin, 1979)

I.1.2. Cycle à l'échelle d'une parcelle

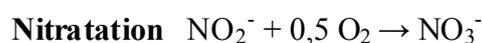
Le sous-sol est divisé en trois compartiments (Figure 2) (Welté, 1999):

- **La zone superficielle** : correspondant au sol dans lequel l'activité biochimique est très importante. Cette zone est colonisée par le système racinaire des plantes. Le stock d'azote à pour origine soit l'azote naturel du sol soit il provient des résidus de récolte et de fumure organique ou minérale.
Une partie de ce stock est exportée sous forme d'ions nitrate par les plantes. L'excédent de nitrate disponible peut être lessivé par les eaux d'infiltration qui percolent. La période la plus propice au lessivage correspond à celle de l'alimentation des eaux souterraines (Octobre -Avril).
- **La zone non saturée** entre le sol et la nappe phréatique. Suivant le type de roches, on a une zone très diverse.
- **La zone saturée** correspondant à l'aquifère dans laquelle les transferts d'eau se font latéralement.

Figure 2 : Cycle à l'échelle de parcelle (Gego, 1991 cité par Welté, 1999).

L'azote apporté aux plantes est soit sous forme ammoniacale, soit sous forme nitrique. L'azote présent ainsi que celui ajouté sous forme d'engrais est transformé dans la zone superficielle par :

- Décomposition de la matière organique ;
- Minéralisation (ammonification) : elle conduit à la libération des ions ammonium dans le sol. Une partie de ces ions est fixée sur le complexe argilo humique et l'autre partie peut être transformée en nitrate (nitrification) ;
- Immobilisation ;
- Nitrification : elle consiste d'abord en l'oxydation d'azote ammoniacal en nitrite, un état intermédiaire, puis ce dernier est rapidement oxydé en nitrate. Cette transformation qui est effectuée en présence d'oxygène, se divise en deux étapes ; la première étant assurée par les Bactéries nitreuses : *Nitrosomonas*, *Nitrosospira*, *Nitrosoglia* et la deuxième par *Nitrobacter*, *Nitrocystis* (Welté, 1999 ; Aubry, 2003)



- Prélèvement racinaire

En raison de la stabilité relative de l'ion nitrate, la plupart des substances azotées de l'environnement ont tendance à se transformer en nitrate. Par conséquent, toutes les sources d'azote devraient être considérées comme des sources potentielles de nitrate (Canada health, 1992). Etant donné que ces derniers sont solubles dans l'eau, la nitrification conduit à un stock de nitrate éventuellement lessivable par les eaux (Welté, 1999).

En plus de l'utilisation intensive des engrais, les nitrates apportés par la forte concentration d'élevage peuvent provoquer la saturation de la capacité d'autoépuration du sol, qui ne peut assimiler tous les nitrates apportés par les déjections animales produites et épandues. C'est en particulier, le cas de la Bretagne, en raison de la grande concentration d'élevages de porc et de poulets (Simon, 1999; CORPEN, 2003; Wakida & Lerner, 2005).

L'agriculture n'est cependant, pas l'unique facteur de pollution par les nitrates. Les agglomérations dont le réseau de collecte des eaux usées est défectueux ou qui ne possèdent pas d'installation de dépollution azotée peuvent également être impliquées, de même que l'industrie (industrie agroalimentaire, industrie chimique où les nitrates ont un rôle d'oxydants ou d'agent de conservation) (<http://perso.wanadoo.fr/hydroland> ; Canada Health, 1992; Wakida & Lerner, 2005).

I.1.3. Les pertes d'azote

Il existe des processus de perte d'azote du sol vers l'atmosphère où les eaux souterraines peuvent réduire la valeur fertilisante des effluents (Figure 3). Ainsi, une partie de l'azote ammoniacale est susceptible d'être **volatisée**. Les pertes d'azote par **dénitrification** et au cours de la **nitrification** sont généralement moins importantes quantitativement même si elles ne doivent pas toujours être négligées. Enfin, pendant les périodes de drainage, l'azote nitrique, provenant de la nitrification de l'ammonium présent dans les effluents ou produit par minéralisation de l'azote organique des effluents, peut être entraîné dans les eaux par **lixiviation** (Simon, 1999 ; Nicolardot, 2004).

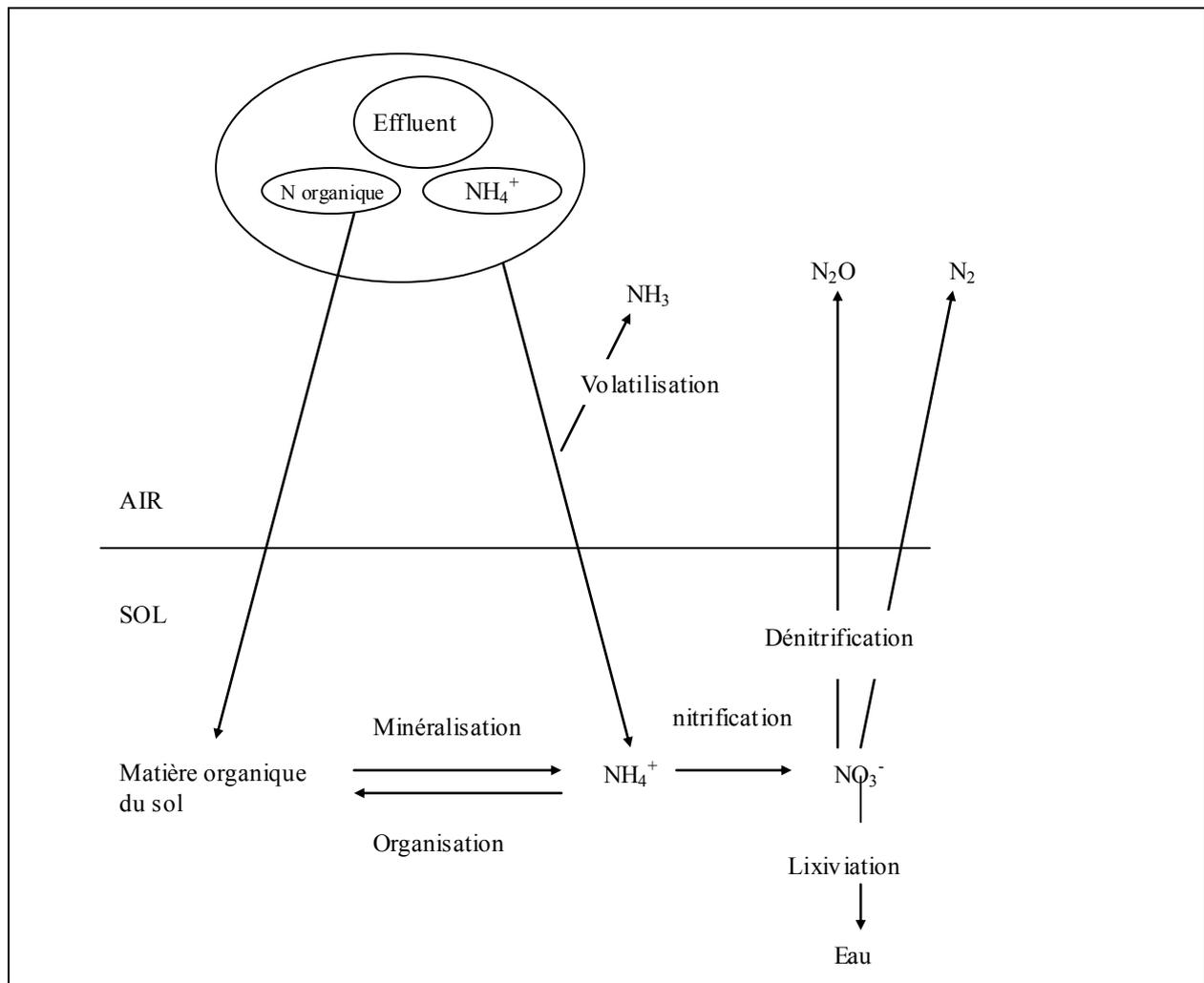


Figure 3 : Principaux processus impliqués dans la transformation de l'azote contenus dans les effluents et déchets (Nicolardot, 2004)

Les fuites d'azote ont lieu pendant la période hivernale. Juergens et Gshwind (1989) (cité par Welté, 1999) ont étudié l'influence des paramètres physico-chimiques sur le lessivage et la migration des nitrates. La perte est en général plus rapide sur sol sableux que sur sol argileux. Les paramètres physico-chimiques mis en jeu sont les suivants :

- **La température** : à titre d'exemple, pour une température supérieure à 28°C sans précipitation. La croissance des plantes est retardée et il se produit une accumulation de nitrate et un lessivage important l'hiver suivant. Si la température est inférieure à 5°C, un net ralentissement du processus microbien est observé et les processus de transformation de l'azote organique sont bloqués (Welté, 1999 ; Dhondt et *al.*, 2002).
- **Les pluies** : plus l'hiver est pluvieux plus le lessivage est important (Welté, 1999 ; Comifer, 2002).

I.2. IMPACT DES NITRATES SUR L'ENVIRONNEMENT

L'azote est un nutriment essentiel à l'activité biologique dans l'eau. Cependant, au dessus d'une certaine concentration, sa présence peut entraîner des problèmes sérieux de pollution. Jumelé au phosphore, l'azote provenant particulièrement des élevages et des engrais lors d'une utilisation abusive, peut mener à des problèmes d'eutrophisation (Bliefert & Perraud, 2001 ; Aubry, 2003)

Ces éléments arrivent aux eaux par lessivage. Lorsque ces effluents dépassent la capacité épuratoires des écosystèmes, les eaux s'eutrophisent, entraînant une perte de biodiversité et un déséquilibre biologique important (CORPEN, 2003).

Dans les eaux de surface continentales, les teneurs en nitrates atteignent actuellement 100 mg/l dans certaines régions. L'accroissement des quantités de nitrates mais surtout de phosphates engendre la prolifération de plancton et de macrophytes et la dégradation de la qualité des lacs et des rivières par réduction de l'oxygène disponible (phénomène d'eutrophisation) (CPP, 1998)

Dans les eaux marines littorales, l'accroissement des concentrations de nitrate entraîne l'apparition d'une prolifération algale qui peut être toxique pour l'homme directement et surtout indirectement par la consommation de coquillage (CPP, 1998). Une forte teneur en nitrates représente également un obstacle à l'usage des eaux brutes souterraines pour produire de l'eau destinée à l'alimentation humaine et aux industries agroalimentaires (CORPEN, 2003).

I.3. IMPACT DES NITRATES SUR LA SANTE DE L'HOMME

Les nitrates ne sont pas toxiques en eux même. C'est leur transformation en nitrites et composés nitrosés qui peut provoquer des troubles caractéristiques. Un rapport de l'OMS de 1985 et de 1993 fait le point sur les risques sanitaires liés aux nitrates dans l'eau de boisson.

L'eau ne représente en moyenne que 15 % des apports en nitrate de l'organisme, alors que 75% proviennent des aliments (charcuterie, conserves de viandes et surtout les légumes) (Société française de santé, 1993 ; <http://perso.wanadoo.fr/hydroland>). En effet, les betteraves, le céleri, la laitue, les radis et les épinards représentent 85 à 90% de l'apport alimentaire en nitrate chez les adultes (Canada Health, 1992).

L'OMS a fixé la dose journalière admissible (DJA) en fonction des risques mesurés ou supposés, $DJA=3,65\text{mg/kg}$ de poids corporel. La limite maximale autorisée est de 50mg/l dans les adductions d'eau potable a été précisée en fonction des recommandations suivantes (Ratel, 2001):

- Le seuil d'ingestion de nitrates par l'homme est fixé à $3,65\text{mg/kg}$ soit 250mg pour un poids moyen de 70kg ;
- La quantité moyenne de nitrates ingérée est évaluée dans une alimentation de type occidental à 175mg/jour ;
- On estime la consommation quotidienne moyenne en eau à $1,5$ litres, ce qui permet alors de préciser la norme suivante : 75mg de nitrate pour $1,5$ litre d'eau soit 50mg/l .

I.3.1. Métabolisme des nitrates chez l'homme

Le nitrate ingéré est facilement absorbé par la partie supérieure de l'intestin grêle et rapidement distribué dans tout l'organisme (figure 4). Environ 25% sont recirculés dans la salive et 20% environ de ce qui est contenu dans celle-ci sont transformés en nitrite par la microflore buccale. Si le pH de l'estomac est élevé (chez les nourrissons), les bactéries réductrices prolifèrent et le nitrate se trouve converti en nitrite.

Dans les conditions normales, 80 à 100% du nitrate ingéré par les nourrissons sont excrétés dans l'urine. Chez l'adulte, l'excrétion urinaire est de l'ordre de 60 à 65% de la quantité ingérée, le reste étant éliminé sous forme d'ammoniaque ou d'urée. Normalement on ne trouve pas de nitrite dans l'urine (Canada Health,1992).

Les nitrates, par eux même sont peu toxiques. Leur seul effet est diurétique. La toxicité des nitrates ne peut en fait venir que d'une ingestion massive ou de leur transformation en nitrites dans l'organisme. Les nitrites peuvent être à l'origine de deux phénomènes potentiellement pathologiques : la méthémoglobinémie et la formation de nitrosamines (<http://perso.wanadoo.fr/hydroland>).

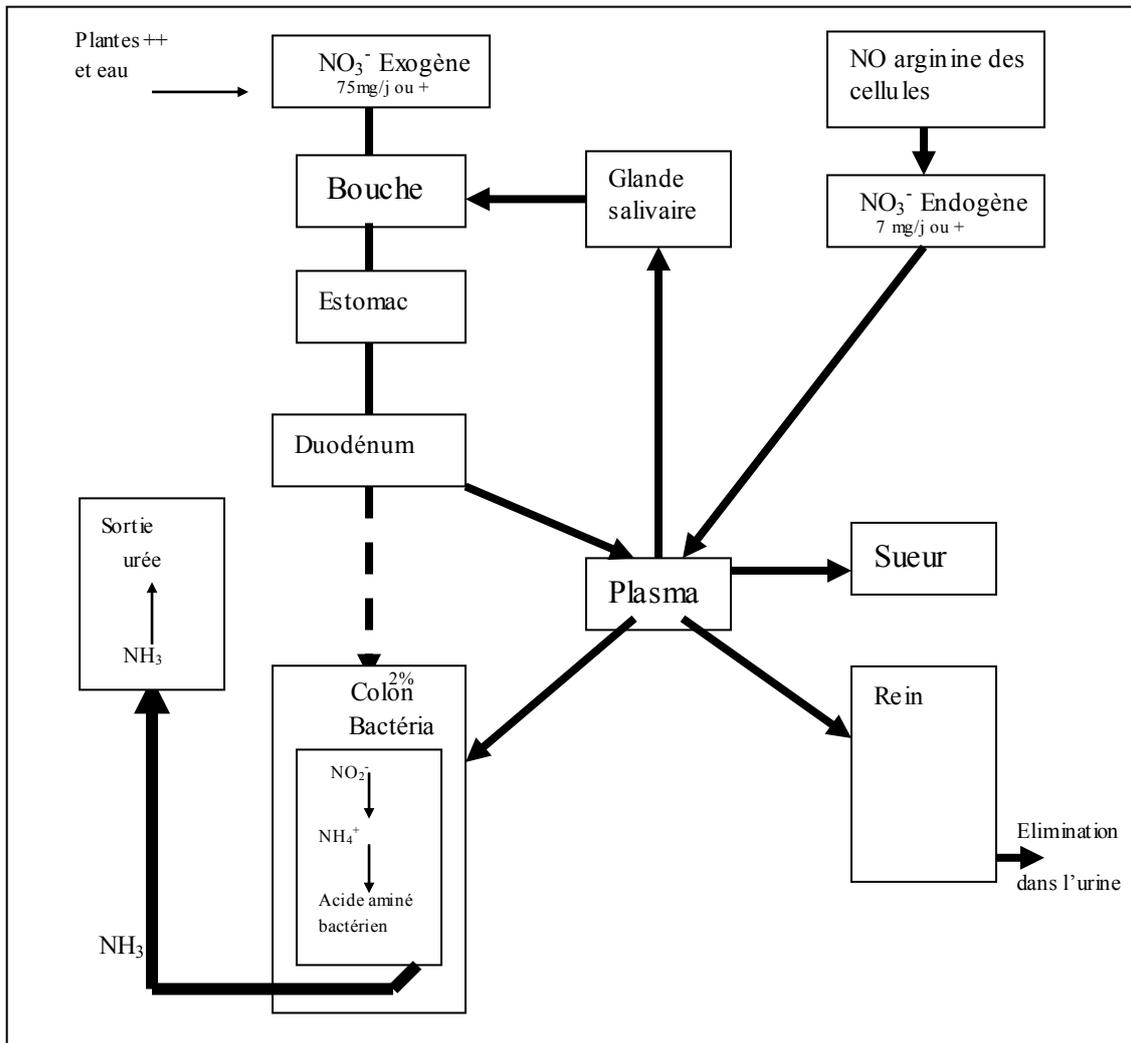


Figure 4 : Métabolisme des nitrates chez l'homme (L'hirondel, 1996)

I.3.2. LA Méthémoglobinémie

On pense que la toxicité du nitrate est due à sa réduction en nitrite. Les ions nitrites ont une toxicité liée à leur faculté d'oxyder le fer réduit Fe^{2+} présent dans l'hémoglobine en fer oxydé Fe^{3+} où tout le système oxydo-réducteur du sang est bloqué. Cela se traduit par une asphyxie interne des cellules, le sang ne pouvant plus transporter l'oxygène. C'est une cyanose appelée « méthémoglobinémie » (Cardot, 1999 ; Welté, 1999 ; Robillard et al., 2001).

Le taux normal de méthémoglobine dans le sang humain est de l'ordre de 1 à 3 %. Normalement, chez l'enfant et l'adulte, un système enzymatique permet de détruire cette molécule (NADH-méthémoglobine-réductase présente dans les globules rouges).

Malheureusement, cette enzyme n'existe pas chez les nourrissons de moins de six mois. De plus, l'hémoglobine fœtale est très réactive vis-à-vis du nitrite (Martin, 1979 ; l'hirondel, 1996 ; Welté, 1999).

Les symptômes de la méthémoglobinémie apparaissent lorsque le taux de la méthémoglobine atteint 10% avec de premiers signe de cyanose (coloration mauve ou bleue de la peau), les vaisseaux transportant un sang mal oxygéné. Lorsque la méthémoglobine dépasse 20%, des signes plus sérieux se font jour, comme des maux de tête, vertiges, tachycardie, asthénie. Des troubles de conscience et des signes neurologiques surviennent au-delà de 60% et à partir de 70% l'intoxication peut être mortelle (Martin, 1979 ; Cardot, 1999 ; <http://perso.wanadoo.fr/hydroland>).

Les nitrates, en tant que tels, ne peuvent être directement responsables de l'apparition de la méthémoglobinémie. C'est leur transformation en nitrites, dans certaines conditions biologiques (pH moins acide de l'estomac, présence de microorganisme) qui peut la provoquer (<http://perso.wanadoo.fr/hydroland>).

Les nourrissons de moins de trois mois sont susceptibles à la méthémoglobinémie que les plus vieux, les enfants et la plupart des adultes, à l'exception des femmes enceintes et des personnes atteintes de carences génétique en glucose 6-phosphate déshydrogénase ou en méthémoglobine- réductase (Canada Health, 1992).

L'organisation mondiale de la santé (OMS) a cité de nombreux cas d'intoxication par les nitrites dû à l'ingestion d'eau fortement contaminée par les nitrates (Weyer, 2001). Il semble que dans la majorité, les cas de méthémoglobinémie surviennent quand les taux de nitrates dans l'eau de consommation dépassent 100mg/l.

En France et plus généralement en Europe de l'ouest, les données disponibles en matière de morbidité n'ont pas signalé de cas de méthémoglobinémie liée à l'eau au cours de ces dernières années (Rate1, 2001).

L'hirondel (1996) conclut que c'est par l'ingestion de soupe de carottes contaminées à la suite de manque d'hygiène dans leur préparation et leur conservation, par l'abandon de plats d'épinards à la température ordinaire avant leur ingestion, par la consommation d'eaux riches en nitrate mais aussi fortement contaminées bactériologiquement (cas de la plupart des méthémoglobinémie hydrique) que peuvent se développer les méthémoglobinémies alimentaires.

I.3.3. Les nitrosamines

Dans l'estomac humain, le nitrite peut réagir avec les composés nitrosables comme les amides et les amines, pour former des composés N-nitrosés (Canada Health, 1992). 75% des nitrosamines de synthèse sont cancérigènes pour les mammifères. Chez l'homme, ce caractère est suspecté par extrapolation.

Encore une fois, se sont les nitrites, impliqués dans la formation de nitrosamines qui peuvent être suspectés d'un effet nocif pour la santé. Canada Health (1992) a rapporté plusieurs études qui ont recherché d'éventuelles corrélations entre le taux de nitrates dans l'eau et la survenue de cancers digestifs essentiellement. Ces études ont montré des résultats contradictoires. En France, le risque de cancer pour l'homme n'a pas été démontré (Ratel, 2001).

La limitation de la concentration des nitrates dans l'eau est conforme au principe de précaution maximale qui vise à garantir la santé des personnes contre tout risque à court ou à long terme, que ce risque soit avéré, probable ou même simplement supposé (<http://perso.wanadoo.fr/hydroland>).

I.3.4. Autres effets

Les autres problèmes pouvant être liés à l'ingestion des nitrates dans l'eau ont été rapportés à savoir : le risque de mal formation congénital (Canada Health, 1992 ; l'hirondel, 1996), l'hyperthyroïdisme (goitre) (l'hirondel, 1996 ; Weyer, 2001), le développement d'un diabète insulino-dépendant (Weyer, 2001).

I.4. LES NITRATES EN ALGERIE (Rapport du Secrétariat d'Etat d'Environnement, 1999 ; Ministère de l'Environnement Algérien, 2003).

Une étude récente réalisée par l'Agence Nationale des Ressources Hydriques (ANRH) et l'université de Blida montre que dans la wilaya de Blida, la procédure de contamination des eaux a atteint un niveau critique. Les concentrations en nitrates ont été mesurées pendant une période (1990-1993), ce qui a permis de déterminer les zones les plus touchées dans la région d'étude.

La zone du haut Cheliff s'est avérée durant la période considérée la plus touchée avec des teneurs allant jusqu'à 270mg/l.

La zone de Mitidja a fait l'objet d'un suivi de 1985-1993 lequel a montré que les parties est et centre de la Mitidja présentaient des teneurs notables en nitrate notamment dans la région de Réghaia pour atteindre en 1993 une valeur de 200mg/l. La partie ouest de la Mitidja ne présente quand à elle pratiquement aucun signe de pollution par les nitrates.

En 1990, l'ANRH a mené une campagne de mesure de la pollution de la nappe de Sidi Bel Abbes. Les eaux souterraines captées par des puits présentaient des teneurs en nitrate variants de 60 à 196mg/l. Les plus faibles mesures correspondaient à des zones de faible perméabilité des formations géologiques.

Dans les trois cas cités ci-dessus, seuls quelques rares cas de mort de nourrissons par méthémoglobinémie ont été rapportés par les services d'hématologie.

L'ANRH a également procédé en 1990 à la détermination des teneurs en nitrate au niveau de quelques barrages du nord algérien (Kheddara, Ghrib, Hamiz, Bouroumi et Derdeur) ainsi que certains oueds alimentant ces barrages (Harbil, Kheddara et Issar). Il a été observé que les plus fortes teneurs apparaissent en saison chaude (étiage) et pouvaient atteindre 56mg/l, mais restaient globalement inférieures à la norme de l'OMS (50mg/l). Un risque d'eutrophisation des plans d'eaux a été rapporté.

Une étude réalisée en 1992 montre que dans une région du pays dont l'écosystème est différent, le problème est le même. En effet, il a été mesuré dans la région de l'Oued des teneurs dépassant les 150mg/l.

I.5. LA LEGISLATION

I.5.1. L'eau potable

L'OMS a fixé la dose de nitrates journalière admissible en fonction des risques mesurés ou supposés, $DJA=3,65\text{mg/kg}$ de poids corporel (Ratel, 2001). Si l'apport en nitrate chez le nourrissons n'est dû qu'à l'eau, le calcul donne une concentration de 25mg/l pour un nourrissons de 5kg (Welté, 1999).

I.5.1.1. Organisation mondiale de la santé (O.M.S) (Welté, 1999)

En 1996, l'OMS a publié un ensemble de recommandations et a arrondi sa valeur guide à 50mg/l de nitrate en précisant : « les preuves épidémiologiques d'une association entre l'apport alimentaire des nitrates et le cancer sont insuffisantes et la valeur guide pour le nitrate dans l'eau de boisson n'a été établie que pour éviter la méthémoglobinémie ».

Les études évaluées par l'OMS ont fixé la quantité de nitrite ne posant pas de problème à 3mg/l en nitrite. Cela s'entend lorsque aucune autre source de nitrite n'existe dans l'eau notamment le nitrate.

Dans certains cas, l'origine du nitrite peut être attribuée à autre chose qu'au nitrate présent dans l'eau. C'est notamment le cas du traitement des eaux par les chloramines où les ions ammonium obtenus par réduction des chloramines ; qui sont oxydés par voie biologique en nitrite.

La présence simultanée possible de l'azote sous ces deux formes a conduit l'OMS à recommander le respect de la relation suivante :

$$\text{Concentration en nitrate (mg/l)} / 50 + \text{Concentration en nitrite (mg/l)} / 3 \leq 1$$

I.5.1.2. Réglementation Européenne (Welté, 1999 ; Ratel, 2001 ; Memotec7, 2002)

Dans la nouvelle directive Européenne 98/83 du 3 Novembre 1998 applicable en France à travers le décret 2001-1220 du 20 Décembre 2001, le paramètre nitrate est passé de « paramètre indésirable » à « paramètre toxique ». La concentration maximale admissible reste fixée à 50mg/l et bien sûr, dans ce cas la teneur en nitrite ne doit pas dépasser 0.1mg/l .

I.5.1.3. Réglementation française

La réglementation française (décret 89-3 du 3/1/89) modifié a repris la directive européenne de 1980 et limite la concentration maximale admissible à 50mg/l pour le nitrate et 0.1mg/l pour le nitrite (Welté, 1999 ; <http://perso.wanadoo.fr/hydroland>).

D'un point de vue normatif, une eau dans la teneur en nitrate dépasse 50mg/l n'est pas potable. Alors que sur le point de vue sanitaire, une eau contenant une teneur en nitrate supérieur à la norme mais inférieure à 100mg/l est temporairement acceptable et peut continuer à être consommée par le reste de la population à l'exception de celle qui suit un traitement médical de réduction de l'acidité gastrique, des enfants en bas age et des femmes enceintes. Au-delà de 100mg/l, l'eau ne doit pas être bue ni utilisée dans la préparation des aliments.

En tout état de cause, les autorités sanitaires doivent assurer l'information de la population en cas de dépassement de la norme (Welté, 1999 ; Rate1, 2001 ; <http://perso.wanadoo.fr/hydroland>

I.5.2.Prévention de la pollution (Welté,1999 ;<http://www.environnement.gouv.fr/>).

Une directive européenne : directive « nitrate » du 12/12/91 vise à réduire la pollution provoquée par le nitrate d'origine agricole. Cette directive impose d'une part l'établissement de zones vulnérables dans chaque état membre ainsi que l'établissement d'un ou des codes de bonne pratique agricole. Cette directive a été transcrite en France par le décret 93-1038 du 27/08/1993.

Un arrêté du ministère de l'environnement français du 22/11/1993 fixe le code des bonnes pratiques agricoles. Des programmes d'action ont été mis en œuvre en décembre 1995 ; ceux-ci comprennent des limitations progressives des épandages d'effluents d'élevage.

En fin le décret 96-163 du 3/1996 fixe le programme d'action à mettre en œuvre en vue de la protection des eaux contre les pollutions par les ions nitrate d'origine agricole.

II.1. ACTIONS PREVENTIVES

Une action préventive consiste à éviter les risques de pollution, en résolvant le problème à sa source. Il s'agit en particulier de protéger les captages en respectant : (<http://www.environnement.gouv.fr/>; PMPOA, 2002).

- l'apport des fertilisants azoté ;
- la limitation des apports d'effluents d'élevage ;
- les périodes d'interdiction d'épandage des fertilisants azotés ;
- la restriction d'épandage à proximité des eaux de surfaces,
- les couvertures des sols.

II.1.1. Fertilisation raisonnée

La recommandation la plus évidente consiste à ajuster aux mieux la dose d'engrais en s'appuyant sur la méthode du bilan prévisionnel. Cette méthode consiste à calculer la quantité d'engrais à apporter en comparant les besoins de la culture, ainsi que d'analyser les résidus d'azote dans le sol à l'interculture afin de prendre en compte l'azote déjà disponible pour la culture suivante (Lacroix, 1995 ; Welté, 1999 ; Douget & Schembri, 2000).

Il faut bien noter que dans la majeure partie des cas, l'ajustement de la fertilisation azotée ne suffit pas pour réduire la pollution. Dans le cas des sols filtrants, la quantité d'azote minéral présente à une date donnée ne permet pas de prédire ce qui sera utilisable ultérieurement par la culture. Il n'y a donc guère d'autres moyens que de fractionner les apports (Lacroix, 1995).

Des modèles sont aujourd'hui disponibles auprès des agriculteurs afin d'optimiser les apports d'engrais en fonction des reliquats dans le sol et de la croissance de la plante. Nous citerons le modèle Ramses qui prend en compte les conditions de pluviométrie et de croissance de la plante (Welté, 1999)

II.1.2. Gérer l'interculture et les rotations de culture

II.1.2.1. Gérer l'enfouissement des résidus de récoltes

Gérer l'interculture consiste, avant tout, à mieux valoriser les résidus de récolte (pailles, cannes...). Il s'agit, au cours du processus de décomposition de ces résidus, de valoriser le potentiel de blocage de l'azote minéral sous forme organique par les microorganismes du sol.

Dans le cas du maïs, il est recommandé de bannir le brûlage des cannes et de procéder à leur enfouissement (Simon, 1999).

La vitesse de décomposition des résidus est variables selon les caractéristiques du sol, la température, la teneur en eau, le contact sol-résidu et les techniques culturales (date et mode d'incorporation). Cette décomposition doit, au même titre que la fertilisation azotée être maîtriser afin d'obtenir une décomposition maximale avant l'hiver, pour bloquer le maximum de nitrates en surface avant leur migration en profondeur (Lacroix, 1995).

Les résidus de récolte pourraient donc jouer un rôle de piège à nitrate, tout comme les cultures intermédiaires (Lacroix, 1995).

II.1.2.2. Les cultures intermédiaires pièges à nitrates

L'interculture, laps de temps entre deux cultures principales, est une période pendant laquelle se manifestent les risques de fuites des nitrates vers les eaux. La solution réside dans une meilleure maîtrise de l'azote en cette période afin d'empêcher le lessivage des nitrates restant dans le sol après la récolte (Chapot, 1990) (cité par Lacroix, 1995).

Decan et Puyol (1992) (cité par Lacroix, 1995) montrent qu'une culture intermédiaire (blé d'hiver, colza d'hiver, ray-grass d'Italie) après le maïs annule toute lixiviation polluante due aux nitrates et que son implantation peut ne pas affecter la production de maïs et même avoir un effet favorable.

Cependant, l'effet bénéfique des cultures intermédiaires sur les nitrates dépend beaucoup des conditions de leur conduite : choix des espèces, modalités d'implantation, d'enfouissement...(Lacroix, 1995). En effet, une attention particulière est à porter aux légumineuses : celles-ci fixent l'azote gazeux et si la culture n'est pas récoltées, l'azote nitrifié est relâché quand la légumineuse meurt.

Les cultures intermédiaires tel que la moutarde, du ray-grass d'Italie prennent l'azote minéral dans la zone racinaire (Simon, 1999 ; Welté, 1999). Elles permettent de réduire l'érosion, protéger la structure du sol et réduire le lessivage de nitrate.

II.1.3. Gérer les autres apports

Les autres apports fertilisants posant problème sont les effluents d'élevage, eaux usées, boues, vinasses (Comifer, 2002). La cinétique de nitrification du lisier a un démarrage lent. L'optimum se situe environ un mois après l'épandage au printemps.

Il faut donc réfléchir à la période d'apport pour avoir une efficacité optimale. Dans tous les cas, il est interdit d'épandre en automne et en hiver car cela entraîne un lessivage important (Welté, 1999).

II.1.4. Jouer sur le drainage

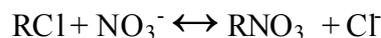
L'eau en excès durant la période de drainage entraîne partiellement le stock d'azote nitrique présent dans le sol à cette période (Comifer, 2002). La quantité d'éléments minéraux perdus par lessivage dépend du volume d'eau percolant annuellement à travers le sol. Cette quantité est appelée « lame drainante » ou plus couramment « drainage » (Simon, 1999).

II.2. ACTIONS CURATIVES

II.2.1. Procédés physico-chimiques

II.2.1.1. Echange d'ions

C'est un processus de sorption dont lequel l'eau chargée en nitrate est filtrée sur une résine anionique forte. Cette dernière échange les nitrates ainsi que tous les autres anions de l'eau, contre un autre anion préalablement fixé. C'est un processus réversible du type :



Les résines anioniques fortes ont une très grande affinité pour les sulfates et les nitrates mais une affinité moyenne pour les bicarbonates et les chlorures. Ces derniers sont souvent utilisés dans la dénitratisation par échange d'ions. Quand la résine est saturée, une régénération par une solution concentrée de chlorures est nécessaire (Dimotsis et *al.*, 1995 ; MSE technologie application, 1998 ; Matosic et *al.*, 2000).

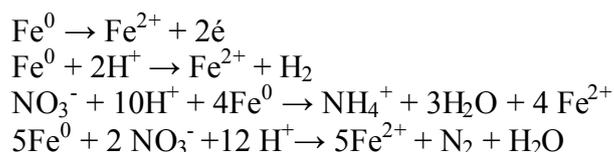
Ce procédé donne un taux d'élimination des nitrates supérieur à 95% ; spécialement lors de l'utilisation de résines sélectives du type **A-520E- Na-chloride** qui permettent au procédé de s'adapter à des conditions variables tel que la présence d'une forte concentration de sulfate (Boumedienne & Achour, 2004).

L'inconvénient de ce procédé est d'engendrer une solution hyper concentrée en nitrate et d'exiger une eau exempte de fer (afin d'éviter le colmatage de la résine) et des compétiteurs de nitrate surtout les sulfates. Il présente également un inconvénient qui fait réduire son efficacité ; il s'agit du risque de relargage de la résine qui s'accompagne de l'augmentation des chlorures dans l'eau traitée et cette dernière a donc tendance à être corrosive (Dimotsis et *al.*, 1995 ; Welté, 1999 ; Boumedienne & Achour, 2004).

II.2.1.2. Réduction des nitrates

II.2.1.2.1. Réduction électrochimique par le fer à la valence zéro

Elle consiste en un échange direct d'électron entre le contaminant (nitrate) et le fer zéro qui est réduit en ion ferreux ou ferrique, ou par la production de l'hydrogène qui par la suite échange des électrons avec le contaminant (Welté, 1999 ; Westerhoff & James, 2003).



Murphy, 1991 (cite par Westerhoff, 2003), est le premier qui a proposé la réduction électrochimique des nitrates par le fer métallique à la valence zéro. Cette réduction est réalisée sous des conditions d'aération et de pH près de la neutralité. Le nitrate est l'ion le plus difficile à réduire, ce qui est probablement dû à la présence de la double liaison (Westerhoff, 2003 ; Westerhoff & James, 2003).

La réduction des nitrates par les métaux a fait l'objet de peu d'études. Le fer en milieu acide a été utilisé, il est généralement employé, en laboratoire, sous forme de fer en poudre ; les meilleurs résultats sont obtenus aux pH les plus acides (95% à pH<2). En fait, si de telles conditions sont peu applicables aux eaux d'alimentation, il est néanmoins intéressant de remarquer qu'à pH ≈ 5, la concentration en nitrate est réduite de 10 à 20% en une heure à froid (Welté, 1999).

Hao et al (2005), a démontré que la réduction des nitrates par le fer à la valence zéro est inversement proportionnelle au pH. Il a réussi à avoir un rendement de 80% en 4 heures à un pH = 2,5 et une concentration initiale de nitrate de 45 mg/l.

Il est également à noter que les nitrates peuvent être complètement éliminés par l'utilisation des méthodes électrochimiques tel que **l'électroréduction** et **l'électrocoagulation**.

Dans l'électroréduction, l'élimination des nitrates est possible à un pH = 5-7 et le principal produit de cette réaction est l'azote gazeux.

Dans l'électrocoagulation, l'élimination des nitrates réalisée dans un intervalle de pH= 9-11. Cette élimination est accompagnée par la précipitation du Fe(OH)₃ produit dans l'eau par l'anode.

L'avantage de ces deux techniques est l'emploi d'une faible source d'énergie surtout l'électrocoagulation (Koparal & Ogutveren, 2002).

II.2.1.2.2. Réduction catalytique (Prüsse et *al.*, 2000)

Le procédé a été décrit pour la première fois en 1989 par Vorlop et *al.*. Il est basé sur l'hydrogénation catalytique des nitrates en azote gazeux. Les nitrates sont catalysés seulement par le bimétal, préférentiellement le cuivre-Palladium. Cependant, les nitrites peuvent être réduits par un mono métal (Palladium). Avec l'hydrogène comme réducteur, le nitrate est converti en azote gazeux comme principal produit et l'ammonium comme sous produit (Figure 5).

