



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET
POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

ECOLE DOCTORALE INGENIERIE ET ENVIRONNEMENT-I.E.

ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE

Mémoire en vue de l'obtention de titre de magister en Ingénierie et
Environnement

Option : Gestion et Protection de l'Environnement.

**Dénitrification des eaux souterraines par biomasse fixée
sur support cellulosique: la drèche**

Présenté par : M. BENYOUCEF Nabil

Devant le jury:

Président: M. BELLAL M.M (Professeur ENSA)

Rapporteur: Mme ABDI N. (Maitre de conférences ENP)

Examineurs: M. MAMERI N. (Professeur ENP)

M. LOUNICI H. (Professeur UMMTO)

M.DROUICHE M. (Maitre de conférences ENP)

Invitée: Mlle. CHEIKH A. (Maitre assistant UMMTO)

Année universitaire 2009/2010

DEDICACES

JE DÉDIE CE MODESTE TRAVAIL EN SIGNE DE RESPECT ET DE
RECONNAISSANCE :

- A MES CHERS PARENTS.
- A MES FRÈRES ET SŒURS.
- A MES BEAUX FRÈRES.
- A MES NEVÉUX ET NIÈCES.
- A TOUTE LA FAMILLE BENYUCEF.
- A TOUS MES AMIS.
- A TOUS CEUX QUI ME REVIENNENT CHÈRE.

NABIL

Remerciements

Enfin la partie la plus facile à écrire, ces deux ans de post-graduation ont été riches pour moi que ce soit d'un point de vue scientifique ou humain. Je tiens alors à remercier de nombreuses personnes:

Je suis profondément heureux d'exprimer ma gratitude et sincère reconnaissance à ma promotrice : M^{me} ABDI. N, maitre de conférence à l'ENP, pour les conseils et l'aide qu'elle ma apporté durant tout mon travail, ainsi qu'à la rédaction de ce modeste mémoire.

Je remercie grandement M. BELLAL M.M., responsable de l'option: Gestion et protection de l'Environnement, professeur à l'ENSA pour ses conseils précieux, son soutien et sa disponibilité, ainsi que d'avoir accepté de présider le jury.

Je tiens également à dire un grand merci à M. LOUNICI H. professeur à UMMTO et à M. MAMERI N. professeur à l'ENP d'avoir accepté d'être les juges de ce mémoire. Je les remercie également pour leurs soutiens durant les moments les plus difficiles. A ce même titre, je tiens à remercier les autres membres du jury. Merci donc à M^{lle} CHEIKH A.et à M. DROUCHE M.

Je tiens à remercier également:

- Le personnel du laboratoire d'analyse de l'institut technique d'élevage de Baba Ali.
- Le laborantin Mabrouk du laboratoire de biochimie alimentaire de l'ENSA.

Mes pensées vont également à mes amis de l'Ecole Doctorale Ingénierie et Environnement sans oublier mon très cher ami Moussa sur qui je sais que je peux conter en toute occasion.

Enfin je tiens bien évidemment à remercier du plus profond de mon cœur ma famille et en particulier mes parents sans qui je ne serais pas ce que je suis aujourd'hui et sans qui je ne serais pas arrivé jusqu'ici.

Sommaire

Introduction	1
I. Synthèse bibliographique.....	3
<i>Chapitre 1 : Les réacteurs à Biofilm</i>	3
I.1.1 Biofiltration sur support organique	3
I.1.2 Caractérisation du biofilm	3
I.1.2.1 Composition et structure d'un biofilm	3
I.1.2.2 Formation du biofilm.....	4
I.1.2.3 Croissance du biofilm	6
I.1.2.4 Phase d'équilibre	6
I.1.2.5 Le détachement.....	6
I.1.2.6 Facteurs d'influence sur la formation du biofilm.....	7
I.1.2.7 Les supports bactériens et la formation du biofilm.....	8
I.1.3 Les procédés à biofilm fixé.....	8
<i>Chapitre 2: Biologie de la Dénitrification</i>	9
I.2.1 Biologie du cycle d'azote.....	9
Dans ce qui suit, nous nous limiterons au processus de dénitrification principale objet de notre étude.	10
I.2.2 La dénitrification.....	10
I.2.2.1 Biochimie de la Dénitrification	10
I.2.2.2 Biologie moléculaire de la dénitrification	12
I.2.2.3 Stoechiométrie de la dénitrification	14
I.2.2.4 Facteurs influençant la dénitrification	14
A. Température	14
B. pH	16
C. Concentration en oxygène dissous	16
D. Concentration en nitrates	17
E. Nature de la source carbonée: rapport DBO: DCO	17
F. Le temps de rétention hydraulique (TRH)	17
<i>Chapitre 3: Effets des nitrates sur l'homme et sur l'environnement</i>	19
I.3.1 Sources et niveaux environnementaux.....	19
I.3.1.1 Source	19
I.3.1.2 Concentration dans l'eau potable	19
I.3.1.2 Normes et recommandations.....	19

I.3.2 Effet sur la santé humaine	20
I.3.2.1 Risque de méthémoglobulinémie	20
I.3.2.2 Risque carcinogène	21
I. 3.2.3 Effets indirects.....	21
I.3.3 Effet sur l'environnement	21
<i>Chapitre 4: Les biofiltres lignocellulosiques</i>	<i>23</i>
I.4.1 Composition biochimique des matériaux lignocellulosiques	23
I.4.1.1 La cellulose	23
I.4.1.2 L'hémicellulose.....	24
I.4.1.3 La lignine.....	25
I.4.2 Prétraitement des matériaux ligno-cellulosiques	27
I.4.3 Mécanisme d'action des enzymes cellulolytiques.....	28
I.4.4. Emploi des matériaux lignocellulosiques comme biofiltres	30
II. Matériels et méthodes	32
II.1. Introduction	32
II.2. Matériel et méthodes utilisés.....	32
II.2.1. Traitement du support utilisé	32
II.2.2. Caractérisation du support	33
II.2.2.1. Caractérisation physique du support	33
II.2.2.2. Caractéristiques biochimiques	35
II.2.3. Sélection des bactéries dénitrifiantes.....	35
II.2.4. Essai de dénitrification en Batch	36
II.2.4.1. Comparaison de l'efficacité du traitement.....	36
II.2.4.2. Optimisation de la concentration en biomasse végétale	36
II.2.5. Essai de dénitrification sur colonne	37
II.2.5.1 Description du montage.....	37
II.2.5.2 Milieu filtrant	38
II.2.5.3 L'eau d'alimentation	39
II.2.5.4. Fixation naturelle des bactéries dénitrifiantes.....	39
II.2.6. La distribution des temps de séjour (DTS) d'un système.....	39
II.2.7. Méthodes d'analyses physico-chimiques.....	41
III. Résultats et discussion	42
III.1. Etat de dégradation des eaux souterraines de la plaine de Mitidja	42
III.2. Traitement chimique de la drèche.....	43

III.3. Caractéristiques de la drèche.....	45
III.3.1. Caractéristiques physiques de la drèche	45
III.4 Essai de dénitrification en batch.....	47
III.4.1 Comparaison de l'efficacité du traitement.....	47
III.4.2. Optimisation de la concentration en biomasse végétale	48
III.5. Dénitrification sur colonne	49
III.5.1. Optimisation des paramètres de fonctionnement des bioréacteurs.....	49
III.5.1.1. Dénitrification sous différents TRH _s	49
III.5.1.2 Dénitrification sous différentes concentrations en nitrates	50
III.5.1.3 Effet de la variation du pH sur le processus de dénitrification.....	53
III.5.2 Profils verticaux des nitrates et des nitrites	53
III.5.2.1 Influence du temps de rétention hydraulique	53
III.5.2.2 Influence de la concentration initiale en nitrates.....	58
III.5.2.3 Influence du pH.....	58
III.6 Caractérisation des réacteurs	66
III.6.1 Distribution des temps de séjour hydraulique des réacteurs	66
III.6.1.1 Temps de séjour	66
III.6.1.2 Influence du biofilm sur l'hydrodynamique des réacteurs	67
Conclusion.....	69
<i>Références bibliographiques</i>	1
Annexes	12

Liste des figures

Figure I.1: Deux modèles conceptuels de la structure d'un biofilm.....	4
Figure I.2: Cycle d'azote.....	9
Figure I. 3: Réaction de dénitrification catalysée par des nitrate (NAR), nitrite (NIR), oxyde nitrique (NOR), et oxyde nitreux (N ₂ OR) réductases, oxydation de l'oxyde nitrique en NO ₂ (OX) par une oxyde nitrique oxydase.....	11
Figure I.4 : Schéma de la dénitrification complète chez <i>Paracoccus denitrificans</i>	13
Figure I.5: Métabolisme de la dénitrification.....	14
Figure I. 6: Représentation schématique de la molécule de cellulose.....	23
Figure I.7: La structure cristallographique de la cellulose en rayon X	24
Figure I.8: Monomères constitutifs de la lignine.....	26
Figure I.9: Liaisons covalentes: lignine-polysaccharide les plus souvent rencontrées.....	27
Figure I.10: Nature modulaire des protéines cellulolytiques.....	29
Figure I.11: Les deux mécanismes stéréochimiques de l'hydrolyse par les cellulases.....	30
Figure II.1: Les différentes rétentions d'un biofiltre organique.....	34
Figure II.2: Montage expérimental de l'essai de dénitrification.....	38
Figure III.1: Résultats des différentes rétentions de la drèche non traitée.....	46
Figure III.2: Résultats des différentes rétentions de la drèche traitée.....	46
Figure III.3: Evolution de l'abattement des nitrates des deux types de support.....	47
Figure III.4: Rendement de dénitrification en fonction de la concentration en biomasse végétale.....	48
Figure III.5: Evolution des concentrations en nitrates et nitrites en fonction de la hauteur du milieu filtrant (support non traité) à différents temps de rétentions hydrauliques et à une concentration initiale en NO ₃ ⁻ de 100mg/l, pH= 7,5-7,9.....	55
Figure III.6: Evolution des concentrations en nitrates et nitrites en fonction de la hauteur du milieu filtrant (support traité) à différents temps de rétentions hydrauliques et à une concentration initiale en NO ₃ -N de 100mg/l, pH=7,5-7,9.....	55
Figure III.7: Evolution des concentrations en nitrates et nitrites en fonction de la hauteur du milieu filtrant (support non traité) à différentes concentrations initiales en nitrates au temps de rétention optimum (100min), pH= 7,5-7,9.....	59

Figure III.8: Evolution des concentrations en nitrates et nitrites en fonction de la hauteur du milieu filtrant (support traité) à différentes concentrations initiales en nitrates au temps de rétention optimum (55min), pH= 7,5-7,9.....	59
Figure III.9: Evolution des concentrations en nitrates et nitrites en fonction de la hauteur du milieu filtrant (support non traité) à différents pH aux conditions de fonctionnement optimales (TRH=100min; NO ₃ -N=200mg.l ⁻¹).....	60
Figure III.10: Evolution des concentrations en nitrates et nitrites en fonction de la hauteur du milieu filtrant (support traité) à différents pH aux conditions de fonctionnement optimales (TRH=55min; NO ₃ -N=200mg.l ⁻¹).....	60
Figure III.11: Courbe de DTS du pilote à support non traité.....	65
Figure III.12: Courbes de DTS du pilote à support traité.....	65

Liste des tableaux

Tableau I.1: Facteurs influençant la formation du biofilm.....	7
Tableau I.2: Résultat des différentes recherches de l'effet de la température sur le processus de dénitrification.....	15
Tableau I.3: Exemples de TRH pour différents procédés de dénitrification.....	18
Tableau I.4: Influence des nitrates sur les activités et la santé humaine.....	19
Tableau I.5: Résumé des normes et recommandations.....	20
Tableau I.6: Groupes d'hémicelluloses présents dans les parois végétales.....	25
Tableau II.1: Composition de l'alimentation en continu et en discontinu.....	36
Tableau III.1: Concentration des nitrates de quelques points d'eau de la plaine de la Mitidja.....	42
Tableau III.2: Composition biochimique de la drèche à l'état initiale, et après traitement alcalin.....	44
Tableau III.3: Caractéristiques physiques de la drèche utilisée.....	45
Tableau III.4: Concentration des nitrates et nitrites dans l'affluent et l'effluent à différents paramètres de fonctionnement du pilote à support non traité.....	51
Tableau III.5: Concentration des nitrates et nitrites dans l'affluent et l'effluent à différents paramètres de fonctionnement du pilote à support traité.....	52
Tableau III.6: Concentration des nitrates, nitrites et rendement de dénitrification des piquages intermédiaires à différents temps de rétention hydrauliques.....	56
Tableau III.7: Récapitulatif des concentrations en nitrates, nitrites et rendement de dénitrification des piquages intermédiaires à différentes concentrations initiales en nitrates de l'affluent.....	61
Tableau III.8 : Récapitulatif des concentrations en nitrates, nitrites et rendement de dénitrification des piquages intermédiaires à différents pH de l'affluent.....	62
Tableau III.9 : Synthèse des résultats de l'étude hydrodynamique pour $Q_0=23,8\text{ml/min}$	64

Liste des abréviations

ADF: Acid Detergent Fiber

ANRH: Agence Nationale des Ressources Hydriques

ASS: Air de la Surface Spécifique.

DBO: Demande Biologique en Oxygène.

DCO: Demande Chimique en Oxygène.

DTS: Distribution du Temps de Séjour

ICr: Indice de Cristallinité.

MS: Matière Sèche

N₂OR: Oxyde nitreux réductases.

NAR: Nitrates réductases.

NDF: Neutral Detergent Fiber

NIR: Nitrites réductases.

NOR: Oxyde nitrique réductases.

OMS: Organisation Mondiale de la Santé.

SBR: Réacteur Séquentiel en Batch.

TE: Taille Effective

TRH: Temps de Rétention Hydraulique.

المخلص:

الغرض من هذا العمل هو دراسة إمكانية استعمال بقايا إنتاج الجعة (بقايا الشعير) كمصدر للكربون ووسيلة لتثبيت اليكتيريا وهذا لمعالجة المياه الجوفية المحملة بشوارد النترات , لهذا الغرض استعمل مفاعل حيوي لمقارنة فعالية بقايا إنتاج الجعة الغير معالجة بمثلتها المعالجة بثاني أكسيد الصوديوم.

البحث عن أفضل عوامل تشغيل المفاعلين (مدة المكوث , التركيز الأولي لشوارد النترات ودرجة حموضة الوسط) بين أن أفضل هذه عوامل للحامل الغير معالج : مدة المكوث : 100 د, التركيز المولي لنترات: 200 مع.ل⁻¹ ودرجة حموضة الوسط: 7,5-7,9 . أما بالنسبة للحامل المعالج فان: مدة المكوث: 55 د , التركيز المولي للنترات : 200 مع.ل⁻¹ و درجة حموضة الوسط : 7,5-7,9 .

ولقد بينت الدراسة العمودية أن لمدة الالتقاء ودرجة حموضة الوسط تأثيرا معتبر على مردود نزع النترات لكن فيما يخص التركيز الأولي للنترات لم يلاحظ لهذا الأخير أي تأثير على مردود نزع النترات.

الكلمات المفتاحية: نزع النترات, المياه الجوفية, مفاعل حيوي, بقايا إنتاج الجعة.

Résumé

Cette étude a pour objectif d'évaluer la possibilité d'utiliser la drèche de brasserie: un sous produit agro-industriel, comme source de carbone et support de fixation des bactéries dénitrifiantes pour traiter les eaux souterraines chargées en nitrates. Un bioréacteur à écoulement ascendant a été utilisé pour comparer la performance de la drèche avant et après traitement à l'hydroxyde de sodium en solution.

L'optimisation des paramètres de fonctionnement (TRH, concentration initiale en nitrates, pH) des deux bioréacteurs a montré que les paramètres optimum de la réaction sont: TRH=100min, $\text{NO}_3^- = 200\text{mg/l}$ et un $\text{pH}=7,5-7,9$ pour le pilote à support non traité et TRH=55min, $\text{NO}_3^- = 200\text{mg/l}$ et un $\text{pH}=7,5-7,9$ pour le pilote à support traité.

L'étude verticale a montré que le temps de contact et le pH affectent significativement l'élimination des nitrates, alors que la concentration initiale en nitrates est sans influence sur le rendement de dénitrification.

Mots clés: Dénitrification, Eaux, Bioréacteurs, Drèche

Abstract

This study evaluates brewer's spent grain as media and Carbone source for denitrification processes in treating groundwater. A laboratory bioreactor was used to compare the performance of not treated and treated brewer's spent grain with sodium hydroxide.

Optimization of running conditions were investigated under various parameters including: hydraulic retention time (HRT), influent nitrate loading and pH. The experimental results demonstrate that the optimum reaction parameters were: HRT= 100min; $\text{N-NO}_3 = 200\text{mg.l}^{-1}$; $\text{pH}= 7,5-7,9$ for the not treated media and HRT= 55min; $\text{N-NO}_3 = 200\text{mg.l}^{-1}$; $\text{pH}= 7,5-7,9$ for media after treatment with NaOH.

Vertical study showed that hydraulic retention time and pH affect significantly the nitrate removal, while nitrate loading do not affect the denitrification process.

Key words: Denitrification, Water, Bioreactor, Brewer's spent grain

Introduction

La teneur en nitrate des eaux souterraines ou de surface sont en augmentation continue ces dernières années avec l'intensification de l'agriculture, de l'industrialisation et de l'urbanisation. Environ 30% à 70% des fertilisants azotés utilisés en agriculture sont perdus dans l'environnement sous forme d'ammoniac (NH_3) et d'oxyde d'azote (N_2O) qui polluent l'atmosphère (Silvan *et al.*, 2002) et sous forme de nitrates que l'on retrouve dans les eaux de surface et souterraines (Li *et al.*, 2003). Et pourtant, ces eaux sont exploitées pour l'eau potable. Pour les nitrates, la valeur guide est fixée à 50 mg/L. Cependant, en Algérie comme ailleurs, ce seuil tend à être dépassé, la quantité de nitrates trouvée dans différents points de la plaine de Mitidja en 2004 est comprise entre 95 et 175mg/L (Agence National des Ressource en Eau 2005).

En effet, les nitrates possèdent une particularité que les autres substances polluantes n'ont pas, ils peuvent se trouver dans le sol et les eaux soit à la suite d'un apport d'engrais, soit comme la conséquence de processus biochimiques naturels qui dépendent étroitement des conditions pédoclimatiques et écologiques régionales. De plus, les systèmes de cultures qui comportent les pratiques de gestion agricoles, depuis le choix des espèces cultivées et des successions culturales jusqu'aux itinéraires techniques, jouent également sur la quantité d'azote nitrique présent dans les différents horizons du sol et déterminent ainsi le risque de pollution de la nappe par les nitrates. Par ailleurs, le transfert des nitrates vers la nappe est conditionné par un excès d'eau d'irrigation ou de pluie. Enfin, d'autres facteurs intrinsèques du milieu physique peuvent accentuer ou limiter le processus de pollution nitrique des eaux souterraines et déterminent ainsi des degrés de vulnérabilité de la nappe à ce type de pollution.