Prüsse et *al.* (2000) ont présenté deux nouveaux catalyseurs de deuxième génération (Pd-Sn, Pd-In). Comparé à celui de la première génération (Pd-Cu), ces deux catalyseurs sont plus efficaces et sélectifs.

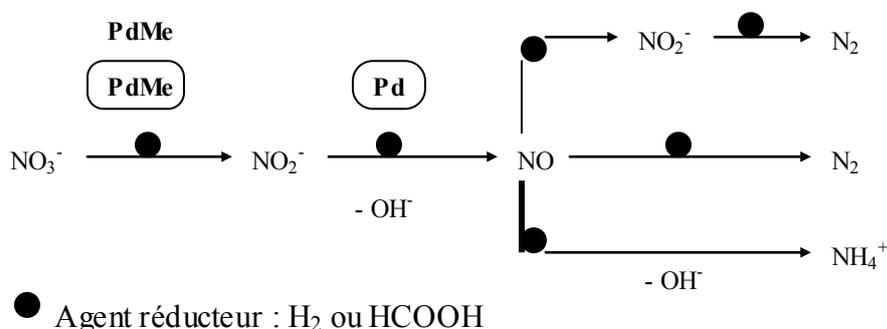


Figure 5 : Schéma du mécanisme de la réduction catalytique des nitrates (Prüsse et *al.*, 2000)

II.2.1.3. Procédé membranaire

II.2.1.3.1. Electrodialyse

Le principe consiste en une application d'un courant électrique continu entre les électrodes d'une cellule constituée d'un empilage de membranes échangeuses d'ions (Figure 6). Sous l'influence du champ électrique, le nitrate présent dans l'eau à traiter migre vers l'anode. Le nitrate quitte le compartiment dilué et traverse la membrane échangeuse d'anion (MEA), mais il est stoppé dans le compartiment concentré par la membrane échangeuse de cations (Welté, 1999 ; Elmidaoui et *al.*, 2003).

Le rendement de l'élimination du nitrate dépend de la teneur en ions sulfate et varie entre 70-90% (Wisniewski et *al.*, 2001).

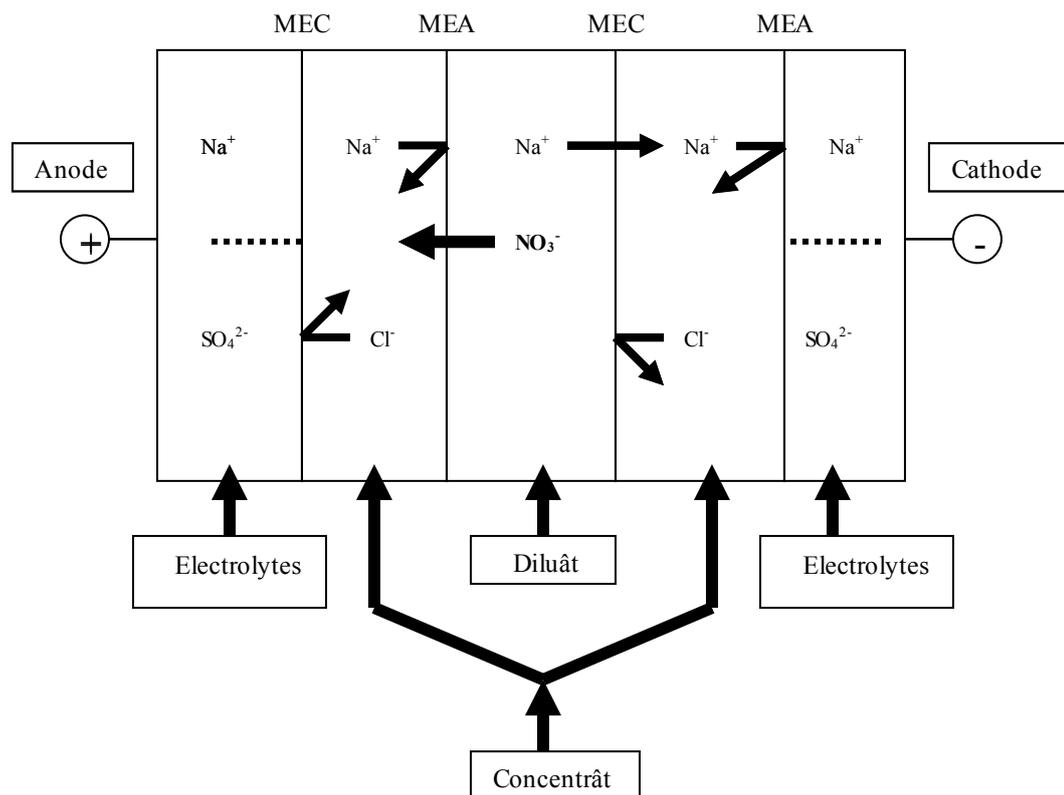


Figure 6 : Principe de l'élimination des nitrates par électrodialyse (Elmidoui et *al.*, 2001)

II.2.1.3.2. Osmose inverse

L'application d'une pression supérieure à la pression osmotique de l'eau à traiter provoque le passage de l'eau à travers une membrane de perméabilité sélective, qui retient les ions nitrate ainsi que d'autres ions. On obtient ainsi une eau déminéralisée, et un éluât concentré en nitrate et autres espèces d'ion. La pression appliquée varie entre 30 et 60 bars et l'élimination des nitrates oscillent entre 85-95% (Eubank et *al.*, 1998 ; Welté, 1999).

L'avantage de ces deux procédés membranaires est surtout l'absence de régénération et l'octroi d'un bon rendement d'élimination mais, les limites d'utilisation ne sont pas négligeables à savoir :

- Le traitement n'est pas spécifique et engendre la modification de la qualité de l'eau traitée ;
- Un prétraitement poussé est nécessaire pour éviter le colmatage de la membrane ;
- Rejet très concentré

D'autres part, ces procédés sont coûteux et ils sont donc peu utilisés pour l'élimination spécifiques des nitrates (Welté,1999 ; OMS, 2004).

II.2.1.3.3. Ultrafiltration associée au surfactant (Baek & Yang, 2004).

C'est un processus d'élimination caractéristique des polluants anioniques tel que les nitrates, chromate et ferrocyanide. Il consiste en l'ajout d'un surfactant cationique à l'eau polluée. Le surfactant forme des micelles ; agrégats de surfactant (50-100 molécules). Les polluants anioniques se lient à la surface des micelles chargées positivement. La solution d'alimentation passe à travers une membrane d'ultrafiltration avec des pores beaucoup plus petit afin de bloquer le passage des micelles.

Baek et Yang (2004) ont étudié l'élimination des nitrates par le surfactant CPC (cetylpyridinium chloride) en présence de chromate et ferricyanide. Ils rapportent que l'ordre d'adsorption sur les micelles est : ferricyanide > chromate > nitrate ; ceci est dû à la différence des valence des polluants anioniques. Le rendement d'élimination de nitrate obtenu est de 36-81% selon la quantité du surfactant.

II.2.2. La dénitrification biologique (Hashly & Leclerc, 1993)

Le traitement biologique occupe une place importante parmi les procédés mis en place pour éliminer les nitrates. C'est un procédé anaérobie, qui utilise l'oxygène des nitrates, pour oxyder, soit des matières organiques (**dénitrification organotrophe**), soit des substances minérales (**dénitrification lithotrophe**).

La dénitrification organotrophe est également **hétérotrophe**, les bactéries intervenantes utilisent également le carbone organique pour la synthèse cellulaire. Par contre, les bactéries de la dénitrification lithotrophe sont **autotrophes**, car elles consomment, pour la synthèse cellulaire le CO₂ dissous dans l'eau ou lié sous forme de bicarbonates (Nuttal et *al.*, 2003).

Les termes utilisés seront donc ceux de **dénitrification hétérotrophe** ou **autotrophe**. La réduction des nitrates, par les deux voies citées ci-dessus aboutie à la formation de l'azote gazeux selon les étapes suivantes :



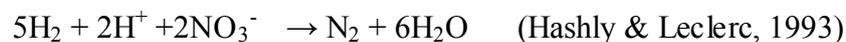
Les bactéries dénitrifiantes sont souvent aérobie anaérobies facultatives ou microaérophiles ; le terme d'**anoxie** sera donc préféré à celui d'anaérobiose, car l'absence total de l'oxygène oriente plutôt la réaction vers la production d'ammonium et non l'azote gazeux.

II.2.2.1. La Dénitrification autotrophe

La dénitrification autotrophe est un phénomène rencontré parfois, de manière spontanée, dans les eaux souterraines. Elle est quasiment absente dans les eaux de surfaces vue leur richesse en matière organique. Elle met en jeu des bactéries qui oxydent le soufre (ou composés soufrés comme la pyrite) c'est le cas de *Thiobacillus denitrificans*, le fer (*Ferrobacillus ferroxidans*) ou l'hydrogène gazeux où la bactérie la plus connue est *Hydrogenomonas* (Hashly & Leclerc, 1993).

II.2.2.1.1. Procédé à hydrogène

Quand l'hydrogène est utilisé, l'équation de la réaction est :

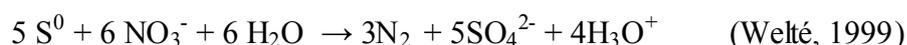


Le donneur d'électron est l'hydrogène et la source de carbone est le CO_2 de l'eau.

Ce procédé est séduisant vu l'absence de nitrite et le maintien du pH près de la neutralité mais, il est caractérisé par une charge volumique admissible quatre fois plus faible que celle obtenue par le procédé hétérotrophe. De plus, l'utilisation de l'hydrogène sous pression rend nécessaire des mesures de sécurités draconiennes. Ce procédé n'a jamais été agréé en France (Hashly & Leclerc, 1993 ; Welté, 1999).

III.2.2.1.2. Procédé au soufre

La réaction biochimique est la suivante :



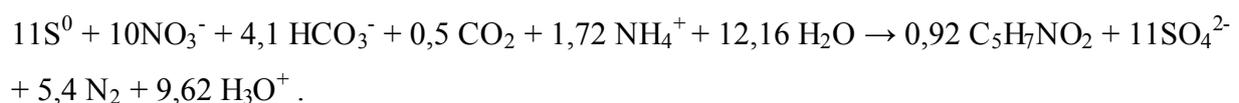
Dans ce procédé le donneur d'électron est le soufre et la source de carbone et le bicarbonate de calcium qui sert également de tampon pour le pH de la réaction.

Vue que la réaction de dénitrification en présence de soufre est acidifiante, et utilise presque deux parties de bicarbonate de calcium (pour la synthèse cellulaire et le maintien du pH de l'eau) pour une partie de soufre. Un ajout de Maërl, produit bon marché et à surface spécifique élevée a donc été utilisé dans de nombreux essais (Hashly & Leclerc, 1993 ; Welté, 1999).

Les problèmes rencontrés dans ce procédé sont :

- Le taux de croissance et la cinétique respiratoire sont lents (caractéristiques des bactéries autotrophes), ce qui impose l'application de faibles charges volumique et hydraulique pour l'obtention d'un rendement de 85% (Martin, 1979 ; Hashly & Leclerc, 1993) ;
- Une augmentation des teneurs en sulfate de l'eau après le traitement, ce fait peut contribuer à interdire le procédé lorsque l'eau de départ est déjà riche en sulfates, dont la CMA (concentration maximale admissible) en Europe est de 250mg/l (Hashly & Leclerc, 1993 ; Welté, 1999).
- Un ajout de phosphore est nécessaire (Hashly & Leclerc, 1993 ; Welté, 1999).

De nombreuses bactéries utilisent le soufre comme donneur d'électron tel que *Thiobacillus denitrificans*. L'équation générale de la dénitrification autotrophe proposée par Martin (1979) est :



Un système utilisant du thiosulfate de sodium (Leclerc & Martin, 1988) a permis d'abattre 80-100% de nitrates avec une charge éliminée de 1,93kg N-NO₃/m³.j. Néanmoins, il donne une eau très riche en sulfates (> 200mg/l).

Plusieurs travaux ont été réalisés afin d'étudier la faisabilité du couplage sulfure/limestone en présence de *T. denitrificans* où le sulfure sert de donneur d'électron et le limestone sert de tampon pour la réaction. Les résultats de ces recherches montrent que cette méthode est très efficace (rendement > 90%). Cependant, de fortes concentrations de sulfate et l'existence de sulfures dans l'effluent peuvent être des facteurs limitants pour son application (Shan & Zhang, 1998).

Selon Darbi et al.(2002), le système a de meilleurs rendements (> 95%) avec une faible production de sulfate et de H⁺, lorsqu'on utilise un rapport sulfure/limestone de 1 : 1. Et selon Kim et al (2000), les petites particules de sulfure/limestone donnent un meilleur abattement comparé aux grandes particules.

Un exemple de dénitrification naturelle dans des eaux souterraines a été simulé à l'échelle pilote par Haider (1986). Les essais ont été réalisés avec une colonne de un mètre travaillant en flux ascendant à une vitesse de 0,01 m/h, où le matériau de remplissage est un

mélange de Maërl utilisé comme source de carbone et de la pyrite de fer comme donneur d'électron. Un abattement de 95% des nitrates a été obtenu (Haider, 1986).

Le processus engendré est d'abord l'oxydation de la pyrite, provoquant une forte augmentation du fer ainsi qu'une dénitrification selon l'équation suivante : (Haider, 1986 ; Welté, 1999)



Cette dénitrification est due à l'activité métabolique de *T.denitrificans* qui peut oxyder différents composés soufrés en réduisant les nitrates.

Après cette étape une réaction secondaire où le nitrate peut être réduit directement par le fer est réalisée par *Ferrobacillus ferroxidans* selon l'équation suivante :



Ces deux réactions font que le système est tamponné à une valeur de pH pratiquement constante où les bactéries peuvent se développer facilement (Haider,1986 ; Welté,1999).

Il est a signalé qu'une réduction chimique des nitrates par la pyrite de fer est thermodynamiquement possible, mais la cinétique est lente et très dépendante de la solubilisation de la pyrite de fer (Haider,1986).

II.2.2.1.3. Procédé au fer

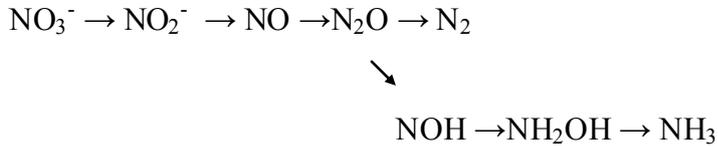
Welté (1999) a décrit que le fer seul pouvait participer au processus de dénitrification. Elle a étudié la possibilité de la réduction du nitrate par le fer à la valence zéro. Les mécanismes invoqués sont à la fois chimique (20%) et biologique (80%).Ce procédé ne nécessite pas d'apport de nutriment dans les eaux qui contiennent une quantité suffisante de carbone minérale. Le principal inconvénient de ce procédé est l'entartrage du réacteur.

Ce procédé a été breveté et en cour d'agrément par le conseil supérieur d'hygiène publique en France. Le seul défaut important et qui a limité, jusqu'à ce jour la réalisation d'installation industrielle, est la faible charge volumique applicable due à la physiologie des bactéries autotrophes ainsi que les investissement onéreux

II.2.2.2. Dénitrification hétérotrophe

La dénitrification est le mécanisme qui permet à un grand nombre de bactéries hétérotrophes vis-à-vis du carbone aérobies facultatifs de convier leurs besoin énergétique à partir des nitrates lorsque l'oxygène dissous fait défaut (Deronzier et *al.*, 2001), on parle de la respiration des nitrates (Martin, 1979).

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 ainsi :



Il existe une vingtaine d'espèces strictement dénitrifiantes, généralement non sporulés, à Gram négatif et anaérobies facultatives. Elle appartiennent notamment aux genres *Bacillus*, *Paracoccus* et *Pseudomonas* (*denitrificans*, *stutzeri*, *B. licheniformis*) (Ratel, 2001).

Drysdale (1999) a effectué une recherche des bactéries hétérotrophes dénitrifiantes dans des boues activées et il a retrouvé les germes suivants : *Achromobacter xylosoxidans*, *Pasteurella sp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. picketti* et *P. stutzeri*.

Les travaux de Thomson et *al.*, 2004 (cité par Bougard, 2004) sur des boues activées de station d'épuration traitant des effluents domestiques font apparaître un nouveau genre de bactéries dénitrifiantes : *Aquaspirillum* de la famille de *Neisseriaceae*.

L'oxydation du carbone fournit à la fois l'énergie et le carbone nécessaire à la synthèse cellulaire (Ratel, 2001). Cette oxydation entraîne la libération d'un nombre d'électrons qui vont circuler le long d'un système de transfert d'électron pour arriver à l'accepteur final qui est l'oxygène des nitrates au lieu de l'oxygène dissous. Cette étape est productrice d'ATP d'une façon analogue à l'utilisation de l'oxygène dissous lors de la respiration (Harremoës & Henze, 1997 ; Nuttal et *al.*, 2003). Cependant, cette réaction est lente ce qui explique que la dénitrification n'est possible qu'en anaérobiose (Roque, 1980 ; Ratel, 2001).

La réduction des nitrates s'effectue selon deux voie : (Martin, 1979)

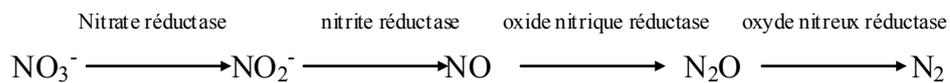
- **La réduction assimilative**

Le nitrate qui disparaît du milieu est entièrement utilisé pour la biosynthèse des protéines et des autres constituants cellulaires azotés. Il subit alors une réduction préalable en ammoniac. Cette assimilation existe chez les végétaux algues, champignons et bactéries (*Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azotobacter*..). Elle peut se schématiser comme suit :



- **La réduction disassimilative ou « respiration des nitrates »**

Dans la dénitrification, le nitrate exerce en anaérobiose la fonction que remplit l'oxygène en aérobiose. La première étape est identique à celle de la réaction assimilatrice : c'est la réduction des nitrates en nitrites. Ces derniers sont ensuite réduits à l'état gazeux selon le schéma (Garcia, 1978) :



La dénitrification hétérotrophe ne fonctionne efficacement que lorsque les bactéries sont placées dans des conditions favorables à savoir, une très faible concentration en l'oxygène, la disponibilité en azote oxydé et en substrat carboné ainsi qu'un pH et une température optimal (Roque, 1980 ; Germon & Couton, 1999).

II.2.2.2.1. Paramètres influençant la dénitrification hétérotrophe

La réaction de dénitrification est d'ordre zéro vis-à-vis de chacun des trois principaux réactifs : azote, carbone et phosphore, dans la mesure où la concentration d'aucun d'entre eux ne devient limitante (Hashly & Leclerc, 1993).

- **Oxygène dissous**

Les organismes dénitrifiants étant aérobie facultatifs, ils utilisent l'oxygène dissous de préférence à l'oxygène des nitrates et nitrites. De plus, le système enzymatique de la dénitrification est un système inductif réprimé par l'oxygène (Roque, 1980). Donc l'oxygène est un inhibiteur du fonctionnement et /ou de synthèse de la plupart des enzymes appliquées dans la dénitrification (Garcia, 1978 ; Martin, 1979 ; Germon & Couton, 1999)

Cette inhibition peut être expliquée par la différence d'énergie produite au cours de la respiration et la dénitrification (Martin, 1979). Pour cette raison, il est nécessaire d'utiliser une concentration en oxygène la plus basse possible afin d'effectuer la dénitrification.

Les concentrations limites sont d'ailleurs variables selon les auteurs et les bactéries (Hashly & Leclerc, 1993). Des concentrations limitantes de 6mg/l et 9.5mg/l ont été rapportées (Martin, 1979). Selon Guillaume (cité par Welté, 1999), la concentration de l'oxygène dans un réacteur doit être comprise entre 0,7 et 2mg/l. Ceci peut être expliqué par le fait que dans certains endroits l'oxygène est consommé plus vite qu'il ne se dissous, ce qui engendre des micro-zones anaérobies aptes à dénitrifier (Martin, 1979).

Dans la pratique industrielle, la teneur en oxygène dans l'eau à dénitrifier ne semble pas poser de problème du fait que l'excès de substrat organique sera utilisé tout d'abord par respiration aérobie, ce qui prouve la tolérance à l'oxygène des bactéries de la dénitrification (Hashly & Leclerc, 1993).

- **Substrat carboné**

La dénitrification est d'autant plus rapide que le carbone disponible est facilement biodégradable et présent en grande quantité (Roque, 1980 ; Ratef, 2001). Le méthanol a de meilleures caractéristiques d'exploitation. Néanmoins, étant donné sa toxicité, il n'est pas envisagé pour la dénitrification des eaux d'alimentation (Martin, 1979).

Les seules sources de carbone agréées en France par le ministère de la santé sont l'éthanol et l'acide acétique. Ce dernier a pour inconvénients, l'utilisation d'une grande quantité et sa corrosivité envers les canalisations (Hashly & Leclerc, 1993).

L'utilisation d'une source plus facilement dégradable tel que le sucre (glucose) entraîne la formation d'une grande quantité de biomasse (Roque, 1980).

D'autres sources de carbone ont été également utilisées tel que les sous produits du toluène ou les métabolites dus à son catabolisme. Ils ont présenté un rendement de 97% (Duplessis et al, 1998). Rajapaksi (2000) a montré la faisabilité de la dénitrification des eaux peu chargées en nitrate en présence du gaz naturel (95% méthane) comme source de carbone. Cependant, son efficacité est faible par rapport au méthanol ou l'éthanol.

La quantité du substrat a un rôle très important et peut être estimée en première approximation par la DCO de l'eau usée. La dénitrification augmente avec la DCO jusqu'à une valeur maximum (correspond à la constante cinétique du substrat : K) au-delà de laquelle elle demeure constante. A de faible valeur, la dénitrification est incomplète (Hashly & Leclerc, 1993). Mosquera-Corral et al (2003) donnent un rapport DCO /N >4 pour un rendement de 90%.

Le rapport carbone / nitrate a une grande influence sur la dénitrification. Cette dernière augmente avec le rapport C/N jusqu'à un maximum au-delà duquel la vitesse devient indépendante du rapport (Roque, 1980). Le rapport diffère selon les auteurs et la nature de la source carbonée ; Welté (1999) donne un C/N= 2,24 pour l'éthanol et 0,86 pour l'acide acétique.

- **Nutriments**

Pour la biosynthèse, les nutriments nécessaires en quantité importante sont C,H,O,N,P,S ainsi que les éléments majeurs K, Na, Mg, Ca, Fe et les éléments en traces Mn, Zn, Cu, Co, Mo (Boussaid, 1987). Le molybdène est un coenzyme de la nitrate réductase (Garcia, 1978 ; Martin, 1979).

- **pH**

L'efficacité de la dénitrification diminue fortement en dehors de la gamme 6-8 avec un optimum au environ de 7-7,5 (Memotec 24). Des pH acides pourraient conduire à une dénitrification incomplète avec l'apparition des nitrites. Lorsque le pH est supérieur à 7, le seul produit final obtenu est l'azote gazeux (Martin, 1979). La réaction de dénitrification peut provoquer une élévation du pH et peut devenir inhibitrice aux alentours de 9 (Bougard, 2004)

- **Le phosphate**

La quantité du phosphate n'a pas besoin d'être supérieur à 0,5mg/l soit environ 0,15mg/l de phosphore. Une valeur supérieure à 1 mg/l de phosphate privilégie la croissance bactérienne sans augmenter le taux de dénitrification (Hashly & Leclerc, 1993).

- **La température**

Les bactéries dénitrifiantes ont des conditions optimales de température très variées. De plus, la dénitrification peut s'effectuer dans une gamme de température très étendue. A 5 °C, la dénitrification peut encore s'effectuer mais avec un temps de latence plus grand (8 jours) alors qu'il n'est que de 5 heures à 27°C. Aux températures élevées, il semble que la dénitrification puisse s'effectuer jusqu'à 65-75°C et cesse à 85°C (Martin, 1979).

Kim et *al* (2002), ont montré la faisabilité de la dénitrification des eaux à de basse température (5-20°C) par l'utilisation de bactéries psychrophiles. Cependant l'activité optimale (99,5%) est obtenue à 15 et 20°C.

Hashly et Leclerc (1993) ont rapporté que des périodes de froid exceptionnelles amenant momentanément la température inférieure à 8°C, ont été responsables de l'arrêt de toute activité biologique sur des installations industrielles de dénitrification.

- **Alcalinité**

La dénitrification augmente l'alcalinité. Quand un ion NO_3^- est consommé, il y a apparition d'ion OH^- , soit une augmentation de 0,081 °F par mg de NO_3^- consommé (Martin, 1979 ; Welté, 1999).

II.2.2.2. Inhibition de la dénitrification

Mise à part les influences de l'oxygène et du pH, d'autres corps ou composés inhibent la dénitrification. Ils peuvent agir au niveau des cytochrome ou au niveau de l'enzyme comme inhibiteurs compétitifs en empêchant leur régénération. On trouve en particulier les agents chélatants tel que les cyanures, les dithioles, et les chlorates. Des composés organiques tel que l'hydroxylamine, pyruvate inhibent également la dénitrification (Martin, 1979).

Les nitrites sont également toxiques envers la dénitrification (Jang et *al.*,2003), car leur accumulation fait diminuer le pH et cette acidité inhibe la synthèse enzymatique des nitrates et nitrites réductases (Glass & Silverstein, 1997).

Les métaux tels que Cr, Cu, Ni, Pb influent sur la dénitrification par la répression de la croissance bactérienne à cause de leur complexation avec la matière organique (Martin, 1979).

II.2.2.2.3. Technologie de la dénitrification

Il existe deux grandes voies de mise en œuvre de procédés biologiques

- **Procédé à bactérie libre**

L'eau à traiter est mise en contact dans un réacteur semi-fermé à mélange intégral avec la biomasse agrégée en flocs bactériens. Dans le cas de la dénitrification, le mélange serait réalisé en absence d'air. Ce procédé présente l'inconvénient d'un faible rendement et le risque d'une mauvaise décantation entraînant une mauvaise épuration. Ce système est surtout utilisé par les stations d'épuration (Bower & Crowe, 1988).

- **Procédé à culture fixée (voir chapitre suivant)**

C'est un procédé utilisé surtout pour la dénitrification de l'eau potable. Dans ce cas, l'épuration des eaux est réalisée dans des filtres biologiques où les bactéries sont adsorbées sur un support fixe.

La fixation des bactéries sur un support approprié dépend de l'hétérogénéité des surfaces, de la charge électrique et du pouvoir adsorbant. Cette fixation conduit à une très grande concentration de bactéries dans le réacteur ce qui permet un meilleur rendement. (Minoret, 2001 ; Michaud, 2001)

La fixation sur support minéral peut se faire en deux voies :

- **En lit fluidisé**, la taille des particules est inférieure à 1 mm et le flux est ascendant avec une vitesse tel que la fluidisation est obtenue. Cette technologie est intéressante car la surface développée par le milieu fin est élevé et permet une forte concentration en bactéries. Par contre, il a été observé une fuite de matière en suspension dans l'eau traitée (Ratel, 2001).
- **En lit fixé**, la taille des particules minérales est supérieure à 1 mm, le flux d'eau est ascendant mais avec une vitesse telle qu'il n'y a pas de fluidisation ou à flux descendant. La biomasse reste stockée dans les interstices du matériau.

La France est le pays possédant le plus grand nombre d'installation industrielle de dénitrification hétérotrophe. Actuellement, ces installations fonctionnent selon des procédés de lit fixé. Toutefois, des expériences ont déjà été menées sur lits fluidisés (Ratel, 2001), ce dernier présentait les inconvénients suivants :

- Le maintien délicat du lit en expansion,
- Fuite des matières en suspension et de la boue produite nécessitant un traitement de clarification.

II.2.2.2.4. Dénitrification hétérotrophe *in situ* (Hashly & Leclerc, 1993)

Le principe consiste en un ajout de matière carbonée à l'eau avant sa réintroduction dans l'aquifère. Les avantages de cette technique consiste dans le travail à une température constante et supérieure à 10°C ainsi que d'éviter le traitement d'affinage car la filtration de l'eau par le sous-sol résout le problème des bactéries, turbidité et le carbone organique dégradable.

- **Dénitrification par la paille** : le réacteur contient un mélange de paille hachée, sable plus maërl. Une hydrolyse de la cellulose de la paille la transforme en sucres solubles qui vont être entraînés par le courant d'eau et provoque la dénitrification dans le sous-sol. Les dysfonctionnements de ce procédé sont dus à l'hétérogénéité du mélange réactionnel provoquant des réactions parasites.
- **Dénitrification par les substrats carbonés solubles** : dans ce cas, il y a utilisation des sous produits de l'industrie agroalimentaire tel que les mélasses ou vinasses, éthanol, acétate et le méthanol. Le dosage de l'ajout carboné est assez délicat, une sous alimentation entraîne l'apparition des nitrites et un surdosage favorisera une fermentation anaérobie avec formation H₂S et de goût putride.

II.2.3. Procédés de couplage

II.2.3.1. Association de l'électrodialyse avec la dénitrification

Le traitement d'une eau chargée en nitrate par un processus hybride combinant un électrodialyseur à un bioréacteur membranaire a été réalisé en France. Sur une eau contenant 62 mg de nitrate, ce procédé a permis l'élimination de 76% des nitrates en produisant une eau partiellement déminéralisée et un concentrât fortement chargé en nitrate. Ce dernier est envoyé dans un bioréacteur afin de réduire les nitrates en azote gazeux. Cette dénitrification de la saumure est presque totale soit 99%.

Ce couplage nous permet d'éviter la contamination de l'eau traitée par les bactéries. Il élimine dans des conditions maîtrisées de la dénitrification ; la totalité des nitrates présents dans le concentrât (Wisniewski *et al.*, 2001 ; 2002).

II.2.3.2. Association de l'échange d'ion à la dénitrification

Il est possible de combiner l'échange d'ion avec la dénitrification hétérotrophique dans le but de réduire la quantité des déchets de régénération du dispositif. Un lit fluidisé à flux ascendant est capable de dénitrifier des solutions de salinité élevée. Ce couplage a permis une réduction de 90% ou plus de nitrate (OMS, 2004).

II.2.3.3. Association de la Dialyse à la dénitrification

Une nouvelle approche pour l'élimination des nitrates a été proposée par Velizarov *et al.* (2002). Il s'agit de l'utilisation d'un bioréacteur à membrane échangeuse d'ion où une membrane anionique sépare le compartiment qui contient l'eau chargée en ion nitrate (S^-) et un compartiment biologique auquel on rajoute les contre ions (C^-) (Figure 7). Ces derniers facilitent le flux des anions vers le compartiment biologique où ils subissent une réduction au niveau du biofilm qui est formé sur la surface de la membrane. Si le produit final de la réaction est chargé négativement (P^-), il peut être considéré comme un contre ion. Les composés cationiques sont répulsés (X^+).

Pour la réduction des nitrates, il faut rajouter dans le compartiment biologique, une culture dénitrifiante, les ions Cl^- comme contre ion et l'éthanol comme source de carbone et d'énergie car c'est un substrat non chargé.

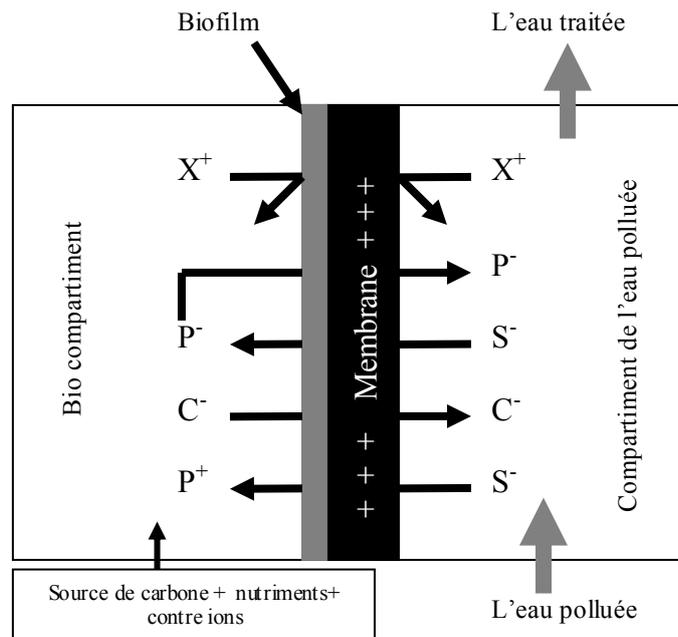


Figure 7 : Schéma du mécanisme de transport des ions dans un bioréacteur à membrane échangeuse d'ions (Velizarov et al., 2002).

Ce procédé nous permet de conserver la composition initiale de l'eau potable ; car la membrane ne permet le passage des ions bivalent tel que les sulfates et évite la co-extraction des bicarbonates avec les nitrates. La membrane nous permet également une isolation complète de la culture bactérienne de l'eau traitée.

Le couplage nous permet d'éliminer totalement les nitrates et nitrite dans les deux compartiments au lieu de les déplacés et permet également un temps plus élevé de fonctionnement des membranes (Velizarov et al., 2002).

II.2.3.4. Filtration associée à la dénitrification

Ce procédé repose sur l'introduction de l'eau de surface chargée en nitrate dans le réacteur biologique, où elle subit un traitement biologique des nitrates. L'effluent sortant du bioréacteur passe directement dans la membrane du module qui va retenir les suspensions bactériennes par filtration. Le retentât chargé en microorganisme est réintroduit dans le bioréacteur et l'eau issue de l'unité est parfaitement dénitrifiée et désinfectée. Sur le plan sanitaire, cette eau peut être utilisée dans l'industrie alimentaire (Wasik et al., 2001).

Kimura et al. (2002) ont combiné un réacteur de dénitrification autotrophe utilisant *Thiobacillus denitrificans*, avec un module d'ultrafiltration. Le processus a donné de bonnes performances. Il a permis d'avoir une eau dénitrifiée exempte de sulfure tout en augmentant la durée de vie des membranes.

II.2.3.5. Dénitrification électrolytique

Le mécanisme de la dénitrification électrolytique repose sur l'élimination des nitrates par un biofilm adsorbé sur une cathode en carbone (Figure 8).

Le donneur d'électron au processus de dénitrification dans ce cas est l'hydrogène gazeux. Ce dernier est produit par l'électrolyse de l'eau provoquée par l'application d'un champ électrique au réacteur (Islam & Suidan, 1998).

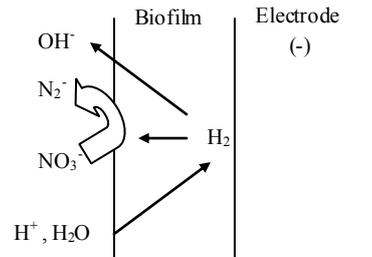
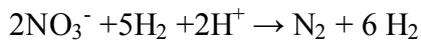
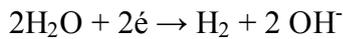
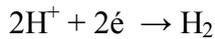


Figure 8: Schéma de la réaction de dénitrification effectuée dans le biofilm

Un rendement de dénitrification de 98% a été obtenu lors de l'application d'une intensité de courant de 20mA et l'utilisation d'un tampon phosphate. Cependant, l'application d'une intensité constante de 25mA et une solution tampon de carbonate nous permis d'avoir des rendements de dénitrification entre 82-87%.

Pour des intensités de courant plus élevées Islam et Suidan (1998), ont observé une diminution du taux de dénitrification qui peut être causée par l'inhibition de l'hydrogène. La faisabilité de ce procédé a été vérifié et démontré par Tripathi (1997).

Feleke et Sakakibara (2002), ont utilisé ce processus couplé à une colonne d'adsorption pour le traitement d'une eau contaminée par les nitrates et un pesticide inhibiteur (IPT) (Isoprothiolane). En présence ou en absence de IPT, 95% des nitrates ont été converti en azote gazeux sans accumulation de nitrite. Cependant, la différence réside dans le produit final de la dénitrification. En présence de IPT, on a une augmentation de N_2O proportionnelle à l'augmentation de IPT. Cela serait probablement dû à une inhibition non compétitive de l'enzyme responsable de la réduction du N_2O en N_2 . L'effluent sortant du réacteur traversera par la suite une colonne garnie de charbon actif ou de résine de silicone où il y aura adsorption de IPT. Ainsi ce procédé pourra être utilisé pour l'élimination des nitrates et IPT.

III.1. LE BIOFILM

III.1.1. Définition du biofilm

Les cellules microbiennes s'attachent fermement à toute surface immergée dans un environnement aqueux. La croissance de cellules fixées comprend la multiplication des cellules et la production de polymères (exopolysaccharides). Ces derniers s'étendent à partir de la cellule et forment une matrice enchevêtrée de fibres organiques. L'assemblage des cellules et des polymères attachés s'appelle le **biofilm** (Michaud, 2001 ; Filloux & Vallet, 2003)

Les biofilms utilisés pour le traitement des eaux sont très complexes. Ils sont considérés comme une surface d'accumulation qui n'est pas nécessairement uniforme dans le temps ou dans l'espace. Sa structure est généralement adsorbante et poreuse et dépendante des conditions environnementales parmi lesquelles on retrouve l'âge du biofilm, l'intensité des forces de cisaillement et la charge nutritive (Minoret, 2001 ; Bertrand, 2002).

La quantité totale de biofilm peut être évaluée physiquement (masse, épaisseur, densité) ou physico chimiquement (COT, DCO). L'activité du biofilm peut, quant à elle, être décrite plus en détail en dosant certains de ces constituants (protéines, exopolysaccharides, densité cellulaire) ou certaines composantes cellulaires (peptidoglycanes, lipides, lipopolysaccharides) (Lazarova & Manem, 1995)

III.1.2. Formation du biofilm

La capacité des bactéries à s'organiser et coloniser une surface leur confère des avantages telque la résistance aux détergents (Assanta, 2001) et aux antibiotiques (Filloux & Vallet, 2003). La fixation garantit souvent une position stable à proximité d'une source de nourriture. Le biofilm ainsi formé est majoritairement constitué de deux composants : les microorganismes et les exopolymères (Menoret, 2001). La dynamique de formation du biofilm est un phénomène complexe et présente un comportement décrit par une courbe sigmoïde qui peut se diviser en trois grandes étapes (Characklis, 1990) (cité par Marchal, 1999) :

- Une phase de latence appelée également lag-phase
- Une phase de croissance caractérisée par la production de biofilm
- Une phase de stabilisation ou « d'équilibre »

III.1.2.1. La phase de latence

Cette période correspond au temps nécessaire pour la formation de la première couche de cellules. C'est la succession de deux étapes :

- Conditionnement organique de la surface du solide
- Adhésion des cellules sur le support

III.1.2.1.1. Conditionnement d'une couche organique sur le support

Cette étape a lieu quelques minutes après l'exposition de la surface propre à un flux de fluide contenant des microorganismes dispersés, des molécules organique et inorganiques (Michaud, 2001).

Plonger dans un liquide, un solide acquiert une charge de surface soit par ionisation des molécules de surfaces, soit par adsorption d'ion. Dans un délai très bref, suite à cette exposition au milieu aqueux, cette surface attire des contre-ions correspondant à des nutriments inorganiques et organiques qui peuvent être utilisés par les bactéries (Minoret, 2001 ; Michaud, 2001). Cette adsorption conditionne la surface du support pour la fixation des microorganismes (Characklis, 1990) (cité par Marchal, 1999). En revanche, la couverture organique initiale est nécessaire mais ne détermine pas la croissance du biofilm (Apilanez et *al.*, 1998). L'importance de cette zone de conditionnement à l'interface, riche en nutriments et en minéraux, varie suivant la nature du support.

III.1.2.1.2. Adhésion des cellules à la surface

Cette adhésion se déroule en deux étapes, une première **réversible de nature physico-chimique** qui suit les lois d'adsorption avec des forces attractives et répulsives, suivie d'une seconde **irréversible de nature biologique** avec la production d'exopolymères cellulaires (Michaud, 2001 ; Chmielewski & Frank, 2003).

- Au cours de la première étape, les cellules se rapprochent de la surface du support par différents types de transports : diffusif (écoulement laminaire), convectifs (écoulement turbulent) ou par les mouvements actifs de la cellule qui sont motivés par chimiotaxie

positive (vers une source de nourriture) ou négative (présence de substance toxique) (Menoret, 2001). Une fois arrivée à la surface, les cellules peuvent s'y fixer de façon réversible. Cette adhésion initiale réversible dépend des forces électriques de la double couche entre la cellule et la surface inerte (Sanchez et *al.*, 1994) (cité par Michaud, 2001). Les forces de Van der Waals et les liaisons chimiques hydrophobes et ioniques sont les forces prédominantes qui gouvernent les interactions attractives entre les surfaces. Les cellules dans un liquide sont généralement chargées négativement, d'où l'importance de la charge de la surface du solide. L'adhésion initiale sur le support est facilitée par la production des polymères par les bactéries (Michaud, 2001 ; Chmielewski & Frank, 2003).

- La seconde étape fait intervenir la production de polysaccharides secondaires ainsi que d'autres polymères biologiques tels que les protéines. Elle est responsable de la consolidation de la fixation entre les cellules à la surface qui devient alors irréversible.

Selon l'espèce bactérienne, il existe différents types d'attachement entre la surface inerte et la cellule (monocouche, colonies verticales). La morphologie du biofilm est fortement liée aux premières cellules fixées. La colonisation initiale durant la phase de latence a lieu préférentiellement dans les cavités et les creux du support, à l'abri des mouvements convectifs du milieu (Michaud, 2001).

III.1.2.2. Croissance, colonisation

La colonisation a lieu par reproduction des cellules irréversiblement attachées. Le biofilm s'étend depuis des micro-colonies en formant un réseau de polymères (glycocalyx). Et il est alors possible de maintenir un micro-environnement à l'intérieur de cet enchevêtrement de polymères substantiellement différent des conditions environnantes (Minoret, 2001). Durant cette période d'accumulation de la biomasse, la sélection entre les différentes souches bactériennes va pouvoir se réaliser. (Michaud, 2001).

La phase de croissance est rapide, elle suit une phase exponentielle avec une consommation du substrat qui augmente jusqu'à une épaisseur critique du biofilm (épaisseur active) au-delà de laquelle le taux de consommation du substrat n'évolue plus (Lazarova et Manem, 1995). Ce phénomène est attribué aux limitations de diffusion du substrat à l'intérieur de la biomasse fixée. La durée de la phase de croissance dépend de la quantité de substrat disponible dans le milieu.

III.1.2.3 La phase d'équilibre

La couverture biologique sur un support est intégrale dans le cas des supports poreux ou rugueux et reste partielle, limitée aux anfractuosités, pour des supports relativement lisses (Rubio, 2002). Le biofilm atteint son épaisseur maximum avec une stabilisation de la biomasse fixée lorsque la production de biomasse est compensée par le détachement du biofilm à la surface du liquide. Cette couche biologique est donc un système dynamique en équilibre entre la production des nouvelles cellules, liée à la croissance et le détachement. (Michaud, 2001).

Lorsque les contraintes hydrodynamiques dans le réacteur ne sont pas importantes, le film biologique continue sa croissance en épaisseur. Quand cette dernière dépasse une valeur critique, l'activité spécifique du biofilm tend à baisser.

Dans le cas des biofilms dénitrifiants, l'épaisseur active se situe dans l'échelle de 100 à 400 μm (Van Loodsrecht, 1993). Pour des biofilm supérieur à 500 μm d'épaisseur, il a été constaté que seules les couches superficielles se composeraient de cellules métaboliquement actives. L'épaisseur est une caractéristique importante du biofilm car plus un biofilm est fins et dense moins il possède de biomasse inactive (Michaud, 2001).

Lorsque le biofilm est mature, les exopolymères peuvent atteindre 50 à 90% du carbone organique présent dans le biofilm (Menoret, 2001 ; Rubio, 2002).

III.1.2.4. Le détachement

Bien que ce phénomène soit impliqué dans l'ensemble des processus de la formation du biofilm, il est généralement décrit de façon indépendante et son étude se limite à celle de la phase de stabilisation du biofilm (Michaud, 2001). Le détachement des cellules est principalement dû aux contraintes extérieures, comme la force du courant (Thyssen, 2003). Il est le résultat de plusieurs phénomènes (Michaud, 2001) :

- **La consommation et la lyse** par d'autres microorganismes.
- **L'érosion**, la perte permanente de biofilm due aux conditions hydrodynamiques du fluide
- **L'abrasion**, la perte de biomasse attachée lors des collisions entre les particules
- **La desquamation**, la perte rapide, massive de biofilm. Elle a lieu surtout avec des biofilms épais lors de changements environnementaux brutaux comme une forte diminution

de la charge par exemple, où la mort cellulaire dans les parties internes conduisent à une rupture de la liaison solide-biofilm.

En conclusion, parmi les différentes étapes de formation du biofilm, la phase de latence semble la plus longue et la plus mal maîtriser. Une forte concentration de la biomasse fixée n'est pas toujours liée à une bonne activité biologique. La sélection des cellules lors de la colonisation semble un paramètre déterminant pour l'activité du biofilm anaérobie. Aussi, le choix des paramètres de fonctionnement doit se diriger vers l'établissement d'un biofilm fin composé de microorganismes à forte activité de dégradation (Michaud, 2001).

III.1.3. Activité du biofilm

La proportion active de la biomasse présente dépend de l'épaisseur du film, de la façon dont les particules de support occupent l'espace liquide et des propriétés de diffusion des différentes substances formant le substrat. Evidemment, les organismes qui ne sont pas exposés au substrat parce qu'ils se retrouvent dans les couches profondes du film ne peuvent pas participer à sa transformation. Les limitations à la diffusion ou au transfert de masse dues à l'accumulation de biofilm peuvent être réduites en augmentant la surface de contact film-liquide (Bertrand, 2002).

III.1.4. Intérêt des procédés utilisant les biofilms

Les procédés à cultures fixées possèdent des avantages par rapport aux procédés à cultures libres. Le glycocalyx qui entoure les microorganismes les protège des substances toxiques (Filloux & Vallet, 2003). L'hétérogénéité structurelle du biofilm lui confère la possibilité d'abriter différents types de microorganismes dans différentes niches écologiques. Ainsi, une grande diversité d'organisme est permise et des bactéries non compétitives mais possédant des facultés spécifiques peuvent se développer (Rubio, 2002).

III.1.5. Facteurs d'influence sur la formation du biofilm

De nombreux facteurs cellulaires, de surface ou environnementaux sont cités dans la littérature comme ayant une influence sur l'adhésion microbienne. Le tableau (1) regroupe les différents facteurs.

Tableau n°1 : Différents facteurs influençant la formation du biofilm (Ménoret, 2001).

Facteurs	Influence sur l'adhésion
<u>Facteurs cellulaires</u>	
Hydrophobicité	Augmente
Concentration	Augmente
Espèce	Espèce dépendante
<u>Conditions de surface</u>	
Rugosité	Augmente
Hydrophobicité	Augmente
Surface spécifique	Augmente ou sans effet
<u>Facteurs environnementaux</u>	
Temps	Augmente
pH	Augmente

La présence de microcrevasses et de rugosités permet semble-t-il, de favoriser l'adhésion initiale. La température joue un rôle primordial dans le développement du biofilm ; puisque pour des températures éloignées de l'optimum, la vitesse de multiplication des cellules est ralentie. Cela se traduit, au niveau du fonctionnement des lits bactériens par des démarrages plus lents et une accumulation plus importante de biosolides à des températures inférieures à 5°C. Les conditions sont essentiellement biologiques, liées à la réduction de l'activité cellulaire. (Ménoret, 2001).

III.2. DEMARRAGE D'UN REACTEUR ANAEROBIE A BIOMASSE FIXEES

III.2.1. Définition

Pour un réacteur anaérobie à biomasse fixée, le démarrage correspond au temps nécessaire à la mise en place d'un biofilm mature. C'est-à-dire une sélection et un arrangement spatiale approprié des différents groupes trophiques les uns par rapport aux autres et vis-à-vis de leur substrat. Le but du démarrage est la fabrication la plus rapide que possible d'un biofilm stable et actif (Michaud, 2001).

III.2.2. Facteurs influençant le démarrage

Afin de montrer la complexité des phénomènes qui vont prendre place lors du démarrage d'un réacteur à biomasse fixée, il faut rappeler que le système est triphasique. Les réactions se passent dans un milieu où se mélange solide, liquide et gaz (Michaud, 2001). Parmi les facteurs qui influencent le démarrage on peut citer :

- Le type d'effluent à traiter
- Le choix du support
- La stratégie d'inoculation

III.2.2.1. Le type d'effluents à traiter

La sélection des microorganismes au cours de la formation du biofilm dépend principalement des caractéristiques de la source d'alimentation (composition et concentration stables).

Un retard du démarrage est observé avec des substrats complexes ou particuliers comme la cellulose, l'amidon et les produits chimiques où une étape d'hydrolyse ou d'adaptation est nécessaire. La composition minérale de l'alimentation va jouer un rôle important sur la fixation, de façon indirecte par la formation de précipités fournissant de nouveaux sites d'attachement ou directe par la présence des cations tels que Mg^{2+} . Ces derniers stabilisent les exopolysaccharides et renforcent les liaisons des protéines des cellules déjà fixées (Michaud, 2001).

Une flore complexe semble avoir une cinétique de fixation plus rapide qu'une culture pure, probablement par des interactions diverses entre les cellules elles-mêmes. Il est également à signaler que le taux de croissance des microorganismes est un paramètre déterminant dans le démarrage du réacteur. Alors certaines études ont été effectuées sur l'optimisation de cette croissance par une complémentation spécifique dans l'alimentation. Il s'agit d'un ajout de stimulant tel que les oligo-éléments qui jouent un rôle sur l'accumulation et la croissance du biofilm sans aucun effet bénéfique sur son activité (Michaud, 2001)

III.2.2.2. Le support

De nombreuses études ont été réalisées afin de déterminer le meilleur support pour l'adhésion des microorganismes. Bien que le choix semble directement lié à la nature de l'effluent à traiter, en partie par sa composition minérale, certaines caractéristiques sont apparues comme primordiales et concernent :

- L'état de surface du support
- La nature chimique de la surface solide
- La taille de la particule

II.2.2.2.1. L'état de la surface du support

La rugosité est désignée comme le point le plus favorable à un support pour la rétention de biomasse (Rubio, 2002). Cependant, ce sont les surfaces modérément rugueuses qui présentent les meilleures capacités de rétention (Michaud, 2001 ; Rubio, 2002).

La texture de la surface et la porosité du solide ont un impact important sur l'attachement des bactéries. En effet, les supports poreux permettent une colonisation plus rapide. Cependant, une grande rétention de biomasse engendre des problèmes de diffusion des éléments nutritifs qui se traduit par une baisse de l'activité du biofilm (Michaud, 2001)

II.2.2.2.2. La nature chimique de la surface solide

La nature chimique d'un solide peut avantager les cinétiques de colonisation. En effet, la première étape de fixation réversible des bactéries est une étape physico-chimique, gouvernée par ce type d'interaction. Les bactéries en solution aqueuse présentent généralement une surface de charge négative, le caractère positif du support, au pH du réacteur, ne peut donc que favoriser le premier contact. Il a été rapporté également que certains auteurs ont choisi des supports **hydrophobes et chargés positivement** (Michaud, 2001)

La composition chimique du solide influence également la fixation initiale. Une colonisation rapide est obtenue avec des matériaux composés de carbone, sans pouvoir bien en expliquer les raisons. De même, les supports à base de magnésium ont des capacités de rétention de biomasse supérieures. Cette caractéristique serait liée à la possibilité d'échange de cation du support, favorisant un micro-environnement riche en Mg^{2+} , approprié pour la nutrition microbienne. La composition chimique du support affecte particulièrement le rapport entre les bactéries du biofilm ce qui entraîne un comportement différent vis à vis de la dégradation suivant la nature de l'effluent (Michaud, 2001).

II.2.2.2.3. La taille et la surface disponible (Hashly & Leclerc, 1993 ; Menoret, 2001)

L'augmentation de la surface de solide augmente les chances de fixation des bactéries sur le support et peut être considérée comme un critère de rapidité d'adhésion. Les particules de petites tailles permettent une surface spécifique élevée.

II.2.2.2.4. Matériaux support pour les bactéries dénitrifiantes

Le matériau support doit posséder une grande surface spécifique, une macroporosité importante, une faible densité et une résistance élevée à l'abrasion. Les matériaux les plus couramment utilisés sont : **la biolite**, argile extrudée, comportant une multitude de microporosités de surface servant de sites d'ensemencement. Et le **Biodagène**, argile étudiée pour favoriser l'accrochage des bactéries dénitrifiantes. Un troisième support est également utilisé en France c'est la **Pouzzolane**, roche minérale d'origine volcanique qui présente une grande surface spécifique et une macroporosité élevée (Welté, 1999 ; Ratel, 2001).

La granulométrie varie entre 2 et 5 mm. Ce choix est un compromis, sachant que des matériaux de petites tailles, permettront un meilleur rendement mais conduiront à un colmatage plus rapide (Welté, 1999 ; Ratel, 2001).

Hiscock et *al* (1991), ont cité des lits de gravier ou de sable fluidisé comme support de réacteur. En effet, ce dernier donne de meilleurs résultats car il permet de maintenir une forte concentration en biomasse au sein du réacteur et delà un faible temps de séjour est obtenu.

Un autre procédé a été breveté en France par la société SOGEA avec un réacteur fonctionnant à flux ascendant. Il s'agit d'un lit de sable fluidisé où l'extraction de la biomasse en excès est effectuée en continu. Ce procédé a pour avantages le maintien constant des paramètres physiques et biologique (perte de charge, rendement) ainsi que de fonctionner à très fortes charges de nitrate (Ratel, 2001).

En France, Ratel (2001) signale qu'un nouveau matériau granulaire a été mis au point à Toulouse mais, des concentrations importantes en nitrite ont également été révélées.

Un procédé Biodeni^{TEM} utilisant l'acide acétique comme substrat et un support en **plastique** a été étudié en Californie par Copland (2002). Ce système s'est révélé viable sur le plan technique et économique pour la dénitrification de l'eau potable.

Des anneaux pall en **plastiques** ont été également utilisés comme support pour la dénitrification d'une eau chargée en nitrate dans un lit immergé (Oh, 2001). Ces anneaux sont considérés comme un excellent support grâce à leur grande porosité qui permet la fixation d'une grande quantité de biomasse produite (Oh, 2001).

Min et *al* (2004), ont étudié la capacité de bioréacteurs garnis de **sable** et de **plastique** et inoculés avec *Dechloromonas sp* KJ à éliminer simultanément les perchlorates et les nitrates. En effet, cette souche a la capacité d'utiliser au même temps ces deux

accepteurs d'électrons par deux systèmes enzymatiques inductibles séparées (Xu et *al.*, 2004). Min et *al.* (2004), ont constaté que les nitrates, et les perchlorates sont complètement éliminés sur le sable à charge hydraulique de 0.34 l /m² s et 0.68 l/m² s. Alors que sur le support en plastique, la dénitrification et l'élimination des perchlorates (ClO₄⁻) sont incomplètes à la vitesse de 0.68 l/m²s. Ceci est dû à la faible porosité et la faible surface spécifique du milieu en plastique (230m²/m³) par rapport au sable (6000m²/m³).

Un essai pilote de dénitrification d'une eau potable a été réalisé par Pekdmir et *al.* (1998), sur une colonne de 1m garni de **charbon actif** de 273µm de taille. Le réacteurensemencé par *Paracoccus denitrificans* et alimenté par l'éthanol comme source de carbone, a donné un rendement de 90%.

III.2.2.3. L'inoculation

Les caractéristiques majeures de cette étape lors du démarrage peuvent être divisées en trois parties :

- Origine et acclimatation ou non des boues utilisées
- Quantité de l'inoculum
- Mode d'inoculation

III.2.2.3.1. Origine et la qualité des boues

Lors de la mise en place d'un réacteur anaérobie, la première difficulté est d'obtenir des boues capables de dégrader la matière organique. Pour cela, suivant la nature de l'effluent à traiter, l'inoculation avec des boues actives et adaptées au substrat est un gain de temps très sérieux. Une inoculation à un pH neutre permet également de stimuler la fixation des bactéries sur le support et de ne pas ralentir la croissance cellulaire (Michaud, 2001).

Vu la difficulté de disposer de la quantité de boues acclimatées suffisante, de nombreux auteurs préconisent l'utilisation de boues de stations urbaines, qui possèdent généralement une flore bactérienne assez complexe capable de traiter de nombreux types d'effluents. Une période d'acclimatation de 1 à 3 semaines sur l'effluent à traiter est recommandée, mais cette étape peut être prolongée plus longtemps (2 à 3 mois).

Les quelques tentatives de bioaugmentation de l'inoculum par une ou plusieurs espèces considérées comme importantes, soit dans la rapidité de colonisation ou dans l'activité de dégradation du substrat, ne se sont en général pas avérées positives (Michaud, 2001)

III.2.2.3.2. La quantité de boues

Dans la majorité des cas, peu de données sur les quantités d'inoculum utilisées et leur provenance sont disponibles. Cependant dans le cas d'une faible quantité de boues acclimatée à l'effluent on peut utiliser un système de recirculation de boues, afin d'assurer une concentration importante durant la phase de démarrage (Michaud, 2001).

III.2.2.3.3. La stratégie d'inoculation

Le mode opératoire demeure plus important que la quantité d'inoculum. Dans de nombreux cas, l'ensemencement est réalisé en flux continu grâce à une boucle fermée de recirculation des boues. Pendant quelques jours, le réacteur fonctionne en mode discontinu afin d'établir la première couche cellulaire sur le support. Après la formation de cette dernière, un lavage progressif des bactéries libres semblerait être judicieux lors d'une inoculation importante (Michaud, 2001).

III.2.3. Influence du biofilm sur le milieu

Le développement d'un film bactérien sur un support agit à deux niveaux sur les propriétés du milieu, au niveau de l'écoulement et des transferts gazeux. Le biofilm se comporte comme une zone humide stagnante (Séguret, 1998) et de ce fait, il augmente l'humidité du support. Cette augmentation réduit la porosité du support et réduit avec elle la diffusivité du milieu poreux. Ce qui entraîne la réduction des échanges gazeux (Ménoret, 2001).

III.2.4. Accumulation de matière organique, colmatage

En pratique, les filtres sont le siège d'une accumulation de matière organique pouvant engendrer le colmatage. Différents facteurs contribuent à l'accumulation de « biosolides » en surface ou au sein des filtres. Les deux principales causes du colmatage des filtres, sont la filtration des matières en suspension et la production excessive de boue au sein du massif (Ménoret, 2001).

III.2.4.1. Colmatage physique : accumulation de matière en suspension (MES)

Le colmatage des filtre par accumulation des MES est le plus cité dans la littérature. Cela est probablement dû à l'utilisation de matériaux relativement fins conduisant à une importante rétention de MES. Les plus grossière d'entre elles sont retenues en surface les plus fines sont retenues par blocage entre les pores. Plus le matériaux est grossier, plus les

MES pénétreront profondément. Le colmatage sera ainsi retardé mais plus épais (Menoret, 2001).

III.2.4.2. Colmatage biologique : surproduction de boue

Le colmatage biologique est engendré par l'occupation de la porosité du matériau, par la biomasse et les sous produits issus du métabolisme bactérien. Si la production de boue devient supérieure aux taux de décroissance de la biomasse, l'accumulation de boue peut survenir (Menoret, 2001)

III.2.4.3. Facteurs influençant le colmatage

III.2.4.3.1. Type de support

La taille du matériau support et sa granulométrie influencent le phénomène de colmatage. Un matériau grossier supportera de fortes charges hydrauliques sans colmatage. Une granulométrie trop grossière conduirait à une moindre surface de contact pollution-biofilm ainsi qu'un moindre temps de contact (Menoret, 2001).

III.2.4.3.2. La charge en MES

La concentration en matière en suspension (MES) est un paramètre majeur dans le colmatage physique mais peu d'informations sont disponibles concernant la charge maximale admissible (Menoret, 2001).

III.2.4.3.3. La charge organique

La charge organique influence directement la production de boue et de ce fait, elle constitue un paramètre important dans le colmatage des filtres. Comme pour la charge en MES, peu d'information sont disponible pour la charge maximale admissible (Menoret, 2001).

III.2.4.3.4. Autres facteurs

La composition des eaux traitées semble également avoir une influence sur le développement du colmatage. Une eau présentant un rapport C/N élevé favoriserait la formation de polysaccharides, composés responsables de l'obstruction des pores. C'est le cas des effluents d'élevage, peu concentrés en azote et présentant une forte pollution carbonée.

Le développement de bactéries anaérobies est aussi cité comme indicateur ou cause de colmatage (Ménoret, 2001).

I. MATERIEL ET METHODES

Ce travail se propose d'étudier la faisabilité de la dénitrification par cultures fixées d'une eau chargée en nitrate issues d'une unité d'électrodialyse, plus exactement du compartiment concentrât.

L'efficacité de ce procédé dépend du type de support utilisé (caractères physico-chimique et hydrodynamique). Dans cet ordre d'idées, nous avons réalisés une étude comparative de la dénitrification sur deux types d'anneaux rashig en céramique : l'un est poreux, l'autre est non poreux.

Dans un premier temps, nous avons réalisé une étude comparative de l'influence de la formation du biofilm sur le comportement hydrodynamique des supports.

Dans un second temps, nous avons déterminé et comparé les paramètres d'exploitation du procédé tel que : les conditions de démarrage, la vitesse de passage et la concentration initiale en nitrate appliquée.

I.1. DESCRIPTION DU DISPOSITIF

L'essai de traitement a été effectué dans un dispositif expérimental constitué d'une colonne (réacteur) garni de support et d'un bac d'alimentation contenant l'eau à traiter. Grâce à une pompe péristaltique, l'effluent est envoyé en flux ascendant vers la colonne.

Le réacteur biologique est un tube en plastique atteignant une hauteur de 100 cm où uniquement 75 cm sont rempli de support. Le diamètre interne de la colonne est de **1,2 cm**. La surface ménagée est d'environ **3,14. 10⁻⁴ m²**. Le volume utile du réacteur est de **235,3.10⁻⁶ m³**

La colonne est équipée de **9** points de prélèvement placés sur la hauteur de la colonne tous les **10 cm** (Figure 9). Ces piquages permettent la prise d'échantillon au sein du lit.

L'efficacité de traitement a été appréciée analytiquement par le suivi de l'évolution de différents paramètres à savoir : nitrate, nitrite, DCO et pH.

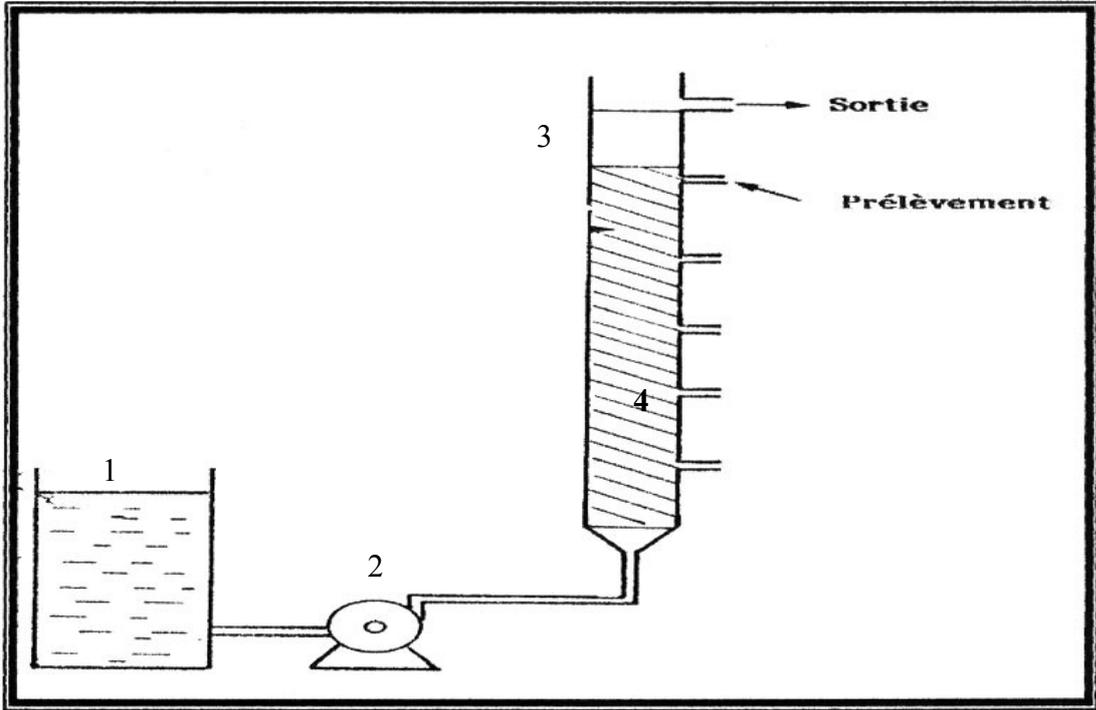


Figure 9 : dispositif d'une colonne de dénitrification

(1) bac d'alimentation ; (2) pompe péristaltique ; (3) colonne de dénitrification ; (4) matériau.

I.2. SUPPORT UTILISE

Deux supports ont été utilisés. Il s'agit de deux types d'anneaux rashig en céramique. L'un est poreux, l'autre est faiblement poreux. Leurs principaux caractères sont regroupés dans le tableau n°2.

Tableau n° 2 : Caractéristiques des supports utilisées

caractéristique	Support non poreux	Support poreux
Diamètre externe	0,5 cm	0,9cm
Diamètre interne	0,3 cm	0,5cm
Hauteur	0,8 cm	0,9cm
Indice de vide	0,4	ND
Masse d'un anneau	0,4013g ± 0.002	0.2938 ± 0.002
Masse totale des anneaux	300,98g	49,06g
Nombre d'anneaux	750	167
Surface totale	15,07cm ²	6,6cm ²

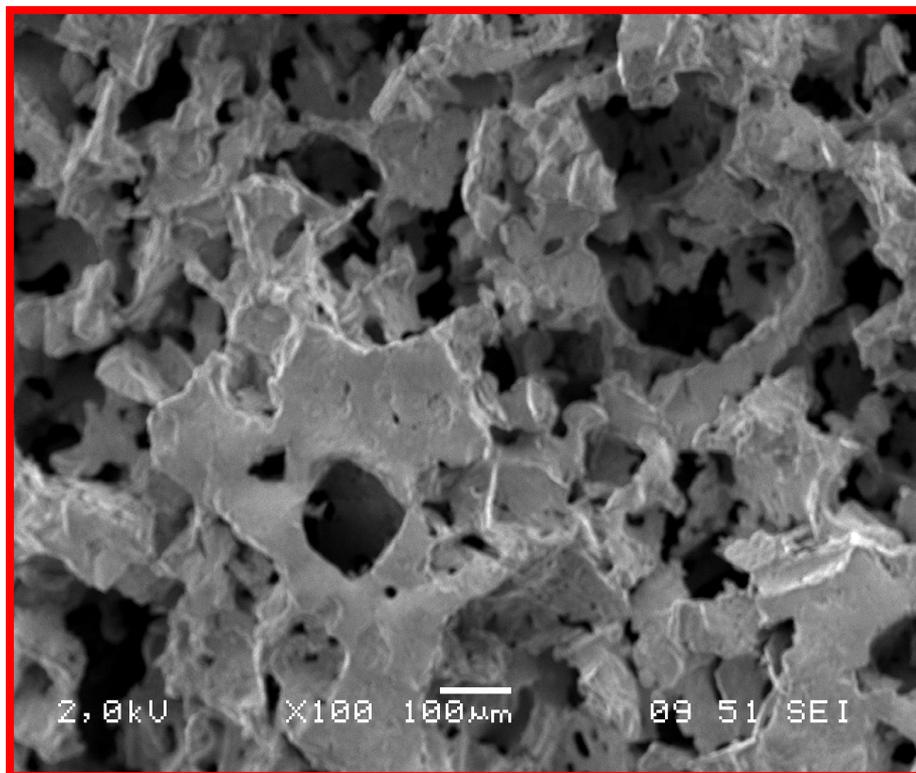
ND : non déterminé

I.2.1. ANALYSE DE LA SURFACE DES DEUX SUPPORTS

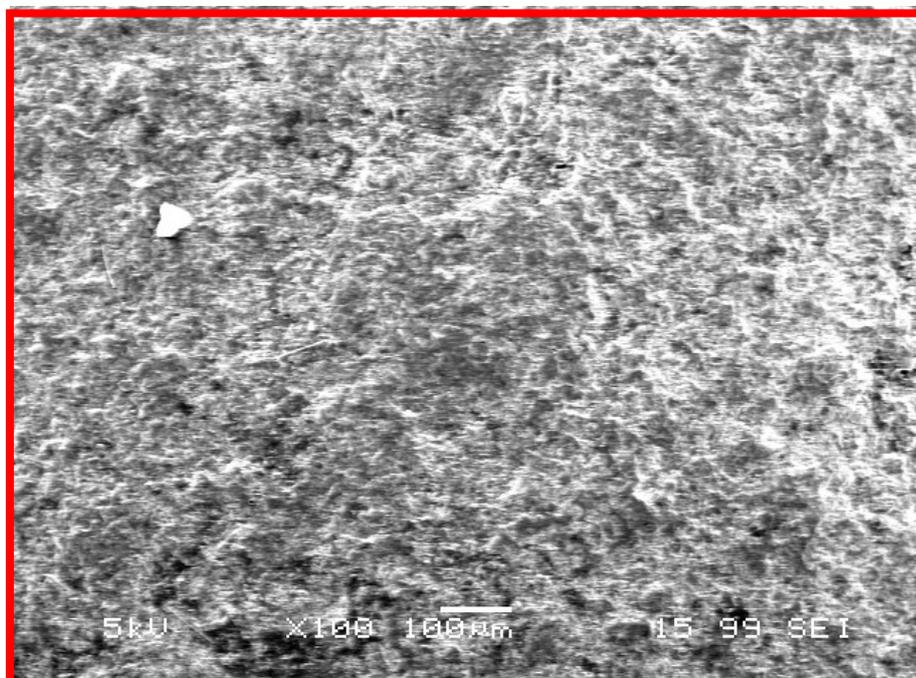
Les analyses de la composition chimique et l'observation de l'état de la surface ont été effectuées par un microscope électronique à balayage couplé à un système d'analyse d'image de marque EDAX. Les résultats sont représentés dans les Figures (10,11).

Les photos (figure10) montrent la différence de porosité entre les deux supports en céramique. Cette caractéristique favorise la formation rapide du biofilm sur le support poreux (Michaud, 2001 ; Minoret, 2001). Ceci laisse supposer que le support poreux présenterait de meilleurs performances que le non poreux.

Cependant, les résultats de l'analyse chimique (Figure 11) montre une différence dans la composition chimique des deux céramiques qui est marquée par l'absence de l'alumine dans le support poreux. Cet élément est connu par son effet positif sur la fixation bactérienne et son absence peut empêcher l'adhésion de se produire, voire entraîner le détachement de la cellule bactérienne (Assanta, 2001).

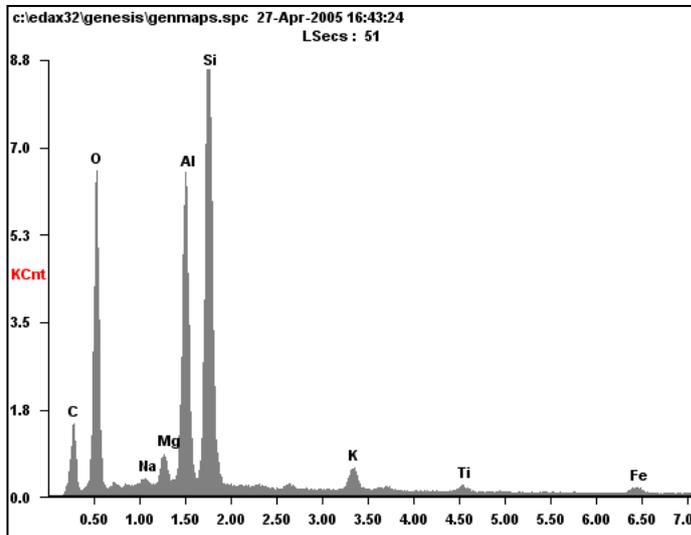


A- Support poreux



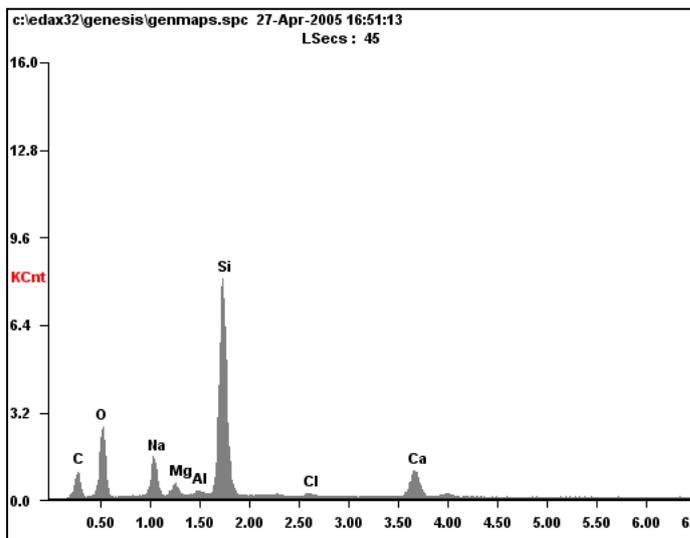
B- support non poreux

Figure 10 : Observation de la surface des supports au MEB Gx 100



<i>Element</i>	<i>Wt%</i>	<i>At%</i>
<i>C</i>	26.47	37.63
<i>O</i>	39.06	41.69
<i>Na</i>	00.43	00.32
<i>Mg</i>	01.21	00.85
<i>Al</i>	10.55	06.68
<i>Si</i>	19.24	11.70
<i>K</i>	01.35	00.59
<i>Ti</i>	00.52	00.19
<i>Fe</i>	01.17	00.36

A- Support non poreux



<i>Element</i>	<i>Wt%</i>	<i>At%</i>
<i>C</i>	30.69	43.48
<i>O</i>	31.60	33.60
<i>Na</i>	06.72	04.97
<i>Mg</i>	01.51	01.06
<i>Al</i>	00.36	00.23
<i>Si</i>	23.58	14.28
<i>Cl</i>	00.45	00.22
<i>Ca</i>	05.10	02.17

B- Support poreux

Figure 11 : Analyse de la composition chimique de la surface des deux supports en céramique

Wt% : pourcentage en poids At% : pourcentage en atomes K : couche d'énergie K

1.2.2. TRAÇAGE DU REACTEUR EN REGIME PERMANENT

Le traçage du réacteur en régime permanent a été effectué dans le cas du support vierge et du support colonisé, afin de déterminer le temps de séjour au sein de ce dernier. Ceci nous permet d'étudier l'influence du biofilm sur les caractéristiques du support et, sur le comportement hydrodynamique du réacteur (Menoret, 2001 ; Michaud, 2002).

Considérons un flux de matière composé de différentes « fractions » entrant dans un réacteur. Toutes les particules d'une même fraction « séjournent » un temps identique dans le réacteur. Mais, lorsque le flux de matière franchit l'entrée du réacteur en régime permanent, les différentes fractions du flux ne franchissent généralement pas la section de sortie du réacteur au même instant. De ce fait, le temps passé par les différentes fractions à l'intérieur du réacteur est variable. Ce phénomène peut être représenté par une distribution des temps de séjour.