A des concentrations élevées, la consommation des nitrates provoque la méthémoglobinémie chez les nourissants (Blue-Baby), Les nitrates sont réduits en nitrites dans l'intestin lesquels sont à l'origine de plusieurs cancers; entre-autre les nitrosamines sont des composés cancérigènes qui peuvent être formés à partir des nitrites dans l'estomac (Gomez *et al.*, 2000).

L'élimination des nitrates peut être réalisée soit par des traitements physico-chimiques: échange sélectif d'ions, procédés membranaires, soit par des procédés biologiques: dénitrification autotrophe ou hétérotrophe.

Les procédés utilisant les bactéries hétérotrophes se sont avérés les plus efficaces pour la dénitrification des eaux souterraines (Mateju et al., 1992) et pour la dénitrification tertiaire des eaux résiduaires urbaines (Chudoba et al., 1998). Toutes ces applications nécessitent l'addition d'une source de carbone extérieure et utilisent des systèmes de bioréacteurs à bactéries fixées.

Dans le cadre du développement durable, les gisements en biomasse agricole et forestier s'inscrivent dans les contextes énergétique, économique et environnemental actuels comme une ressource valorisable, voire stratégique. Actuellement les recherches sont orientées vers la valorisation des matériaux ligno-cellulosiques. Notre contribution innovatrice est l'utilisation d'un sous produit de l'industrie agro-alimentaire (drèche), comme source de carbone, et support de fixation des bactéries dénitrifiantes. Le présent travail a été réalisé au laboratoire de biotechnologie environnementale et génie des procédés (BIOGEP) comprend trois parties:

- Une partie bibliographique qui regroupe les résultats déjà obtenus lors du traitement de la pollution nitrique en utilisant la dénitrification hétérotrophe.
- La deuxième partie traitera les méthodes utilisées.
- La troisième partie est consacrée aux résultats obtenus et leurs discussions.
- Une conclusion finale.

I. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : Les réacteurs à Biofilm

I.1.1 Biofiltration sur support organique

La biofiltration est un procédé de traitement des eaux pour lequel un matériau solide sert à la fois de support à la croissance microbologique et de filtre. Les polluants (carbone, azote, phosphore) sont enlevés de la phase aqueuse par différents phénomènes physiques et biologiques (Hodkinson et al. 1999). En effet les microorganismes présents sur le support utilisent les composantes de l'eau à traiter comme source de nourriture pour leur croissance et transforment ainsi la matière soluble en biomasse, en sous-produit de dégradation et en matière gazeuse. De plus, la très faible dimension des pores du milieu filtrant permet de retenir une importante proportion de la matière particulaire plus difficilement biodégradable présente dans l'affluent; la portion organique de ces particules pouvant ensuite être hydrolysées et utilisée comme source de nutriments par certains microorganismes (Grady et al. 1999; Metcalf et Eddy 2003).

Plusieurs systèmes sont conçus avec un support inorganique ou synthétique, comme de la pierre poreuse, du polystyrène ou du plastique très poreux (Hodkinson et al. 1999) tandis que d'autres utilisent plutôt un matériel poreux organique comme la paille, le charbon activé ou la tourbe (Garzon et al. 2005). La charge hydraulique pouvant être appliquée sur un système à support organique est cependant beaucoup plus faible que pour les autres types de biofiltres. Celle-ci peut varier de 0,015 à 0,84 $\text{m}^3 \text{m}^{-2}\text{j}^{-1}$ pour les biofiltres à tourbe (Couillard 1994) comparativement à plus de 120 $\text{m}^3 \text{m}^{-2}\text{j}^{-1}$ pour certains filtres à sable utilisés en dénitrification (Metcalf et Eddy 2003).

I.1.2 Caractérisation du biofilm

Le biofilm est un film biologique adhérent à une surface, constitué de cellules microbiennes, d'exopolymères, et d'eau. Le biofilm peut donc être considéré comme un gel de polymères adhérent à l'intérieur duquel se trouve les microorganismes. Il présente une structure poreuse très absorbante.

I.1.2.1 Composition et structure d'un biofilm

Les caractéristiques suivantes sont considérées typiques des films microbiens:

- Ces films sont des couches visqueuses avec un comportement rhéologique et viscoélastique consistant comme un gel.

- Leur couleur varie du blanc translucide ou jaunâtre à marron sombre ou noircit. Cette variation est fonction du type de microorganisme et du substrat dominant.
- Ils peuvent avoir une épaisseur qui peut aller de quelques microns (films formés dans des liquides avec une faible concentration en substrat) à quelques millimètres ou centimètres (exemple: les eaux blanches de pulpes de la fabrication du papier).
- La masse du biofilm est constituée essentiellement d'eau (fréquemment plus de 90%).
- La masse des polymères extracellulaires contient typiquement des polysaccharides et des glycoprotéines, qui peuvent représenter plus de 70% ou plus du poids de biofilm.
- La fraction des microorganismes dans les biofilms dépend des caractéristiques métaboliques des populations microbiennes et de la concentration en substrat. Elle peut correspondre à 10-50% de biomasse sèche.

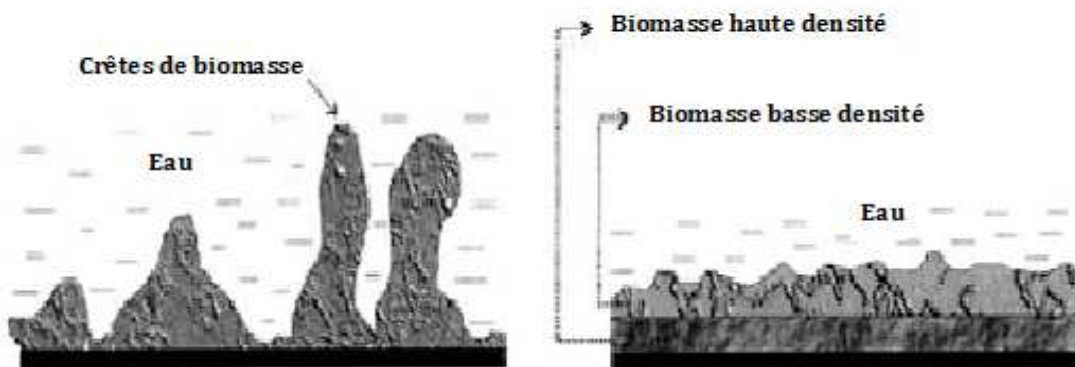


Figure I.1: Deux modèles conceptuels de la structure d'un biofilm (Melo et Oleveira 2005).

1.1.2.2 Formation du biofilm

La formation du biofilm est un phénomène complexe se déroulant en plusieurs étapes influencées par des facteurs physico-chimiques et biologiques. Cette formation se déroule en cinq étapes.

- Le conditionnement organique de la surface,
- L'adhésion primaire des cellules sur le support,
- Une phase de croissance caractérisée par la production de biofilm,
- Une phase de stabilisation ou « d'équilibre »,
- Le détachement.

Les deux premières étapes constituent la phase de latence; cette période correspond au temps nécessaire à la formation de la première couche de cellules fixées. Elle a lieu quelques minutes après l'exposition de la surface propre à un flux de fluide contenant des microorganismes, des molécules organiques et inorganiques. Un solide immergé dans un liquide acquiert une charge de surface, soit par ionisation des groupes de surface, soit par adsorption d'ions présents dans la phase aqueuse. Une fois chargée, cette surface attire des contre ions correspondant à des nutriments organiques et inorganiques qui peuvent être utilisés par les bactéries. Par conséquent, la formation de cette couche électrique est indirectement une source potentielle de nutriments. Cette adsorption conditionne la surface du support pour la fixation de microorganismes (Trulear et Characklis, 1982). En revanche la formation d'une couche importante pendant la phase initiale de développement du biofilm ne produira pas un biofilm plus important. La couverture organique initiale est donc nécessaire, mais ne détermine pas la croissance du biofilm (Apilanez *et al.*, 1998).

L'adhésion des cellules à la surface se déroule en deux étapes, une première réversible de nature physico-chimique qui suit les lois d'adsorption avec des forces attractives et répulsives, suivi d'une seconde irréversible de nature biologique avec la formation d'exopolymères cellulaires.

Au cours de la première étape, les cellules se rapprochent de la surface du support par interactions attractives gouvernées par les forces de Van Der Waals et les liaisons chimiques hydrophobes et ioniques. Elles peuvent alors s'y fixer de façon réversible. Ces forces sont liées aux propriétés physico-chimiques des cellules et de la surface du solide (Belkhadir, 1986, Alves *et al.*, 1999).

La seconde étape fait intervenir la production de polysaccharides secondaires ainsi que d'autres polymères biologiques tels que les protéines. Elle est considérée comme responsable de la fixation irréversible entre les cellules et la surface. La force

d'adhésion d'un biofilm suit le même phénomène que la densité et augmente avec la profondeur (Alves *et al.*, 1999).

La colonisation initiale durant la phase de latence a lieu préférentiellement dans les cavités et les creux du support, à l'abri des mouvements du milieu. L'influence du type du support sur l'adhésion et la formation du biofilm a été étudiée par Gjaltema *et al.*, (1997). Les résultats montrent clairement que les forces de cisaillement contrôlent la formation du biofilm.

1.1.2.3 Croissance du biofilm

Une fois fixées, les cellules se développent en micro colonies et se développent rapidement à la surface du support.

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, c'est-à-dire de la charge nominale du réacteur.

1.1.2.4 Phase d'équilibre

Le biofilm atteint son épaisseur maximale avec une stabilisation de la biomasse fixée lorsque la production de biomasse est compensée par le détachement (Heijnen *et al.*, 1989). Lorsque les contraintes hydrodynamiques dans le réacteur ne sont pas suffisamment importantes, le biofilm continue sa croissance en épaisseur. L'activité spécifique du biofilm tend à l'abaisser lorsque l'épaisseur du film biologique dépasse une valeur critique (Buffière *et al.*, 1995).

1.1.2.5 Le détachement

Bien que le phénomène de détachement soit impliqué dans l'ensemble des processus de la formation du biofilm. Le détachement est le résultat de plusieurs phénomènes (Van Loodsrecht et Heijnen, 1996 ; Nicoletta *et al.*, 2000) :

- La consommation des bactéries de la surface par les protozoaires.
- La mort cellulaire.
- La perte rapide et massive de biofilm surtout avec des biofilms épais lors des changements environnementaux brutaux comme une forte diminution de la

charge ou la présence d'un toxique. La mort dans les parties internes conduit également à une rupture de la liaison solide-biofilm.

- L'érosion (la perte permanente de petites particules de la surface du biofilm, essentiellement provoquées par les forces de cisaillement).
- L'abrasion (analogue à l'érosion, mais provoquée par les collisions de particules).

Le taux de détachement du biofilm est une fonction complexe, qui inclut l'hydrodynamique de l'écoulement, la morphologie du biofilm, et les caractéristiques du support. Les données expérimentales sur le taux de détachement du biofilm dans les réacteurs à lit fluidisés signalés par Nicoletta et al., (1996) ont montrés que le coefficient du taux de détachement spécifique augmente fortement avec l'augmentation de la vitesse de l'écoulement.

1.1.2.6 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 I.1 regroupe les différents facteurs mis en évidence par différents auteurs (d'après Annachhatre et Bhamidimarri, 1992). 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 importante de biosolides à des températures inférieures à 5°C (Annachhatre et Bhamidimarri, 1992).

Tableau I.1: facteurs influençant la formation du biofilm (Annachhatre et Bhamidimarri, 1992).

Facteurs	Influence sur l'adhésion cellulaire
Facteurs cellulaires	
Hydrophobicité	Augmente
Concentration	Augmente
Espèce	Dépendante
Facteurs de surface	
Rugosité	Augmente
Hydrophobicité	Augmente
Surface spécifique	Augmente ou sans effet
Facteurs environnementaux	
Temps	Augmente
Température	Augmente

Dans un réacteur classique, la capacité de l'élimination de la charge des effluents dépend en effet des conditions de fonctionnement du réacteur (notamment de la composition de l'effluent, le temps de séjour hydraulique TRH, la charge massique en carbone, la charge volumique en azote).

1.1.2.7 Les supports bactériens et la formation du biofilm

Les supports de biofilm devraient avoir des propriétés physiques et chimiques désirables dans le but de réussir l'attachement des microorganismes et supporter la croissance microbienne. Dussert et Tramposch (1996) suggèrent que le support utilisé pour la biofiltration doit avoir une bonne porosité, une bonne rugosité de la surface, ainsi qu'une bonne capacité d'adsorption. Sa chimie de surface doit être favorable (ne réagit pas avec le liquide qui s'écoule en surface).

Son et al. (2004), ont montrés que l'aptitude des microorganismes à se fixer sur la surface d'un support est fonction de la résistance du matériau utilisé aux courants du fluide traversant le système de biofiltration. De plus le médium doit avoir un volume interstitiel suffisant pour prendre au piège les microorganismes qui se détachent.

La présence d'oligo-éléments dans un support bactérien contribue à la prolifération des microorganismes. Saka (2001) a identifié plusieurs oligo-éléments contenus dans le bois comme le Ca, K, Mg, Na, B, Mn, Mo, Cu, Zn, Co, Ni. Ces éléments sont essentiels pour la multiplication des microorganismes.

1.1.3 Les procédés à biofilm fixé

Les procédés à cultures fixées possèdent des avantages par rapport aux procédés à cultures libres. L'hétérogénéité structurelle du biofilm lui confère la possibilité d'abriter différents types de microorganismes dans différentes niches écologiques. Ainsi, une grande diversité d'organismes se développe. Il a, par exemple, été prouvé que les bactéries nitrifiantes se développaient plus en profondeur au sein du biofilm où l'oxygène est encore présent pour la nitrification où il n'y pas de compétition avec les souches hétérotrophes à croissance plus rapide. Cette technologie associe les principaux avantages du biofilm (Sriwiriyarat et Randall, 2005).

Le système à culture fixée fournit une surface volumique élevée pour les microorganismes par l'attachement naturel du biofilm sur les supports. La présence de biomasse sur les supports augmente également la stabilité du système biologique en

réduisant les problèmes des surcharges organiques et des charges toxiques (Sriwiriyarat et Randall, 2005).

Chapitre 2: Biologie de la Dénitrification

I.2.1 Biologie du cycle d'azote

La figure I.2 montre les différents processus impliqués dans la transformation de l'azote. L'enlèvement biologique de l'azote dans un affluent liquide implique généralement deux processus successifs: la nitrification suivie de la dénitrification.

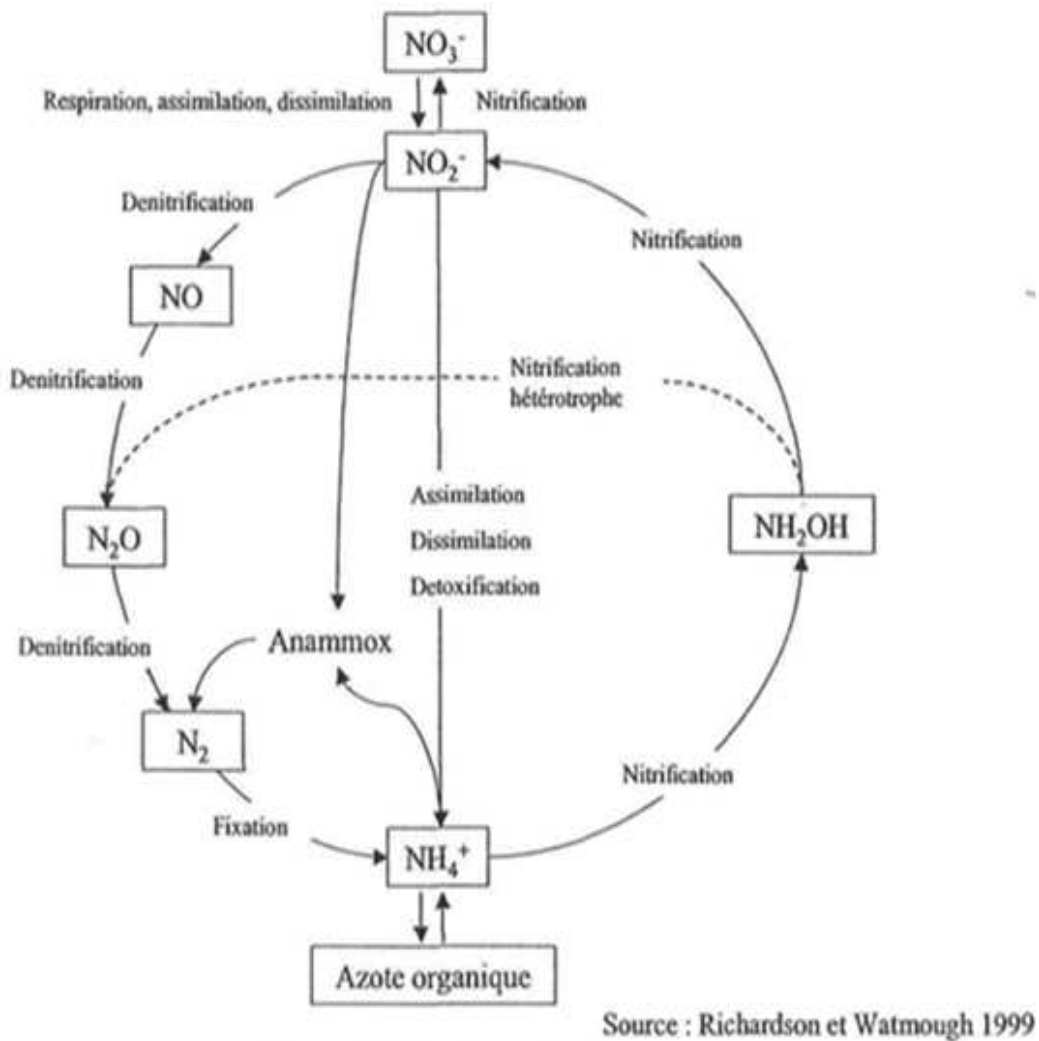


Figure I.2 Cycle de l'azote

Dans ce qui suit, nous nous limiterons au processus de dénitrification principale objet de notre étude.

I.2.2 La dénitrification

I.2.2.1 Biochimie de la Dénitrification

IL s'agit d'un procédé biologique qui consiste en la réduction du nitrate en azote gazeux via la formation de composés intermédiaires tels que le nitrite, l'oxyde nitrique et l'oxyde nitreux (ou protoxyde d'azote) en conditions d'anoxie.

Lors de la dénitrification, un oxyde d'azote sert d'accepteur d'électrons afin de générer un potentiel électrochimique de part et d'autre de la membrane cytoplasmique du microorganisme. Les électrons, provenant généralement d'une source de carbone organique, mais pouvant aussi dériver d'une molécule inorganique, cheminent jusqu'à différentes oxydoréductases, chacune spécifique à un oxyde d'azote particulier (Zumft 1997). L'action concertée de toutes ces enzymes conduit donc à la formation de l'azote N_2 à partir du nitrate, selon la chaîne de transformation suivante (Bothe et al., 2000):

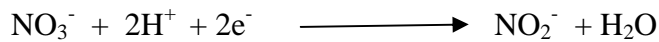


Certains organismes, ne produisant pas certaines réductases, doivent utilisées un oxyde d'azote partiellement réduit comme premier accepteur d'électrons ou ne peuvent tout simplement pas se rendre jusqu'au N_2 . Jusqu'à récemment, les chercheurs ne s'entendaient pas sur la formation de monoxyde d'azote (NO) lors de la dénitrification. Cependant, il a été récemment établi que cette molécule est un intermédiaire obligatoire de la dénitrification (Zumft 1997; Watmough et al. 1999; Bothe et al. 2000).

La capacité à dénitrifier est largement répandue dans le monde bactérien, les gènes nécessaires étant présents chez une très grande variété d'espèces et de genres. Les microorganismes dénitrifiants sont généralement hétérotrophes, mais les oxydes d'azote peuvent également être réduits par certains organismes autotrophes nitrifiants sous des conditions limitantes en oxygène (Kowalchuk et Stephen 2001) ou par une réaction chimique ayant lieu dans des conditions légèrement acides, appelée chimodénitrification (Kappelmeyer et al.2003).

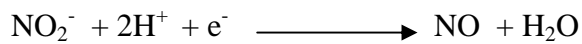
Parmi les organismes hétérotrophes pouvant dénitrifier, on retrouve des bactéries aérobies facultatives communes, comme *Paracoccus denitrificans*, *Thiobacillus denitrificans*, *Pseudomonas* et *Alcaligènes* en plus de genres moins communs comme *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas* et *Propionobacterium* (Atlas et Bartha 1998).

L'enzyme catalysant la première transformation est la nitrate réductase (NAR), enzyme membranaire codée par l'opéron nar (Richardson et Watmough 1999).



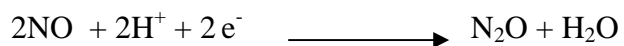
Certains organismes eucaryotes aptes à effectuer la dénitrification produisent également une nitrate réductase, mais celle-ci ne présente aucune homologie de séquence avec celles retrouvées dans le monde bactérien (Richardson et Watmough 1999).

La seconde étape de la dénitrification est contrôlée par la nitrite réductase (NIR), codée par le gène nir, et constitue l'étape clé du processus, puisque l'azote soluble passe sous forme gazeuse. L'équation suivante montre la réduction du nitrite en oxyde nitrique.

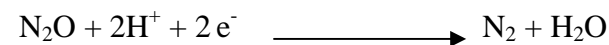


Il existe deux types de nitrite réductase chez les bactéries dénitrifiantes. Le quart et le tiers d'entre elles produit une nitrite réductase contenant du cuivre (NIRK) tandis que les autres produisent une enzyme porteuse d'un groupement hème cd1 (NIRS) (Richardson et Watmough 1999). Aucune étude n'a pu démontrer jusqu'à maintenant qu'un microorganisme pouvait produire simultanément les deux types d'enzymes (Watmough et al. 1999).

La réduction de l'oxyde nitrique est catalysée par l'oxyde nitrique réductase (nitric oxide reductase: NOR) selon la réaction suivante:



La dernière étape du processus de la dénitrification est effectuée par l'oxyde nitreux réductase (Nitrous oxide reductase N₂OR) selon l'équation suivante:



Cette dernière est fortement inhibée par une concentration en acétylène (C₂H₂) d'environ 0,1KPa, par le monoxyde de carbone (CO), l'azide (N₃), le cyanure (CN) et les sulfures (Hochstein et TomLinson 1998).

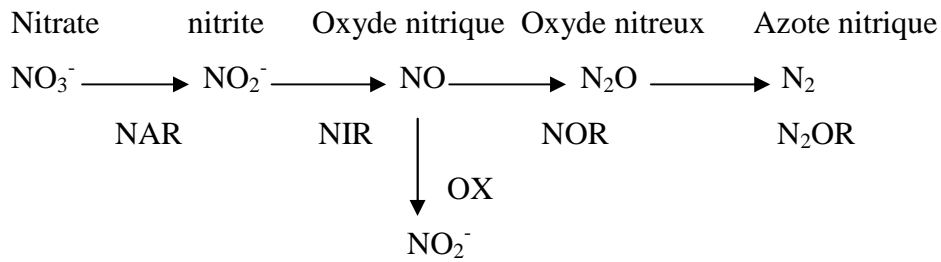


Figure I. 3: Réaction de dénitrification catalysée par des nitrate (NAR), nitrite (NIR), oxyde nitrique (NOR), et oxyde nitreux (N_2OR) réductases, oxydation de l'oxyde nitrique en NO_2^- (OX) par une oxyde nitrique oxydase.

1.2.2.2 Biologie moléculaire de la dénitrification

Chez toutes les bactéries, les enzymes de la dénitrification reçoivent un électron à partir du système de la chaîne respiratoire qui est une partie de la membrane cytoplasmique. En d'autres termes, la dénitrification est une forme de la respiration et une part des composantes de la chaîne respiratoire avec un système de transport d'électron qui délivre des électrons à l'oxygène O_2 par les oxydases terminales (Einsle et Kroneck 2004). La réduction de l'ubiquinone en ubiquinol aura lieu par l'utilisation d'électron issu des agents réducteurs tel que le NADH, les acides gras, etc. Il existe une structure cristalline de l'enzyme correspondante habituellement connu comme Nar. En bref l'ubiquinol est oxydé à travers la surface de la membrane periplasmique avec un relargage de H^+ au périplasma, et transfère des électrons à travers la membrane vers le site actif qui est localisé sur un domaine globulaire qui sort dans le cytoplasme. Le point clé à noter durant cette phase est le transfert d'électrons à travers la Nar conjointement avec l'apparition et la disparition de H^+ aux deux cotés de la membrane, ce transfert produit une force motrice à travers cette dernière.

L'emplacement du site de la réduction des nitrates NO_3^- du côté du cytoplasme de la membrane exige un système de transport des nitrates, cela peut être fournit par les protéines NarK. (Moir et Wood 2001).

Chez *Paracoccus denitrificans* il existe deux protéines identiques, une d'entre elles catalyse les nitrates avec un ou plusieurs H^+ . Cela permettrait l'entrée des nitrates dans la cellule et commencer la respiration. A l'état d'équilibre l'import des nitrates doit être en échange avec le transfert des nitrites vers le périplasma, c'est un processus non affecté par le transfert d'électrons c'est-à-dire électroniquement neutre. Le transfert des nitrites vers le périplasma est exigé parce que les nitrites réductases de la dénitrification sont localisées dans celui-ci. Chez *Paracoccus denitrificans* les nitrites réductases sont de type cytochrome cd_1 , les électrons sont délivrés au cytochrome cd_1

par un mono hème cytochrome type-c, cytochrome c_{550} , ou par des protéines appelées pseudoazurin. Ces protéines périplasmiques hydrosolubles sont réduites par un complexe de membranes intégrées appelé complexe cytochrome bc_1 , qui est à son tour réduit par l'ubiquinol. Ce complexe n'est pas spécifique à la dénitrification; il se produit dans divers systèmes de la chaîne respiratoire des bactéries aussi bien que dans la chaîne de transfert des électrons chez les mitochondries. Les NO produites par les nitrites doivent être réduites à des faibles concentrations à cause de leur toxicité potentielle, c'est un produit intermédiaire de la dénitrification. Les NO- réductases constituent une membrane protéique intégrale dont il n'est pas encore expérimentalement établi qu'elles fournissent des électrons en commun avec les nitrites réductases. L'étape finale de la dénitrification est catalysée par les N_2O -réductase, c'est une enzyme périplasmique. Il est encore supposé que les pseudoazurin et les cytochromes c_{550} sont les protéines intermédiaires donateurs d'électrons. Les N_2O -réductases sont des Cu-enzymes (van Spanning et al., 2007).

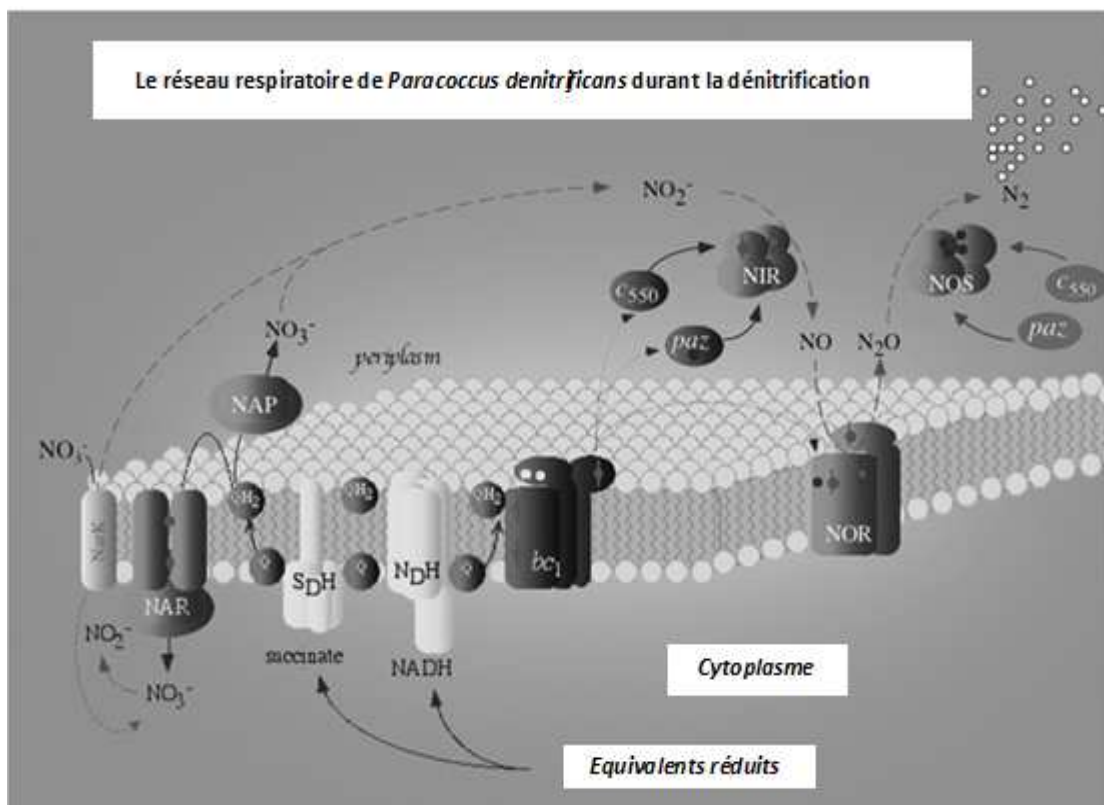


Figure I.4 : Schéma de la dénitrification complète chez *Paracoccus denitrificans*.

SDH: succinate déshydrogénase; NDH, NADH déshydrogénase; Q: Quinone; bc_1 : complexe cytochrome bc_1 ; c_{550} : cytochrome c; paz: pseudoazurin; NAR: NO_3^- réductase; NAP: périplasmique NO_3^- réductase; NIR: NO_2^- réductase; NOR: NO-réductases; NarK: NO_3^-/NO_2^- clapet anti-retour.

1.2.2.3 Stœchiométrie de la dénitrification

Le métabolisme global de la réaction de dénitrification peut être illustré par la figure suivante:

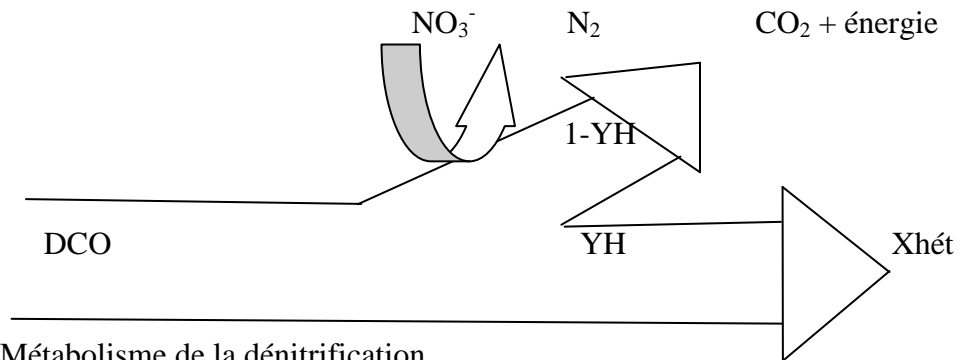


Figure I.5: Métabolisme de la dénitrification

Avec:

YH: rendement de conversion de la DCO en biomasse en g de $\text{DCO}_x \cdot \text{g}^{-1} \text{DCO}_{\text{oxydée}}$

1-YH: consommation de la DCO pour la réduction des nitrates en g de $\text{DCO} \cdot \text{g}^{-1} \text{NO}_3^-$

Xhét: concentration en bactéries dénitrifiantes exprimé en $\text{g DCO}_x \cdot \text{L}^{-1}$

De nombreuses recherches sur la dénitrification ont été réalisées en ajoutant différents composés organiques comme source externe de carbone, comme par exemple l'acide acétique (Constantin et Fick, 1997), l'éthanol (Aslan, 2005). Les eaux résiduaires peuvent également constituer une bonne source de carbone, et doivent pour cela être chargées en carbone bioassimilable et conduire à un taux de dénitrification suffisant tout en étant uniforme en composition et disponible en quantité suffisante.

1.2.2.4 Facteurs influençant la dénitrification

A. Température

En règle générale, la réaction semble être réalisée par des micro-organismes mésophiles. Mais il n'existe pas de températures optimales pour réaliser la dénitrification.

Bien que la dénitrification semble possible entre 5C^0 et 75C^0 (Martin 1979) du fait de la grande diversité des germes dénitrifiants, la température constitue néanmoins une variable majeure affectant la vitesse de la réaction biologique. Par ailleurs, l'augmentation de la température est favorable à la réaction puisqu'elle entraîne une diminution de la concentration saturante donc du transfert de l'oxygène dissous,

paramètre limitant la vitesse de dénitrification. Cet effet est communément décrit en utilisant une équation de type Arrhenius (Orhon et al., 2000).

$$r_{D, T1} = r_{D, T2} \cdot \theta^{(T_1 - T_2)}$$

Ou:

$r_{D, Ti}$ = Rendement de dénitrification à température T_i , mg N-NO₃ .mg MVS⁻¹.j⁻¹.

θ = Coefficient de température.

Le tableau 2.1 résume les résultats de différentes recherches sur l'effet de la température sur le processus de dénitrification avec système à boue activée et système à culture de dénitrification pure.

Tableau I.2: Résultat des différentes recherches de l'effet de la température sur le processus de dénitrification d'après Carrera et al. (2003).

Coefficients de température des différents systèmes				
Coefficient de température	Technologie	Source de carbone	Intervalle de T (°C)	Référence
1, 06	Boue activée	Méthanol	7- 17	Nyberg et al. (1996)
1, 06		Ethanol		
1, 06	Boue activée	Boue hydrolysée	-	Barlindhaug et Odegaard (1996)
1, 06	Boue activée		7- 15	Oleszkiewicz et
1, 30			2- 7	Berquist (1988)
1, 11	Culture de dénitrification pure	Méthanol	15-25	Christonsson et al. (1994)
1, 12		Ethanol		
1, 13	Culture de dénitrification pure	Méthanol	6-30	Timmermans et Van Haute (1983)

B. pH

Les microorganismes réalisant la dénitrification sont moyennement sensibles aux fluctuations de pH. Le pH optimum semble se situer entre 7 et 8,7. La réaction de dénitrification entraîne une élévation de pH, qui doit être contrôlé puisqu'il peut y avoir inhibition de la réaction au delà de pH 9. Les travaux de Gee et Kim (2004) montrent toutefois que la dénitrification est possible à pH 9,5 dans un réacteur séquentiel en batch (SBR) accumulant les nitrites. Foglar et Briski (2003) observent un pH optimum de 7,4 mais également une bonne dénitrification dans des gammes de pH allant de 5,9 à 8,4 pour une biomasse acclimatée.

Cependant, sans acclimatation et des pH trop acides, la réduction des nitrates est incomplète, induisant la production d'oxyde nitreux (N_2O) voir nitrique (NO) comme le montre Knowles (1982).

C. Concentration en oxygène dissous

Les microorganismes dénitrifiants sont des bactéries aérobies facultatives qui tirent leurs énergies de celle libérée lors du transfert des électrons des composés organiques vers l'oxygène, le nitrite ou le nitrate. Le choix de l'accepteur final se fait bien entendu en faveur de celui qui donnera la plus grande quantité d'énergie par unité de matière organique oxydée. Il a été montré que l'utilisation de l'oxygène comme accepteur d'électrons, plutôt que le nitrite ou le nitrate, permet de produire d'avantage de l'énergie (Wisjnuprpto, 1981). De ce fait, la réaction de dénitrification est inhibée en présence d'oxygène, le rendement de dénitrification étant affecté. La concentration maximale en oxygène pour que la réaction puisse avoir lieu est difficile à évaluer. La dénitrification pourra toujours débiter même en présence de 1 à 3mg/l d'oxygène dissous puisque il faut discerner entre la concentration d'oxygène dans le macro- et le microenvironnement des organismes hétérotrophes: lorsque 1 à 3mg/l d' O_2 sont mesurés dans le liquide interstitiel, il est possible que des conditions anoxiques règnent en dessous de la couche externe du biofilm (Hagedorn-Olsen et Moller, 1994). En 1994 Hagedorn-Olsen et Moller ont développé un modèle évaluant le taux d'enlèvement des nitrates dans un biofilm en présence d'oxygène:

$$R_{NO_3, O_2} = k_t * [(\beta^2 NO_3 + \beta^2 O_2)^{1/2} - \beta^2 O_2]$$

Ou k_t représente le taux d'enlèvement des nitrates en absence d'oxygène, $\beta^2 NO_3$ la fraction des nitrates diffusant dans le biofilm sans l'influence de l'oxygène et $\beta^2 O_2$ la fraction de l'oxygène pénétrant.