Soit un système de volume V dans lequel s'établit un régime d'écoulement permanent au débit Q . Le temps de séjour « t » d'une fraction de matière est égal au temps qu'il a fallu pour parcourir la distance comprise entre l'entrée et la sortie. (Menoret, 2001)

On considère une injection impulsion d'une masse d'un traceur qui se conserve au cours de l'écoulement et qui n'était pas présent initialement. On suit l'évolution, en fonction du temps, de la concentration du traceur $C(t)$ à la sortie du réacteur. On détermine en suite le temps de séjour moyen, donné par la relation suivante :

$$\bar{t}_s = \frac{\int_0^{\infty} tC(t)dt}{\int_0^{\infty} C(t)dt} \quad (1)$$

Le choix du traceur doit tenir compte des contraintes de mesure ainsi que des moyens analytiques disponibles. Notre choix s'est porté sur le chlorure de sodium (NaCl) qui est simple d'emploi et peu coûteux. C'est une méthode conductimétrique où le traceur est injecté à l'entrée du réacteur. La variation de la conductivité en sortie de réacteur est mesurée à des intervalles de temps réguliers à l'aide d'un conductimètre (HANNA instrument EC124).

Après établissement du régime permanent grâce au fonctionnement ininterrompu de la pompe, le traceur est injecté. On utilise 5ml de solution de NaCl à une concentration de 20 g/l. ce qui correspond à une concentration d'environ 1g/l au sein du réacteur. La conductivité de la solution est directement corrélée à la concentration en traceur grâce à une courbe étalon.

Le temps de séjours peut être calculé théoriquement par la formule :

$$T_s = \frac{V}{Q} \quad (2)$$

Avec :

Q : le débit d'alimentation du réacteur, $Q=2,4\text{ml/min}$.

V : le volume d'eau contenu dans le réacteur garni, $V =122\text{ml}$ (non poreux) et $V= 167\text{ml}$ (poreux).

Ce qui donne : $T_s = 51\text{min}$. Pour la colonne 1 (support non poreux)

$T_s = 70\text{ min}$ pour la colonne 2 (support poreux)

Les essais de traçage sur les colonnes garnies de support vierge représentés dans la Figure 12 montrent que le temps de séjour moyen dans le support poreux est supérieur à celui du support non poreux (72min. contre 51 min).Ceci est dû à la capacité de ce support à retenir l'eau dans sa microporosité qui lui confère en milieu vierge, un comportement hydraulique marqué par un temps de séjour plus long. Cet caractéristique laisse suggérer que le support poreux devrait conduire à des performances supérieures à celle du support non poreux (Menoret, 2001). Il est à signaler que la composition de l'eau du robinet utilisée dans le traçage des deux supports n'est pas la même. Ce qui explique la différence de la valeur initiale du traçage (0,6mg/l et 0,4mg/l) pour le poreux et le non poreux respectivement.

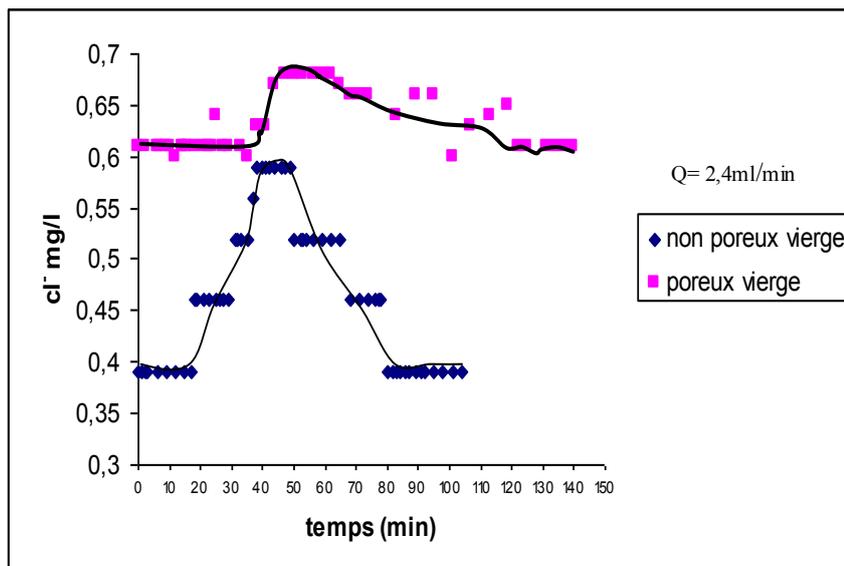


Figure 12: Traçage en régime permanent des deux supports vierges

I.3. FONCTIONNEMENT DU REACTEUR

Lors de la mise en place d'un réacteur biologique, la première difficulté est d'obtenir une boue capable de dégrader le polluant. Pour cela, l'inoculation avec des boues activées sélectionnées et adaptées au substrat et aux conditions de fonctionnement est un gain de temps très sérieux.

I.3.1. SELECTION DES BACTERIES DENITRIFIANTES

Vu que les stations d'épuration urbaines possèdent généralement une flore bactérienne assez complexe capable de traiter plusieurs polluant ; nous avons choisi de sélectionner nos bactéries dénitrifiantes à partir d'une boue issue de la station d'épuration du palais du peuple situé à Staouali.

I.3.1.1. Système en batch

Afin de sélectionner les bactéries dénitrifiantes, les boues sont mises dans un bassin fermé en présence d'une alimentation riche en nitrate (alimentation I) (Figure 13). Le dispositif fonctionne en discontinu. Un suivi de la concentration des nitrates et nitrites est effectué régulièrement et la solution d'alimentation est renouvelée à chaque fois que la concentration diminue au dessous de la norme. Une fois que la consommation des nitrates est réalisée au bout de 10 heures, les boues seront transférées dans un système en continu qui permettra le développement et le maintien de notre biomasse dénitrifiante.

I.3.1.2. Système en continu

Le dispositif de culture en continu est constitué d'un réacteur de boues activées relié à un décanteur (Figure 14). Les boues issues de ce dernier sont recyclées et introduites dans le réacteur en même temps que l'alimentation (II) à l'aide d'une pompe centrifuge. Une agitation mécanique permet le mélange intime entre les boues et l'alimentation.

Afin de maintenir un régime en continu et conserver la biomasse en phase exponentielle, il fallait déterminer le temps de séjour au niveau du réacteur.

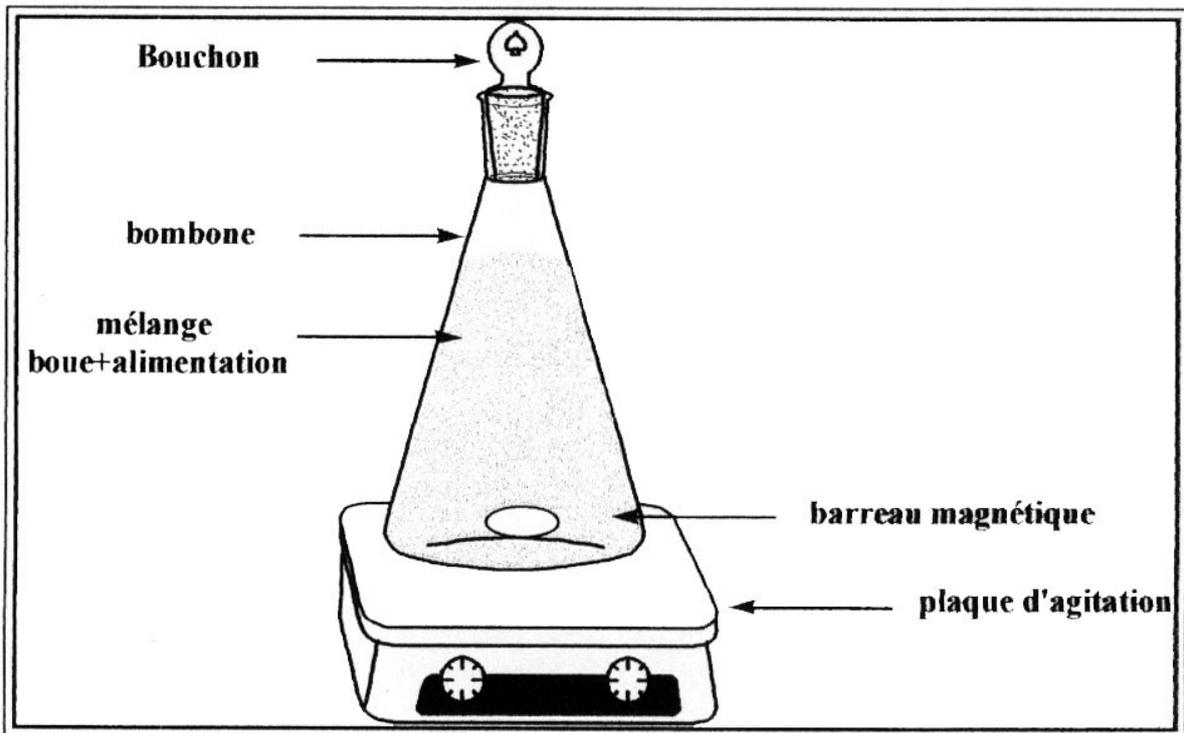


Figure 13 : dispositif de la sélection des bactéries dénitrifiantes en réacteur discontinu.

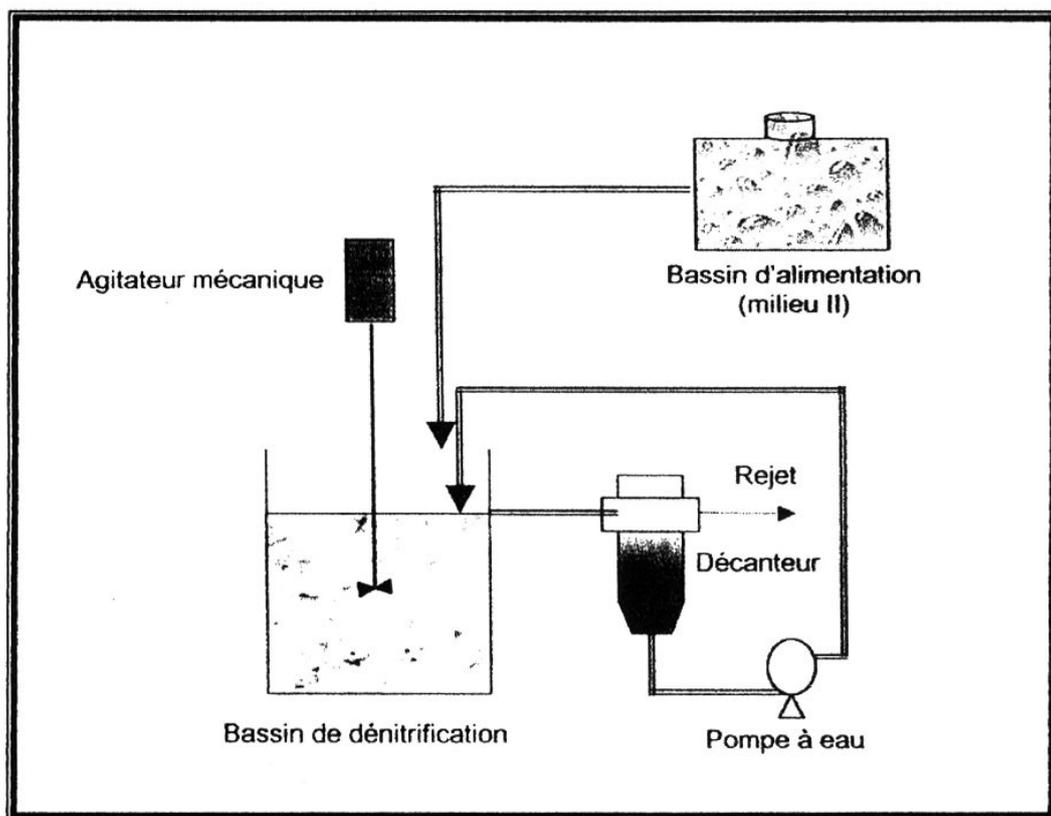


Figure 14 : Dispositif de la culture en continue des boues dénitrifiantes

Sachant que lors d'une culture en continu, la variation de la concentration en micro-organisme en cours du temps est régie par l'équation :

$$\frac{dX}{dt} = \mu X - DX \quad (3)$$

- μX : Production de la biomasse.

- DX : Soutirage de la biomasse.

D Étant le taux de dilution (h^{-1}) et μ le taux de croissance (h^{-1}).

Le régime continu est établi lorsque :

$$\frac{dX}{dt} = 0 \Rightarrow \mu_{\max} = D \quad (4)$$

C'est donc le réglage du taux de dilution qui fixe aux micro-organismes leur taux de croissance. Ceci est bien entendu possible que si : $D < \mu_{\max}$

Dans le cas contraire ($D > \mu_{\max}$), le régime continu ne peut s'établir et le réacteur « se lave ».

Le réglage du taux de dilution va donc conditionner les résultats de la biomasse. Selon la théorie du réacteur parfaitement agité et si le réacteur est considéré comme parfaitement homogène, les concentrations en micro-organismes et en substrats résiduels en sortie sont identiques à celle de l'intérieur du réacteur, le temps de séjour sera défini par :

$$T_s = \frac{V}{Q} \quad (h) \quad (5)$$

Où V est le volume du réacteur (m^3) et Q est le débit de l'alimentation (m^3/h).

Le taux de dilution est alors donné par :

$$D = \frac{1}{T_s} = \frac{Q}{V} \quad (h^{-1}) \quad (6)$$

Ce qui conduit à établir que :

$$T_s \geq 1/\mu_{\max} \quad (\text{Condition nécessaire à la stabilité du réacteur}). \quad (7)$$

Expérimentalement on trouve que : $\mu_{\max} = 0.6542 \text{ h}^{-1}$, ce qui donne : $T_s \geq 1.528 \text{ h}$.

Si on considère un temps de séjour $T_s = 2h$ et un réacteur de volume $V = 20l$, cela va nécessiter un débit d'alimentation $Q = 10 \text{ l/h}$.

I.3.1.3. Alimentation

La composition des solutions d'alimentation est représentée dans le tableau n°3. Il est à signaler que l'effluent synthétique est préparé dans de l'eau de robinet. Le pH des solutions est neutre. Les expériences ont été effectuées à une température ambiante (20-28°C).

Tableau n° 3 : La composition de l'alimentation en continu et en discontinu.

composés	Alimentation en discontinu (1)	Alimentation en continu (2)
KNO ₃	2000mg/l ⇔ 1200mg/l de NO ₃ ⁻	163mg/l ⇔ 100mg de NO ₃ ⁻
KH ₂ PO ₄	4.5mg/l ⇔ 1.05mg/l de P	2.25mg/l ⇔ 0.5mg/l de P
FeSO ₄	10mg/l	0
MgCl ₂	25mg/l	0
Lactose	1000mg/l	500mg/l

I.3.2. ENSEMENCEMENT DU REACTEUR

L'inoculation du réacteur était réalisée par passage en circuit fermé et à faible vitesse d'une solution contenant des boues sélectionnée représentant 2% du volume de réacteur. Une fois la biomasse fixée, le réacteur fonctionne en mode fermé afin de permettre le développement du biofilm sur la surface des anneaux. Cette procédure a été jugée trop longue, donc nous avons opté pour l'augmentation de la quantité de l'inoculum.

Une quantité de boues égale à 10% du volume de réacteur préparée dans une solution concentrée en nitrate était suffisante pour réduire le temps de démarrage du réacteur de 30 jours à 3 jours.

Une fois que la quantité des nitrates à la sortie du réacteur atteint les normes au bout de 10 heures, on estime que le biofilm s'est développé et que le réacteur est apte à fonctionner en mode continu.

Les prélèvements effectués au niveau des piquages sont collectés et utilisés pour le dosage des différents paramètres : nitrate, nitrite, DCO et pH.

I.4. METHODE D'ANALYSE PHYSICO-CHIMIQUE

Les dosages sont effectués selon les normes (voir annexes)

- Les nitrates : Méthode au réactif sulfophénique
(Norme AFNOR NF 90 012)
- Les nitrites : Méthode au réactif de diazotation
(NORME AFNOR NF 90 013)
- Mesure de la demande chimique en oxygène (DCO)
Standard Methods (APHA, 1985).
- Mesure du pH : pH mètre. (Metrohm)

I.5. OBSERVATION AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE A BALAYAGE (MEB)

Le microscope électronique à balayage (MEB) est un appareil d'analyse, pouvant fournir rapidement des informations sur la morphologie et la composition chimique d'un objet solide. Ces analyses ont été effectuées au niveau du CRD Sonatrach et au niveau du CRAPC

I.5. 1. Appareillages

I.5.1.1. Métalliseur :

C'est un pulvérisateur pour la métallisation des échantillons. De marque : **Balzers SCD (050 et 040)**.

I.5.1.2. Microscope électronique à balayage :

Référence : **Philips XL (20 et 30)**

I.5.2. Préparation de l'échantillon

L'échantillon est collé sur le porte objet par la laque d'argent et il doit passer à la métallisation.

La métallisation est le dépôt de couches métalliques de carbone de l'ordre du nanomètre sur toute la surface de l'échantillon. Les échantillons doivent être électriquement conducteurs pour éviter les charges électriques à la surface et pour améliorer la qualité de l'image.

II. RESULTATS ET DISCUSSION

II.1. TRAÇAGE EN REGIME PERMANENT EN MILIEUX COLONISES

Les traçages des supports vierges et colonisés par l'injection d'une solution concentrée de NaCl, nous ont montré que : les particules d'une même fraction du fluide séjournent plus lentement dans le cas du support non poreux colonisé par rapport au vierge. Le temps de séjour moyen passe de 51 min. à 67 min. Ce qui suppose que le biofilm échange lentement du traceur avec l'écoulement principal et se comporte comme une zone stagnante (Séguret, 1998 ; Menoret, 2001) (Figure 15).

Le traçage effectué dans le réacteur garni par le support poreux montre une apparition immédiate de chlorures dans le réacteur, avec un temps de séjour inférieur à celui du vierge (72 min à 14 min) (Figure 16). Ceci est dû au fait que le biofilm tapisserait la microporosité du support et suggérerait l'hypothèse de passage préférentielle de l'eau dans le réacteur (Menoret, 2001).

La présence du biofilm rend différent les comportements hydrauliques des deux types de support, en créant des passages préférentiels dans le réacteur à support poreux (Figure 17).

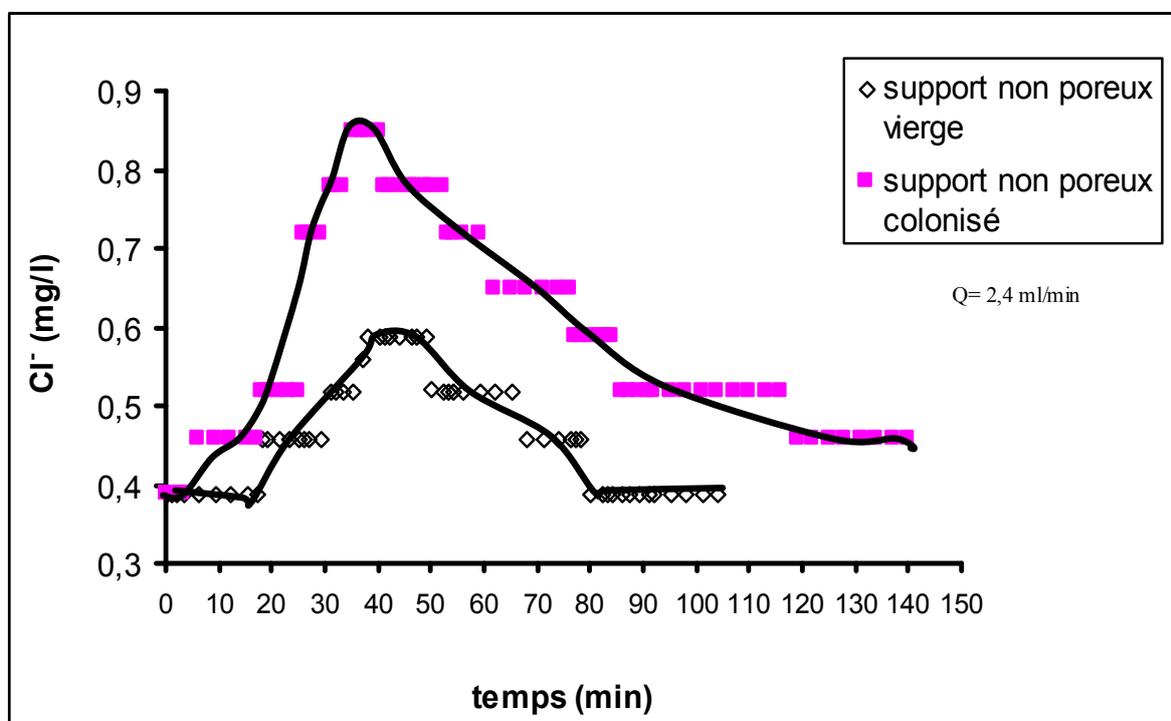


Figure 15 : Traçage dans le réacteur - Comparaison de l'évolution de la concentration en chlorure à la sortie du réacteur garni de support non poreux

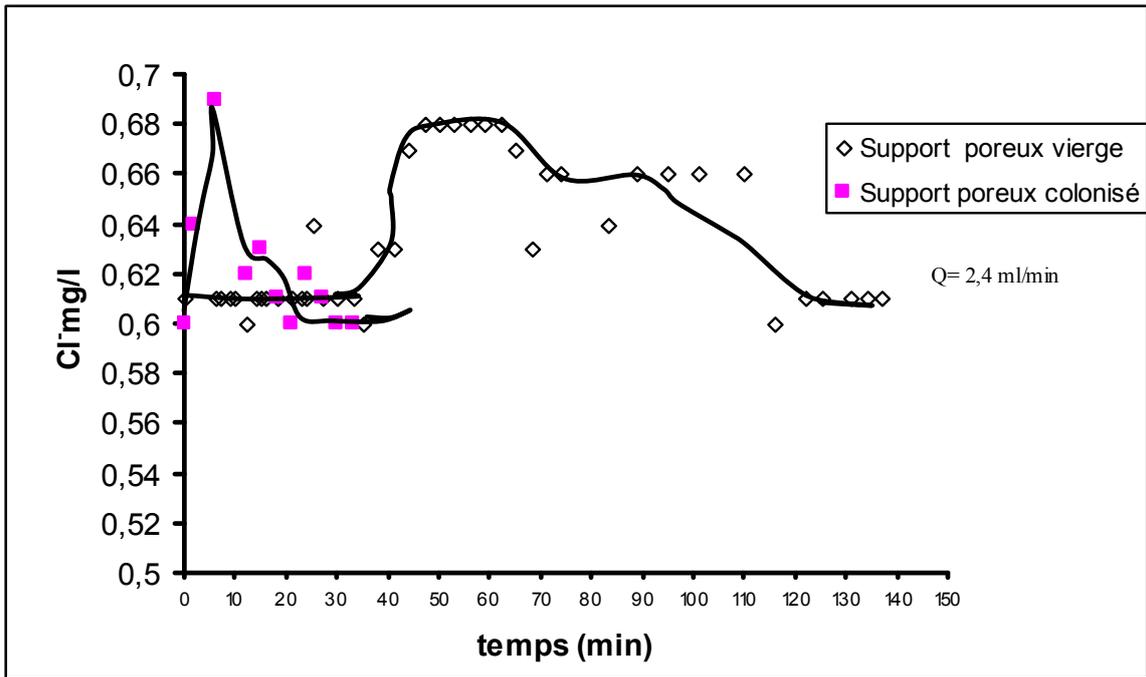


Figure 16 : Traçage dans le réacteur - Comparaison de l'évolution de la concentration en chlorure à la sortie du réacteur garni de support poreux

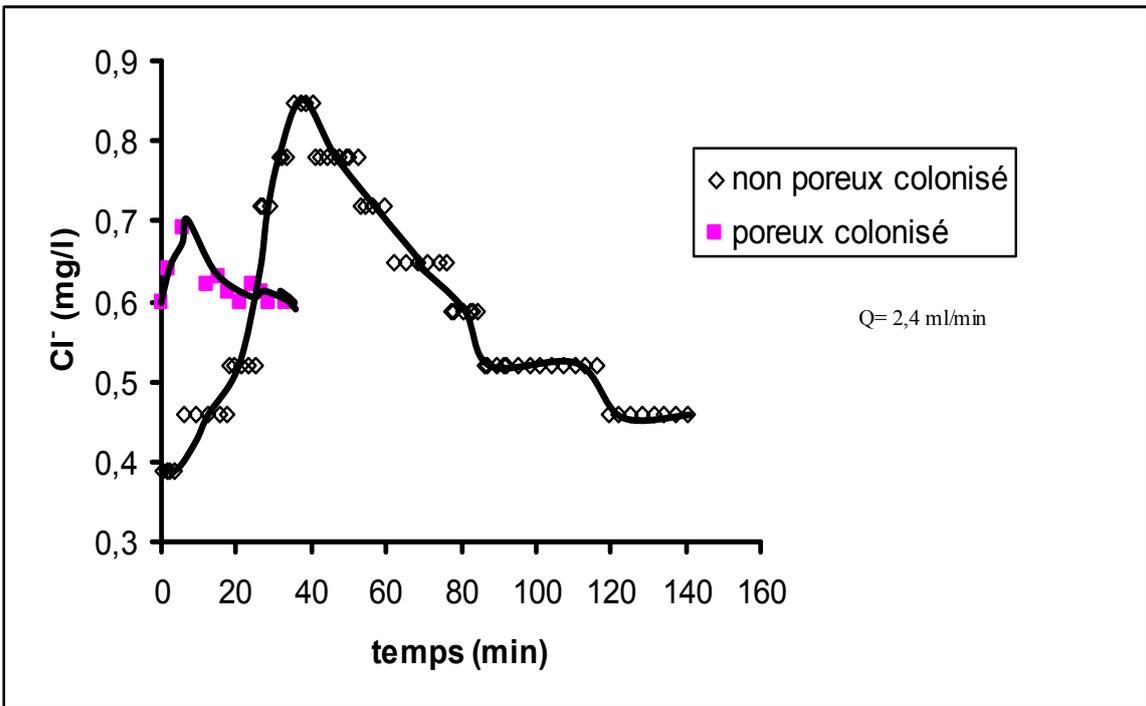


Figure 17 : Traçage dans le réacteur- Comparaison de l'évolution de la concentration en chlorure à la sortie du réacteur pour les deux supports colonisés.

II.2. INFLUENCE DE LA VITESSE DE PASSAGE

La vitesse de passage dans le réacteur est un paramètre important. Il conditionne le fonctionnement d'un procédé de dénitrification biologique à culture fixée. Son rôle a été démontré en faisant percoler le long de la colonne et en flux ascendant, une solution de nitrate à 100mg/l, en appliquant différentes vitesses à savoir : 0,3m/h, 0,45m/h, 0,6m/h, 0,8m/h et 1m/h.

L'influence de ce paramètre sur le déroulement de la réaction de dénitrification à l'intérieur du réacteur, est mise en évidence par le suivi de l'évolution des différents paramètres : nitrate, nitrite, DCO et pH.

II.2.1. Nitrate

Les profils représentés sur les Figures (18 à 22) montrent que l'élimination des nitrates est effectuée d'une manière exponentielle et que le réacteur de dénitrification possède deux phases de fonctionnement (Figure 23 et 24) :

- **La première phase** : elle se situe dans les premiers **30 cm** de colonne 1 (support non poreux) et entre **10 et 20 cm** de la colonne 2 (support poreux). C'est une phase rapide qui se caractérise par l'élimination de plus de **50%** des nitrates présents dans le milieu. Cette phase a également été décrite par Kesseru et *al.*(2003).
- **La deuxième phase** : elle est caractérisée par l'élimination plus lente de la quantité restante de nitrate le long de la colonne (**30-75cm**) de la colonne 1 et (**20-75cm**) de la colonne 2 avec des rendements moyens de **34%** et **15%** respectivement. cette deuxième phase sera caractérisée par la réduction des nitrites (Kesseru et *al.*, 2003).

Ces deux phases peuvent être expliquées par la présence de bactéries dénitrifiantes le long de la colonne selon un profil de forme exponentielle décroissante du bas vers le haut de la colonne. Cette répartition est due au mouvement ascendant de l'effluent qui provoque une proportion bactérienne importante en bas de colonne : Il y a accumulation de la masse bactérienne près de l'alimentation (Martin, 1979 ; Lecloirec, 1983).

En effet, quand l'eau à traiter passe à travers la colonne, les bactéries aéro-anaérobies facultatives consomment l'oxygène de l'eau en premier puis le nitrate. Donc l'excès du substrat carboné permet l'élimination rapide de l'oxygène et une élimination efficace des nitrates. Le nitrate peut diffuser à l'intérieur des couches profondes du biofilm et être transformé dans les zones anoxiques malgré la présence de l'oxygène (Copland, 2002 ; Bougard, 2004).

L'élimination des nitrates obéit à la loi (Yazid, 2000) : $[NO_3]_s = [NO_3]_e e^{-\alpha H}$ (8)

Cette équation nous permet de conclure que plus la hauteur est élevée plus la concentration des nitrates est faible. En général, une hauteur de 1 à 2 m est suffisante pour la dénitrification.

Toutes les vitesses utilisées nous ont permis d'avoir des concentrations de nitrate à la sortie inférieures à la norme. Cependant, nous remarquons une relation inversement proportionnelle à la vitesse de passage ce qui concorde avec les conclusions obtenues par Blecon (1985), Pekdmir (1998) et Chaib (2002) sur du charbon actif.

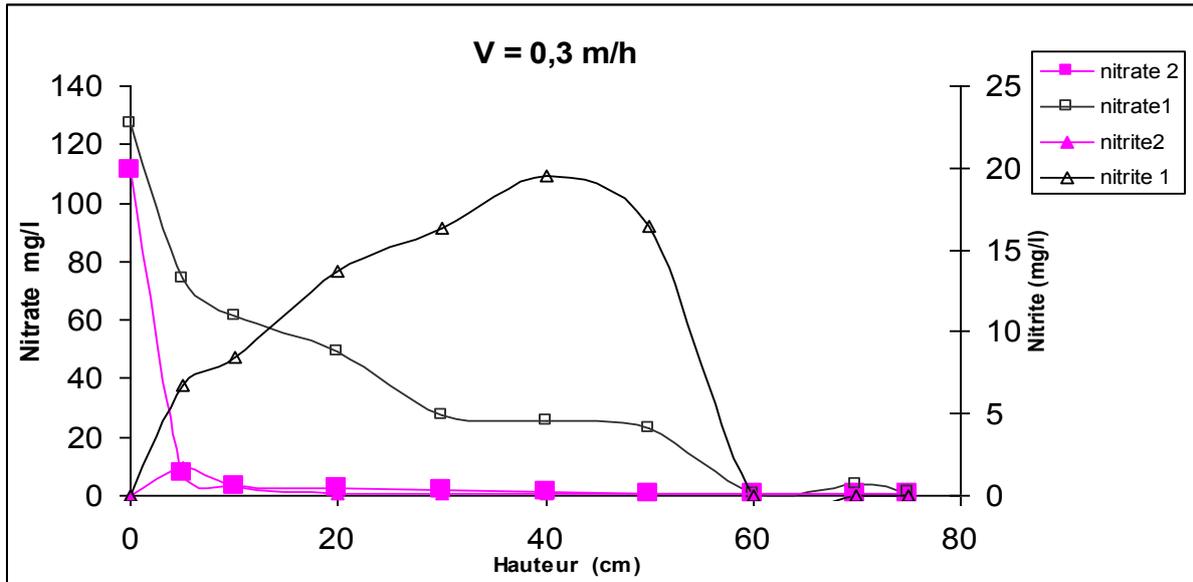


Figure 18 : Evolution des nitrates et nitrites le long de la colonne (1 et 2) à une vitesse $v=0,3m/h$ et à une concentration initiale de nitrate $C_0=100\text{ mg/l}$.