D. Concentration en nitrates

La concentration en substrat sur le taux de dénitrification est assez controversée. Des auteurs ont montré que la présence des nitrates diminuait l'efficacité de l'enlèvement des nitrites (Çeçen et Gonenç, 1994). Au contraire les travaux de Nichols (1983) ont montré que le taux de dénitrification était indépendant de la concentration en nitrates pour une large gamme de concentrations en ion nitrate.

E. Nature de la source carbonée: rapport DBO: DCO

Le taux de dénitrification est fortement influencé par la nature de la source de carbone. Il est d'autant plus important que la source organique est facilement biodégradable. Les composés faiblement dégradables provoquent préférentiellement l'ammonification des nitrates plutôt que leurs dénitrification (Bode et Seyfried, 1987). Des sources de carbone comme l'acide acétique (Constantin et Fick, 1997), l'éthanol (Anderson et al., 1998) sont alors souvent ajoutées comme donneurs d'électrons.

Songliu et al. (2009) ont montré que l'addition du glucose comme source de carbone externe améliore nettement le rendement d'élimination des nitrates. Cette amélioration est de 20 à plus de 50% en été, et de 10 à 30% en hiver.

F. Le temps de rétention hydraulique (TRH)

Les TRH ont une influence importante sur les performances du traitement appliqué en mode boue activée hybride et sont fonction de la complexité des effluents à traiter. Les TRH appliqués sont extrêmement variés et sont fonction des objectifs des travaux. Le tableau I.3 résume les différents TRH pour les procédés de dénitrification par biomasse fixées.

A titre d'exemple, Wang et al. (2009) ont rapporté une élimination de 99% des nitrates à un temps de rétention hydraulique de 8heures dans un réacteur à biofilm pour le traitement des eaux souterraines contaminées par les nitrates.

Aslan et Turkman (2005), ont observés que le rendement de dénitrification est de l'ordre de 99% pour des temps de rétention hydraulique allant de 4,5 à 8 heures

Tableau I.3: Exemples de TRH pour différents procédés de dénitrification

Type de réacteur	Temps de rétention	Auteurs
Réacteur à biofilm	8heures	Wang et al. (2009)
Réacteur à biofilm	8heures	Jin et al. (2004)
Réacteur à biofilm	40 à 60 minutes	Wojnowska-Baryla et Zielinska (2002)
Réacteur à biofilm	4,5 à 8 heures	Aslan et Turkman (2005)

Les temps de séjour hydraulique (TRH) doivent alors être suffisamment importants pour permettre le développement des bactéries dénitrifiantes.

Chapitre 3: Effets des nitrates sur l'homme et sur l'environnement

I.3.1 Sources et niveaux environnementaux

I.3.1.1 Source

La présence des nitrates dans l'eau de consommation est principalement attribuable aux activités humaines (Santé Canada, 1992). L'utilisation de fertilisants synthétiques et de fumier, associés aux cultures et à l'élevage intensifs, favorise l'apparition de nitrates dans l'eau. Les installations septiques déficientes, de même que la décomposition de la matière végétale et animale, peuvent être une source de nitrates dans l'eau (Levallois et Phaneuf, 1994). Le risque de contamination est plus important si le sol recouvrant la nappe d'eau est vulnérable (ex: sablonneux) et si la nappe est peu profonde (puits de surface).

I.3.1.2 Concentration dans l'eau potable

La concentration en nitrates dans l'eau potable peut être classée selon quatre catégories: Le tableau suivant résume l'influence sur les activités humaines et l'impact sur la santé des différents niveaux des nitrates dans l'eau (Madison et Brunett, 1985).

Tableau I.4: Influence des nitrates sur les activités et la santé humaine.

Concentration des nitrates dans l'eau potable (mg-N/L)	<0,2	0,21-3,0	3,0-10	> 10
Influence des activités humaines	Non	Possible mais impact mineur	Certaine mais avec impact modéré	Certaine avec impact majeur
Impact sur la santé	Non	Non	Non démontré	Possible

I.3.1.2 Normes et recommandations

La valeur guide maximale de l'OMS pour les teneurs en nitrates des eaux de consommation est de 11,3 mg-N/l (équivalent à 50mg/l de NO₃). Pour ce qui est des nitrites, une valeur guide provisoire à été établie à 0,9 mg-N/l (équivalent à 3 mg/l de NO₂). De plus, afin de tenir compte de l'effet possiblement additif des nitrates et des nitrites dans l'eau de consommation, l'OMS considère que la somme

des rapports entre la concentration mesurée et sa valeur guide ne doit pas excéder l'unité (Organisation Mondiale de la Santé, 2000). Pour toutes les normes existantes, les valeurs guides fixées pour les nitrates et les nitrites reposent sur la revue des cas de la méthémoglobinémie effectuée par Walton (1951), pour laquelle les nourrissons de moins de trois mois sont particulièrement sensibles. Le tableau suivant résume les normes et les recommandations existantes.

Tableau I.5: Résumé des normes et recommandations

Agent chimique	Norme québécoise	Recommandation canadienne	Norme américaine	Critère de l'OMS
Nitrates		10mg-N/l	10mg-N/l	11,3mg-N/l
Nitrites	1mg-N/l	1mg-N/l	1mg-N/l	0,9 mg-N/l
Nitrate+Nitrites	10mg-N/l		10mg-N/l	

Source Chaussé et al. (2003)

I.3.2 Effet sur la santé humaine

Le principal risque pour la santé humaine associé à l'ingestion des nitrates est lié à la capacité de l'organisme humain de transformer les nitrates en nitrites. Cette réduction de NO_3^- en NO_2^- est le fait de bactéries ayant une activité nitrate réductase.

I.3.2.1 Risque de méthémoglobinémie

Les nitrites formés par réduction des nitrates sont susceptibles de se fixer sur l'hémoglobine (L'hirondel et L'hirondel, 2002). Celle-ci est alors oxydée en méthémoglobine. Le transport de l'oxygène vers les tissus qui en ont besoin ne se fait plus. Cette maladie est dénommée méthémoglobinémie. Chez l'adulte, ce risque est très faible car une enzyme réduit la méthémoglobine en hémoglobine. En revanche cette enzyme n'est pas activée chez le nourrisson et ne devient fonctionnelle que vers trois à quatre mois. De plus le pH dans l'estomac est plus élevé que celui d'un adulte car les sécrétions gastriques acides sont plus faibles durant les premiers mois de la vie. Ce pH élevé semble permettre un développement plus aisé des bactéries ayant une activité nitrate réductase. Par conséquent lorsqu'il y a ingestion d'une forte quantité de nitrates dans des conditions favorisant sa réduction en nitrites, la méthémoglobine s'accumule.

L'enfant développe alors une coloration bleue de la peau qui débute par les lèvres, puis les bouts des doigts, et peut éventuellement s'étendre à l'ensemble du corps. Pour cette raison, cette pathologie qui est plus fréquente chez le nourrisson, est aussi appelé syndrome du bébé bleu (Testud, 2004).

1.3.2.2 Risque carcinogène

Les nitrates sont susceptibles de présenter un risque lié à leur transformation en nitrites et éventuellement en nitrosamines dans le tractus digestif. Il n'existe pas de données qui démontrent avec certitude les effets carcinogènes des nitrates via la formation de nitrosamines chez l'animal (WHO, 1995). Les études épidémiologiques et toxicologiques n'ont pas mis en évidence de relations certaines entre l'ingestion des nitrates et le risque de cancer (Messinga et al., 2003). Démontrer avec certitude une telle relation est particulièrement difficile étant donné le temps de latence entre la cause et le dépistage de la pathologie qui peut dépasser vingt ans. Cependant, les tests chez de nombreuses espèces animales ont montré l'effet carcinogène d'un grand nombre de nitrosamines (WHO, 1995). Divers études permettent de suspecter fortement la responsabilité des fortes teneurs en nitrates dans l'eau et les aliments, dans le développement des cancers de la prostate, du pharynx, de l'œsophage et du colon (Gulis et al., 2001). En absence de certitudes absolues, ces résultats imposent de prendre les précautions nécessaires afin de préserver la santé humaine.

1.3.2.3 Effets indirects

Dans les eaux marines littorales, l'accroissement de la concentration des nitrates entraîne l'apparition d'une prolifération algale qui peut être toxique pour l'homme directement et/ou indirectement par la consommation de coquillage. Dans les eaux douces, l'eutrophisation accélérée (induite par les pollutions azotées mais aussi phosphatées) du milieu peut conduire à la formation des phytoplanctons producteurs d'hépatotoxines et de neurotoxines.

1.3.3 Effet sur l'environnement

L'effet principal des nitrates sur l'environnement consiste à favoriser la croissance végétale. Cet impact qui peut apparaître bénéfique, s'avère désastreux pour les écosystèmes aquatiques lorsque la prolifération végétale est poussée à l'excès. Le processus d'eutrophisation, qui correspond à un enrichissement naturel des milieux aquatiques en éléments nutritifs et une augmentation de la productivité

végétale, est alors considérablement accéléré. L'eutrophisation du milieu nécessite la présence d'éléments nutritifs (carbone, azote, phosphore) indispensables à la croissance des végétaux aquatiques. Le carbone est toujours présent à des concentrations suffisantes pour permettre le développement végétal. En milieux aquatiques, la croissance des végétaux est limitée par l'élément dont la concentration dans le milieu est la plus faible par rapport aux besoins des végétaux. Cet élément limitant est généralement le phosphore et parfois l'azote. C'est donc en rejetant de l'azote et/ou du phosphore dans l'eau que l'activité anthropique va induire une accélération de l'eutrophisation. Lorsque la concentration en azote et en phosphore du milieu aquatique est élevée, la production d'algues microscopiques (phytoplancton) et des végétaux fixés (macrophytes) est exacerbée. La quantité de matière organique présente dans le milieu aquatique s'accroît de plus en plus. A la mort de ces végétaux, la matière organique se décompose en consommant tout l'oxygène de la colonne d'eau, induisant l'anoxie du milieu aquatique. La plupart des animaux vivant dans ces milieux ne peuvent pas survivre dans un lieu dépourvu d'oxygène (Rouse et al., 1999). Cette modification des populations peut également conduire au développement de microorganismes pathogènes ou sécrétant des toxines qui rendent impropre à divers usages ou peuvent considérablement accroître les coûts de traitement des eaux. Un deuxième effet, moins aisément quantifiable pour l'instant, est la participation des nitrates via leur dénitrification, à la formation de gaz à effet de serre.

Chapitre 4: Les biofiltres lignocellulosiques

La cellulose est l'élément le plus abondant sur terre, avec une production annuelle estimée à 10^{12} tonnes, c'est le constituant majoritaire de la paroi cellulaire des végétaux. Ce polymère végétal n'est pas distribué uniformément au sein de la paroi cellulaire, de plus sa concentration varie d'une région morphologique à une autre (stryer, 1988).

I.4.1 Composition biochimique des matériaux lignocellulosiques

I.4.1.1 La cellulose

La cellulose est le constituant majoritaire du bois et celui presque unique du coton et des fibres textiles du type lin. Elle est constituée par un enchainement de cycles glycopyranoses avec une liaison glycosidique du type β 1-4 (figure I.6). Le degré de polymérisation varie suivant l'origine des fibres et le type de procédé d'isolement. Par exemple, il est supérieur à 3000 pour le coton et égal à environ 1500 pour les pâtes de bois obtenues avec un minimum de dégradation (Heiner et Teleman, 1997).

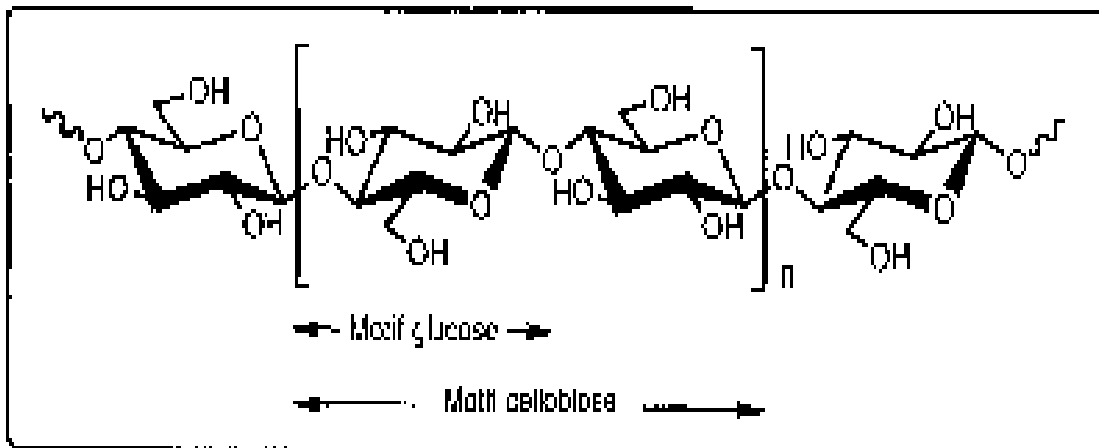


Figure I. 6: Représentation schématique de la molécule de cellulose.

Les nombreux groupements hydroxyles sont responsables du comportement physico-chimique de la cellulose. Ils sont capables de former deux types de liaisons hydrogène selon leur position dans l'unité de glucose. Elles existent entre deux fonctions hydroxyles adjacentes présentes dans la même chaîne de cellulose (liaison intramoléculaire) et entre celles issues de deux chaînes adjacentes (liaison intermoléculaire). Ces dernières sont responsables de la formation de microfibrilles.

La cellulose est imbriquée dans une matrice d'hémicellulose et de lignine pour constituer la paroi cellulaire (Marchessault et Sundararajan, 1983).

Les principales caractéristiques dominantes de la cellulose sont: l'aire de la surface spécifique (ASS) et l'indice de cristallinité (ICr). L'aire de la surface spécifique est définie comme étant le rapport de la surface spécifique par la masse de cellulose. L'indice de cristallinité est le rapport de la cellulose cristalline par opposition à la cellulose amorphe (Lee et Fan, 1982). La cellulose est associée étroitement avec l'hémicellulose et la lignine. Les résidus agricoles sont composés de 30 à 40% de cellulose, 25 à 35% d'hémicellulose et 10 à 15% de lignine avec un faible pourcentage en protéines, en sucres simples et en éléments minéraux (Ladisich, 1983).

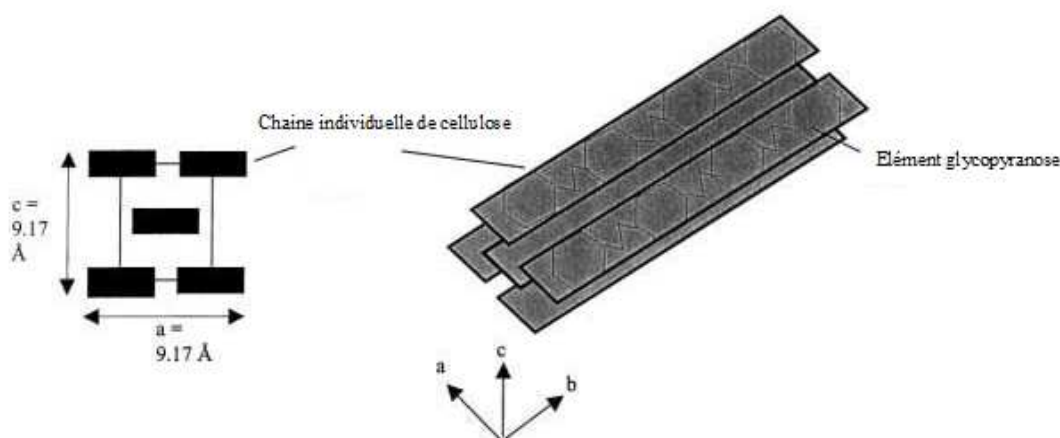


Figure I.7: La structure cristallographique de la cellulose en rayon X (Linder et al., 1995).

1.4.1.2 L'hémicellulose

Les hémicelluloses sont définies comme étant des polysaccharides (polyosides) non cellulosiques présent dans les parois cellulaires des végétaux. Ces macromolécules polyosidiques présentent une grande diversité de structures (Joseleau, 1980). En effet, les chaînes ont un degré de polymérisation moyen de 150; elles sont plus courtes que celle de la cellulose et sont souvent ramifiées. Elles correspondent à des polymères dont l'unité monomère est un sucre (Pentoses, Hexoses, Acides huxoroniques, Deoxy-hexoses).

Les homopolysaccharides minoritaires sont constitués par un seul type de monomère (glucane, xylanes, mannanes). Les hétéropolysaccharides (arabinoglucuronoxylanes ou galactoglucomannanes) sont majoritaires.

Tableau I.6: groupes d'hémicelluloses présents dans les parois végétales (Joseleau, 1980).

Groupe	Hémicelluloses	Type de liaison dans la chaîne principale
Xylanes	Arabinoxylanes 4-O-méthyl-glucuronoxylanes Arabino-4-O-méthylglucuronoxylanes Galactoarabinoxylanes Hétéroxylanes complexes	β (1 \rightarrow 4)
Mannanes	Galactomannanes Glucomannanes Galactoglucomannanes	β (1 \rightarrow 4)
Galactanes	Galactanes acides	β (1 \rightarrow 4) β (1 \rightarrow 6)
Arabinogalactanes	Glucuronoarabinogalactanes	β (1 \rightarrow 3) β (1 \rightarrow 6)
Glucanes	Glucanes	β (1 \rightarrow 3) β (1 \rightarrow 4)

De même que pour la cellulose, les hémicelluloses possèdent un grand nombre de fonctions hydroxyles. Comme elles ne forment pas de réseau cristallin, leur fonctionnalisation est par conséquent plus facile que celle de la cellulose. Ils sont essentiellement utilisés pour la production de sucres. En effet en milieu acide et/ou basique, l'hydrolyse de la plupart des hémicelluloses conduit aux monomères constitutifs tels que le xylose, le glucose, l'arabinose (Bazus, 1991). La fermentation alcoolique ou enzymatique des sucres ainsi formés, les transforme en alcools (éthanol, butanol) et en acides organiques (acétique, lactique, butyriques) (Baynast et al., 1989).

1.4.1.3 La lignine

La lignine est après la cellulose la matière organique renouvelable la plus abondante à la surface de la terre. La lignine originelle ou " protolignine " est la plus

importante fraction non saccharidique des fibres végétales. C'est la matière "incrustante" de la cellulose.

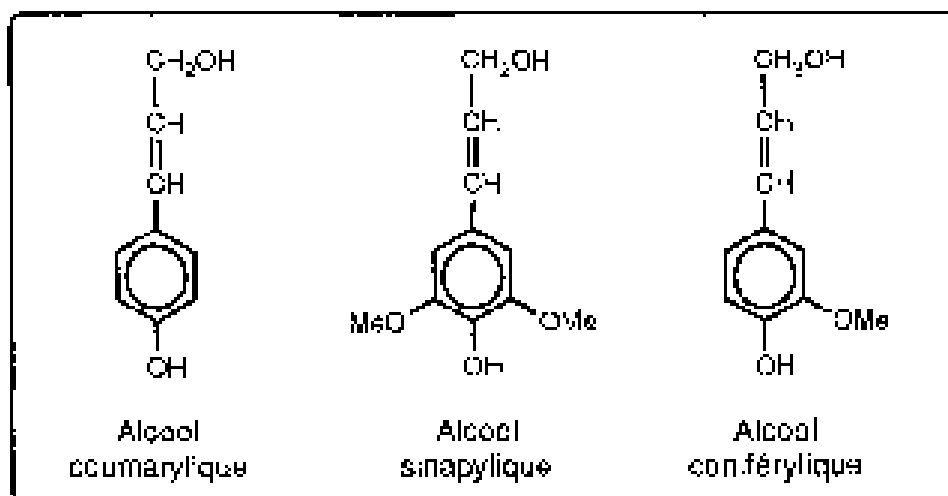


Figure I.8: Monomères constitutifs de la lignine

La lignine est constituée de polymères phénoliques tridimensionnels, amorphe possédant trois unités différentes de type phénylpropane ; les alcools p-caumaryliques, coniférylique et sinapyliques (Figure I.8).

A l'inverse de la cellulose, la lignine ne comporte pas de motifs répétitifs et possède une grande diversité de liaisons intermonomériques. Sa composition est différente suivant les espèces végétales, et pour le même végétale, elle varie selon qu'il s'agisse de lignine de la lamelle ou de celle des parois des fibres (Ladisich et al., 1983).

La structure complexe de la lignine comprenant de nombreuses fonctions phénoliques, hydroxyles et éthers explique sa grande réactivité. Cependant, leur accessibilité est limitée par la conformation tridimensionnelle du réseau moléculaire mais aussi par la distribution de ce polymère parmi les autres constituants de la paroi cellulaire de la matière végétale. Par exemple, avec l'hémicellulose, la lignine forme des complexes à l'aide de liaisons covalentes (Hwang et al., 1989).

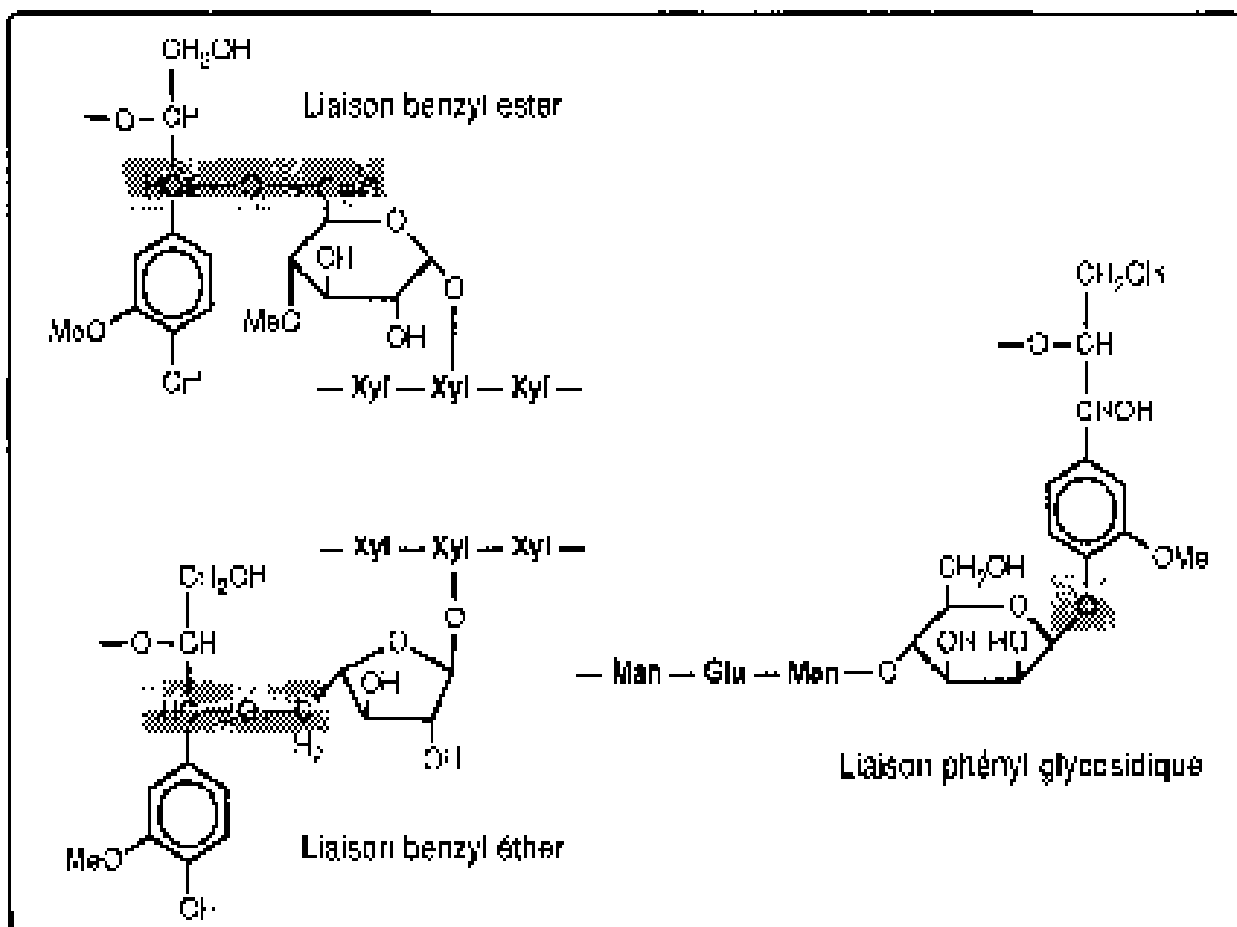


Figure I.9: Liaisons covalentes: lignine-polysaccharide les plus souvent rencontrées.

I.4.2 Prétraitement des matériaux ligno-cellulosiques

La résistance de la cellulose à l'hydrolyse enzymatique s'explique d'une part par la présence d'une matrice formée par les hémicelluloses et la lignine qui entoure la cellulose; cet ensemble constituant un système de hauts polymères étroitement imbriqués et d'autres part par la structure hautement ordonnée de la cellulose, qui lui confère une certaine cristallinité. L'accessibilité de la cellulose aux cellulases dépend des propriétés de surface des fibres, des liaisons entre les divers constituants et de la taille des particules, tandis que sa dégradation est liée à son degré de cristallinité (Vidaud, 1982). L'accessibilité peut être augmentée par des traitements, qui se subdivisent en deux catégories:

- Des traitements physiques comme l'utilisation des broyeurs à marteaux (vibratory ball miling), le broyage (grinding), les irradiations ou les effets thermomécaniques.
- Les traitements chimiques par les agents alcalins " gonflants" (swelling agents) tels que l'ammoniaque, la soude ou la potasse et les acides tels que l'acide sulfurique dilué. Ces traitements se font également à chaud (traitement à la vapeur).

L'efficacité d'un traitement se mesure par la dégradabilité de la cellulose que l'on peut apprécier par la détermination des sucres réducteurs libérés après action des cellulases (Tohrai et Torashima, 1978).

I.4.3 Mécanisme d'action des enzymes cellulolytiques

La majorité des enzymes cellulolytiques: cellobiohydrolases et endoglucanases sont des protéines modulaires avec deux fonctions indépendantes (Gilkes et al., 1991). La première fonction est responsable de l'hydrolyse de la chaîne cellulosique. La deuxième est une fonction spécifique à la cellulose (FCC), qui à une double activité d'une part augmenter l'adsorption des enzymes cellulolytiques vers la cellulose insoluble et d'autres parts affecter la structure de la cellulose en intercalant entre les fibrilles et les irrégularités de la surface de la cellulose. La fonction spécifique à la cellulose aide à réduire les dimensions des particules et augmenter la surface spécifique (Din et al., 1991). En générale les cellobiohydrolases représentent l'un des plus importants groupe d'enzymes cellulolytiques, parce que les cellobiohydrolases I (CBH I) constitue 60% de la masse des protéines du système cellulolytique de *Trichoderma reesei* (Abuja et al., 1988). Les études limitées de protéolyses complétées récemment, montrent que la cellobiohydrolase I contient deux groupements fonctionnels (Van Tilbeurgh et al., 1986). Le glycopeptide C-terminal (10 kDa) affecte la structure de la cellulose insoluble, alors que le cœur de la protéine (55kDa) contient le site hydrolytique actif. Les études de dispersion en rayons X montrent que les cellobiohydrolases et les endoglucanases sont " têtard" façonné avec le cœur catalytique et forment "la tête" et le domaine de l'agglutination en cellulose en forme de coin constitue la "queue" (Figure I.10 (Abuja et al., 1988)).

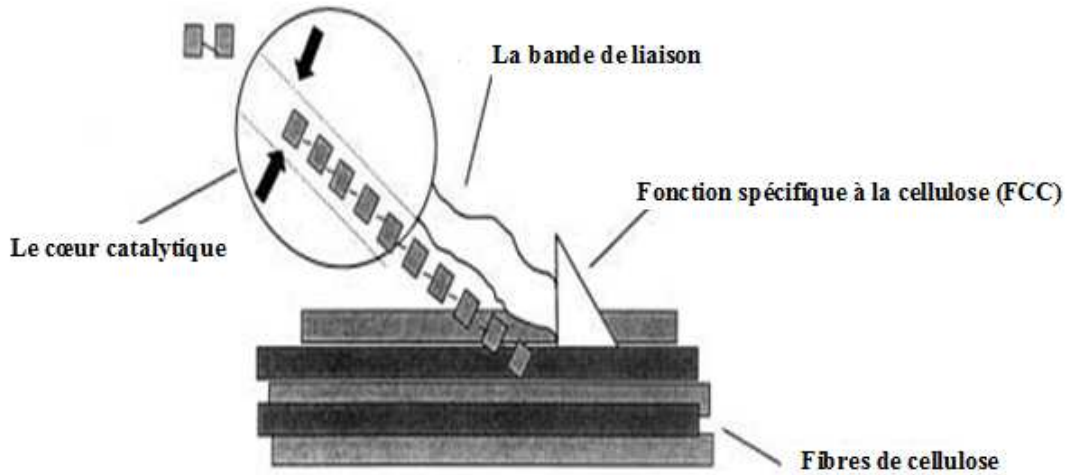


Figure I.10: Nature modulaire des protéines cellulolytiques.

Il existe deux différents mécanismes stéréochimiques de l'hydrolyse par les cellulases comme le montre la figure 4.6: l'hydrolyse avec inversion et l'hydrolyse avec rétention de la conformation β 1-4 de la bande de liaison (Wilson et Irwin, 1999).

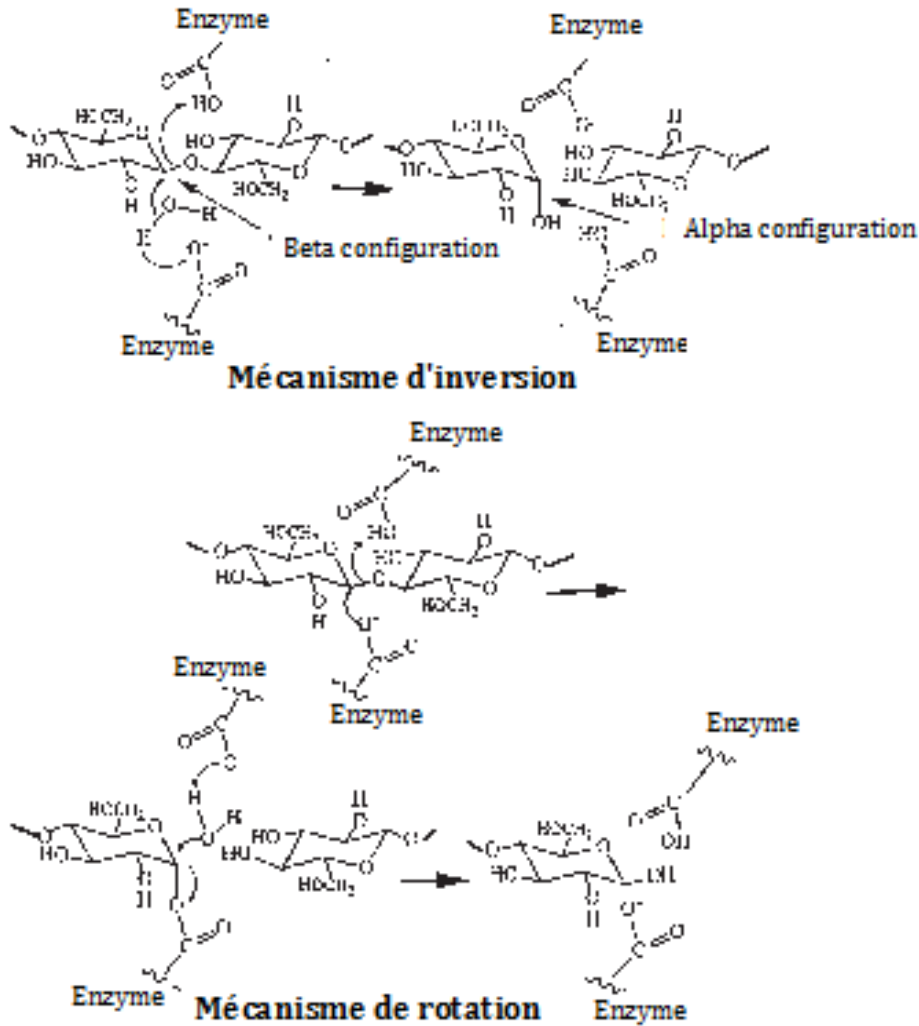


Figure I.11: Les deux mécanismes stéréochimiques de l'hydrolyse par les cellulases

I.4.4. Emploi des matériaux lignocellulosiques comme biofiltres

De nombreuses études ont été menées dans le but de tester la possibilité d'utiliser les sous produits agricoles et forestiers comme support de dénitrification des eaux potables, des eaux usées urbaines et agricoles.

Les résultats tirés des études de Soares et Abeliovich (1998) et Aslan et Turkman (2003), indiquent que la paille de blé peut être utilisée comme un support de biofiltration et source de carbone pour la dénitrification des eaux potables. Lowengart et al. (1993) ont aussi utilisés la paille de blé pour dénitrifier les eaux d'irrigation turbides et riches en azote. De même, Blowes et al. (1994) ont montrés que la sciure de bois peut être utilisée comme support de biofiltration des eaux d'irrigation. Kim et al. (2003), dans le cadre des études de biorétention ont testé l'utilisation de la sciure

de bois et la paille de blé pour éliminer les nitrates. Plus récemment Roberston et al. (2005) rapportent qu'un biofiltre commerciale à base de bois (Nitrex™) est utilisé pour dénitrifier des eaux urbaines prétraitées. Volokitta et al. (1996); Jin et al. (2004b) ont étudiés les journaux râpés comme support de biofiltration des colonnes de dénitrification et ont mis en évidence que le rendement de dénitrification baisse quand le papier est consommé par les bactéries immobilisées.

Wang et al. (2009) ont montré la possibilité de dénitrifier les eaux souterraines en utilisant un bioréacteur à biofilm à base du coton.

MATERIELS ET METHODES

II. Matériels et méthodes

II.1. Introduction

Les recherches sont orientées ces dernières années, vers la valorisation des matériaux ligno-cellulosiques dans les procédés de traitement des eaux. Notre contribution innovatrice, est l'utilisation d'un sous produit de l'industrie agro-alimentaire (la drèche) comme source de carbone et support de fixation des bactéries dénitrifiantes en réacteur à lit fixe à biomasse hétérotrophe.

La première étape de notre travail consiste à faire un état des lieux concernant la pollution par les nitrates dans les eaux souterraines. Nous nous sommes intéressés à quelques puits de la nappe de la Mitidja.

La deuxième étape est une comparaison des performances de dénitrification de deux réacteurs remplis de drèches l'une sans traitement et l'autre traitée chimiquement avec l'hydroxyde de sodium (NaOH).

II.2. Matériel et méthodes utilisés

II.2.1. Traitement du support utilisé

La drèche utilisée, fournie par la compagnie COCA COLA, est un sous produit de la fabrication de la bière, constitué essentiellement d'enveloppes d'orges et de fragments de l'albumen amylicé.

L'humidité de la drèche est ramenée à 16% pour faciliter la séparation des enveloppes de l'albumen. La mouture a été réalisée avec un moulin expérimental de type CHOPIN-DUBOIS avec deux passages. L'élimination de l'amidon qui adhère encore aux enveloppes est effectuée avec de l'eau chaude, puis séchée à 50 °C jusqu'à l'obtention de 10% d'humidité.

Le support ainsi obtenu subira ensuite un traitement alcalin à l'hydroxyde de sodium en solution pour éliminer le réseau protecteur formé essentiellement par l'hémicellulose et la lignine. Les conditions optimales du traitement ont été préconisées par Mussatto et al. (2006b) et consistent à utiliser une solution de NaOH à 2% w/v pour un ratio solide: liquide de 1: 20 g:g à 120 °C pendant 90 minutes. Après la réaction, le matériel solide résiduel est séparé et lavé avec de l'eau jusqu'à la neutralité, puis séché à 50 °C jusqu'à l'obtention de 10% d'humidité.

II.2.2. Caractérisation du support

II.2.2.1. Caractérisation physique du support

Les caractéristiques physiques des deux supports avant et après traitement à l'hydroxyde de sodium, portent essentiellement sur la taille effective TE (mm), la masse volumique vraie et la porosité.

La taille effective:

Exprimée en mm (ou μm) et notée TE est déterminée suivant la norme AFNOR X 11-507, 1990. Elle correspond à l'ouverture de maille laissant passer 10 % en poids de l'échantillon soumis à l'analyse. La taille effective donne une indication sur les particules les plus fines, qui se retrouveront dans la couche filtrante.

La courbe granulométrique permet de déterminer deux paramètres fondamentaux dans la caractérisation granulométrique des matériaux filtrants, soit:

- La taille effective,
- Le coefficient d'uniformité.

Le coefficient d'uniformité, nombre sans dimension, est égal au quotient de la diversité 60 % par la taille effective. Ce coefficient donne une indication de l'homogénéité granulométrique de la masse filtrante. Un coefficient d'uniformité égal à 1 est représentatif d'un milieu filtrant homogène.

La masse volumique vraie :

Exprimée en g/cm^3 , elle est déterminée selon la norme ISO-567, (1995).