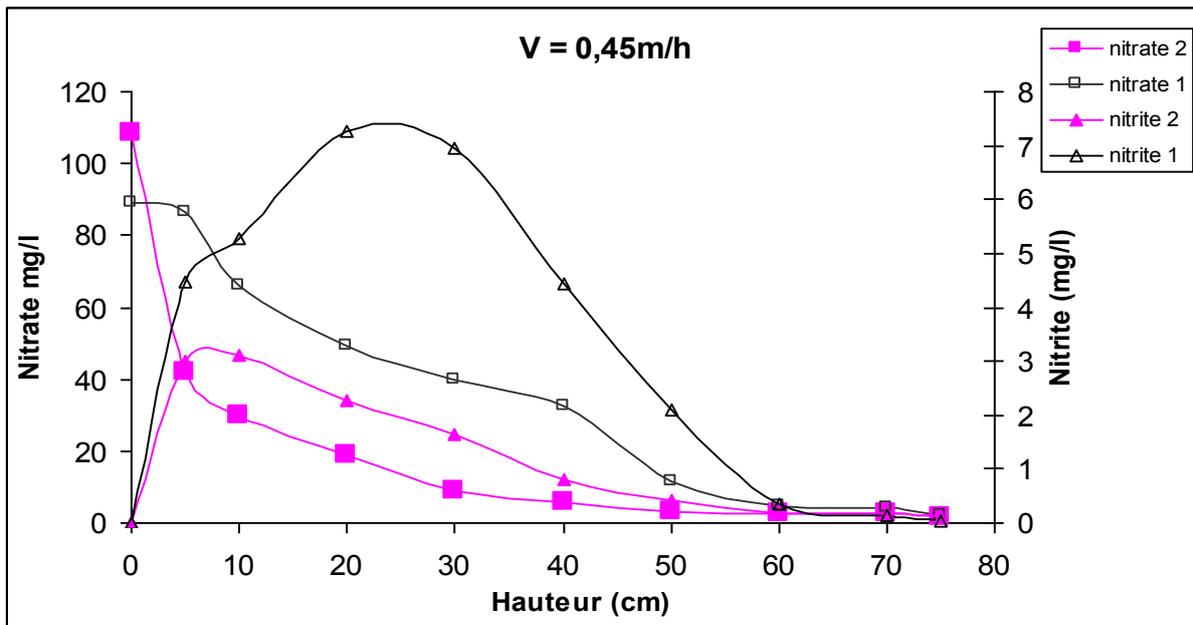


Figure 19 : Evolution des nitrates et nitrites le long de la colonne (1 et 2) à une vitesse $V=0,45m/h$ et à une concentration initiale du nitrate $C_0 = 100\text{ mg/l}$

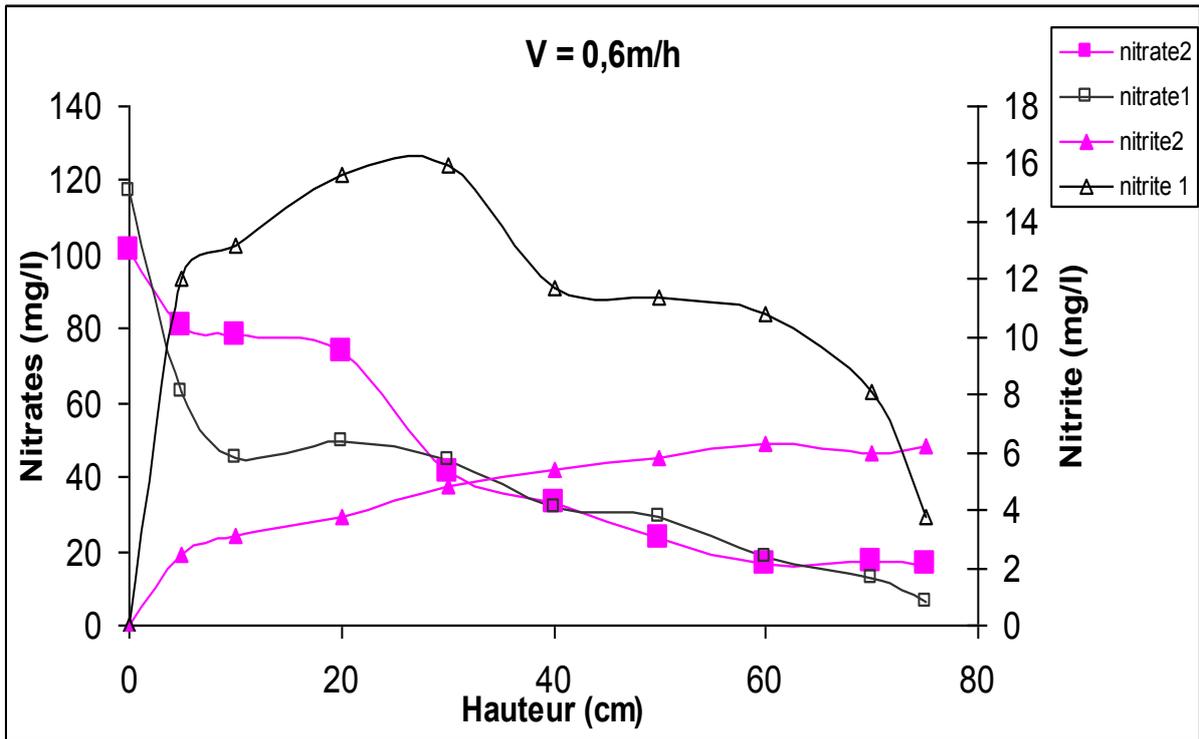


Figure 20 : Evolution des nitrates et nitrites le long de la colonne (1 et 2) à une vitesse $V = 0,6\text{m/h}$ et à une concentration initiale $C_0 = 100\text{mg/l}$

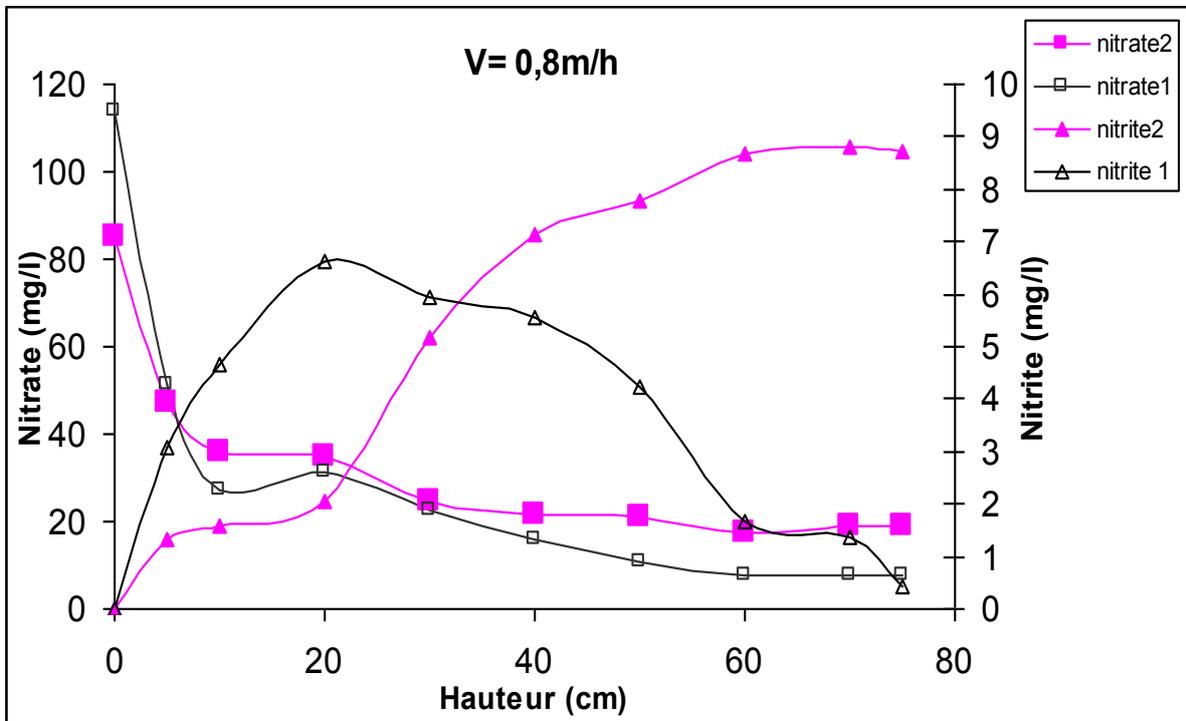


Figure 21 : Evolution des nitrates et nitrites le long de la colonne (1 et 2) à une vitesse $V = 0,8\text{m/h}$ et à une concentration initiale $C_0 = 100\text{mg/l}$

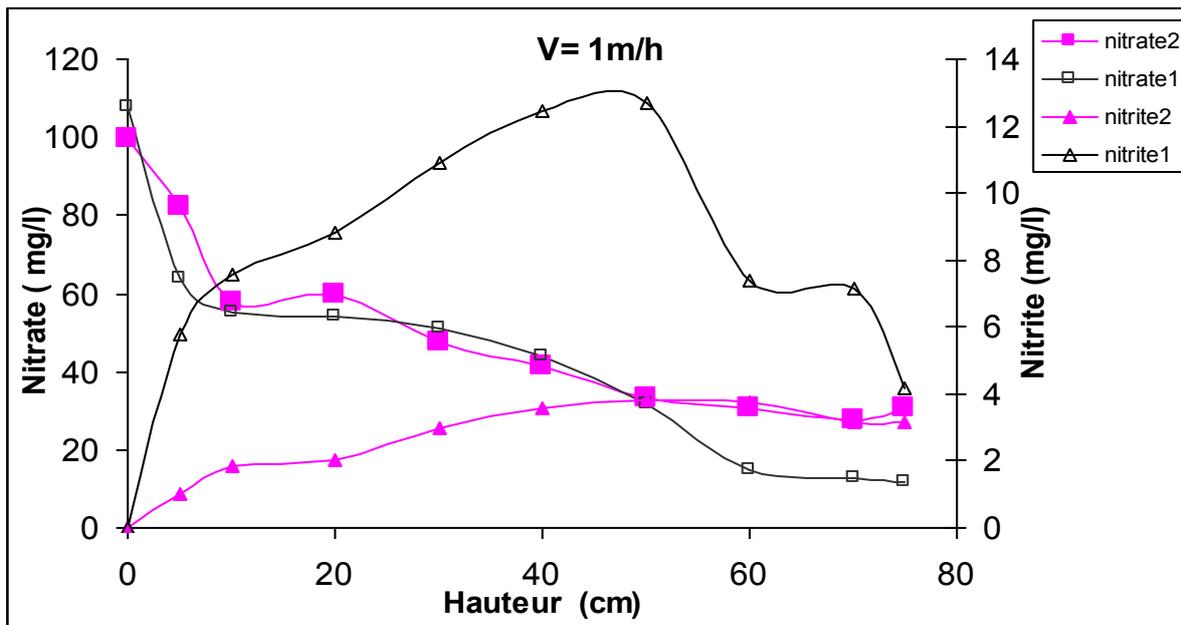


Figure 22 : Evolution des nitrates et nitrites le long de la colonne (1 et 2) à une vitesse de passage $V= 1\text{ m/h}$ et à une concentration initiale $C_0 = 100\text{ mg/l}$

• Comparaison entre les deux supports

Le profil des nitrates est identique dans les deux colonnes. Cependant, nous remarquons que :

- à de faibles vitesses (0,3m/h et 0,45m/h) (Figures 18, 19, 23 et 24), nous obtenons de meilleurs rendements de dénitrification avec le support poreux (colonne 2) et cela dès les dix premiers centimètres.
- à des vitesses plus élevées (0,6 m/h, 0,8 m/h et 1 m/h) (Figures 20,21, 22, 23 et 24), les taux d'élimination des nitrates diminuent dans la colonne 2 par rapport à ceux de la colonne 1.

D'après les résultats représentés sur la Figure 24, nous constatons que la première phase de la colonne 2 (support poreux) est plus active que celle de la colonne 1 (support non poreux). Mais son activité diminue avec l'augmentation de la vitesse. Par contre, la première phase de la colonne 1 présente un rendement moyen (50%) qui n'est pas affecté par l'augmentation de la vitesse.

La deuxième phase de la colonne 1 (support non poreux) présente un rendement légèrement faible par rapport à la 1^{ière} phase (entre 34- 40%) (Figure 24). Ce rendement ne varie pas significativement avec l'augmentation de la vitesse (sauf pour 0.8m/h).

Par contre, le rendement de cette même phase dans la colonne 2 (support poreux) est presque nul à une faible vitesse de passage 0,3m/h. Ce rendement augmente avec

l'augmentation de la vitesse de passage afin de compenser la diminution du rendement dans la 1^{ère} phase sous l'effet de l'augmentation de la vitesse. L'effet de la vitesse de passage sur l'activité du biofilm le long de la colonne devient appréciable au delà d'une valeur de 0,6m/h et le rendement à la sortie diminue pour atteindre les 69% à une vitesse de 1m/h.

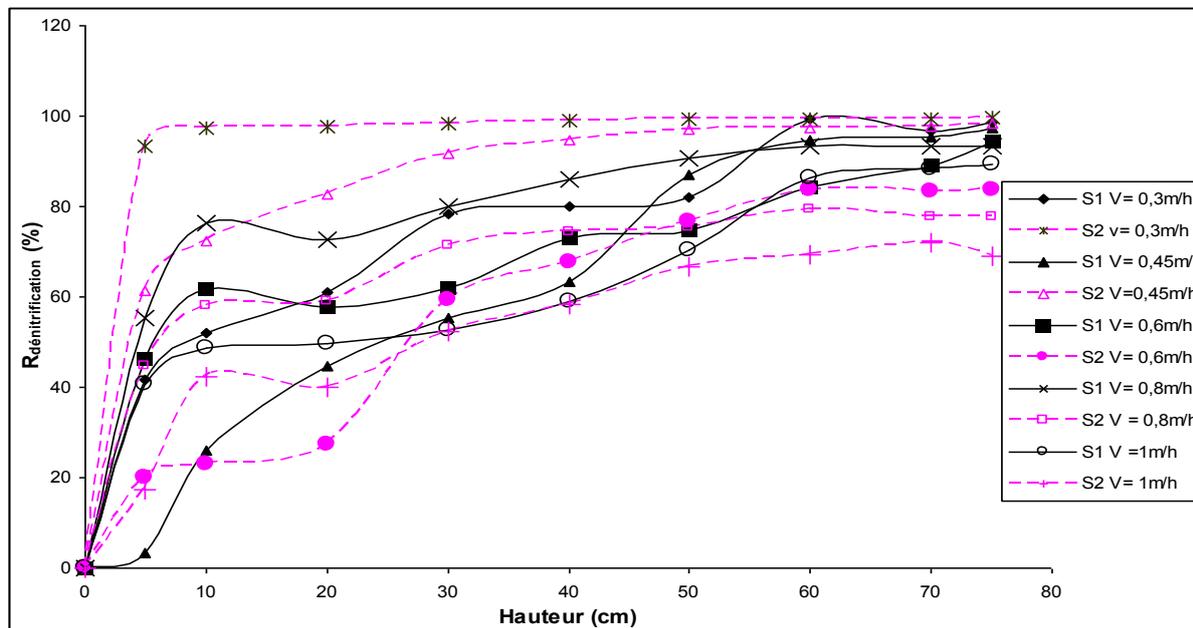


Figure 23 : Variation des rendements de la dénitrification en fonction de la hauteur à différentes vitesses pour le support non poreux (S1) et le support poreux (S2). Pour une concentration initiale de nitrate de 100mg/l

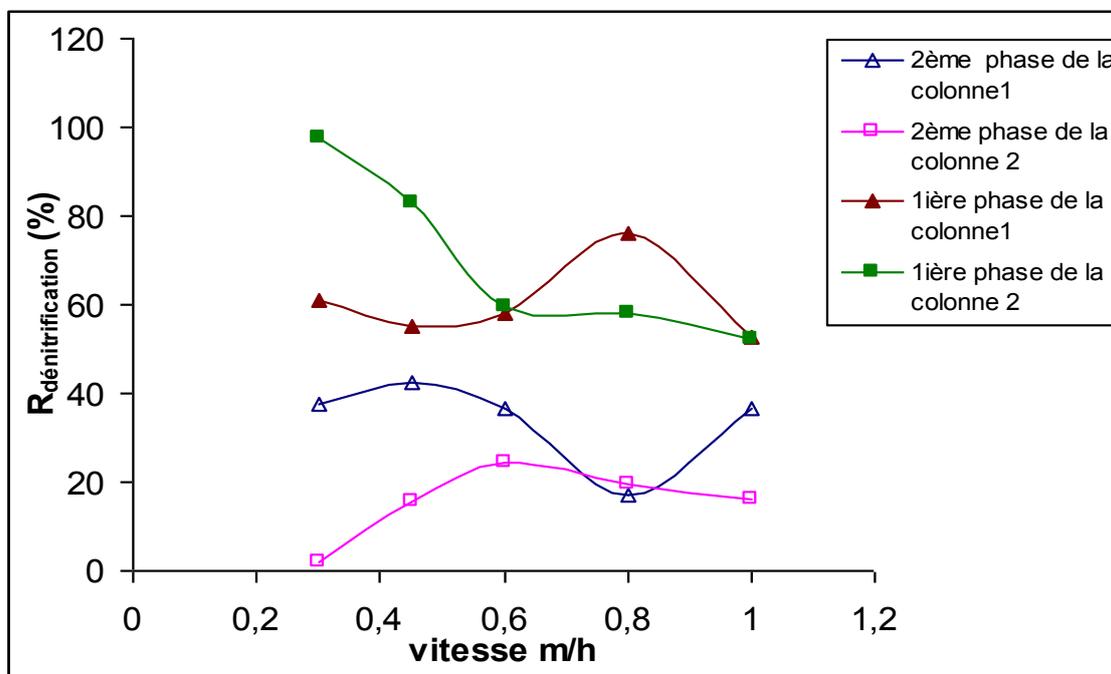


Figure 24 : variation des rendement de la dénitrification en fonction des variations de la vitesse dans les deux phases du réacteur. Pour une concentration initiale $C_0=100\text{mg/l}$
 colonne 1 : support non poreux colonne 2 : support poreux

D'après ces résultats, et sachant que la quantité des nitrates réduits est proportionnelle à la hauteur du lit, à la concentration en biomasse active dans le lit et à l'inverse de la vitesse de filtration (Hashlay & Leclerc, 1993), nous suggérons que l'activité bactérienne du biofilm de la colonne 2 (support poreux) est faible par rapport à celle de la colonne 1 (support non poreux). En effet, la céramique poreuse, comme tout support poreux permet une colonisation plus rapide. Cependant, cette grande rétention de biomasse engendre également des problèmes de diffusion des éléments nutritifs. La partie active du biofilm en surface recouvre une zone non active de biomasse, ce qui tend à baisser l'activité spécifique du biofilm qui peut aller jusqu'à 50% dans le cas des support poreux (Alves et al., 1999 ; Michaud, 2001 ; Mao, 2003). Afin d'éviter ce problème il serait judicieux d'utiliser une autre source de carbone moins facile à métaboliser que les sucres (lactose) tel que l'éthanol, méthanol ou autres qui conduit à la formation d'une faible quantité de biomasse (Roque, 1980).

La vitesse de passage détermine le rendement cellulaire et la densité du biofilm ; c'est-à-dire la résistance vis-à-vis des forces de détachement (Michaud, 2001). Dans notre étude nous remarquons que le support poreux (colonne 2) est plus sensible à l'augmentation de la vitesse que le support non poreux (colonne 1). Ceci peut-être dû à l'épaisseur du biofilm. En effet, au-delà d'une épaisseur optimale effective qui est de 100 à 400 µm pour les biofilms dénitrifiants, les cinétiques de dégradation ainsi que la production des enzymes intervenants dans la synthèse des exopolymères nécessaires à l'attachement microbien baissent (Van Loodsrecht & Heijnen, 1993 ; Michaud, 2001).

Il est à signaler que lorsque nous avons appliqué au niveau de la colonne 2 (support poreux), une forte vitesse (1m/h), nous avons observé des flocs bactériens dans les échantillons prélevés. Ce qui est peut-être attribué aux phénomènes d'**érosion** et de **desquamation** : c'est la perte rapide et massive du biofilm. Elle a lieu surtout avec des biofilms épais lors de changement environnementaux comme la diminution de la charge ou la mort des cellules internes conduisant à une rupture de la liaison solide-biofilm. Une augmentation du contenu relatif en protéines dans la matrice favoriserait le détachement. Ce comportement aurait été observé pour des flocs de boues activées, ou le changement dans la quantité de protéines serait apparenté à la désintégration des flocs (Van Loodsrecht & Heijnen, 1996 ; Nielsen et al., 1997 ; Nicoletta et al., 2000). Cette hypothèse est étayée par la chute de l'activité bactérienne dans la suite des essais (moins de 30%) et l'absence de la moindre turbidité dans les prélèvements à partir de 10 cm. A partir de ces observations, nous avons jugé nécessaire de recoloniser la colonne 2.

• **Conclusion**

Le paramètre vitesse influe d’une manière inversement proportionnelle sur le rendement de la dénitrification en cultures fixées, ceci a été démontré par Pekdmir (1998) et Yazid (2000).

Le support non poreux présente une bonne résistance à toutes les vitesses de passage avec un bon rendement. Alors que le support poreux présente un biofilm très sensible à l’augmentation de la vitesse et il est sujet d’érosion. Ces résultats sont imputés aux caractéristiques du support à savoir :

- la grande porosité qui engendre un biofilm épais (Alves et al., 1999).
- la nature chimique : probablement l’absence de l’alumine et des ions cationiques qui favorisent la fixation bactérienne (Assanta, 2001, Michaud, 2001).
- un temps de séjour court (Ménoret, 2001).
- une faible surface de colonisation (Michaud, 2001)
- le support s’effrite facilement en présence de l’eau. Les cristaux se détachent entraînant une partie du biofilm.

II.2.2. Nitrite

Le profil des nitrites le long de la colonne (Figure 18 à 22 et 25) montre que ces derniers apparaissent et leur teneur augmente pour atteindre un pic, puis elle diminue pour atteindre des valeurs proches du zéro à la sortie de la colonne. Ceci est expliqué par le fait que les nitrites représentent l’étape intermédiaire de la réduction des nitrates en azote gazeux selon la relation (Bougard, 2004 ; Copland, 2002) :



La concentration des nitrites à la sortie de la colonne dépend de la hauteur de cette dernière et de la charge hydraulique appliquée (Blecon, 1985). Plus la vitesse est élevée, plus on a des nitrites à la sortie. Ceci est inhérent au temps de contact qui demeure insuffisant pour éliminer tous les nitrites. A de faibles vitesses (0,3m/h et 0,45m/h), on obtient des valeurs de nitrites égales ou en dessous de la norme. Par contre, pour des vitesses supérieures ou égales à 0,6m/h, nous obtenons des valeurs de nitrites au dessus des normes.

• **Comparaison entre les deux supports**

D’après les courbes représentées sur les Figures (18 à 22 et 25), nous observons que dans la colonne 1 (support non poreux) nous obtenons une grande production de nitrites par rapport à la colonne 2 (support poreux).

- A de faibles vitesses (0,3m/h et 0,45m/h) nous avons un pic de nitrite assez important dans la colonne 1 (support non poreux) puis une baisse afin de l'éliminer à la sortie. Par contre, pour la colonne 2 (support poreux), nous avons un faible pic de nitrite qui apparaît et il est éliminé dans les premiers 40 cm pour la vitesse de 0,3m/h et dans les 60cm pour la vitesse de 0,45m/h.
- Donc nous estimons qu'à de faibles vitesses, le support poreux présente de meilleures capacités de dénitrification et d'élimination des nitrites cela est dû à sa nature poreuse.
- A des vitesses plus élevées (0,6m/h, 0,8m/h, 1 m/h), nous observons des pics importants de nitrites dans la colonne 1 (support non poreux). Ceux-ci ne sont pas complètement éliminés à la sortie. Dans ce cas nous suggérons d'augmenter un peu plus la hauteur. Par contre, pour la colonne 2 (support poreux), nous remarquons que nous atteignons les pics de nitrite à la sortie du réacteur. Ceci pourrait être attribué à une faible activité bactérienne dans la colonne 2. Cette dernière serait dû à la porosité du support qui engendre la formation d'un biofilm épais sensible à l'augmentation de la vitesse (Michaud, 2001), à la composition chimique de la céramique poreuse (Assanta, 2001) et à son frittage.

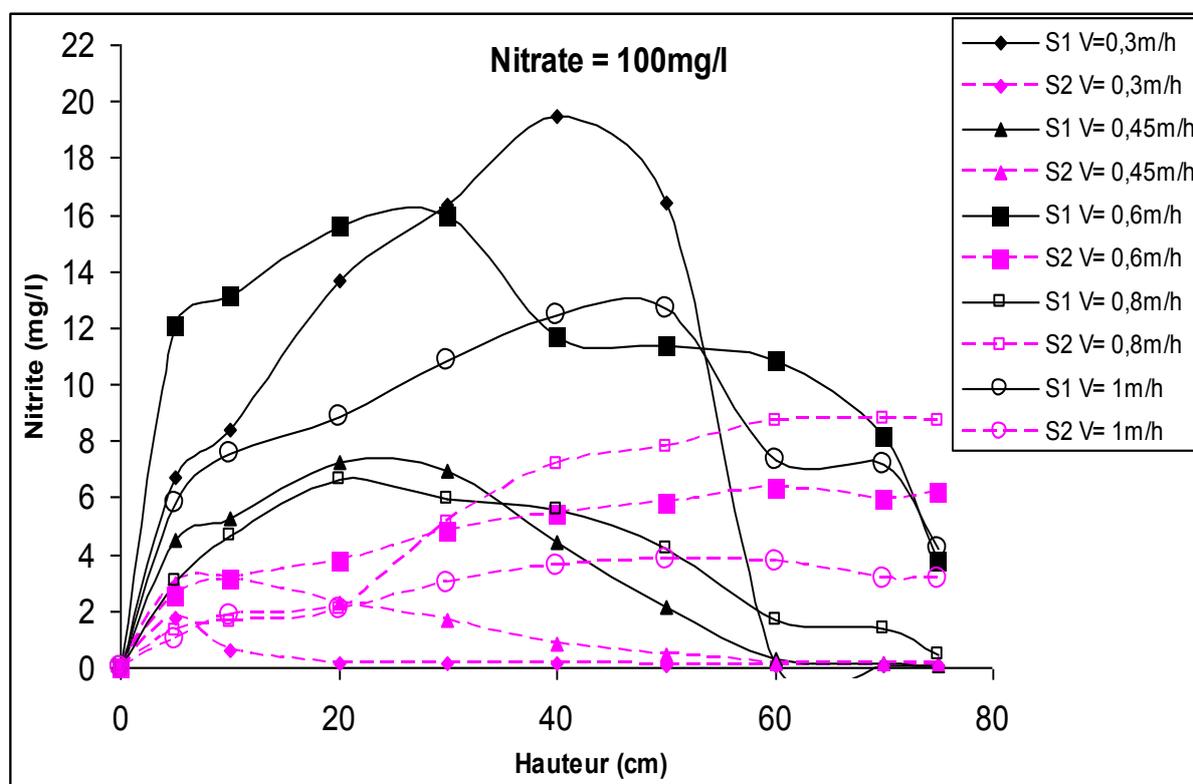


Figure 25 : Profils de l'évolution des nitrites à différentes vitesses dans la colonne 1 (S1) (support non poreux) et la colonne 2 (S2) (support poreux). Pour une concentration initiale $C_0=100\text{mg/l}$

II.2.3. Demande Chimique d'Oxygène (DCO)

Nous remarquons un profil d'abattement de la DCO identique à celui obtenu pour l'abattement des nitrates (Martin, 1979). Cet abattement traduit la consommation du substrat carboné (lactose) par la biomasse dénitrifiante.

D'après les Figures (26 à 28), nous avons une relation inversement proportionnelle entre l'abattement de la DCO et l'augmentation de la vitesse de passage. Ceci pourrait nous renseigner sur l'état de l'activité bactérienne sous l'influence des différentes vitesses, comme il peut expliquer la diminution du rendement de la dénitrification. En effet, si moins de substrats (donneur d'électron) sont consommés il y aura moins d'accepteurs finaux (NO_3) utilisés. Ce qui entraîne un faible rendement de dénitrification.

L'élimination de la DCO est faible dans la colonne 2 (support poreux) surtout lors de l'utilisation de grandes vitesses. Ceci est en corrélation avec les rendements de dénitrification obtenus et qui confirment que plus la vitesse est élevée, plus l'activité du bio film diminue.

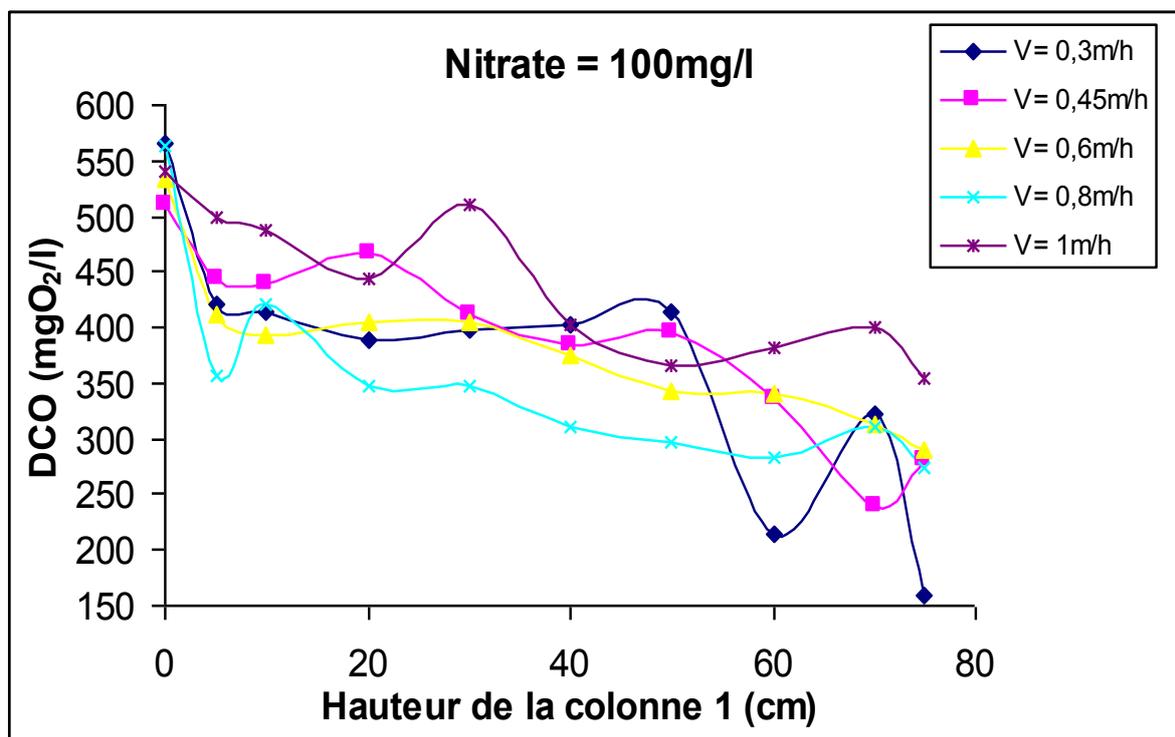


Figure 26 : Evolution de la DCO en fonction de la hauteur dans la colonne 1(support non poreux) pour différentes vitesses de passage

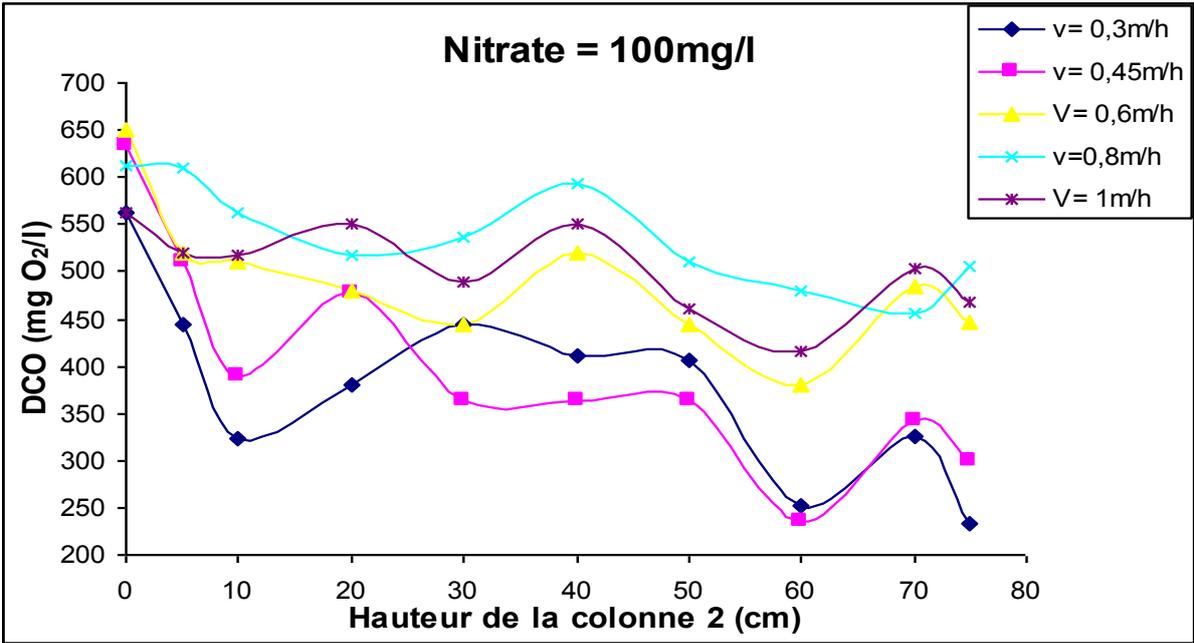


Figure 27 : Evolution de la DCO en fonction de la hauteur dans la colonne 2 (support poreux) pour différents vitesses de passage

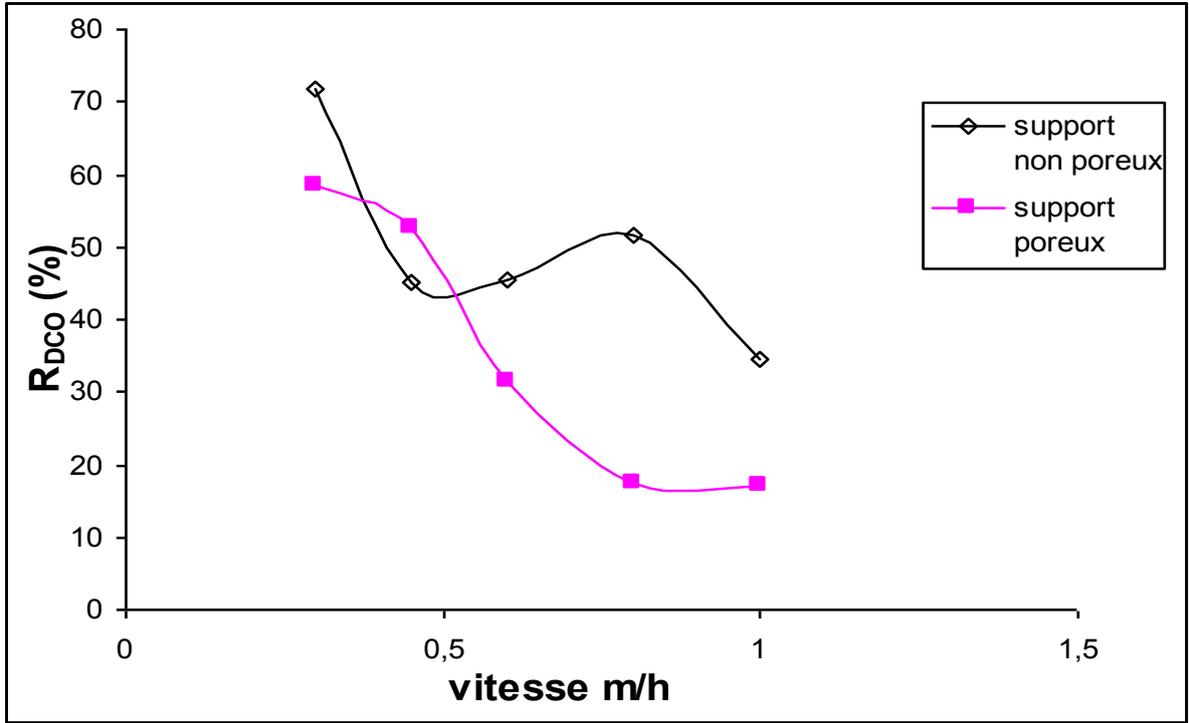


Figure 28 : Rendement de l'élimination de la DCO en fonction de la vitesse de passage dans la colonne 1(support non poreux) et la colonne 2 (support poreux)

II.2.4. Le pH

L'évolution du pH en fonction de la hauteur (Figure 29) montre des fluctuations. Elles sont dues à une acidification du milieu lors de l'apparition des nitrites. Lors de la disparition de ces derniers, une augmentation du pH est observée à la sortie de la colonne. Ceci est expliqué par le fait que la dénitrification hétérotrophe fait augmenter le pH (Bougard, 2004). En effet, la dénitrification tend à diminuer le pH et la dénitrification le fait augmenter (Nuttall et al., 2003).

Cependant, il est à signaler que toutes ces fluctuations se situent dans une gamme de pH de [6-8] qui est une gamme optimale de la réduction des nitrates (Gaïd, 1981). Donc nous n'avons pas eu à intervenir sur ce paramètre.

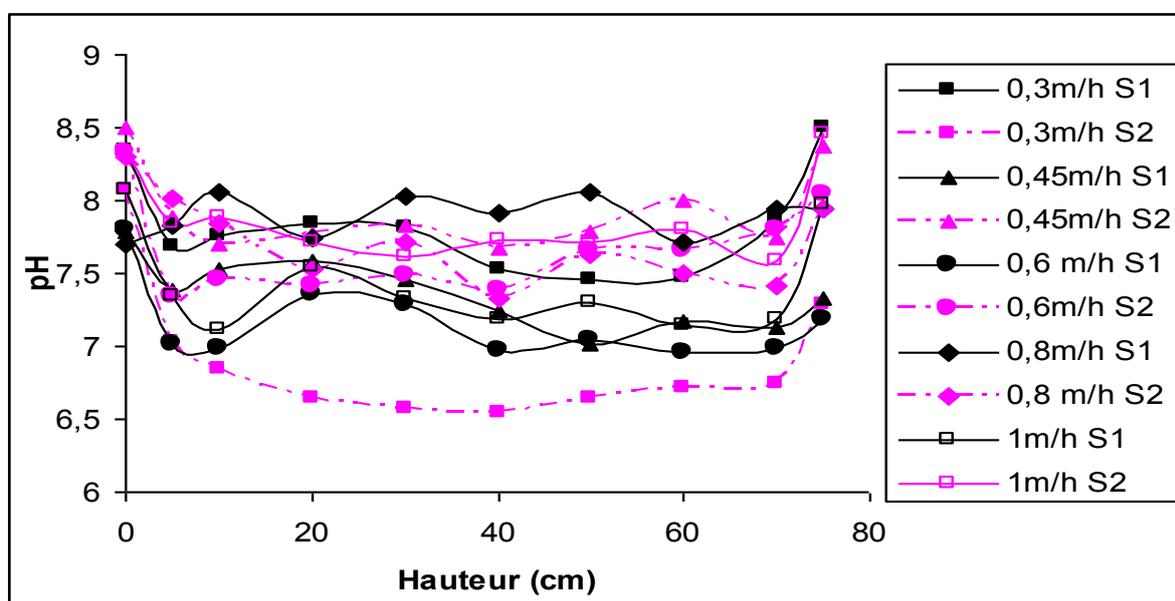


Figure 29 : Evolution du pH en fonction de la hauteur de la colonne à différentes vitesses de passage
 Pour une concentration initiale $C_0 = 100\text{mg/l}$ S1 : colonne 1(support non poreux)
 S2 : colonne 2 (support poreux)

II.2.5. Conclusion

L'étude de l'influence du paramètre vitesse de passage nous a permis de conclure que :

- les meilleurs rendements de dénitrification sont obtenus avec les faibles vitesses (0,3m/h et 0,45m/h) pour les deux supports ;
- A de faibles vitesses le support poreux (colonne 2) présente les meilleurs rendements d'élimination de nitrates et nitrites. Ceci est dû à sa surface poreuse qui permet la rétention rapide des bactéries. Cependant, à des vitesses élevées, le support poreux perd significativement sa capacité à dénitrifier, car il devient moins résistant aux « forces de détachement ». Ce qui serait dû à sa forte porosité, son frittage, le court temps de séjour et

sa nature chimique (moins d'alumine qui favorise l'adhésion au support) ainsi qu'à la faible surface de contact offerte.

- Le support non poreux présente une bonne résistance à l'augmentation de la vitesse. Il reste à résoudre le problème des nitrites par l'augmentation de la hauteur.

D'un point de vue pratique, la plus grande vitesse donnant le meilleur rendement est la plus simple à mettre en œuvre. Ce qui nous conduit à choisir la vitesse de **0,45m/h** comme une vitesse utilisée pour les deux supports.

II.3. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION INITIALE DES NITRATES

Notre travail consiste à traiter une eau fortement chargée en nitrates issue du compartiment concentrât d'une unité d'électrodialyse. Afin d'étudier l'influence de la charge volumique sur le processus de dénitrification le long de la colonne, nous avons utilisé des solutions de 100mg/l, 200mg/l, 300mg/l, 400mg/l et 550mg/l avec une vitesse de passage de 0,45m/h.

II.3.1. Nitrate

Les résultats représentés sur les Figures (30 à 34) montrent que les nitrates décroissent d'une manière exponentielle (Martin, 1979). La moitié de la charge est éliminée dans les premiers **20 cm**. (Figure 35). Cependant, nous remarquons que plus la charge est élevée plus la hauteur nécessaire pour atteindre la norme est élevée.

Une faible influence de la concentration initiale sur l'élimination des nitrates est constatée. En effet les bactéries éliminent le maximum de nitrates en raison de la faible vitesse de passage (Yazid, 2000). Les observations concordent avec celles obtenues sur du charbon actif par Pekdmir (1998) et Chaib (2002).

II.3.2. Nitrite

- A une vitesse optimale de 0,45m/h, tous les profils de nitrites sont caractérisés par l'apparition d'un pic et son atténuation à la sortie de la colonne (Figure 30 à 34 et 36).
 - La colonne 2 (matériaux poreux) présente à la sortie des concentrations en nitrites inférieures à la norme pour une concentration initiale de 100mg/l et 200mg/l.
 - La colonne 1 (matériaux non poreux) présente à la sortie des valeurs de nitrites supérieures à la norme pour des concentrations initiales de nitrate supérieures à 100mg/l.
- Ces résultats peuvent être expliqués par la hauteur non suffisante des deux colonnes.

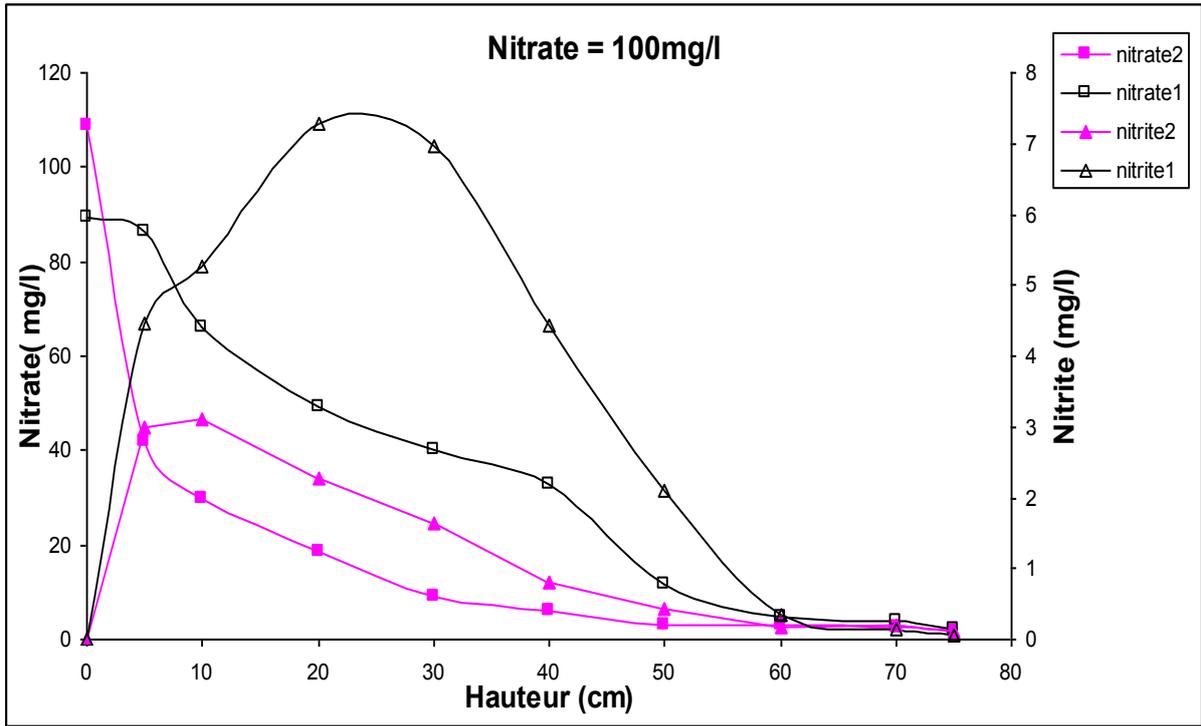


Figure 30 : Evolution de la concentration des nitrates et nitrites le long de la colonne (1et 2) à $V=0,45\text{m/h}$ et $C_0=100\text{mg/l}$.

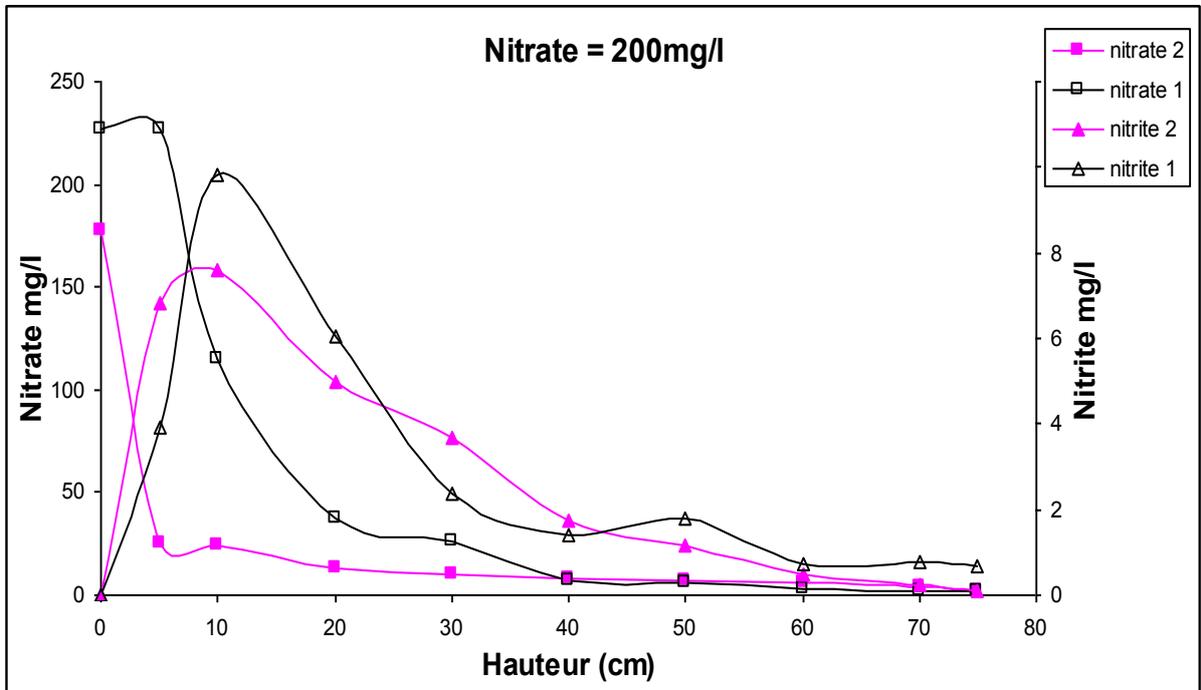


Figure 31 : Evolution de la concentration des nitrates et nitrites le long de la colonne (1 et 2) à $V=0,45\text{m/h}$ et $C_0=200\text{mg/l}$.

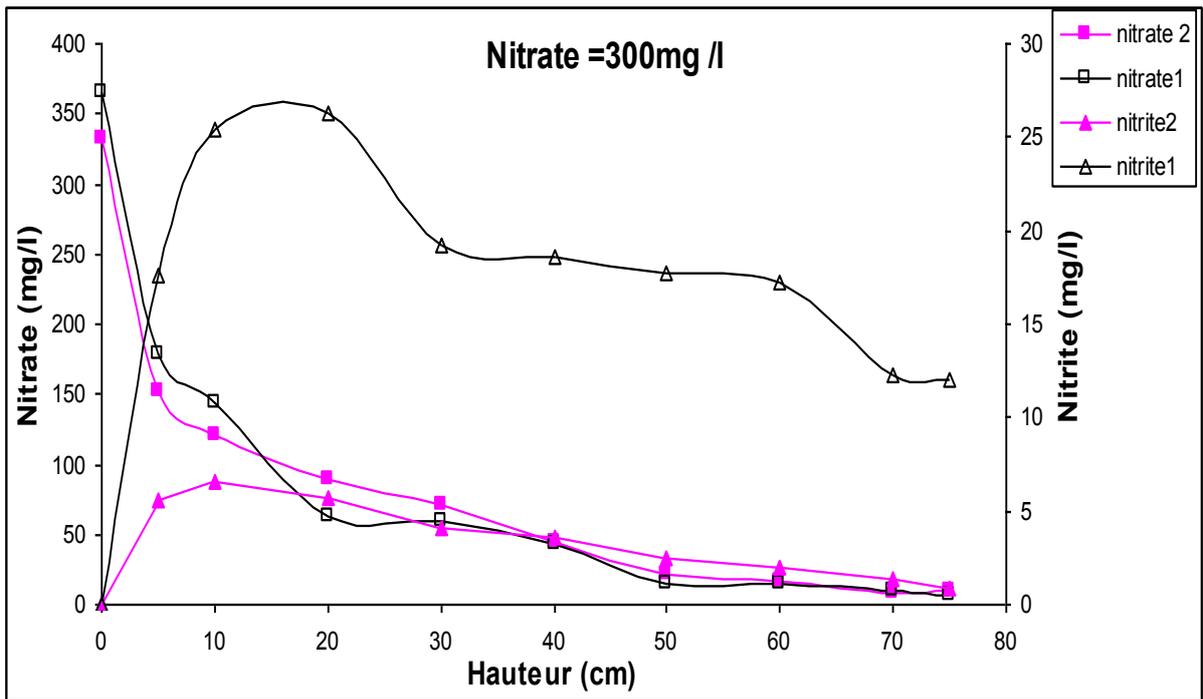


Figure 32 : Evolution de la concentration des nitrates et nitrites le long de la colonne (1et 2) à $V= 0,45\text{m/h}$ et $C_0= 300\text{mg/l}$.

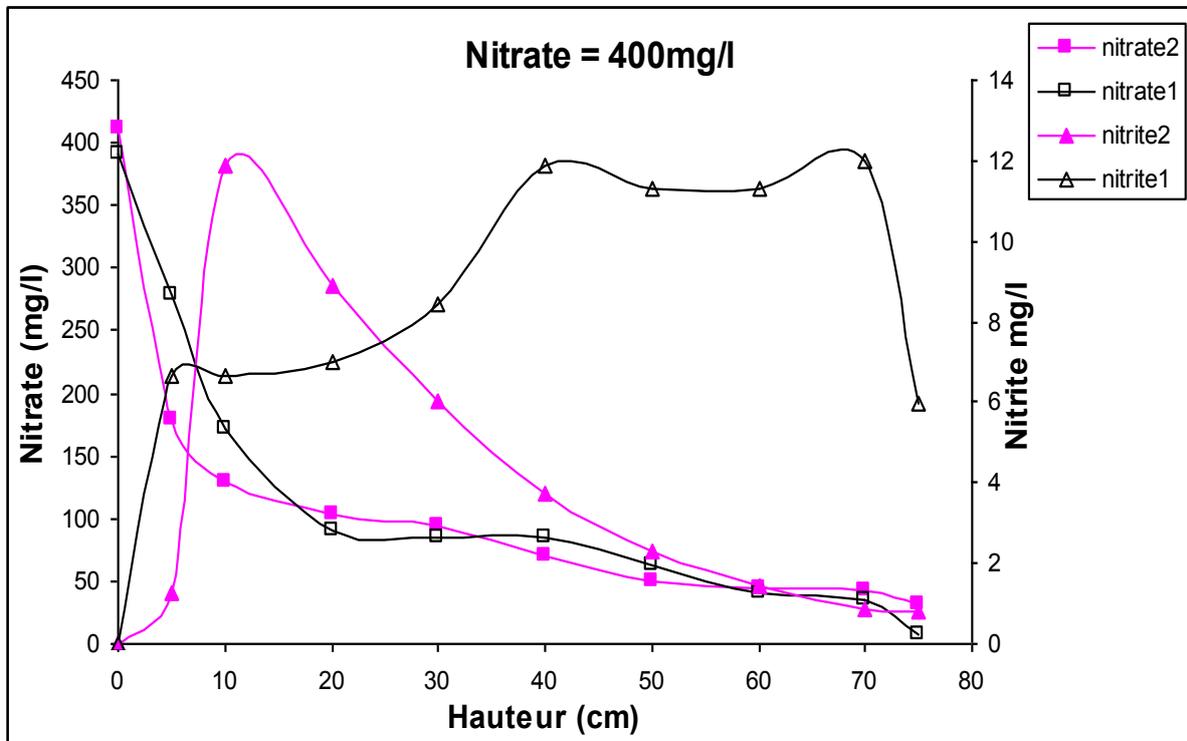


Figure 33 : Evolution de la concentration des nitrates et nitrites le long de la colonne (1 et 2) à $V= 0,45\text{m/h}$ et $C_0= 400\text{mg/l}$.

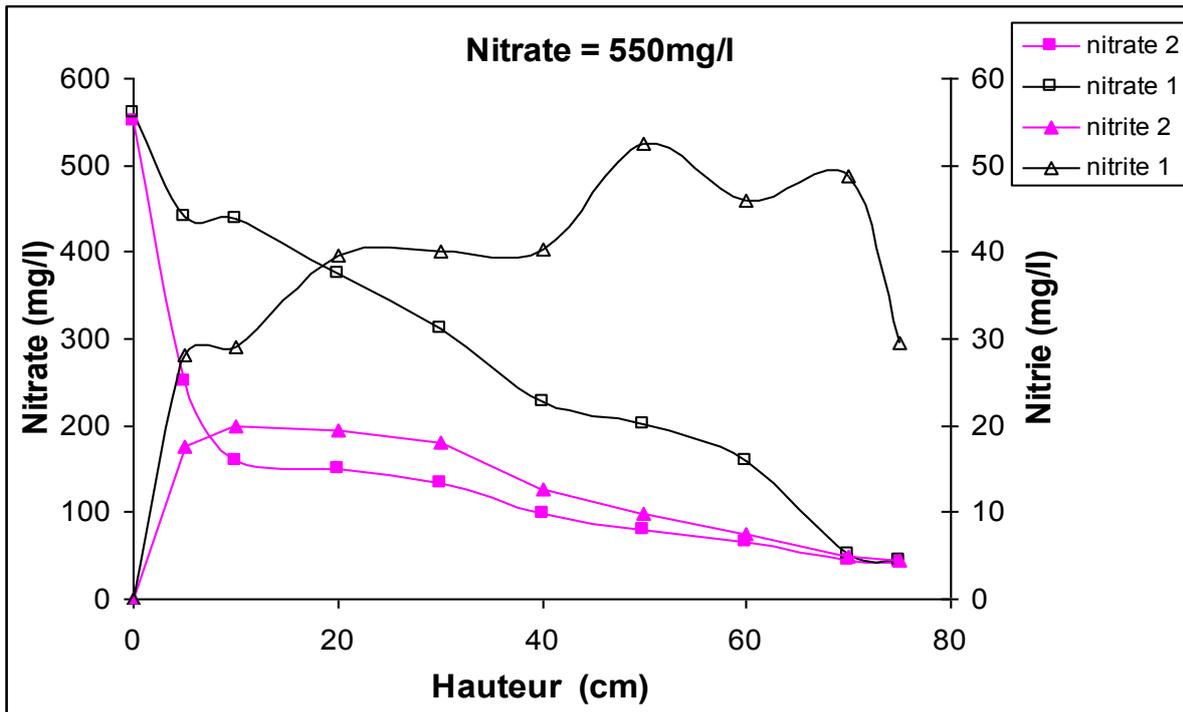


Figure 34 : Evolution de la concentration des nitrates et nitrites le long de la colonne (let 2) à $V=0,45\text{m/h}$ et $C_0=550\text{mg/l}$

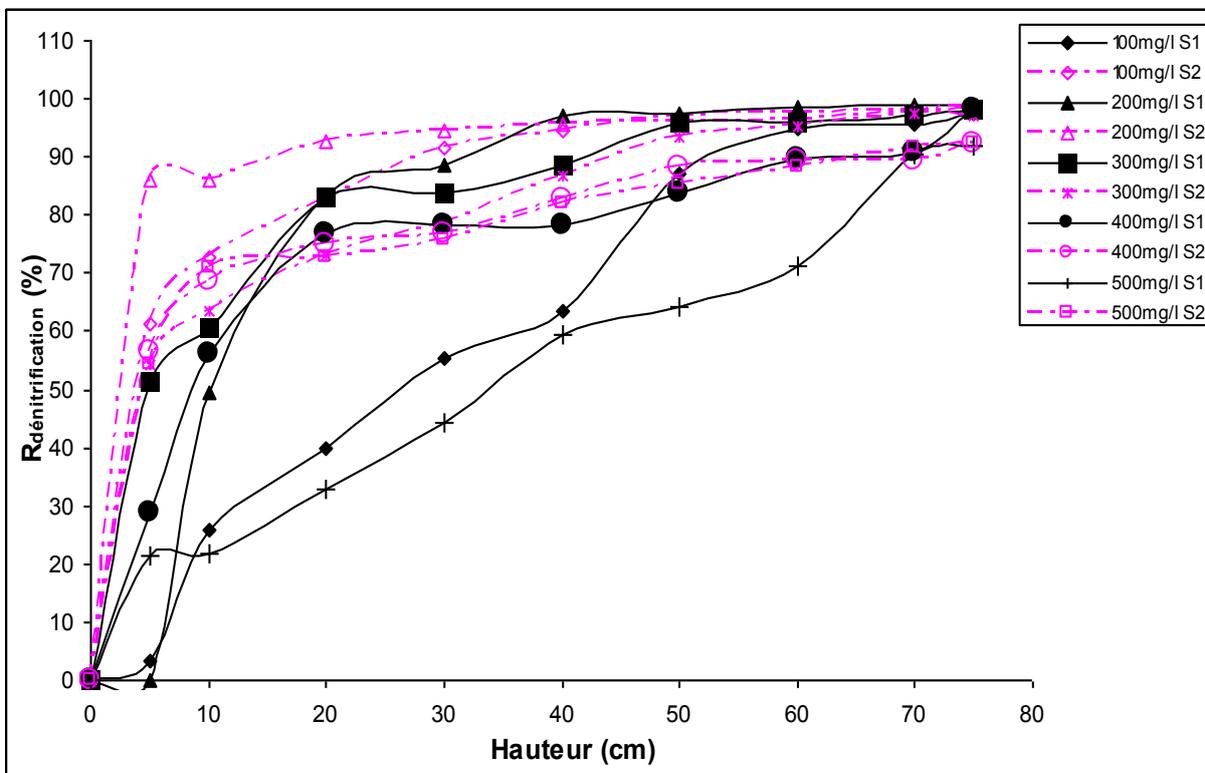


Figure 35 : Evolution des rendements de la dénitrification en fonction de la hauteur à différentes concentrations et à une vitesse $V=0,45\text{m/h}$. S1 : support non poreux S2 : support poreux

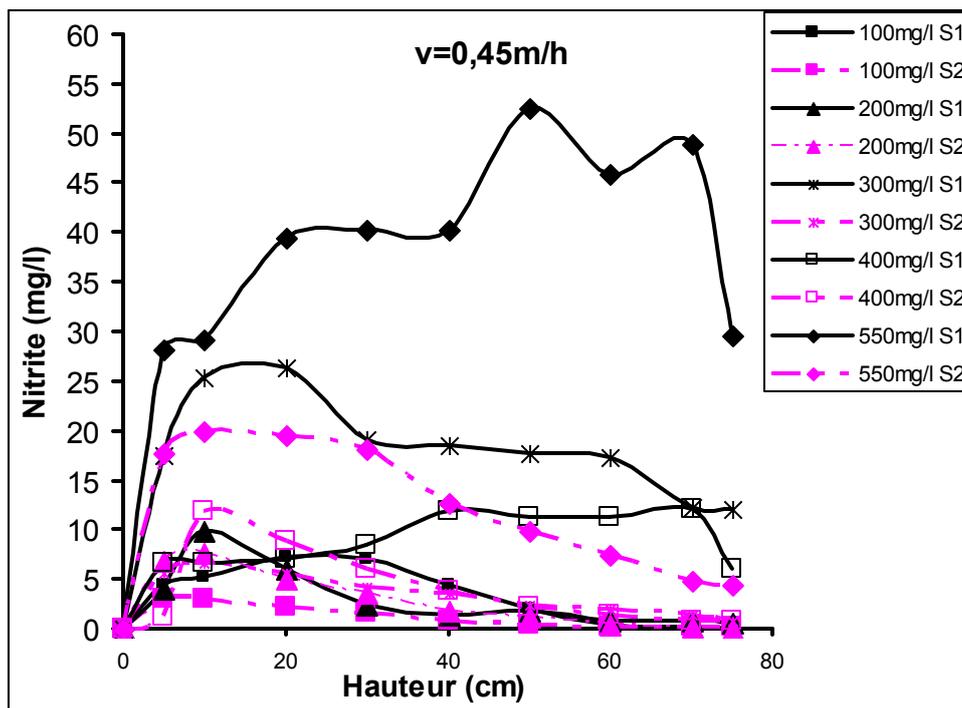


Figure 36: Evolution des nitrites le long de la colonne pour différentes concentrations initiales de nitrate pour les deux supports. S1= support non poreux S2= Support poreux

II.3.3. Demande Chimique d'Oxygène (DCO)

Le substrat carboné est consommé le long de la colonne, de la même manière que les nitrates (Figure 37 à 39), ce qui correspond aux données de la littérature (Martin, 1979). Cependant, nous remarquons que dans le cas du support non poreux, Le profil du rendement de l'élimination de la DCO en fonction de la concentration initiale de nitrate est pratiquement identique à celui du rendement de la dénitrification. Par contre, dans le cas du support poreux, nous observons une augmentation du rendement de l'élimination de la DCO en fonction de la concentration initiale des nitrates alors que le rendement de dénitrification dans ce cas est constant. Ceci serait dû à l'utilisation du substrat carboné (lactose) pour la synthèse cellulaire (Michaud, 2001).

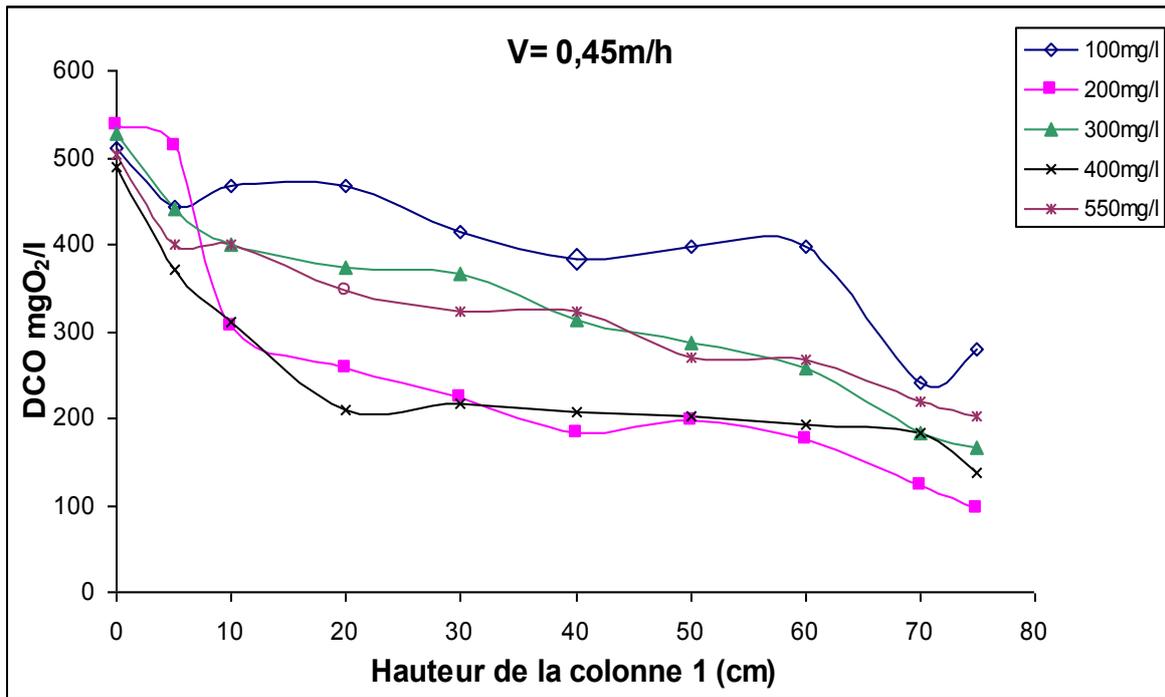


Figure 37 : Evolution de la DCO en fonction de la hauteur dans la colonne 1 (support non poreux) pour différentes concentrations

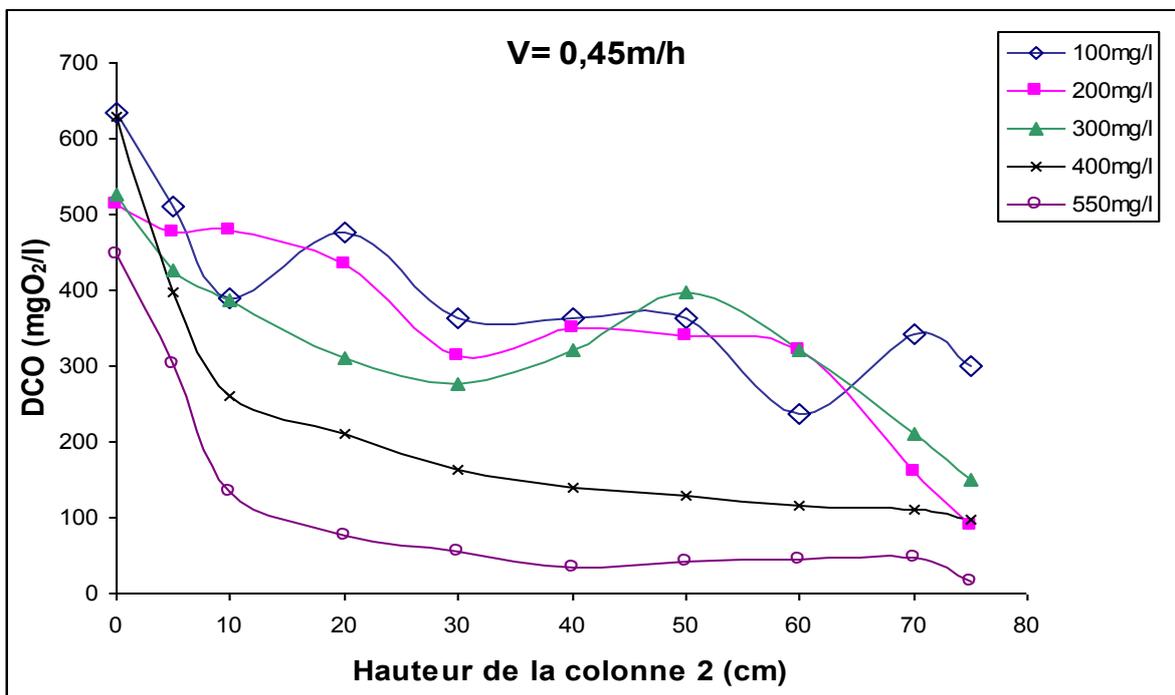


Figure 38 : Evolution de la DCO en fonction de la hauteur dans la colonne 2 (support poreux) pour différentes concentrations

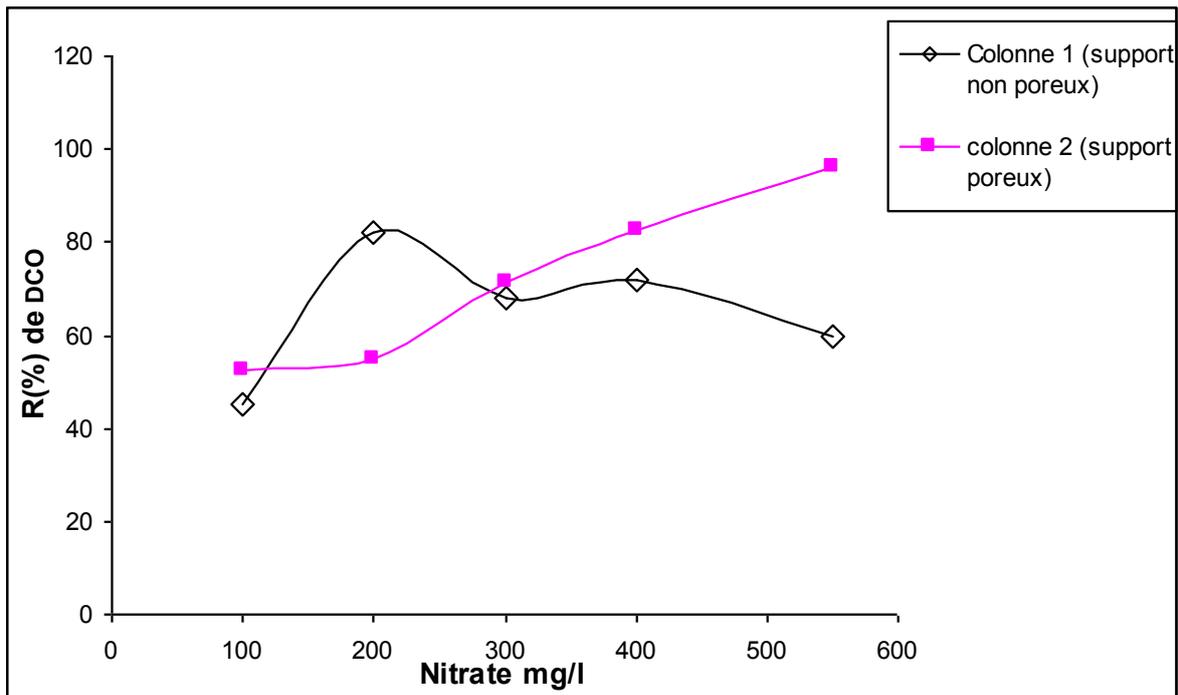


Figure 39 : Rendement de l'élimination de la DCO en fonction de la concentration initiale de nitrate dans la colonne 1(support non poreux) et la colonne 2 (support poreux)

II.4. INFLUENCE DE LA VITESSE DE PASSAGE SUR LE RENDEMENT DE LA DENITRIFICATION

L'influence de la vitesse de passage sur le rendement de la dénitrification est déterminée en utilisant des vitesses de (0,3m/h - 1m/h). Les résultats représentés sur la Figure 40 montrent que :

- Le rendement de dénitrification est inversement proportionnel à la vitesse de passage ; donc lié au temps de contact dans la colonne. Ce résultat est en accord avec les données de la littérature (Hashlay & Leclerc, 1993) ; Ces deux paramètres (vitesse de passage et temps de contact) jouent un rôle important dans la réalisation d'une réaction complète de dénitrification au sein du réacteur biologique (Yazid, 2000 ; Menoret, 2001)
- Les rendements maxima sont de 98,7% et 99,6% respectivement pour le support non poreux et le support poreux à une vitesse de 0,3m/h.
- Les rendements de dénitrification obtenus dans la colonne 1 (support non poreux) sont compris entre (89,2% - 98,7%).

- La colonne 2 (support poreux) donne de meilleurs rendements à de faibles vitesses ; 99,6% et 98,4% pour 0,3m/h et 0,45m/h respectivement. Ces rendements diminuent avec l'augmentation de la vitesse pour atteindre 69% pour une vitesse de 1 m/h.

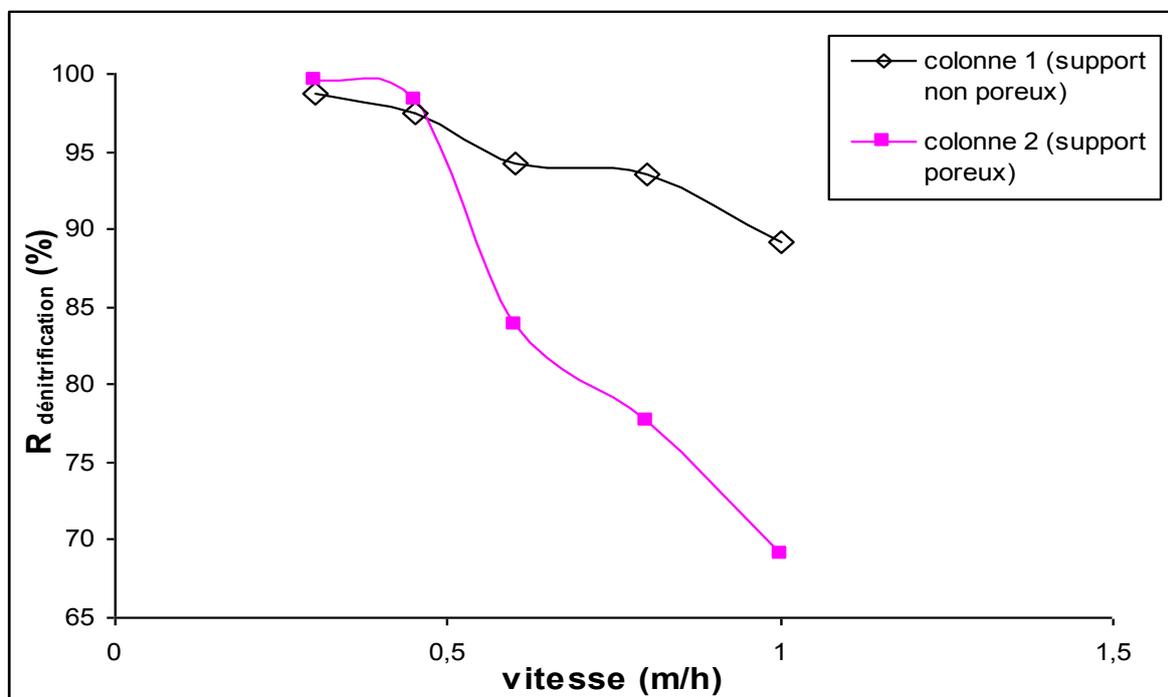


Figure 40 : Variation du rendement de la dénitrification en fonction des vitesses de passage pour une concentration initiale de nitrate $C_0= 100\text{mg/l}$.

Nos résultats sont meilleurs par rapport à ceux présentés par Boussaid (1987) avec le garnissage d'une colonne de 1,5m de hauteur rempli de paille et maërl avec une concentration initiale de 100mg/l ; où elle a obtenu des rendements de 100, 85 et 60% pour des vitesses respectivement de 0,3, 0,45 et 0,6m/h.

Nos résultats sont également presque identiques à ceux trouvés en présence de soufre comme support : un rendement de 95-98% pour des vitesses de 0,32 et 0,52m/h (Gaid, 1981). De même pour les résultats obtenus avec le charbon actif comme support (Chaïb, 2002) où des rendements de (100-94%) ont été rapportés. Ces résultats concordent avec les rendements du support non poreux pour des vitesses de passage de 0,3-0,8m/h. Cependant, ils concordent avec ceux du support poreux uniquement pour des faibles vitesses de passage (0,3m/h et 0,45m/h).

II.5. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION INITIALE EN NITRATE SUR LE RENDEMENT DE LA DENITRIFICATION

Les résultats représentés sur la Figure 41 montrent que les deux colonnes présentent des rendements de dénitrification supérieurs à 90% quelque soit la charge volumique appliquée. d'où une faible influence de la concentration initiale du nitrates sur le rendement de dénitrification et ce pour les deux types d'anneaux rashig dans la gamme de concentration utilisée

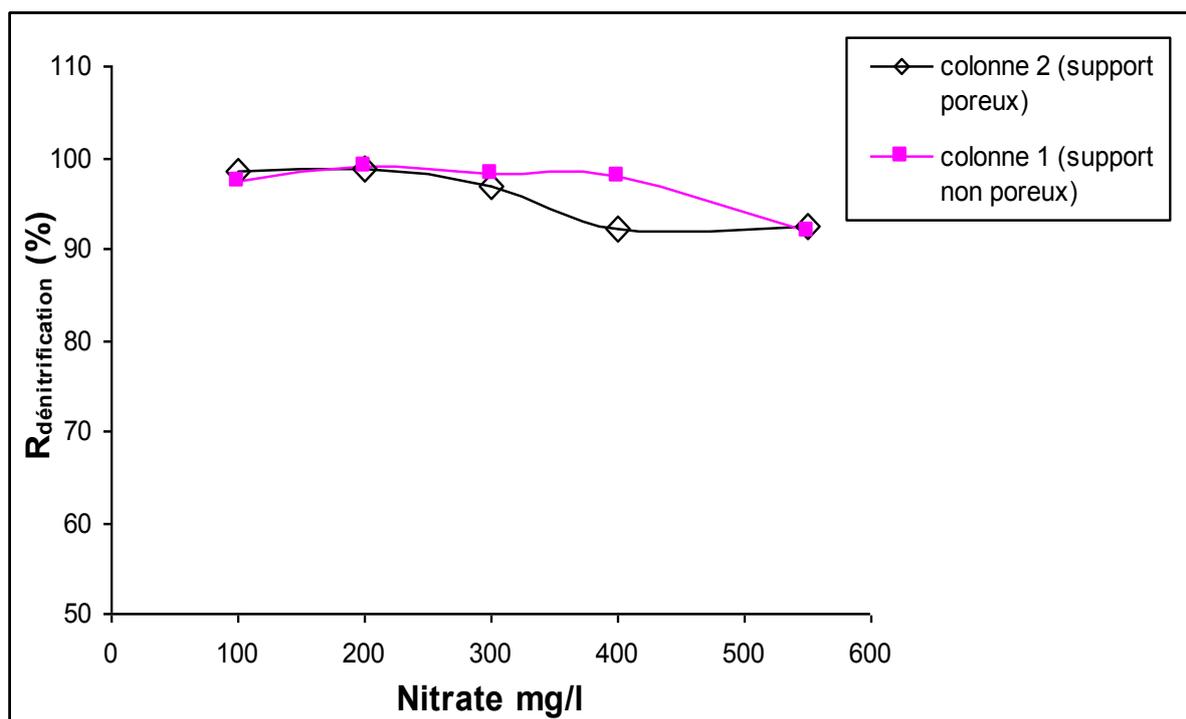


Figure 41 : Variation du rendement de la dénitrification en fonction des concentrations initiales de nitrates appliquées pour une vitesse $v = 0,45 \text{ m/h}$

II.6. OBSERVATION MICROSCOPIQUE

Un anneau rashig est prélevé de l'intérieur du réacteur. Ce dernier a subi une métallisation puis une observation au MEB (Microscope Electronique à Balayage). Les différentes photos obtenues (Figure 42,43,44,45) montrent l'état de la surface des supports vierges et colonisés. Nous remarquons la présence de bactéries isolées ou regroupées, formant un biofilm biologique sur les supports colonisés (Figure 43 et 45).