La rétention liquide

La structure d'un biofiltre organique comprend deux phases, chacune caractérisée par une rétention " ε " Figure II.1

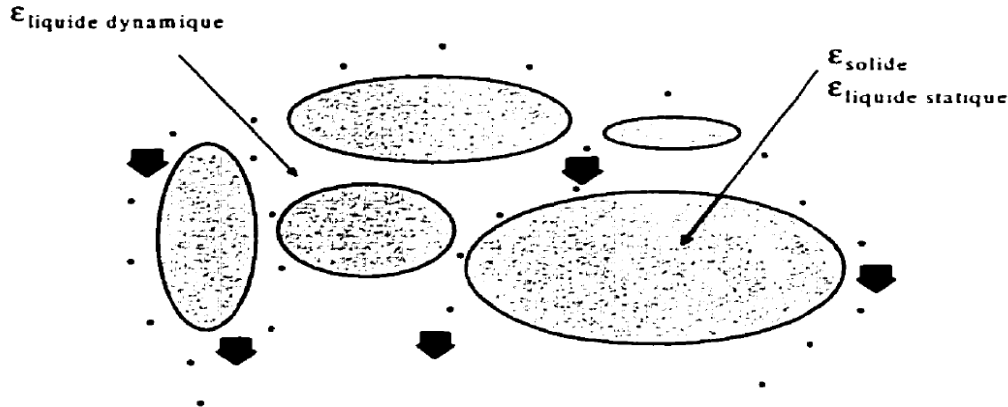


Figure II.1: Les différentes rétentions d'un biofiltre organique (Henery, 1999).

La rétention solide ε_s représente le rapport du volume de drèche (excluant le volume des pores) sur le volume total du lit.

La rétention liquide ε_L se subdivise comme suit :

- La rétention liquide statique ε_{Ls} représente le liquide interne capturé à l'intérieur des pores de la drèche non drainable.
- La rétention liquide dynamique ε_{Ld} représente le liquide externe s'écoulant entre les particules de la drèche. il est à noter qu'en mode submergé, la rétention liquide dynamique est en fait égale à la rétention gazeuse du lit filtrant.

L'expérimentation débute par la submersion du lit de drèche V_{lit} avec un volume d'eau connu V_{eau} dans un béccher. Les fragments de drèches sont plaqués avec un poids pour saturer les pores en liquide et éviter la remonté des fragments en surface. De l'eau est ajoutée régulièrement afin de maintenir le niveau d'eau égale à V_{lit} . Les essais sont réalisés en triplicata afin d'estimer un écart type sur les valeurs des rétentions. Au bout de trois jours, on note la quantité totale d'eau qui peut s'écouler $V_{drainée}$. A partir de ces mesures, il est possible de calculer les rétentions solide et liquide de la manière suivante :

$$\varepsilon_{Ls} = (V_{eau} - V_{drainée}) / V_{lit} \quad (1)$$

$$\varepsilon_{Ld} = V_{drainée} / V_{lit} \quad (2)$$

$$\varepsilon_s = 1 - (V_{eau} / V_{lit}) \quad (3)$$

II.2.2.2. Caractéristiques biochimiques

Les caractéristiques biochimiques portent essentiellement sur l'appréciation en polyholsides. La détermination des quantités de lignine, de cellulose et d'hémicellulose à été effectuée en utilisant des méthodes de type gravimétriques (méthode de Van Soest et Wine connu sous le nom N.D.F-A.D.F) qui se basent sur la différence de solubilité des constituants de la paroi cellulaire. Le détail des méthodes utilisées est donné en annexe.

II.2.3. Sélection des bactéries dénitrifiantes

Lors de la mise en place d'un bioréacteur, il est nécessaire de produire une biomasse capable de dégrader le polluant ciblé. Pour cette raison une adaptation au substrat et aux conditions de fonctionnement est nécessaire pour la mise en marche du bioréacteur.

La source de bactéries dénitrifiantes pour la présente étude est une boue activée prélevée au niveau de la station d'épuration des eaux usées de la ville de Tizi-Ouzou. Les boues sont mises dans un bassin fermé en présence d'une alimentation riche en nitrates avec des quantités suffisantes de drèche comme source de carbone. Le dispositif fonctionne en discontinu. Un suivi de la concentration en nitrates et nitrites est effectué régulièrement et la solution d'alimentation est renouvelée quand la concentration en nitrates diminue en dessous de la norme. Une fois que la consommation des nitrates est réalisée au bout d'un temps relativement court (10 heures), nous estimons que les boues sont aptes à dénitrifier. Elles seront transférées dans un système en continu qui permettra le développement et le maintien de notre biomasse dénitrifiante.

Tableau II.1: Composition de l'alimentation en continu et en discontinu.

Composé	Alimentation en discontinu	Alimentation en continu
NaNO ₃	1645mg/l ⇔ 1200mg de NO ₃ ⁻	137,09mg/l ⇔ 100mg/l de NO ₃ ⁻
K ₂ HPO ₄	2g/l	2,25mg/l ⇔ 0,5 mg/l de P
FeSO ₄	10mg/l	0
MgCl ₂	25mg/l	0
La drèche	En excès	En excès

II.2.4. Essai de dénitrification en Batch

II.2.4.1. Comparaison de l'efficacité du traitement

L'efficacité du traitement est directement liée à l'utilisation et à la disponibilité du support organique. Dans le but d'une utilisation complète des matériaux organiques et de rentabiliser le procédé, nous avons utilisé des drèches traitées chimiquement.

Pour mettre en évidence la disponibilité de ce matériau traité et son efficacité vis-à-vis de la dénitrification, nous comparons le rendement de dénitrification de deux réacteurs en batch chargés, l'un de drèche non traitée et l'autre de drèche traitée chimiquement. Les réacteurs sont soumis aux mêmes conditions opératoires, et la solution d'alimentation est renouvelée toutes les 24h. Cette dernière est identique à la solution d'alimentation utilisée pour la sélection des bactéries dénitrifiantes sauf que la source de carbone (la drèche) n'est pas renouvelée.

II.2.4.2. Optimisation de la concentration en biomasse végétale

D'après Glass et Silverstein (1998) le choix de la source de carbone est un des paramètres dont dépend la biodénitrification. Afin d'optimiser la concentration en biomasse végétale, nous avons déterminé le rendement de dénitrification (%) en batch pour 250mg/l de NO₃⁻ et une concentration en biomasse végétale allant de 0 à 10g/l.

II.2.5. Essai de dénitrification sur colonne

Préalablement à des essais à l'échelle industrielle, une étude au laboratoire doit être réalisée à fin de déterminer les conditions de fonctionnement. Après les essais en batch, deux colonnes ont été mises en fonctionnement:

- l'une remplie de drèche ayant subi un traitement alcalin afin de rendre le support plus accessible aux microorganismes dénitrifiants.
- l'autre avec de la drèche non traitée.

Ces deux pilotes de laboratoire ont été mis en fonctionnement dans des conditions identiques.

II.2.5.1 Description du montage

Les expériences de dénitrification sont réalisées dans une colonne en verre d'une hauteur de 90cm, d'un diamètre interne de 5cm, ainsi $L/D=18$; on considère généralement qu'une valeur $L/D \geq 3$ est nécessaire. L'unité opère à température ambiante et consiste en un lit fixe de drèche complètement immergée. L'alimentation est réalisée en continue avec un écoulement ascendant tandis qu'un trop plein en haut de colonne permet de maintenir le niveau d'eau constant. La colonne demeure par conséquent saturée pendant toute la durée de l'expérience et fonctionne ainsi en absence d'oxygène. Le réacteur, fermé à l'atmosphère, est percé à 5 hauteurs différentes. Ceci permettra de déterminer la concentration en nitrates aux divers plateaux lorsque le régime permanent sera atteint et donc d'évaluer les rendements épuratoires en fonction de la hauteur du milieu filtrant. Le montage expérimental est représenté à la Figure II.2.

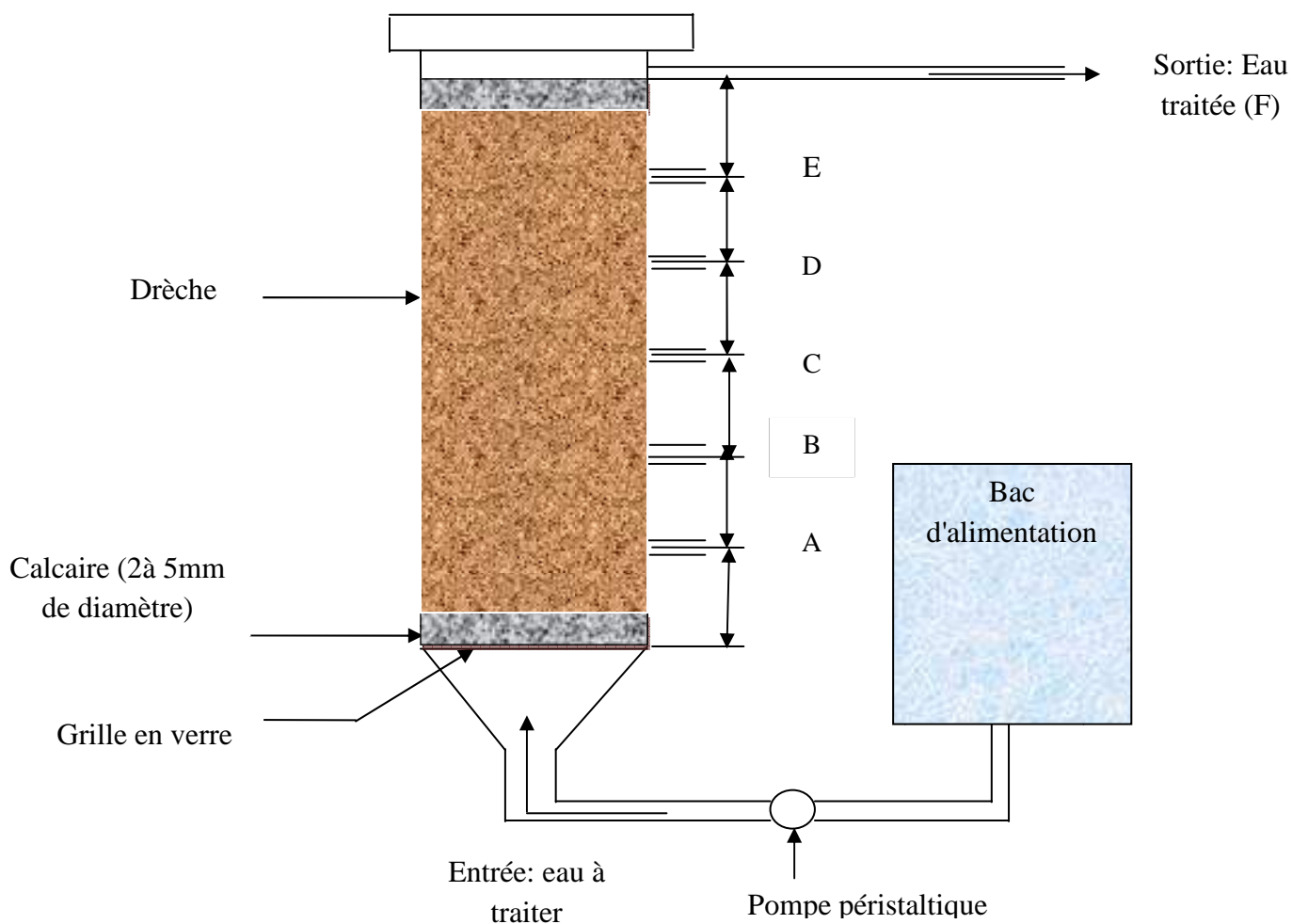


Figure II.2: Montage expérimental de l'essai de dénitrification

II.2.5.2 Milieu filtrant

Le milieu filtrant comporte trois étages différents (Figure II.2). Le premier étage est constitué d'un lit de 3cm de gravier (pierres concassés de 2 à 5 mm de diamètre moyen) déposés au fond du bioréacteur qui permet de supporter le lit de la drèche et d'assurer une distribution uniforme de l'affluent (Lafrance et al., 1996). Les pierres concassées (riches en calcaire) ont également le pouvoir d'augmenter la capacité tampon du liquide (Forteath, 1991). Le second étage est constitué de 84 cm de drèche. Les fragments de la drèche ne sont pas trop compacts pour éviter une mauvaise séparation gaz (N_2)-liquide. Le troisième étage est identique au premier, a pour but d'éviter que les solides en suspension et le milieu filtrant ne soient entraînés par les bulles d'azote.

II.2.5.3 L'eau d'alimentation

Les réacteurs sont alimentés à l'aide d'une pompe péristaltique (Masterflex L/S model 77200-12 Bernant company USA) par une eau dopée en nitrates à différentes concentrations et en phosphates. Le flux est ascendant, pour éviter la formation de poches gazeuses, et à été réglé à différents temps de rétention hydrauliques (TRH). Le pH est ajusté en ajoutant des quantités de KH_2PO_4 pour varier l'acidité du milieu et des quantités de Na_2HPO_4 pour la basicité (Chu et Yang, 2005).

II.2.5.4. Fixation naturelle des bactéries dénitrifiantes

Il existe différentes méthodes d'ensemencement bactérien. La première consiste en un passage continu d'une solution concentrée en nitrates et en phosphates, à travers le support dénitrifiant. Cette méthode a donné des temps de démarrage de la fonction dénitrifiante allant jusqu'à 10 jours. Cette période étant jugée trop longue, nous avons apporté au moment du remplissage des réacteurs, des boues de station d'épuration déjà adaptées, placés en discontinu, avec une alimentation spécifique (décrite précédemment).

II.2.6. La distribution des temps de séjour (DTS) d'un système

La technique de détermination des temps de séjours (DTS) consiste à utiliser un traceur que l'on injecte à une concentration donnée à l'entrée du système et pour lequel on suit la concentration à la sortie en fonction du temps. Les molécules marquées du traceur ne doivent avoir évidemment aucune interaction avec les substances contenues dans le système mais doivent être assez proches de celles-ci afin d'avoir les mêmes propriétés d'écoulement. Le traceur peut être injecté de trois manières différentes : sous forme d'impulsion, d'échelons, ou de façon quelconque (Leclerc et al., 1995). Nous avons utilisés la méthodologie d'injection de Tizghadam (2007) appelé "Injection Dirac", qui consiste à injecter dans un temps très court, une quantité du traceur. Ce dernier ne doit pas être injecté à très fortes concentrations pour éviter la formation de courants de convection naturelles transitoires résultant d'un écart de densité entre le traceur et le fluide.

Les hypothèses suivantes sont supposées être vérifiées:

- Le fluide est incompressible,
- L'écoulement du fluide doit rester permanent,

- Le débit traversant le système est constant et permanent,
- La vitesse du fluide reste uniforme,
- Le système possède une seule entrée et une seule sortie à l'exclusion de toute fuite.

Le traceur utilisé dans cette étude est une solution de chlorure de sodium à 100g.L^{-1} , dont 5ml ont été injectés instantanément à l'entrée du réacteur, sous forme d'un Dirac. La détection du signal à la sortie du réacteur est réalisée par la mesure de la conductivité et les valeurs sont exprimées en concentration de NaCl ($C(t)$). Les expériences sont menées pendant une durée correspondante à deux fois le temps de rétention hydraulique du réacteur. Le dispositif de mesure utilisé est un conductimètre (HANNA instrument EC 124).

L'étude de la DTS permet pour un réacteur donné quelconque, de définir son comportement et de déterminer les flux de matière et d'énergie. Cette étude permet également de mettre en évidence des dysfonctionnements du réacteur tels que les courts circuits et les zones mortes.

La concentration $C(t)$ du traceur mesurée à la sortie peut être exprimée par la fonction $E(t)$ qui représente la distribution des temps de séjour de fluide.

$$E(t) = \frac{C(t)}{\int_0^{\infty} C(t) dt} \dots\dots\dots(1)$$

On a ainsi

$$\int_0^{\infty} E(t) dt = 1 \dots\dots\dots(2)$$

$$\mu_n = \int_0^{\infty} t^n E(t) dt \dots\dots\dots(3)$$

On a donc

$$\mu_0 = \int_0^{\infty} E(t).d(t) = 1 \quad \dots\dots\dots(4)$$

$$\mu_1 = \int_0^{\infty} t.E(t).d(t) = \tau_s = \text{temps de séjour moyen} = \frac{V}{Q} \quad \dots\dots\dots(5)$$

II.2.7. Méthodes d'analyses physico-chimiques

Les nitrates et les nitrites ont été mesurés selon les normes suivantes:

- Les nitrates: Méthode au réactif sulfophénique (norme AFNOR NF 90012).
- Les nitrites: Méthode au réactif de diazotation (norme AFNOR NF 90013).

RESULTATS ET DISCUSSIONS

III. Résultats et discussion

III.1. Etat de dégradation des eaux souterraines de la plaine de Mitidja

Les eaux souterraines constituent le réservoir essentiel des eaux de boissons. Or on constate suite à une enquête réalisée au niveau de la plaine de Mitidja, que leur teneur en nitrates dépasse énormément les normes de potabilité (Tableau III.1). Ces résultats sont très proches de ceux donnés par l'Agence nationale des ressources hydriques (ANRH, 2004) dont les concentrations en nitrates de quelques points d'eau caractéristiques de la plaine de la Mitidja de deux campagnes 2002 et 2004 étaient comprises entre 95 et 175mg/l.

D'après Boudjadja et al. (2003) la moitié des puits de la plaine de la Mitidja présentent des concentrations en nitrates supérieures à 45mg/l. seule la partie occidentale du bassin semble encore préservée. De même de nombreux points d'eau de la plaine de Chlef présentent malgré la dilution induite par les hautes eaux, des concentrations très élevées, variant entre 77 et 175mg/l, soit 66 à 288% au-dessus de la norme admise. On constate, à l'examen de ces résultats, que l'enrichissement en nitrates est étroitement lié aux activités agricoles et aux rejets domestiques urbains surtout lorsque les couches superficielles sont perméables.

Tableau III.1: Concentrations des nitrates de quelques points d'eau de la plaine de la Mitidja

Localité	Nord Réghaia	Est Rouiba	Est Birtouta	Sidi Moussa	Khemis el Khechna	Ouled moussa	Baraki
NO ₃ ⁻ (mg/l)	107	152	66	69	110	142	89

Les eaux qu'elles soient de surface ou souterraines, se dégradent de façon continue en liaison avec l'environnement en conséquence de plusieurs problèmes:

- La majorité des unités industrielles est dépourvue d'infrastructures de prétraitement et leurs rejets ne font l'objet d'aucun contrôle;

- Les rejets des réseaux d'assainissement se font à ciel ouvert dans les oueds et atteignent donc facilement les nappes phréatiques;
- Les agriculteurs réalisent leurs travaux d'amendement de manières empiriques par manque de soutien technique, ce qui fournit à l'environnement des quantités incontrôlées de nitrates en particulier.
- L'absence d'une véritable politique environnementale.

Cette situation, si elle n'est pas enrayerée, entrainera des coûts de traitement très élevés des eaux potables. Une politique drastique de l'environnement doit être entreprise, afin de limiter les rejets, entre autres, des nitrates et des phosphates etc.

La technologie de traitement sans rejets dommageables pour l'environnement, et pouvant être utilisée pour le traitement des eaux souterraines chargées en nitrates est la dénitrification biologique. Celle-ci se fait naturellement par des microorganismes utilisant les nitrates comme accepteur final d'électrons dans leur métabolisme respiratoire. En absence d'oxygène, les nitrates sont convertis en azote gazeux. La dénitrification peut être autotrophe ou hétérotrophe. Cette dernière voie nécessite un milieu anaérobie et riche en substrat carboné.

C'est dans cette optique, que nous nous proposons d'apporter une solution permettant d'une part de traiter l'eau polluée par les nitrates, et d'autre part de valoriser un sous produit issu de l'industrie agro-alimentaire (la drèche).

III.2. Traitement chimique de la drèche

La drèche à été soumise initialement à un traitement chimique, afin d'augmenter l'accessibilité de la cellulose aux attaques enzymatiques. Il à été longtemps admis que le prétraitement physique et/ou chimique est nécessaire pour atteindre des taux raisonnables dans l'hydrolyse enzymatique de la biomasse, cela à été attribué généralement à trois facteurs:

- La cristallinité de la cellulose
- Le bouclier hémicellulose-lignine qui entoure la cellulose
- Manque de régions et de surface spécifique disponible pour l'attaque des enzymes (Mussatto et al., 2008).

Plusieurs méthodes de traitement des matériaux lignocellulosiques incluant des procédures physiques et chimiques ont été évaluées pour augmenter le taux

d'hydrolyse de la cellulose. Les traitements physiques sont considérés être relativement moins efficaces par rapport aux traitements chimiques. Récemment l'attention a été concentrée sur les traitements chimiques.

Le bouclier hémicellulose-lignine peut être interrompu par des catalyseurs acide ou basique (McMillan, 1994). Dans notre étude, nous avons utilisé l'hydroxyde de sodium en solution. Selon Mussatto et al. (2006b) le traitement alcalin est très efficace dans la destruction du bouclier hémicellulose-lignine de la drèche avec un faible taux de perte en cellulose.

Les résultats obtenus en utilisant des méthodes d'analyses de type gravimétriques montrent clairement l'efficacité de ce traitement alcalin. La teneur en cellulose de la drèche après traitement est passée de 19,72 à 30,56% de MS, soit une augmentation de 77,48%, tandis que les teneurs en hémicellulose et en lignine ont diminué de 44,74 à 37,59% de MS et de 5,76 à 5,42% de MS respectivement (tableau III.2).

Tableau III.2: Composition biochimique de la drèche à l'état initiale, et après traitement alcalin.

Echantillon	Matière sèche (%)	% en matière sèche				
		NDF	ADF	Lignine	Hémicellulose	Cellulose
Drèche non traitée	94,70	70,22	25,48	5,76	44,74	19,72
Drèche traitée	94,43	73,57	35,98	5,42	37,59	30,56
Résultats de Mussatto et al. (2006b)	/	/	/	27,8	28,4	16,8
	/	/	/	8,4	6,2	96,4

L'hydrolyse enzymatique des matériaux lignocellulosiques est une réaction hétérogène avec des enzymes solubles attachées sur la cellulose qui la convertissent en sucres simples. En effet la taille des particules est un paramètre important de l'hydrolyse enzymatique car elle influence le contact entre l'enzyme et le substrat (Gan et al. 2002).

III.3. Caractéristiques de la drèche

III.3.1. Caractéristiques physiques de la drèche

Il est important de s'intéresser à la caractérisation physique de la drèche, car elle nous oriente sur le choix de la granulométrie du matériau à utiliser dans les essais.

Il repose sur plusieurs critères, dont:

- la qualité de l'eau à filtrer,
- la vitesse de filtration,
- la hauteur de la couche filtrante,
- la qualité d'eau filtrée,
- les pertes de charge disponibles,
- la durée de cycle souhaitée.

Afin d'éviter les problèmes relatifs au contournement de la zone de traitement (zones mortes), il est important que le biofiltre remplissant la colonne de dénitrification présente de bonnes propriétés mécaniques. Ainsi, le milieu filtrant utilisé devrait être caractérisé par une porosité élevée. Ceci favorisera le passage de l'eau contaminée à travers la zone de biofiltration. De plus, il est crucial que le milieu utilisé pour la biodénitrification ne soit pas sujet à des problèmes de compaction ou de colmatage. Le tableau III.3 illustre les résultats des différents paramètres considérés.

Tableau III.3: Caractéristiques physiques de la drèche utilisée

Caractéristiques	Taille effective TE (mm)	Masse volumique ρ (g/cm ³)
Drèche non traitée	0,80	0,963
Drèche traitée	0,68	0,927

❖ Rétention liquide

Les résultats des essais de caractérisation physique (la porosité) de la drèche utilisée dans notre étude sont regroupés sur la Figure III.1 et III.2. Ils montrent une forte rétention liquide de la drèche, qui peut être attribuée à sa forte porosité et à sa forte teneur en matière organique. La légère différence entre la drèche à l'état initiale et après traitement à l'hydroxyde de sodium vient des dimensions des fragments de celle-ci qui peuvent affecter parfois grandement la porosité. En résumé, les valeurs de

la rétention liquide statique de 37 et de 33% de la drèche non traitée et celle traitée respectivement font que la drèche possède les caractéristiques d'un bon milieu filtrant.

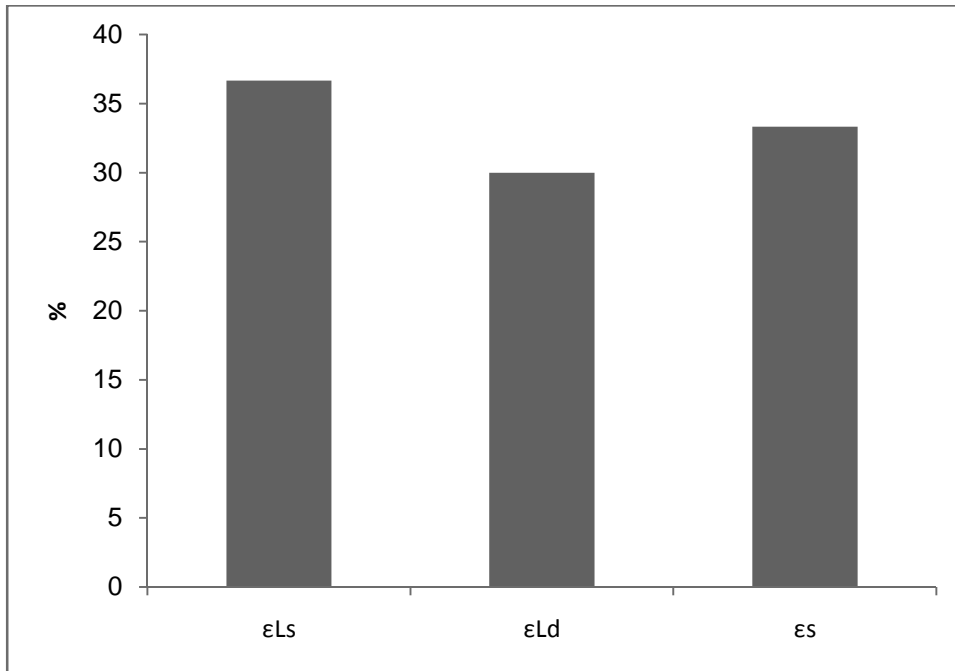


Figure III.1: Résultats des différentes rétentions de la drèche non traitée.

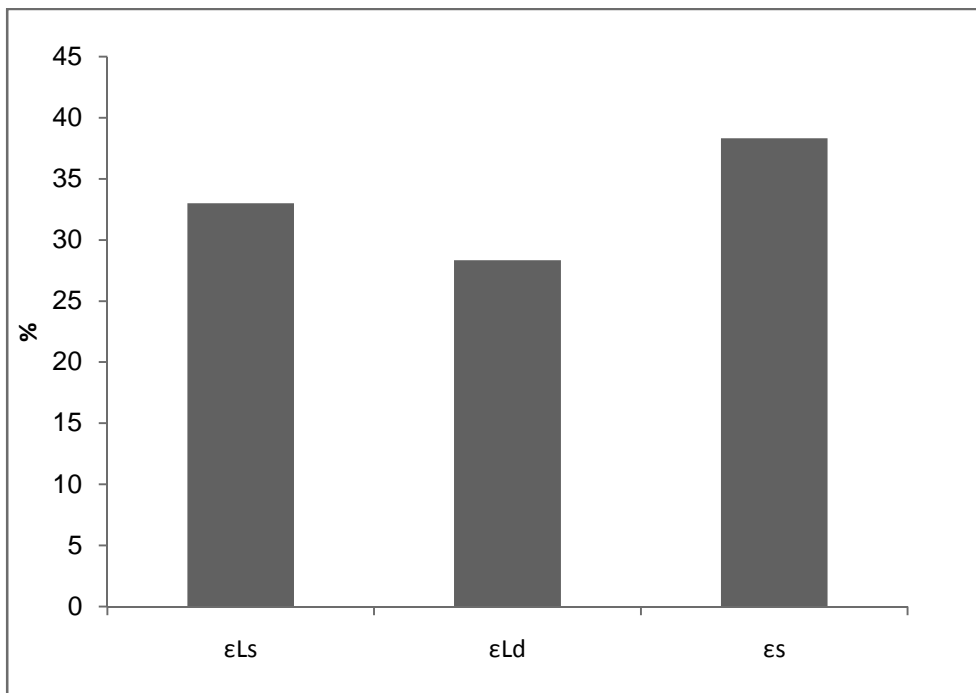


Figure III.2: Résultats des différentes rétentions de la drèche traitée.

III.4 Essai de dénitrification en batch

III.4.1 Comparaison de l'efficacité du traitement

La drèche est constituée essentiellement d'un mélange de cellulose (16 à 20%) d'hémicellulose (28 à 45%) et de lignine (5 à 27%). De fortes liaisons chimiques unissent ces trois composants pour former un complexe appelé ligno-cellulose.

Dans la drèche de céréales, la lignine imprègne totalement la membrane cellulosique et se comporte comme un bouclier protecteur entre la cellulose et les enzymes car elle n'est pas attaquée par les enzymes microbiens (Vidaud et al., 1982). Pour cette raison nous avons soumis notre matériau à un traitement chimique avec de l'hydroxyde de sodium (NaOH) en solution dans le but d'améliorer la disponibilité de la cellulose aux enzymes cellulolytiques pour une éventuelle amélioration de la rentabilité du procédé. La Figure III.3 nous montre que le pourcentage de dénitrification au premier cycle est de 90% pour la drèche traitée et 70% pour la drèche non traitée. Contrairement au réacteur drèche non traitée, on observe sur celui de la drèche traitée une dénitrification optimale de 100% à partir du troisième cycle. Cette différence entre les deux réacteurs est le fait que la drèche traitée est sujet d'un relargage important de matières organiques assimilables, source de carbone nécessaire au processus de dénitrification lors de l'hydrolyse de la cellulose et de l'hémicellulose.

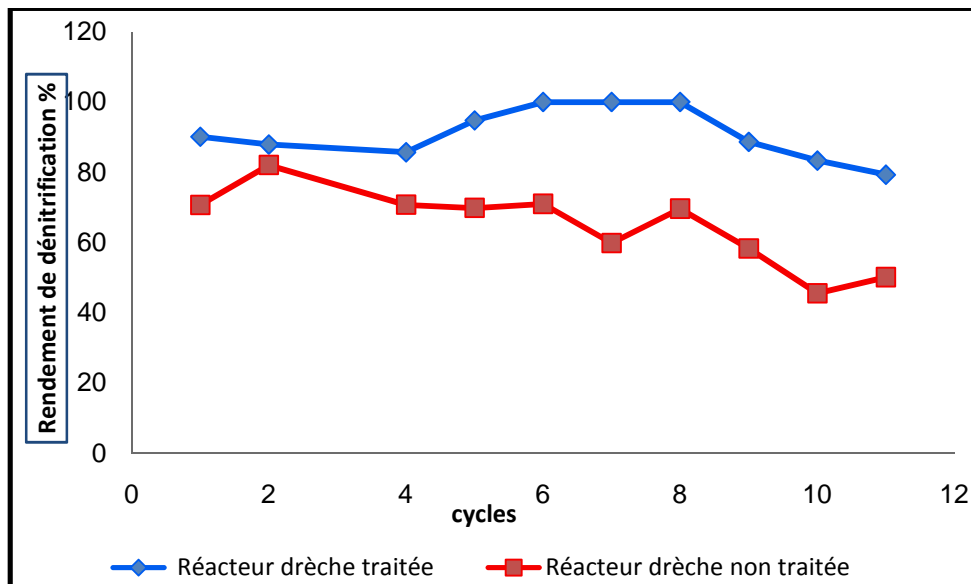


Figure III.3: Evolution de l'abattement des nitrates des deux types de support.

III.4.2. Optimisation de la concentration en biomasse végétale

Nous réalisons des essais en batch dans le but d'optimiser la concentration végétale. La quantité de support ajoutée comme source de carbone varie entre 0 et 10 g/l, les autres paramètres sont gardés constants. Nous remarquons une augmentation proportionnelle du rendement de dénitrification en fonction de la concentration en biomasse jusqu'à la valeur de 3 g/l et 5g/l pour la biomasse traitée et non traité respectivement, au-delà de laquelle l'augmentation de la quantité de biomasse végétale n'affecte plus le taux de dénitrification. D'après Glass et Silverstein (1998) le choix de la source de carbone est un des paramètres dont dépend la biodénitrification car les nitrates sont des accepteurs d'électrons et la matière organique est un donneur d'électron ce qui fait que l'apport en matière organique doit être suffisant pour une dénitrification complète.

Dans cette étude, nous avons utilisé une source de carbone qui n'est rien d'autre qu'un sous produit de l'industrie agro-alimentaire (la drèche), car Il est nécessaire de prendre en considération le coût et la disponibilité de la source de carbone externe. Si cette dernière est un produit chimique pur (méthanol, éthanol....etc) le cout de traitement augmentera. Un autre point très important à prendre en considération lors du choix de la source de carbone externe est qu'elle garantie un fonctionnement en continu de l'opération du traitement.

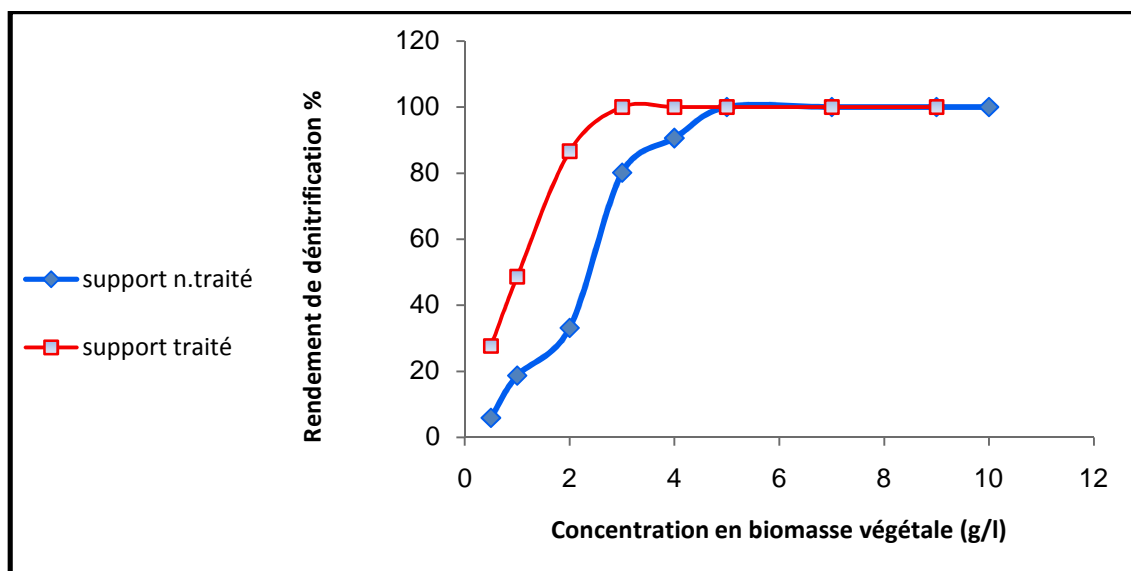


Figure III.4: Rendement de dénitrification en fonction de la concentration en biomasse végétale.

III.5. Dénitrification sur colonne

III.5.1. Optimisation des paramètres de fonctionnement des bioréacteurs

III.5.1.1. Dénitrification sous différents TRH_s

Il est apparent à partir du tableau III.4 et III.5 que la concentration en nitrates NO_3^- et en nitrites NO_2^- dans l'effluent diminue lorsque le temps de rétention hydraulique TRH_s augmente. La concentration en nitrates dans l'effluent reste en dessous de 13mg.l^{-1} (pour des temps de rétentions allant de 55 à 260 minutes) pour le pilote à biofiltre non traité, alors que l'effluent issue du pilote à biofiltre traité est exempt de nitrates (NO_3^-). Le rendement de dénitrification est supérieur à 98% pour les deux supports et la concentration en nitrites NO_2^- est inférieure à $0,01\text{ mg.l}^{-1}$ quand le TRH est supérieur à 100minutes, et elle est de l'ordre de $0,9\text{ mg.l}^{-1}$ à un TRH=75min pour le bioréacteur remplie de drèche non traitée. Par conséquent la concentration en nitrites NO_2^- dépasse la valeur standard de l'eau souterraine à des TRH courts. Pour le pilote à support traité la concentration des nitrites à la sortie est toujours nulle même à des TRH supérieurs à 100minutes.

Il est très important de déterminer le TRH de chaque réacteur par ce que la performance de la dénitrification est associée au temps de rétention hydraulique. La concentration en nitrites NO_2^- dépasserait donc la valeur standard pour l'eau souterraine si le TRH était trop court, pendant que l'efficacité du traitement diminuerait et le coût de réalisation augmenterait si le TRH était aussi long.

Dans la présente étude, le TRH optimal est de 100minutes pour le bioréacteur à support non traité et de 55min pour le pilote à support traité. Ces résultats se rapprochent des résultats de Wojnowska-Baryla et Zielinska (2002), qui ont trouvés que le rendement de dénitrification est maximal à un TRH de 40 à 60 minutes pour deux types d'anneaux céramiques comme support de dénitrification. Jin et al., (2004a), en utilisant le coton comme substrat de dénitrification ont trouvés qu'un TRH de 8 heures est optimale. Dans des essais de biodénitrification sur colonne remplie de matériaux plastiques, Aslan et Turkman (2005), ont observés que le rendement de dénitrification est de l'ordre de 99% pour des temps de rétention hydraulique allant de 4,5 à 8 heures mais la majorité des prélèvements contiennent des nitrites dû aux fluctuations de la température, car cette dernière est un paramètre important dans l'élimination des nitrates et la formation des nitrites.