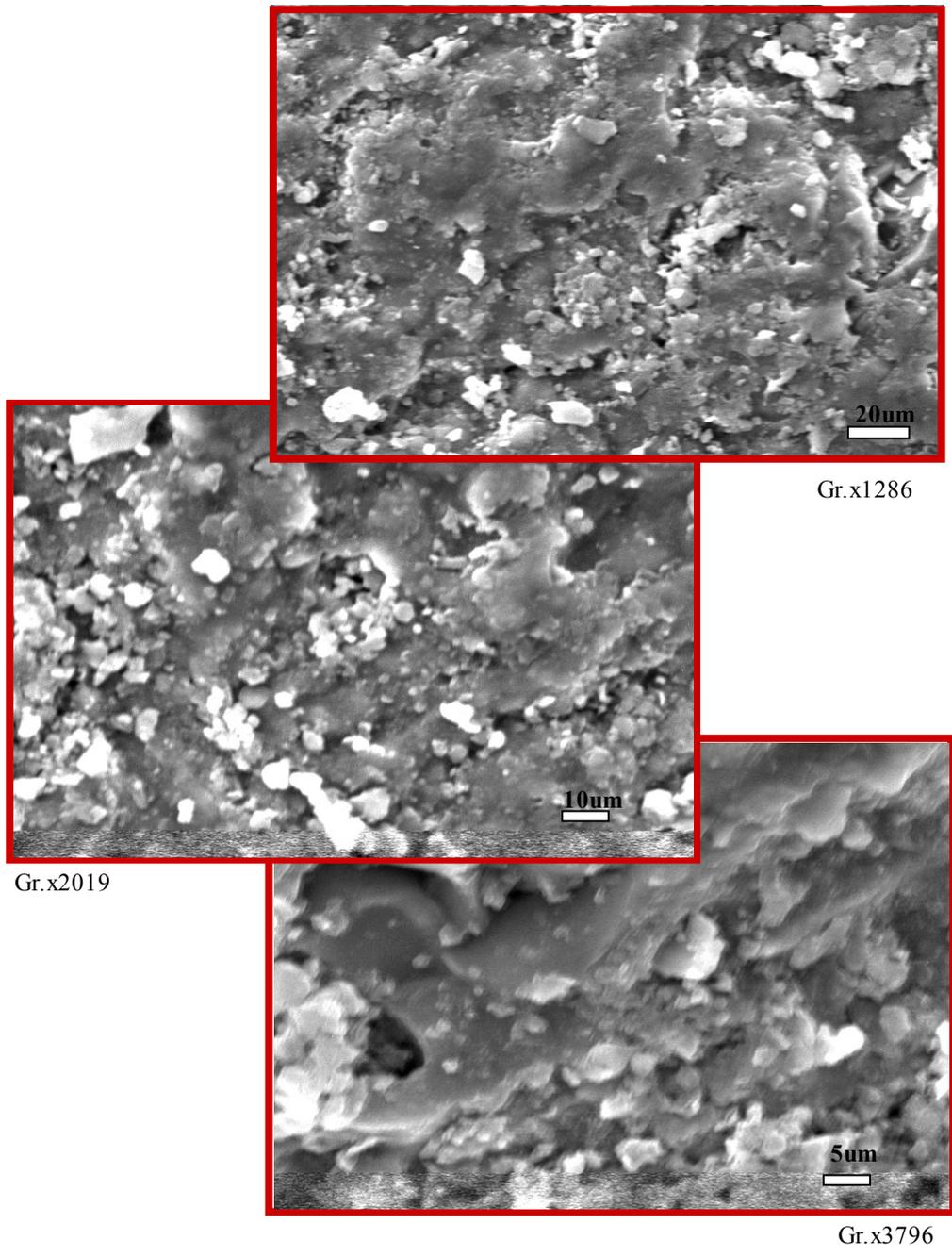


Figure 42 : Observations microscopiques du support non poreux vierge

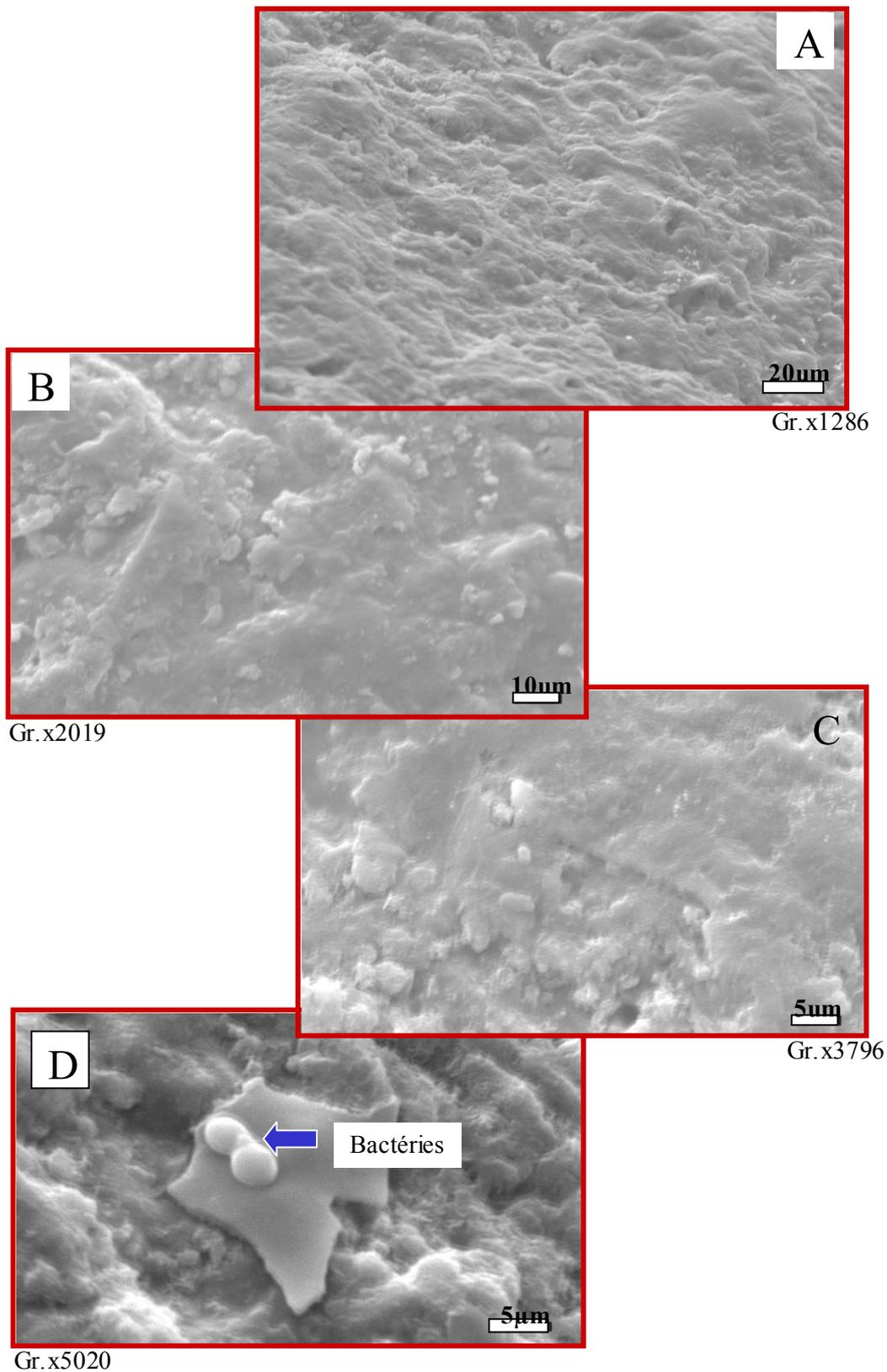


Figure 43 : Observations microscopiques du support non poreux colonisé

A) Vue générale du biofilm B) Vue approfondie du biofilm C) Observation de bactéries fixées sur le support D) Observation d'une bactérie en pleine division sur le support

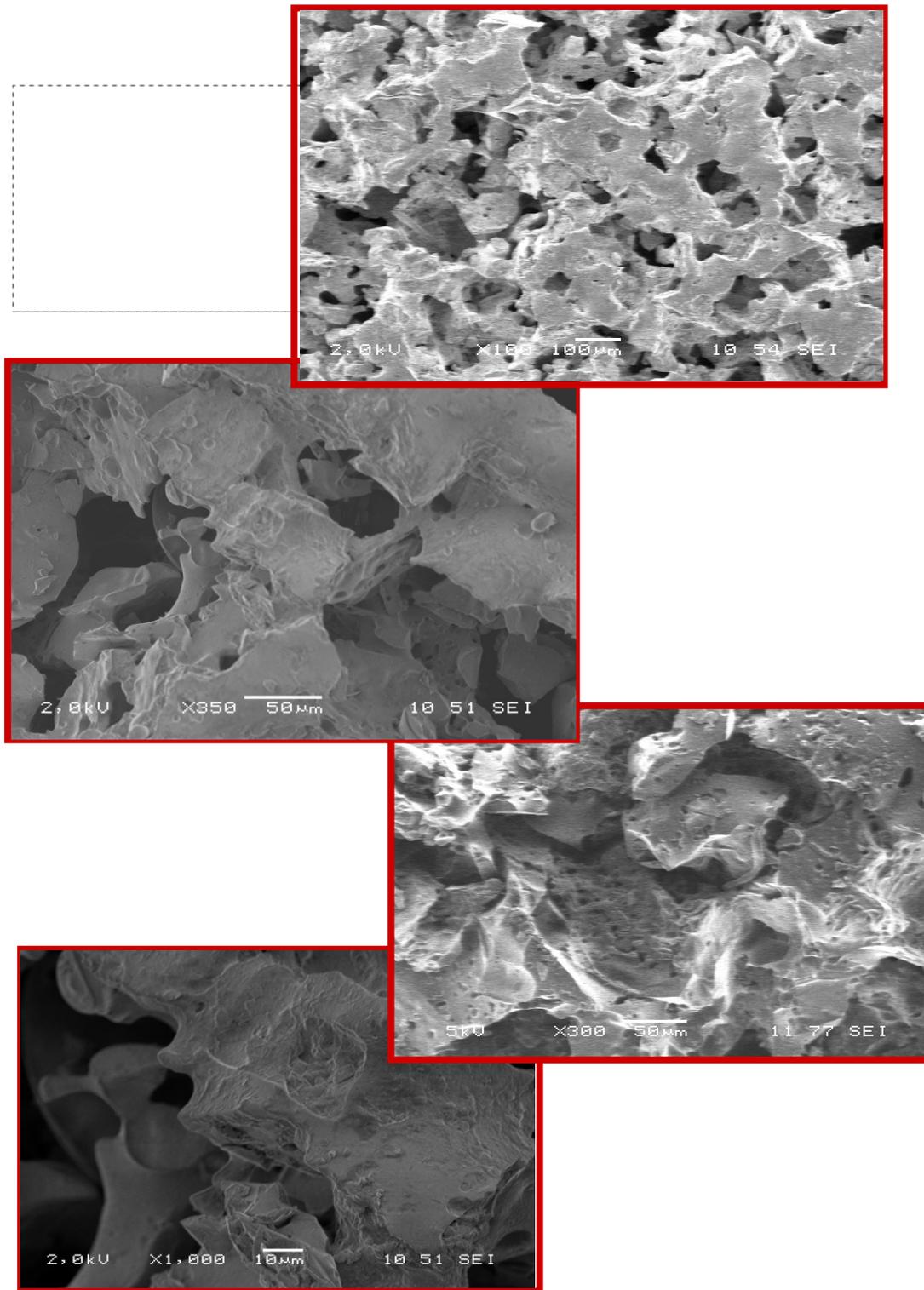


Figure 44 : Observations microscopiques du support poreux vierge

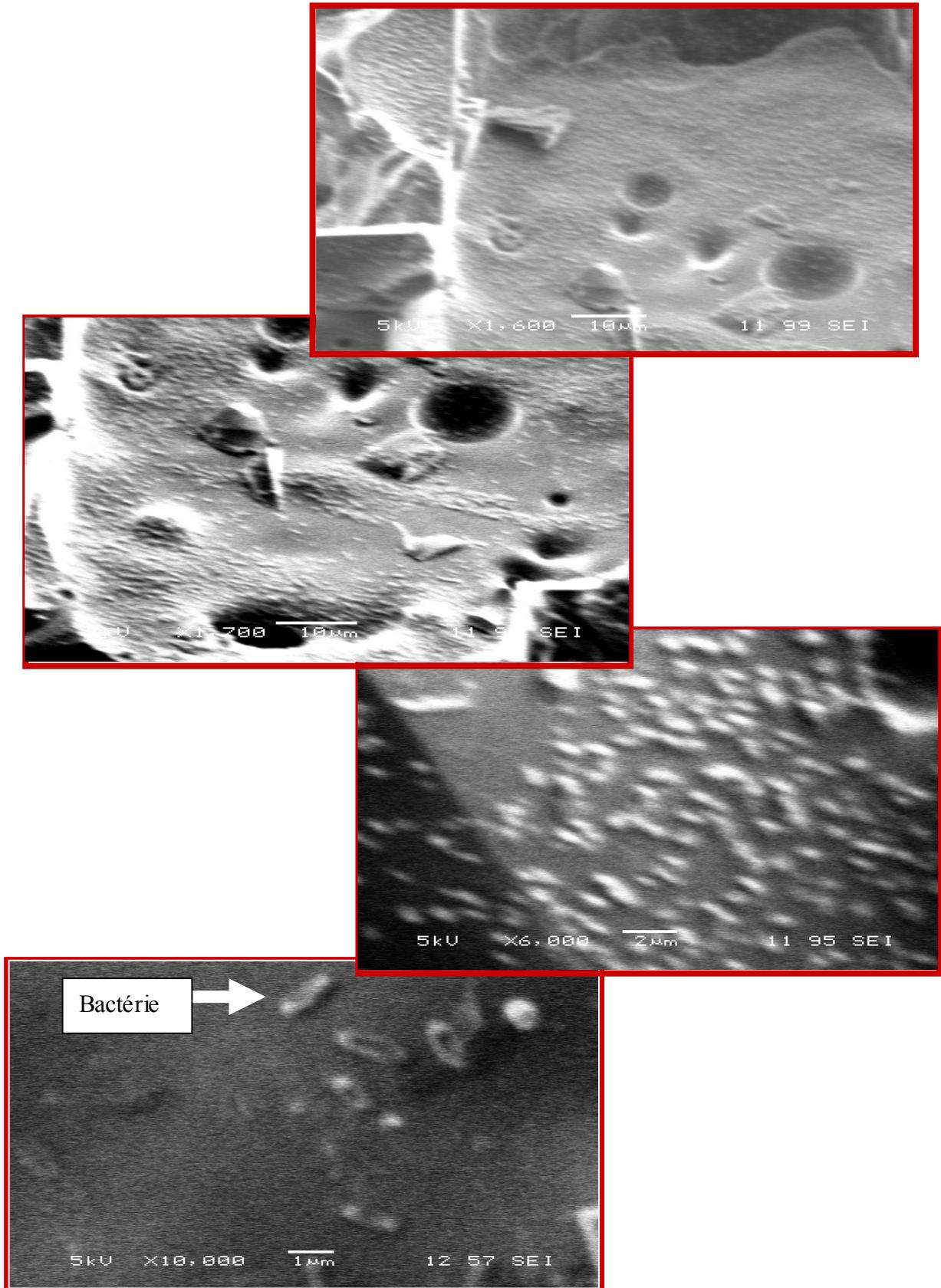


Figure 45: Observation microscopique du support poreux colonisé. Présence de bactéries en forme de bâtonnet (Bacille).

IV. Modélisation de la colonne de dénitrification :

Dans cette partie on cherche à donner un modèle mathématique au processus de dénitrification dans la colonne et identifier par la suite les paramètres de ce modèle à partir des résultats expérimentaux.

Tout d'abord, il est à rappeler que l'écoulement à l'intérieur de la colonne (réacteur) est en flux piston. La concentration des nitrates n'est pas uniforme mais évolue tout au long de la colonne. La vitesse de réaction varie également en fonction la position dans la colonne.

A l'état stationnaire, le bilan de matière sur un élément de volume dV est donné par :

$$-rdV = QdC \quad (1) \quad (9)$$

r : Vitesse de dénitrification.

Q : Débit d'alimentation.

C : Concentration des nitrates.

On admet que la réaction de dénitrification est du premier ordre par rapport à la biomasse (LeCloirec,1983). De même que l'on suppose une biomasse dénitrifiante répartie dans la colonne, ce qui donne (Boussaid, 1987) :

$$r = kCX(z) \quad (2) \quad (10)$$

k : Constante cinétique ($Kg^{-1}h^{-1}m^3$).

z : La cote dans le réacteur (m).

$X(z)$: Biomasse à la cote z ($Kg.m^{-3}$).

Sachant que :

$$dV = Sdz \quad \text{Et} \quad Q = Sv$$

S : Section de la colonne (m^2).

v : Vitesse de passage du fluide dans la colonne (mh^{-1}).

L'équation (1) devient alors :

$$-kCX(z)dz = vdC \quad (11)$$

L'exploitation des courbes de représentation de la biomasse montre que la concentration de celle-ci varie en fonction de la cote dans le réacteur selon la loi (Bousaid, 1987) :

$$X(z) = \frac{X_0}{z^{3/4}} \quad (4) \quad (12)$$

X_0 : Constante de biomasse ($Kg.m^{-2}$).

En remplaçant l'équation (12) dans l'équation (11), et en posant :

$$K = kX_0 \quad (mh^{-1}) \quad (5) \quad (13)$$

On obtient :

$$\frac{dC}{C} = -\frac{K}{vz^{3/4}} dz \quad (6) \quad (14)$$

En supposant que la concentration des nitrates à l'entrée de la colonne est $C(z=0) = C_0$, l'intégration de l'équation (14) entre $z=0$ et $z=H$, donne l'expression de la concentration des nitrates à la sortie de la colonne :

$$C = C_0 \exp\left(-\frac{4KH^{1/4}}{v}\right) \quad (7) \quad (15)$$

Soit un rendement de dénitrification :

$$\rho = \frac{C_0 - C}{C_0} = 1 - \exp\left(-\frac{4KH^{1/4}}{v}\right) \quad (8) \quad (16)$$

En introduisant dans l'équation (16) l'expression de la charge volumique :

$$C_v = \frac{C_0 Q}{V} = \frac{C_0 v}{H} \quad (9) \quad (17)$$

V : Volume de la colonne.

On aura :

$$\rho = 1 - \exp\left(-\frac{4KC_0}{H^{3/4}C_v}\right) \quad (10) \quad (18)$$

Il est à noter que le modèle donné par l'équation (18) n'est qu'une approximation du processus de dénitrification, c'est pourquoi la valeur réelle du rendement est donnée par :

$$\rho_r = \rho + \varepsilon = 1 - \exp\left(-\frac{4KC_0}{H^{3/4}C_v}\right) + \varepsilon \quad (11) \quad (19)$$

Où ε est une fonction qui représente les erreurs d'approximation.

D'après l'équation (17) nous remarquons que C_v dépend de trois variables : v , C_0 et H .

L'étape d'identification consiste à estimer les paramètres du modèle à partir d'un échantillon de données expérimentales.

- Dans un premier cas, la hauteur de la colonne est fixée à $H = 0.75m$, la concentration des nitrates à l'entrée est $C_0 = 100 mg/l$. Donc C_v varie en fonction de la vitesse (v) (selon l'équation 17)

On obtient alors :

$$\rho_r = 1 - \exp\left(-\frac{K}{2C_v}\right) + \varepsilon \quad (12) (20)$$

Reste à estimer le paramètre K de sorte que ρ se rapproche le plus de ρ_r .

Pour cela on calcul expérimentalement ρ_r pour différentes valeurs de C_v (voir tableau 4) et on estime K de façon à minimiser le critère des moindres carrés, ce qui donne :

$$\hat{K} = \arg \min_{K \in \mathbb{R}} (J(K)) \quad (13) (21)$$

$$J(K) = \sum_{i=1}^5 (\rho_r(i) - \rho(i))^2 \quad (14) (22)$$

$$\rho(i) = 1 - \exp\left(-\frac{K}{2C_v(i)}\right) \quad (15) (23)$$

Tableau n° 4 : Valeurs expérimentales de ρ_r et C_v pour différentes vitesses appliquées et $C_0 = 100\text{mg/l}$. Sachant que S1 : support non poreux et S2 : support poreux

i	$C_v(i)$	$\rho_r(i)$ S1	$\rho_r(i)$ S2
1	0.96	0.987	0.996
2	1.44	0.977	0.983
3	1.92	0.950	0.838
4	2.4	0.930	0.776
5	3.12	0.890	0.690

En d'autres termes \hat{K} est une solution de l'équation :

$$\frac{\partial J(K)}{\partial K} = \sum_{i=1}^5 \left(\frac{1}{C_v(i)} \exp\left(-\frac{K}{C_v(i)}\right) \left(\rho_r(i) - 1 + \exp\left(-\frac{K}{2C_v(i)}\right) \right) \right) = 0 \quad (16) (24)$$

Une évaluation numérique des racines de l'équation (24) nous donne une estimation de K pour les différents supports: \hat{K}_v : \hat{K} dans le cas de la variation de la vitesse

$$\hat{K}_{1v} = 13.2 \text{ mj}^{-1} \quad \text{pour le support non poreux}$$

$$\hat{K}_{2v} = 7.5 \text{ mj}^{-1} \quad \text{pour le support poreux}$$

- Dans un deuxième cas, la hauteur de la colonne est toujours fixée à $H = 0.75\text{m}$, la vitesse de passage est fixée à $v = 0.45\text{m/h}$. Alors que la concentration initiale C_0 est variable. Donc C_v varie en fonction de C_0 (selon l'équation 17).

On obtient alors l'expression du rendement :

$$\rho = \frac{C_0 - C}{C_0} = 1 - \exp\left(-\frac{4KH^{1/4}}{v}\right) \quad (8) (16)$$

D'après cette équation nous remarquons que ρ_r est indépendant de la charge volumique C_v .

Pour $H= 0.75\text{m}$ et $v= 0.45\text{m/h}$ nous avons :

$$\rho_r = 1 - \exp(-0.32 K) + \varepsilon \quad (25)$$

Reste à estimer K de sorte que ρ se rapproche le plus de ρ_r .

Pour cela, on calcul expérimentalement ρ_r pour différentes valeurs de C_v (voir tableau 5) et on estime K de façon à minimiser le critère des moindres carrés. Dans ce cas la fonction coût est donnée par :

$$J(K) = \sum_{i=1}^5 (\rho_r(i) - \rho(i))^2 \quad (14) \quad (22)$$

$$\rho(i) = 1 - \exp(-0.32 K) \quad (26)$$

Tableau n°5 : Valeurs expérimentales de ρ_r et C_v pour une vitesse constante et C_0 variable

i	$C_v(i)$	$\rho_r(i)$ S1	$\rho_r(i)$ S2
1	1.44	0.975	0.983
2	2.88	0.991	0.988
3	4.32	0.982	0.969
4	5.76	0.979	0.922
5	7.92	0.920	0.924

En d'autre terme K est une solution de l'équation :

$$\frac{\partial J(K)}{\partial K} = \sum_{i=1}^5 (-0.64 (\rho_r(i) - 1 + \exp(-0.32K))) = 0 \quad (27)$$

Une évaluation numérique des racines de l'équation (27) nous donne une estimation de K pour les différents supports : \hat{K}_{c_0} : constante K dans le cas de la variation de la concentration

$$\hat{K}_{1c_0} = 10.9 \text{ m}^{-1} \text{ pour le support non poreux}$$

$$\hat{K}_{2c_0} = 9.9 \text{ m}^{-1} \text{ pour le support poreux}$$

Sachant que pour chaque dispositif nous avons une seule valeur de K qui est calculée de la manière suivante :

$$\hat{K}_1 = \hat{K}_{1v} + \hat{K}_{1c_0} / 2 = 12.05 \text{ m}^{-1} \text{ pour le support non poreux.}$$

$$K_2 = \hat{K}_{2v} + \hat{K}_{2c_0} / 2 = 8.7 \text{ m}^{-1} \text{ pour le support poreux.}$$

Ce qui nous conduit à une estimation de la fonction ρ en fonction de C_v , égale à :

- Cas de la variation de la vitesse

$$\hat{\rho}_{v1} = 1 - \exp(-6.02/C_v) \text{ support non poreux} \quad (28)$$

$$\hat{\rho}_{v2} = 1 - \exp(-4.35/C_v) \text{ support poreux} \quad (29)$$

- Cas de la variation de la concentration initiale des nitrates

$$\hat{\rho}_{c_01} = 1 - \exp(-0.32 * 12.05) = 0.978 \text{ support non poreux} \quad (30)$$

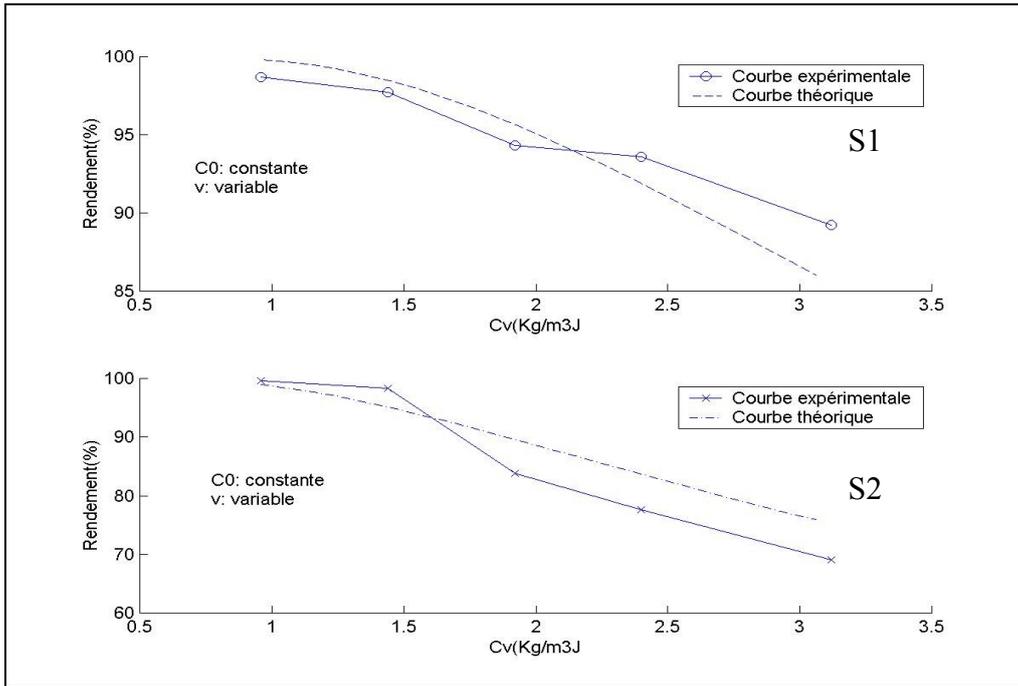
$$\hat{\rho}_{c_02} = 1 - \exp(-0.32 * 8.7) = 0.938 \text{ support poreux} \quad (31)$$

La Figure (46) nous permet de comparer l'évolution du rendement réel ρ_r et du rendement théorique $\hat{\rho}$ en fonction de C_v . Cette dernière est calculée pour différentes vitesses de passage. Nous remarquons que le modèle mathématique évolue de la même manière que les valeurs expérimentales pour les deux colonnes utilisées.

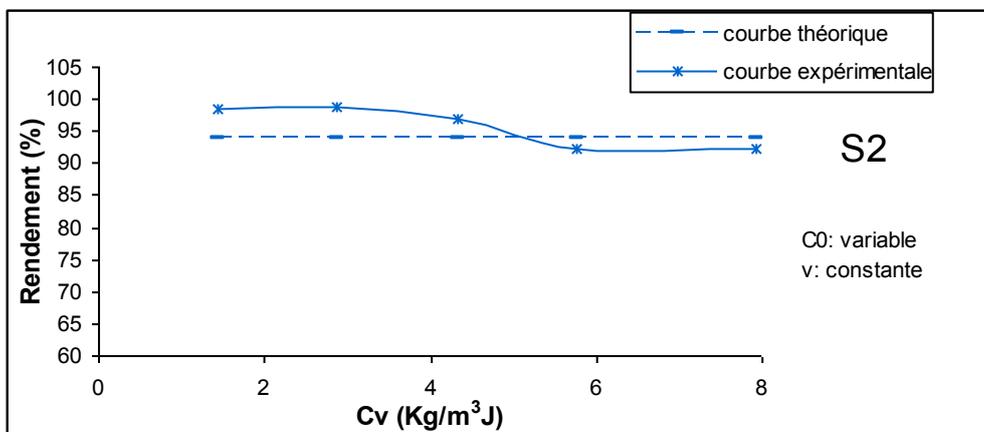
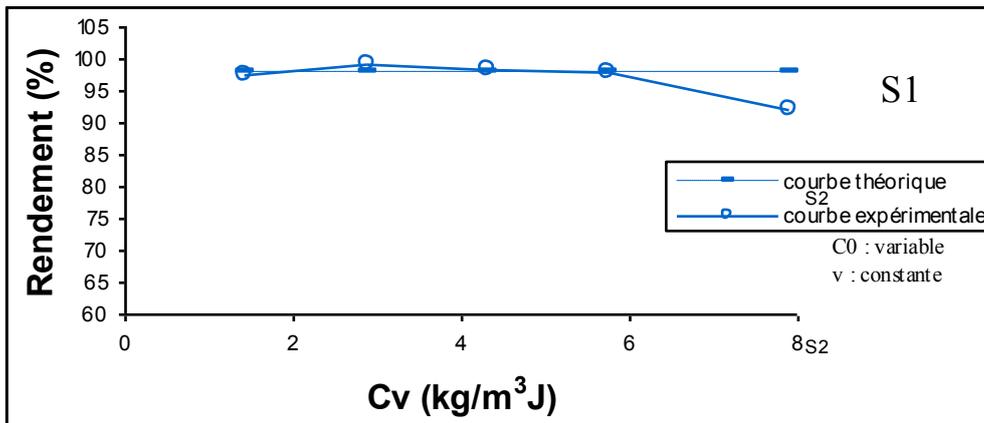
La Figure (47) nous permet de comparer l'évolution du rendement réel ρ_r et du rendement théorique $\hat{\rho}$ en fonction de C_v , dans le cas où la vitesse est constante et C_0 varie.

Nous remarquons que le modèle est vérifié dans la gamme de charge volumique utilisée. En effet la concentration initiale des nitrates n'influe pas significativement sur le rendement de la dénitrification et ceci pour les deux supports utilisés.

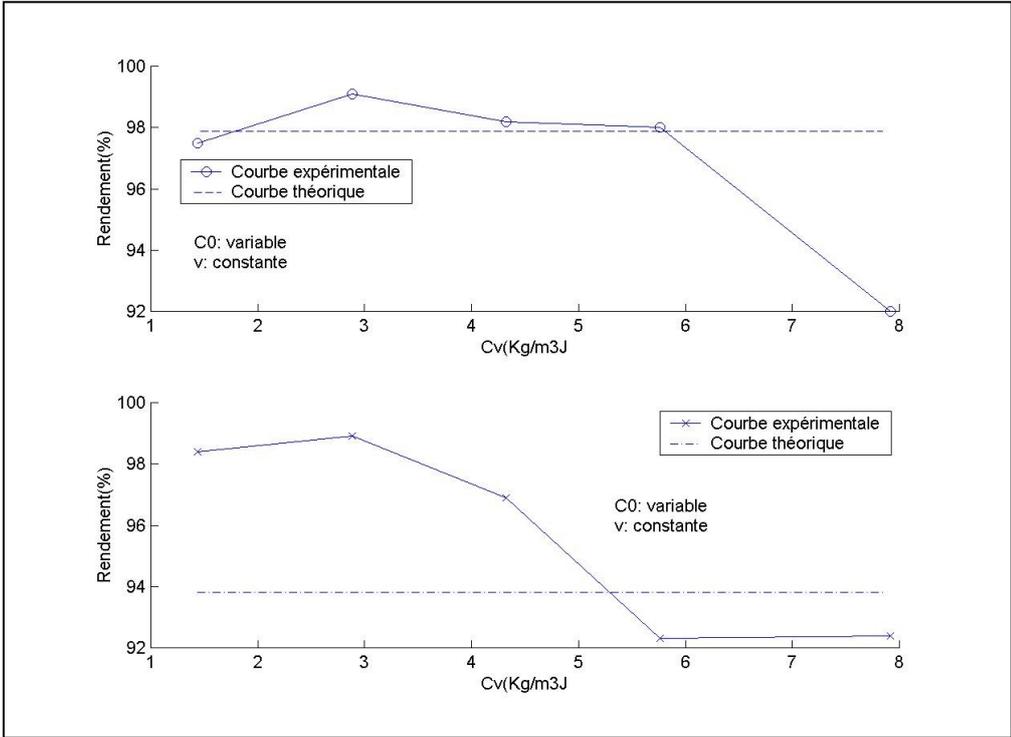
En conclusion, le modèle trop simplifié que nous avons utilisé, est bien adapté pour prédire l'influence des paramètres vitesse de passage et concentration initiale en nitrate sur le rendement de la dénitrification et ceci dans notre domaine d'étude



Figures 22 : évolution du modèle mathématique par rapport à la courbe expérimentale dans le cas de la variation de la vitesse. S1 : Support non poreux S2 : Support poreux



Figures 23 : évolution du modèle mathématique par rapport à la courbe expérimentale dans le cas de la variation de la concentration C₀. S1 : Support non poreux S2 : Support poreux



Conclusion

Notre travail portant sur l'étude des performances de la dénitrification biologique sur deux supports en céramique qui se différencient essentiellement par leur porosité, nous a permis d'aboutir aux conclusions suivantes :

Caractérisation des supports

- L'analyse par microscope électronique à balayage des deux supports nous a montré que ces derniers présentaient des différences dans leur composition chimique marquée essentiellement par l'absence de l'alumine dans le support poreux.
- Le support poreux présente un temps de séjour moyen plus grand par rapport au support non poreux ce qui laisse suggérer de meilleures performances pour le support poreux.

Influence du biofilm sur le temps de séjour

- Le développement bactérien au sein des deux supports augmente la différence des comportements hydrauliques. En effet, le temps de séjour augmente dans le cas du support non poreux (51 à 67min). Par contre, dans le cas du support poreux, le biofilm fait diminuer la microporosité du support. il y a formation de chemins préférentiels qui se traduit par une diminution du temps de séjour (72 à 14 min). Un temps de séjour très court fait diminuer les performances du support.

Influence de la vitesse de passage

- La vitesse de passage influe d'une manière inversement proportionnelle sur le rendement de la dénitrification
- A de faibles vitesses (0,3m/h et 0,45m/h), le support poreux présente de meilleures performances par rapport au support non poreux. Ceci est dû à la porosité du support.
- La porosité permet une colonisation rapide. Cependant, cette grande rétention de biomasse engendre la formation d'un biofilm épais moins actif et moins résistants aux forces de détachement. En effet, à de grandes vitesses (0,6m/h, 0,8m/h et 1 m/h) les performances du support non poreux ne sont pas affectées d'une manière significative. Par contre, celles du support poreux diminuent d'une manière appréciable lors de l'augmentation de la vitesse ; pour atteindre 69% pour une vitesse de 1 m/h. Ceci est également favorisé par la

composition chimique du support (absence d'alumine), son frittage en présence de l'eau et au court temps de séjour.

- Les nitrites apparaissent et disparaissent, mais leur concentration à la sortie dépend de la hauteur de la colonne ainsi que de la charge hydraulique appliquée.
- La vitesse de passage optimale pour les deux supports est de 0,45m/h.

Influence de la concentration initiale des nitrates

- Les deux supports présentent des rendements supérieurs ou égales à 90% et sont peu influencés par la charge appliquée allant de 100 à 550mg/l
- Les valeurs de nitrites à la sortie du réacteur dépassent la norme pour des concentrations supérieures à 100mg/l dans le cas du support non poreux et supérieures à 200mg/l dans le cas du support poreux. Afin de résoudre ce problème, il faut augmenter la hauteur de la colonne.

Les observations au microscope électronique à balayage ont permis de mettre en évidence la biomasse fixée sur les deux supports en céramique (poreux et non poreux).

Enfin, nous avons tenté d'identifier un modèle mathématique décrivant l'abattement des nitrates en fonction de la charge volumique, et de le simuler avec nos valeurs expérimentales. Nous avons constaté que le modèle simplifié que nous avons utilisé, est bien adapté pour prédire l'influence des paramètres hauteur, vitesse de passage et concentration initiale en nitrate sur le rendement de dénitrification et ceci dans le domaine étudié.

En perspective de ce travail, il serait intéressant de vérifier l'efficacité de ces supports dans des procédés de couplage qui mettent en jeu la dénitrification biologique associée à un procédé physico-chimique tel que l'électrodialyse ou l'échange d'ion.

Il est également important de tester l'effet d'autres supports sur les procédés à cultures fixées. Et ceci, afin de trouver un support qui présente des meilleures performances surtout pour l'élimination des nitrites.

Références Bibliographiques

- ❖ **Adebowale. A. O., Cox. D. S., Liang. Z and Eddinyton. N. D., 2000.** Analysis of glucosamine and chondroitin sulphate content in marketed products and the CaCO₂ permeability of chondroitin sulphate raw materials, *J. Am. Nutraceutical Assc*, 3, 37-44.
- ❖ **Adriana. P., C., Benedito. P. D., 1999.** Purification and partial characterization of N Acetyl-β-D Glucosaminidase from *Tritrichomonas foetus*, *Prasitol. Res*, 85, 256-262.
- ❖ **Allan. C. R and Hadwiger. L. A., 1979.** The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell wall composition, *Exp. Mycol*, 3, 285-287.
- ❖ **Amyl. S., Sinead. M. NI. C., Moore. J. A and Kirchman. D. L., 1997.** Chitin degradation protein produced by the marine bacterium *Vibrio harveyi* growing on different forms of chitin, *Applied and Environmental, Microbiology*, 63, 2, 408-413.
- ❖ **Apria., 1981.** Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries Agro-alimentaires : Analyse des constituants alimentaires, vol 4 ed Apria, pp 194-198.
- ❖ **Audigié.C., Dupont. G., Zonszain. F., 1982.** Principes des methods d'analyse biochimique, Tome 1, Editin Doin.
- ❖ **Beauvais. A and Latgé. J. P., 2005.** Chitinases and peptide minotopes: inhibition of glycosylhydrolases by peptides mimicking carbohydrates opens a new field in antifungal research. *Chemistry and Biology*, 12, 1-8.
- ❖ **Benecke. W., 1905, cité dans Goodrich, 1977.**
- ❖ **Bentone. A.G., 1935.** Chitinovorous bacteria, *Journal of Bacteriology*, 29, 449 – 464.
- ❖ **Billon. J., 1976.** Interet du froid dans la conservation du poisson et des crustacés (Aspect microbiologique), *Bull. Acad. Vét de France*, 49, 333-339.
- ❖ **Billon. J., 1982.** Etude bactériologique des poissons et farines de poissons, Institut Pasteur de Lille, pp 1-8.
- ❖ **Bollert. G ., Mauch. A and Vögeliu. F., 1983.** Chitinases in bean leaves: induction by ethylene, purification , proprieties and possible function, *planta*, 157, 22 – 31.
- ❖ **Bonnie. L. B., Yu. C. Y., Lee. C and Saule . R., 1991.** Chitin utilization by marine bacteria: degradation and catabolism of chitin oligosaccharides by *Vibrio furnissii*, *The Journal Biological Chemistry*, 266, 36, 24276-24286.

- ❖ **Boot.R. G., Renkema. G. H., Vehoeck.M., Srizland. A., Bliek. J., Meulemeester. T. M. A. M. O., Mammens. M. M. A. M., Aerts. J. M. F. G., 1998.** The human chitotriosidase gene, nature of inherited enzymes deficiency, *Journal of Biology and Chemistry*, 273, 40, 25680-25685.
- ❖ **Bourab. K.,2000.** Bases biochimiques et cellulaires des interactions plante-pathogènes dans le système *Chondrus crispus Acrochacte opercuta*, Thèse de Doctorat. Université de Paris.
- ❖ **Bradaim. B., 1990.** Régime alimentaire de *Scorpaena porcus* et *Scorpaena srofa* (Téléostéens scorpaenides) du golfe de Gabès (Tunisie), *Cybium*, 14, 3, 207-216.
- ❖ **Brahim. M., Mohrlen.F., Frohme.M. and Uri. F., 2004.** A putative double role of chitinase in a cnidarian, *Pattern, Formation and Immunity, Developmental and Comparative, Immunology*, 28, 973-981.
- ❖ **Brisou. J., 1971.** Techniques d'enzymologie Bactérienne, Edition Masson, Paris
- ❖ **Buchholz. F., Vetter. R., 1993.** Enzyme kinetic in cold water: characteristic of N-acetyl β -glucosaminidase activity in the Antarctic krill. *Euphausia superba* compared with other crustacean species; *Journal of Comp. Physiology*, 163 B, 28-37.
- ❖ **Buhot. N., 2003.** Rôle des éliciteurs et des protéines de transfert des lipides dans l'induction de la résistance des plantes à leurs agents pathogènes, Thèse de Doctorat, Université de Bourgogne.
- ❖ **Burstein. N. , 2000.** Biotechnologie enzymatique, Mode d'emploi : Industrie alimentaire – Environnement – Médical, Paris.
- ❖ **Castell. C. H., Greenough. M. F.? 1957.** The action of *Pseudomonas* on fish muscle, organism responsible for odours produced during incipient spoilage of chilled muscle, *Journal. Fisheries. Resboard. Canada*, 14, 617-625.
- ❖ **Ceftell. J.C., Lorent . D., 1985.** Protéines alimentaires, Ed Lavoisier, Paris
- ❖ **Chanpen. W.P., Siwaya P., Amarat. B., 1999.** Purification and characterization of chitinase from *Bacillus circulans* No.4.1, *current Microbiology* 39, 134 –140
- ❖ **Chien. J. H., Tang. K. W., Shu. C. C and Chao. Y. C., 2005.** Identification of an antifungal chitinase from a potential biocontrol agent, *Bacillus cereus* 28-9, *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 38, 1, 82-88.
- ❖ **Chlan. C. A and Bourgeois. P. B., 2001.** Classe I chitinases in cotton (*Gossypium hirsutum*). Characterization, expression and purification, *Plant. Science*, 161, 143-154.
- ❖ **Corrood. P. A., Tom. R. A., 1978.** "Bioconversion of shellfish chitin wastes: process conception and selection of micro organism", *Journal of Food Science*, 43, 1158-1161.

- ❖ **Cutt. J. R., Klessig. D and Bollert. F., 1992.** Pathogenesis-related proteins in plant gene, Research. Genes involved in Plant Defence, p 209.
- ❖ **Daste and Williams., 1956.** A study of chitin decomposing microorganism of *Flavobacterium resinovorum*, Species. International. Journal. Bacteriology, 30-300.
- ❖ **Debatisse. M., 1981.** « Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro – alimentaires », volume 2 , Ed. Apria, Paris.
- ❖ **Dipietro. A., Lorito. M., Hayes. C. K., Broadway. R. M and Harman. G. E., 1993.** Endochitinase from *gliocladium virens*: isolation, characterization, and synergistic antifungal activity in combination with gliotoxin, *Phytopathology*, 83, 308-313.
- ❖ **Direction de la pêche de la wilaya d'Alger :** Les statistiques de 2004.
- ❖ **Djabali. F., Brahim. B et Mamasse. M ., 1993.** Pelagos: poissons des cotes algériennes, Bulletin de l'Institut des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral (ISMAL)
- ❖ **Djeghri.M., 1983.** Hygiène et contrôle microbiologique des poissons, crustacés et mollusques, Université de Constantine (Institut des Sciences Vétérinaires) Thèse de Doctorat.
- ❖ **Drazen. J and Robison. B., 2002.** Chitinase activity of fishes with varying depth distribution, Magdalena Gutowska, the Evergreen state college, 1-18
- ❖ **Durand. G., Monsa. P., 1982.** Les enzymes: production et utilisation industrielle, Edition Gauthier Villars, Paris.
- ❖ **Durand. P., Lagouin. Y., 1983.** Valorisation des sous produits de la pêche : « réalisation et perspectives ». Science et pêche. Pêche marine, p 330
- ❖ **Elliot.J. M., 1975.** Number of meals in a day maximum weight of food consumed in a day and maximum rate of feeding for brown trout. *Salmo trutta*L., *Freshwat. Biol*, 5, 287-303.
- ❖ **Eschmeyer. W. N., 1969.** A systematic of the scorpionfisher of the Atlantic Ocean (pisces scorpaenidae). California. Academy of Sciences, 79, 93-99.
- ❖ **Escott. G. M., Adams. D .J., 1995.** Chitinase activity in human serum and leucocytes, *Infection. Immunology*, 63, 12, 4770-4773.
- ❖ **Espie. P. J., Roff. J. C., 1995.** Characterization of chitobiase from *Daphnia magna* and its relation of chitin flux, *Physiology zoology*, 68, 727-748.
- ❖ **Fanger. R., Lundbladg. L. , Sletten. G. , 1979.** *Marine biology*, 53, 317-321.
- ❖ **Fanili. G., Weiner. S., Addadi. L., 2003.** Chitin-silk fibroin interaction relevance to calcium carbonate formation in invertebrates, *Calcified. Tissu. International*, 75, 5, 548-554.

- ❖
- ❖ **Flash J., Pilet P. E., Jolles P. , 1992.** What's New in chitinase research? *Experienta*, 48, 8, 701 – 716.
- ❖ **Francine. H., Rodolphe. B., Trembly. C and Bellamar. G., 1997.** Structural and evolutionary relationships among chitinases of flowering, *Journal of Molecular Evolution*, 44, 614-624.
- ❖ **Frank.H., Schmitz. J. E., Rolf. D., 2005.** Enrichment of chitinolytic microorganism : Isolation and characterization of chitinase exhibiting antifungal activity against phytopathogenic fungi from a novel *Streptomyces strain*, *Applied. Microbial and Cell Physiology*, 66, 434-442.
- ❖ **Frère. J.M et Gerday.C. , 1981.** Les méthodes de purification et d'analyse des protéines, Masson, paris.
- ❖ **Fusetti.F., Holger.V. Moeler. Douglas, Houston., Henriëtte J. ROZEBOOM., Bauke. W. Dijkstva. , ROLF. G., Johannes. M.F.G. Aerts., and Daan. M.F. Van. Aalten. , 2002.** Structure of human chitotriosidase, *the journal of biological chemistry*, 277, 28, 25537 - 25544.
- ❖ **Gatesoupe. F. J., René.L., 1998.** Flore digestive des poissons: Approche environnemental, *Cahier. Agriculture*, 7, 29-35.
- ❖ **Ghaouth. A. E. A and Asselin. A., 1992.** Potential uses of chitosan in postharvest preservation of fruits and vegetables, cité dans **Brine. C. J., Sandford. P. A and Zikakis., 1992.** Advances in chitin and chitosan, *Applied. Sciences*
- ❖ **Gomez. L., Allona. I., Casado.R and Aragoncillo. C., 2002.** Seed chitinases, *Seed. Sci. Res.*, 12, 217-230.
- ❖ **Goodrich, T.D., and Morita.R .Y., 1977.** Incidence and estimation of chitinases activity associated with marine fish and other estuarine samples, *Marine. Biology*, 41, 349 – 353.
- ❖ **Goodrich. T.D., and Morita.R. Y., 1977.** Bacterial chitinase in the stomachs of marine *Biology*, 41, 355 – 360.
- ❖ **Grattan. W. G., 1994.** Physiology of microbial degradation of chitin and chitosan, *Biochemisrtry of Microbial Degradation*, Ed Colin. Ratledge, University of Aberdeen, 279-312.
- ❖ **Green. A. T.,Healy. M. G and Healy. A., 2004.** Production of chitinolytic enzymes by *Serratia marcescens* Q M B 1466, using various chitinous substrates, *Journal of Chemical. Technology and Biotechnology*, 99, 000-000.
- ❖ **Guillaume. J., Kaushik. S., Bergot. P et Metailler. R., 1999.** Nutrition et alimentation des poissons et crustacés: physiologie digestive et digestibilité des nutriments chez les poissons, *Edition INRA*, 2, 467-473.
- ❖ **Gunnar. B., 1948.** The determination of Hexosamines according to Elson and Morgan, *Acta. Chemica. Scandinavica*, 2, 467-473.

- ❖ **Gustav.V. K., Douglas. R. H., Francesco. V. R., Martin. G. P., Bjornar. S. D., Aulten. M. F. V and Eijsink. V. G. H., 2004.** Structure of the D142N mutant of family 18 chitinase chi B from *Serratia marcescens* and its complex with allosamidin, *Biochemica and Biophysica Acta*, 103-111.
- ❖ **Hamid. A., Sakata. T., Kakimoto. D., 1976.** Microflora in the alimentary tract of gray mullet ; isolation and identification of bacteria, *Mem. Fac, Fish, Kagoshima Univ*, 25, 59 – 65.
- ❖ **Harman. G. E., Hayes. C. K., Lorito. M., Broadway. R. M., Dipietro. A., Peterbawr. C and Tronsmo. A., 1993.** Chitinolytic enzymes of *Trichoderma garzianum*: purification of chitobiosidase and endochitinase, *Phytopathology*, 83, 313-318.
- ❖ **Henrissat. B., Bairoch. A., 1993.** New families in the classification of glycosyl hydrolases based an amino acid sequence similarities, *Biochemistry. Journal*, 293, 781-788.
- ❖ **Jeuniaux. C., 1961.** Chitinases: An addition to the list of hydrolases in the digestives tract of vertebrates: *Nature. Lond*, 192, 135-136.
- ❖ **Jeuniaux. C., 1996.** Chitinases : *Methods in Enzymology V.* Ginsburg. New York. Academic press, 8, 644 – 650.
- ❖ **Jones J. G., 1971.** Studies on fresh water bacteria: Factors which influence the population and its activity. *Journal. Ecology*, 59, 593-613.
- ❖ **Joubert. J. M., Yvin., Barchietto. T., Seng. J. M., Pless. B., Klarzynsk. O., Kopp. M., Fritig. B., Kloareg. B., 1998.** A β 1-3 glucan, specific to a marine alga, stimulates plant defence reactions and induces broad range resistance against pathogens, *Proc. In Lateur.*, 2002.
- ❖ **Kamoun. P., 1993.** *Principes de Biochimie*, 2^{eme} edition. Paris.
- ❖ **Kaneko. T and Colwell. R. R., 1975.** Adsorption of *Vibrio parahaemolyticus* on to chitin and caepods, *Appl. Microbiology*, 29, 269-274.
- ❖ **Kasprzewska. A., 2003.** Plant chitinases, regulation and function. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 8, 809-824.
- ❖ **Kim . F., 2004.** Physicochemical and functional properties of grawfish chitosan as affected by different processing protocols, a Thesis of Master of Science in the department of Food Science. B.S., Seoul National University
- ❖ **Klarnziki. O., Fritig. B., Joubert. J. M., Yvin. J. C., Kloareg. B., 2000.** Stimulation naturelle des défenses des plantes par la laminarine naturelle : exemple de protection chez le blé. Cité dans *Lateur.*, 2002.
- ❖

- ❖ **Kramer. K.j., Muthukrishnan. S., 1997.** Insect chitinase : Molecular biology and potential use as biopesticides. *Insect. Biochemistry. Molecular. Biology* 27, 887-900.
- ❖ **Kuc. J., 2002.** Concept and direction of induced systemic resistance in plants and its application; *Europe. Journal. Plant Pathology*, 107, 7-12.
- ❖ **Kurita. K., 2001.** Controlled functionalization of the polysaccharide chitin, *Progress in Polymer Science*, 26, 1921-1971.
- ❖ **Lagrade. J. D., 1983.** Initiation à l'analyse des données, Edition Dunod, pp 31-38, Paris.
- ❖ **Lasse. R., Azam. F., 2002.** Widespread N-Acetyl-D-Glucosamine uptake among pelagic marine bacteria and its ecological implication, *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 11, 5554-5562.
- ❖ **Lateur. M., 2002.** Perspectives de lutte contre les maladies des arbres fruitiers à pépins au moyen de substances naturelles inductrices d'une résistance systémique, *Biothechnol. Agron. Soc. Environ*, 6, 2, 67-77.
- ❖ **Lehninger. A., 1989.** Principe de Biochimie, Johns Hopkins University. School of Medecine. Descartes, Paris.
- ❖ **Lin. W., Anarata. C. S., Datta. K., Portykus. I., Muthukrishnan Sdata. S.K., 1995.** Genetic engineering of rice for resistance to sheath blight, *Biology. Technology*, 13, 123-150.
- ❖ **Loiseleur. J., 1963.** Techniques de laboratoire : Chimie physique, chimie biologique, Tome 1, 3ème édition, Masson, Paris, pp 1046-1052.
- ❖ **Mac Carthy. M., 1975.** Facultative anaerobic bacteria in digestive tract of *Chum salmon* (*uncorhynchus*) maintained in fresh water under defined culture. *Applied Microbiology*, 29, 663-668.
- ❖ **Malgorzata. W., 2003.** Signal molecules in embryogenesis of Norway spruce. Doctorat Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences Uppsala.
- ❖ **Mannhein. A., Cheryan. M., 1990.** Continuous Hydrolysis of milk protein in a membrane reactor, *Journal. Food Science*, 55, 2, 381 – 390.
- ❖ **Masako. S., Masami. M., Tetsuro .Y. , Toshihiko .I., and Bunei. S. , 2001 .** A novel serum Chitinase that is expressed in bovine liver ; *FEBS Letters* 506 , 127 –130.
- ❖ **Maurice Fontaine. M., 1979.** Nutrition des poissons, Actes du colloque C.N.E.R.N.A, Paris.
- ❖ **Mecha. J. C., Danbrifosse. G., Jeuniaux. C. H., 1973.** Activité des chitinases gastrique de reptile en fonction de pH, *Journal. Physiology. Biochemistry*, 81, n°4, 629-637.

- ❖ **Meera. G. N., Gallagher. L. J., Matthew. D., P'ngloke. T., Coulson. P. S., Wilson. R. A., Maizek. R. M and Judith. E. A., 2005.** Chitinase and fizz family members area generalized feature of nematode infection with selective upregulation of yml and fizz by antigen-presenting cells, *Infection and Immunity*, 73, 1-10.
- ❖ **Michel. V., 2003.** The enzyme as drug: application of enzymes as phamaceuticals, *Current. Opinion in Biotechnology*, 17, 1-7.
- ❖ **Moranche. A et Costes.C. , 1985.** Hydrolases et dépolymérases : Les Enzymes d'intérêt industriel, Bordas paris.
- ❖ **Muzzarelli. R. A. A., 1977** cité dans, Mohand, Mouloud, Bellal. Relation entre la structure des polymères pariétaux et la floculation des levures *Kluyveromyces lactis* (doctorat d'état 1994)
- ❖ **Nelly. M., 1992.** Initiation à la microbiologie, nouvelle édition. Dunod Paris, pp 97-108.
- ❖ **Nemat. O. K and Saul .R., 1996.** The chitin catabolic cascade in the marine bacterium *Vibrio furnissii*, molecular cloning, isolation, and characterization of a periplasmique β -N-Acetylglucosaminidase, *American Society for Biochemistry and Molecular Biology*, 271, 52, 33425-33432.
- ❖ **Neveu.A., 1979.** Les Rythmes alimentaires en milieu naturel Acte du colloque C.N.E.K.N.A, Ed Nutrition des poisons, paris.
- ❖ **Nouar. A., 2003.** Ecologie, biologie et explication d'une espèce de la famille des Scorpaenidae: *Helicolenus dactylopterus* (Delarache, 1809) des cotes algériennes. Thèse de Doctorat d'etat, US THB , p 139.
- ❖ **Nutripeak., 2002.** Hair and skim herbal formula with MSM and glucosamine. Nature's Way. <http://www.Nutripeak.Com>.
- ❖ **Okutani. K., 1966.** Studies of chitinolytic systems in the digestive tracts of *Lateolabrax japonicus*, *Marine, Biology*, 10, 1-47.
- ❖ **Olsen. M. A., Blix. A. S., Utsi. T. H. A., Sormo. W and Mathiesen. S. D., 2000.** Chitinolytic bacteria in the minke whole forestomach, *Canadian. Journal of Microbiology*, 46 1, 85-94.
- ❖ **Park. H. Y., Hopan. C., Youngso. M., Hoonahn. J., Hyunjo. D and Iikim. S., 2002.** Purification, characterization, and cDNA cloning of rice class III chitinase, *Molecules and Cells*, 13, 69-76.
- ❖ **Pelmont. J., 1994.** Les enzymes, collection Grenoble. Science.
- ❖ **Percheron. F., Perlés. R et Foglietti. J. M., 1981.** Abrégé de biochimie générale, Tome 2, Edition Masson, Paris.
- ❖ **Peres.G., 1979.** Nutrition des poissons : Enzymologie digestive (Les proteases, L'amylase, Les enzymes chitinolytiques), actes du colloque C.N.E.R.N.A, paris, publié sous la direction du professeur Maurice Fontaine.

- ❖ **Perrin. R et Scharff. J. P., 1995.** Chimie industrielle, Tome1, Edition Masson, Paris, pp 259-316.
- ❖ **Place. A. R., 1996.** Enzymatic digestion of chitin oligosaccharides, Chitin. Enzymology, 2, R. A. A , Ed Muzarrelli, pp 39 - 54
- ❖ **Plumner. D. T., 1994 .** Introduction aux techniques de biochimie S / la direction du professeur (geneviève .S . PIK) ed science interatiral .
- ❖ **Prescott et Harley. K., 1995.** Microbiologie, 1ere Edition, Deboeck. Université, 41-54.
- ❖ **Quéro. J. C., Vayne. J. J., 2001.** Les poisons de mer des pêches françaises identification, inventaire et répartition de 209 espèces, pp 166-167.
- ❖ **Quingsong. Z, Youping. D., Brown. S. J., Subboratnam. M., Kramer. K. J., 2004.**Computational identification of novel chitinase-like proteins in the Drosophila melanogaster genome, Bioinformatics, 20, 2, 161-169.
- ❖ **Rachel. C and Kupice. L., 1998.** The molecular biology of chitin digestion, Current Opinion in Biotechnology, 9, 270-277.
- ❖ **Reissig. J.L., Strominger. J.L ., 1955.** A modified calorimetric method fort he estimation of N- acetyamino- sugar, Journal of Biological, Chemistry, 217, 959-966
- ❖ **Renkema. G. H., Boot. R. G., Muijsers.A. O., Donker- Koopman. W. E and Aerts. J. M. F. G., 1995.** Purification and characterization of human chitotriosidase, a novel member of the chitinase family of proteins, Journal of Biological Chemistry, 270, 2198-2202.
- ❖ **Saguez.J., 2002.** Les chitinases et leur implication dans la pénétration de la membrane péri trophique des moustiques par les oocinètes de plasmodium, présenté pour l'obtention de la maîtrise de Biologie, option, Biologie cellulaire et physiologie.
- ❖ **San. L. W ; ING. S., Tze. W. L and CHI. H. W., 2002a.** Purification and characterization of two Antifungal chitinases Extracellularly produced by *Bacillus amyloliquefaciens* V656 in a shrimp and crab shell powder Medium ; Journal of agricultural and Food chemistry, 50, 2241 – 2248.
- ❖ **San. L. W., Wei. J. H., and Wen. T. C., 2002 b.** Purification and characterization of an antimicrobial chitinase extracellularly produced by *Monascus purpureus* CCRC31499 in a shrimp and crab shell powdes Medium, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 2249-2255.
- ❖ **Sarker. A. L., 1977.** Feeding ecology of the blue gill *Lepomis macrochirus*, in two heated reservoirs of Texas III. Tile of day and patterns of feeding trans. American Fish. Sociology, 106 596-601.
- ❖ **Schimmerling. P., Sisson. J. C et Zaidi. A., 1998.**Pratique des plans d'expériences, technique et documentation, Edition Lavoisier, Londre, Paris, New York.
- ❖ **Scriban, R., 1988.** Biotechnologie, 3eme edition, Technique et documentation

- ❖ **Scriban. R., 1997. Biotechnologie, 5eme ed., technique et documentation.**
- ❖ **Scriban. R., 1999. Biotechnologie, 5eme Edition, 317-340.**
- ❖ **Sekata.T., Nakaj.M., Kakimotod.D., 1978.** Microflora in the digestive tract of marine fish : General characterization of the isolates from yellowtail., Mem. Fac. Fish, Kagoshima Univ, 27, 65-71.
- ❖ **Seng. J. M., 1988.** Polymeres : Chitine, chitosane et dérivés : de nouvelles perspectives pour l'industrie, Biofutur.
- ❖ **Sera. H., Kimata. M., 1972.** Bacterial flora in the digestive tract of marine fishes: Bacterial of fish red sea bream snaper and crimson sea bream.Fed three kinds of diets,. Bull. Jap. Sociology Science. Fish, vol 38, pp 50-55.
- ❖ **Shewan. J. M., Liston. J., 1955.** A review of food poisoning caused by fish and fishery products, The Journal Applied. Bacteriology, 18, 3, 522-534.
- ❖ **Shim.H. P., Jung. H. L and Hong. K., 2000.** Purification and characterization of chitinase from a marine bacterium, *Vibrio SP 98 C J 11027*, Journal of Microbiology, 38, 4, 224-229.
- ❖ **Shu. Y. W., Moyne. A. I., Thollapilly. G., Shaw. Y., Locy. R. D and Narendrak. S., 2001.** Purification and characterization of a *Bacillus cereus* exochitinase, Enzyme and Microbial Technology, 28, 6, 492-498.
- ❖ **Simon. P et Meunier. R., 1970.** Microbiologie industrielle et génie biologique. Ed Masson, Paris, pp 108-114.
- ❖ **Soudan. F., 1950.** L'altération du poisson, préservation de sa fraîcheur, Notes. Rapport. Maritime, 9, 21-44.
- ❖ **Soudan. F., 1965.** La conservation par le froid des poissons, crustacés chez les Ballières et fish, 59-99.
- ❖ **Spann. P., Boller.T., Ludwig. A., Weiemken. A., Bonfante. F. P., 1989** Chitinase in roots of mycorrhizal *Allium porrum*, regulation and localization, Planta, 177, 447-455.
- ❖ **Taboada. E., Cbrena. G., Cardenas. G., 2003.** Retention capacity of chitosan for copper and mercury ion, Journal of the Chilean chemical Society, 14, 1, 7-12.
- ❖ **Tabudravu. J. N., Eijsink. V. G. H., Gooday. G. W., Jaspors. M., Komander. D., Legg. M., Synstad. B and Van Aalten. D. M. F., 2002.** Psammaplin A, a chitinase inhibitor isolated from the Fijian marine sponge *Aplysinella rhax*, Bioorganic and Medicinal Chemistry, 10, 1123-1128.
- ❖ **Takeshi .T., Tshiaki. F., Haruyuki . A and Tdayuki .I., 2003.** Characterization of an Exo- β -D- Glucosaminidase Involved in a novel chitinolytic pathway from the hyperthermophilic *Archaeon thermococcus Kodakazaensis KoD1*, Journal of Bacteriology, 5175-5181.

- ❖ **Tamo. F., Sasaki. C., Schelp. E., Bortone. K and Robertus. J. D., 2001.** Kinetic properties of chitinase-1 from the fungal pathogen *Coccidioides immitis*, *Biochemistry*, 40, 2448-2454.
- ❖ **Tsartos. A., Pyrpassopoulos. S., Papanikolaou. Y., Zees. A., Vorgias. K., Petratos and Nounesis. G., 1994.** The thermal unfolding of chitinase a from mesophile *Serratia marcescens*. WWW. Microcalorimetry. Com/ index. Php.
- ❖ **Valles. E et Furet. U. P., 1997.** Etude des caillettes des bovins à l'état ruminant pour l'obtention d'extraits coagulants à base de pepsine bovine, *Méthodes d'extraction, Lait* Nov-Dec, 569-570.
- ❖ **Vandamme. E. J., Charles. D., Roy. S., Tirens. K., Barre. A., Martin. J. C., Rouge. P., Vanleuven. F., Does. M and Peumans. W. J., 1999.** Agene encoding a hevein-like protein from elderaerry fruits is homologous to PR-4 and class V chitinase gene, *Plant. Physiology*, 119, 1547-1556.
- ❖ **Vellard. M., 2003.** The enzymes as drug: application of enzymes as pharmaceutical. *Current. Opinion in Biotechnology*, 14, 1-7. .
- ❖ **Vipul.G., Pranav. V and Shhatpar.H.S., 2004.** Activity staining method of chitin agar plate trough polyacrylamide gel electrophoresis, *African Journal of Biotechnology*, 4, 1 87-90.
- ❖ **Watanabe. T., Kanai. R., Kawase. T., Tanabe.T., Mitsutomi. M., Sukuda. S and Miyashita. K., 1999.** Family 19 chitinases of *Sreptomycetes* species : Characterization and distribution, *Microbiology*, 145, 3353-3363.
- ❖ **Weinman. S et Méhul. P., 2000.** *Biochimie: structure et fonction des protéines*, Dunad, Paris, pp 110-11.
- ❖ **Wen.C., Ying.C.C., and Yaw. H., 1998.** Chitinase activity of sweet potato (*Ipomoea batatas*), *Botanique Bulletin Academy. Sin*, 39, 93-97
- ❖ **Xiangzhen. L., and Brune. A., 2005.** Digestion of microbial biomass, structural polysaccharides, and protein by the Humivorous larva of *Pahnoda ephippiata* (Coleoptera: Scarabaeidae), *Soil. Biology and Biochemistry*, 37,107-116.
- ❖ **Yazuyuki. A., Quingsong, Z., Masahiro. M., Subbaratnam., Muthu, Krishnan., and Karl, J.Kramer., 2003.** Proprieties of catalytic, linker and chitin-binding domains of insect chitinase, *Insect. Biochemistry and Molecular Biology*, 33, 631-648.
- ❖ **Yon. J., 1969.** *Sructure et dynamique conformationnelles des proteins*, Ed Herman, Paris
- ❖ **You. J. J., Kim. K. S., 2000.** Production of chito oligosaccharides using an ultrafiltration membrane reactr and their antibacterial activity, *Carbohydrate Polymers*, 41, 133-141.

- ❖ **Zhang. M., Hoga. A., Sekigushi. H., Hirano. S., 2002.** Structure of insect chitin isolated from beetle larva cuticule and silkworm (*Bombyx mori*) pupa exuvia. *International. Journal of Biological Macromolecules*, 27, 99-105.
- ❖ **Zobell. C. C., 1946.** *Chronica botonica*, Waltham, Massachusetts, Marine. Microbiology, cite dans Djeghri. M., 1986.

TECHNIQUE ANALYTIQUE

I. DOSAGE DES NITRATES :

Méthode au réactif Sulfophénique (Norme AFNOR NF 90 012)

Le dosage des nitrates se fait par colorimétrie dans le visible.

Réactifs :

- Acide sulfurique (36N).
- Ammoniac.
- Phénol.

Préparation du réactif sulfophénique :

Dissoudre 12 grammes de phénol dans 140ml d'acide sulfurique dans un bain marie.

Appareillage :

- Un photomètre UV visible, pour travailler à 440nm

Mode opératoire :

1. Prendre 5 ml de l'échantillon à analyser, le faire évaporer à sec.
2. Laisser refroidir et ajouter 2ml du réactif sulfophénique.
3. Attendre 10minutes, puis ajouter 15ml d'eau distillée et 15ml d'ammoniac qui développe la couleur jaune.
4. Compléter à 50ml avec de l'eau distillée.
5. Effectuer la lecture sur le photomètre à $\lambda = 440\text{nm}$.
6. La teneur en nitrates de l'échantillon est déduite à partir de la courbe d'étalonnage figure (1).

II. DOSAGE DE NITRITES

Méthode au réactif de DIAZOTATION (Norme AFNOR NF T 90 013)

Réactif de diazotation :

- Acide orthophosphorique (H_3PO_4).
- Sulfaniamide ($C_6H_8O_2N_2S$).
- Dichlorure de N-(1-naphty) éthylène diamine ($C_{10}H_7NHCH_2CH_2, 2HCl$).

Préparation du réactif de diazotation :

- A 800 ml d'eau distillée, ajouter 100ml d'acide orthophosphorique concentré, et 40g de Sulfaniamide.
- Après dilution, ajouter 2g de dichlorure de N-(1-naphty) éthylène diamine
- Compléter à 1000ml avec de l'eau distillée.

Appareillage :

- Un photomètre UV visible, pour travailler à 537nm.

Mode opératoire :

1. Prendre 50ml de l'échantillon à analyser.
2. Ajouter 1 ml de réactif de diazotation.
3. Attendre 10minutes pour le développement de la couleur rose.
4. Effectuer la lecture sur le photomètre à $\lambda = 537nm$
5. La teneur en nitrites de l'échantillon est déduite du graphique d'étalonnage figure (2)

III. DOSAGE DE LA Demande Chimique en Oxygène (DCO)

Standard methods (APHA, 1985)

Appareillage :

- Un photomètre UV visible, pour travailler à 600nm.

Réactif de digestion :

1. Dissoudre 10.216g de $K_2Cr_2O_7$, préalablement chauffé à 103°C pendant 2h, dans 500ml d'eau distillée.
2. Ajouter 167ml de H_2SO_4 concentré + 33.3 $HgSO_4$, dissoudre à température ambiante et diluer à 1000ml avec de l'eau distillée.

Réactif d'acide sulfurique :

Ajouter Ag_2SO_4 à H_2SO_4 concentré avec un taux de 5.5g de $Ag_2SO_4/kg H_2SO_4$.

Mode opératoire :

1. Prendre 2ml de réactif de digestion + 1 ml de réactif d'acide sulfurique dans des tubes spécifiques, après le mélange les tubes doivent être immédiatement bien fermés afin d'éviter toute évaporation suite à un fort échauffement dû à une réaction exothermique.
2. Bien mélanger les tubes au vortex, et laisser les refroidir.
3. Mettre le bloc chauffant en marche pendant au moins 30min. à 148°C, jusqu'à ce que le voyant de chauffe (heating) s'allume.
4. Ajouter 2ml de l'échantillon à analyser pour le tube déjà préparé, fermer le tube et agiter.
5. Positionner les tubes dans le bloc chauffant préalablement préchauffé, régler le minuteur sur 120min.
6. Après minéralisation des tubes échantillons, le bloc s'arrête automatiquement de chauffer.
7. Sortir les tubes, les laisser refroidir, les agiter.
8. Effectuer la lecture sur le photomètre à $\lambda = 600nm$.
9. La DCO de l'échantillon est déduite de la courbe d'étalonnage figure (3).

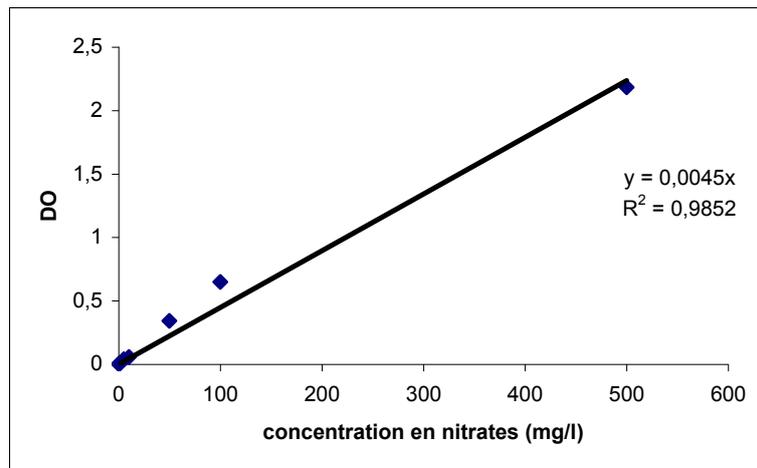


Figure1 : courbe d'étalonnage des nitrates.

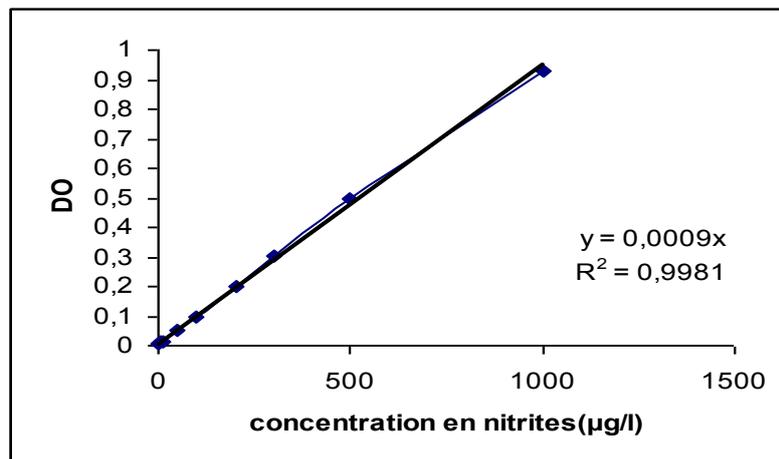


Figure2 : courbe d'étalonnage des nitrites

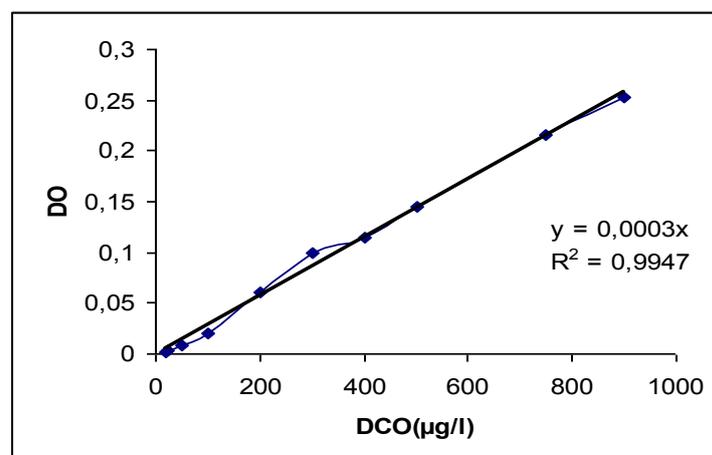
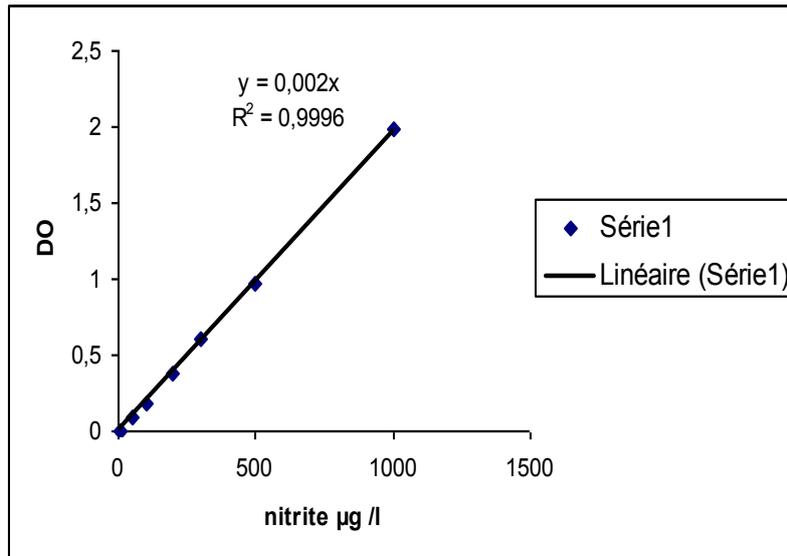


Figure3 : courbe d'étalonnage de la DCO.



(b) Janvier- Avril 2005