III.5.1.2 Dénitrification sous différentes concentrations en nitrates

Il peut être observé à partir des tableaux III.4 et III.5 que la concentration des nitrates et nitrites (NO_3^- et NO_2^-) dans l'effluent augmente avec l'augmentation de la concentration initiale en nitrates. Elle est toujours en dessous de $0,1\text{mg.l}^{-1}$ pour l'effluent issu du pilote à biofiltre non traité alors que celui issu du pilote à support traité ne contient pas de nitrites. La variation de la concentration initiale en nitrates est sans aucune influence sur le rendement final de dénitrification, il atteint toujours le maximum (100%) au temps de rétention optimal des deux pilotes.

Mansell et Schroeder (1999) en utilisant un bioréacteur à membrane pour traiter l'eau souterraine contaminée par les nitrates ont montré que le rendement d'élimination des nitrates est de 90% seulement quand la concentration en nitrates de l'effluent est de 20mg.l^{-1} .

Les résultats obtenus par Soarcs et Abeliovich (1998) avec un bioréacteur remplie de paille comme source de carbone et support de fixation des bactéries dénitrifiantes montrent que l'élimination des nitrates n'est totale qu'à de faibles concentrations initiales ($<20\text{mg.l}^{-1}$).

Dans notre étude une concentration de 200mg.l^{-1} est totalement éliminée et la concentration des nitrites dans l'effluent n'excède pas la valeur standard à un TRH de 100 et 55min pour le bioréacteur à support non traité et à support traité respectivement. Le rendement de dénitrification obtenu est lié à l'affinité support-bactérie (grande concentration de bactéries sur les fibres de celluloses) tandis que la différence observée entre les deux supports résulte de la disponibilité de la source de carbone améliorée par le traitement chimique. Ces résultats concordent avec ceux trouvés par Saliling et al. (2007) qui ont utilisé la paille de blé et la sciure de bois comme support de fixation des bactéries dénitrifiantes. Ces deux supports ont permis l'élimination de 200mg/L de nitrates d'une eau usée d'aquaculture synthétique. Quand la source de carbone n'est pas suffisante, les nitrites s'accumulent et la croissance de la biomasse est ralentie. Le même phénomène a aussi été observé par Gomez et al. (2000). Cheng et lin (1993) ont élaborés une équation stœchiométrique de dénitrification avec le méthanol comme source de carbone, le ratio théorique C/N pour le méthanol est établie à 0,71. Des études similaires montrent des C/N de 1,1 (Gomez et al., 2000); 2,2 (Fan et al., 2001); 1,25 (Wang et al., 2009). Pour la présente

étude, il est supposé que le support traité fournit aux bactéries dénitrifiantes la quantité de carbone nécessaire et suffisante pour la dénitrification.

Tableau III.4: Concentrations des nitrates et nitrites dans l'affluent et l'effluent à différents paramètres de fonctionnement du pilote à support non traité.

Conditions de fonctionnement	L'Affluent		L'Effluent	
	pH	NO ₃ ⁻ (mg.l ⁻¹)	NO ₃ ⁻ (mg.l ⁻¹)	NO ₂ ⁻ (mg.l ⁻¹)
260	7,5-7,9	104,41	0,00	0,021
135	7,5-7,9	104,41	0,00	0,009
100	7,5-7,9	104,41	0,00	0,011
75	7,5-7,9	104,41	0,00	0,951
55	7,5-7,9	104,41	12,06	2,790
100	7,5-7,9	51,69	0,00	0,000
100	7,5-7,9	155,07	0,00	0,080
100	7,5-7,9	199,00	0,00	0,090
100	8,5	196,94	5,85	0,349
100	6,5	198,14	18,09	2,839

Tableau III.5: Concentrations des nitrates et nitrites dans l'affluent et l'effluent à différents paramètres de fonctionnement du pilote à support traité.

Conditions de fonctionnement	L'Affluent		L'Effluent	
	pH	NO ₃ ⁻ (mg.l ⁻¹)	NO ₃ ⁻ (mg.l ⁻¹)	NO ₂ ⁻ (mg.l ⁻¹)
260	7,5-7,9	106,65	0,00	0,000
135	7,5-7,9	106,65	0,00	0,000
100	7,5-7,9	106,65	0,00	0,000
75	7,5-7,9	106,65	0,00	0,000
55	7,5-7,9	106,65	0,00	0,000
55	7,5-7,9	49,45	0,00	0,000
55	7,5-7,9	152,14	0,00	0,000
55	7,5-7,9	211,06	0,00	0,000
55	8,5	211,06	3,10	0,088
55	6,5	211,06	13,43	0,052

III.5.1.3 Effet de la variation du pH sur le processus de dénitrification

Dans notre étude, il est apparent que la concentration des nitrates et nitrites dans l'effluent augmente avec l'augmentation et/ou l'abaissement du pH. La concentration des nitrates est inférieure à 20mg/l pour les deux pilotes de dénitrification, alors que la concentration des nitrites dépasse énormément la valeur standard ($> 0,1\text{mg.l}^{-1}$). Il y'a donc accumulation des nitrites résultant d'un blocage de la fonction dénitrifiante.

Ces résultats montrent que l'activité dénitrifiante est maximale aux pH neutres (7,5-7,9). Ils sont en concordance avec ceux trouvés par Wang et al. (2009). L'environnement acide et alcalin n'est pas favorable au développement microbien, et la valeur du pH joue un rôle important dans l'accumulation des nitrites (Zhou et al., 2007). La raison principale est que le pH influence l'activité enzymatique des bactéries, les nitrites réductases seraient restreintes par un haut pH et l'accumulation des nitrites provoquerait la toxicité des microorganismes (Liu, 2006).

Dans la présente étude l'accumulation des nitrites serait fonction du pH. Un pH neutre (7,5-7,9) est nécessaire pour que la rentabilité du procédé soit maximale.

III.5.2 Profils verticaux des nitrates et des nitrites

Le suivi vertical de la dénitrification a pour but de mettre en évidence les relations pouvant exister entre les paramètres de fonctionnement des bioréacteurs et la hauteur du milieu filtrant.

Pour calculer le rendement de dénitrification à différents plateaux, les concentrations en nitrates et nitrites sont mesurées en analysant les échantillons d'eau à des piquages intermédiaires A (15cm), B (30cm), C (45cm), D(60cm), E(75cm) et F (90cm) pour chaque paramètre étudié.

III.5.2.1 Influence du temps de rétention hydraulique

Les courbes obtenues en régime permanent (Figure III.5 et III.6) montrent que la majorité des nitrates sont éliminés dans les quinze premiers centimètres de la colonne pour le support traité, alors que dans le cas du support non traité l'élimination des nitrates s'effectue plus loin (45cm), pendant que la concentration en nitrites NO_2^- augmente. L'augmentation du temps de rétention a provoqué l'augmentation de la concentration des nitrates et nitrites dans l'effluent. Elles sont en dessous des valeurs acceptables pour l'eau de boisson pour des temps de rétention allant de 260 à

100minutes dans le cas du pilote à support non traité, alors que pour le pilote à support traité, elles restent encore en dessous des normes régies par la législation pour des temps de rétention qui s'étendent jusqu'au 55minutes. Le rendement de dénitrification pour le bioréacteur à support non traité a diminué dans les 15 premiers centimètres de 78,9% à 9,7% pour une concentration initiale de 100mg/l de NO_3^- , tandis que pour le bioréacteur à support traité, l'élimination des nitrates est passée de 100% à 57% (tableau III.6)

Nakhla et Farooq, (2005) ont étudiés l'impact de la vitesse de passage sur le rendement d'élimination des nitrates dans un bioréacteur à sable. Ils ont trouvé que le rendement d'élimination des nitrates restait supérieur à 95% à une vitesse de filtration de 0,05m/h.

Aslan et Cakici, (2007) en utilisant la biofiltration sur sable ont observés que l'augmentation de la vitesse de filtration de 0.04, 0.05 et 0.06m/h provoque une diminution du rendement d'élimination des nitrates 55%, 51% et 47% à 10cm et 100%, 99% et 94% à 80cm de hauteur du milieu filtrant respectivement.

Dans le cadre de ce travail, il est supposé que la dégradation lente de la source de carbone (cellulose) affecte négativement le processus de dénitrification et un important temps de contact affecte positivement l'élimination des nitrates dans un système de biodénitrification.

L'accumulation des nitrites est observée quand les nitrates ne sont pas totalement éliminés à la sortie du réacteur, leur concentration diminue avec la hauteur du milieu filtrant (Figure III.5 et III.6). A la base du réacteur (0à 15cm) les nitrates diminuent alors que les nitrites augmentent. Leur réduction se produit entre 15 et 60cm pour les temps de rétention supérieur au temps optimal.

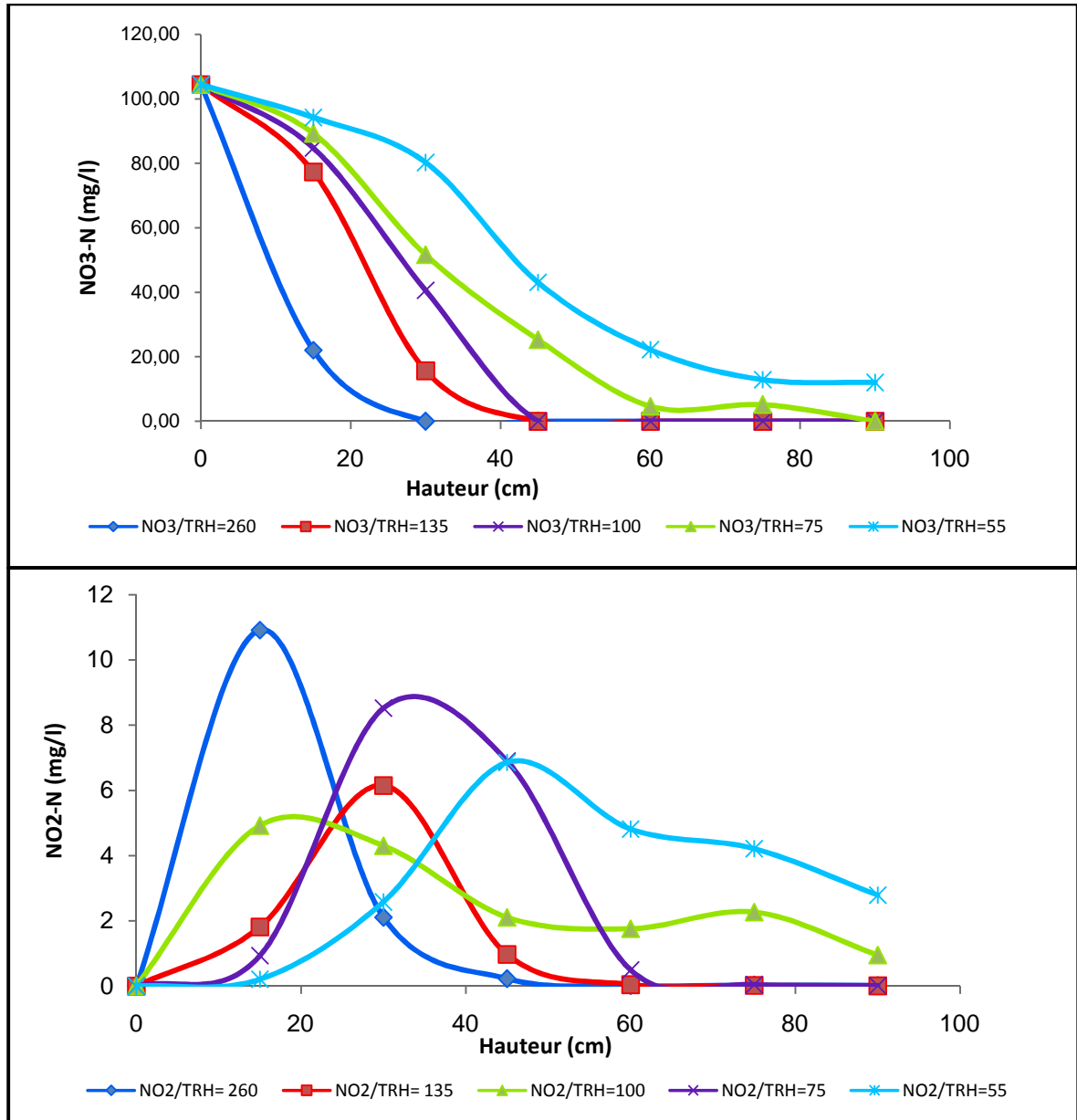


Figure III.5: Evolution des concentrations en nitrates et nitrites en fonction de la hauteur du milieu filtrant (support non traité) à différents temps de rétention hydraulique et à une concentration initiale en NO_3^- de 100mg/l, pH= 7,5-7,9.

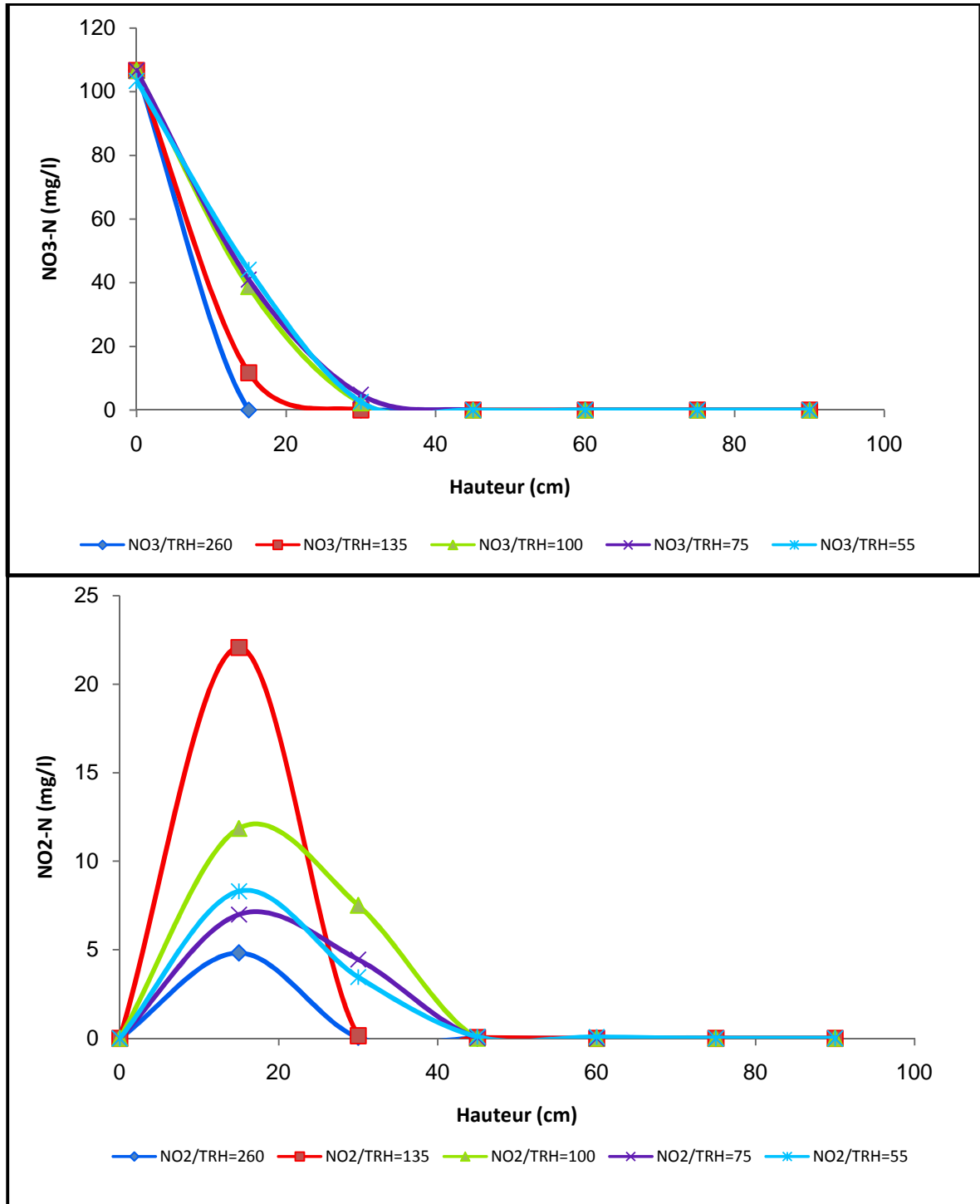


Figure III.6: Evolution des concentrations en nitrates et nitrites en fonction de la hauteur du milieu filtrant (support traité) à différents temps de rétentions hydrauliques et à une concentration initiale en $\text{NO}_3\text{-N}$ de 100mg/l, pH=7,5-7,9.

Tableau III.6: Concentrations des nitrates, nitrites et rendement de dénitrification des piquages intermédiaires à différents temps de rétention hydraulique

TRH (min)	support	A			B			C			D			E			F		
		NO ₃ ⁻ (mg/l)	NO ₂ ⁻ (mg/l)	Rd (%)	NO ₃ ⁻ (mg/l)	NO ₂ ⁻ (mg/l)	Rd (%)	NO ₃ ⁻ (mg/l)	NO ₂ ⁻ (mg/l)	Rd (%)	NO ₃ ⁻ (mg/l)	NO ₂ ⁻ (mg/l)	Rd (%)	NO ₃ ⁻ (mg/l)	NO ₂ ⁻ (mg/l)	Rd (%)	NO ₃ ⁻ (mg/l)	NO ₂ ⁻ (mg/l)	Rd (%)
260	N.traité	22,05	10,91	78,87	0,00	2,10	100	0,00	0,22	100	0,00	0,01	100	0,00	0,02	100	0,00	0,02	100
	traité	0,00	4,82	100	0,00	0,04	100	0,00	0,00	100	0,00	0,00	100	0,00	0,00	100	0,00	0,00	100
135	N.traité	77,36	1,81	25,90	15,67	6,15	84,98	0,00	0,97	100	0,00	0,04	100	0,00	0,02	100	0,00	0,009	100
	traité	11,71	22,07	89,01	0,00	0,15	100	0,00	0,04	100	0,00	0,00	100	0,00	0,00	100	0,00	0,00	100
100	N.traité	84,77	0,93	18,80	40,66	8,51	61,05	0,00	6,89	100	0,00	0,49	100	0,00	0,04	100	0,00	0,01	100
	traité	38,76	6,99	63,64	2,23	4,45	97,89	0,00	0,02	100	0,00	0,00	100	0,00	0,00	100	0,00	0,00	100
75	N.traité	89,25	4,92	14,51	51,69	4,30	50,49	25,32	2,10	75,74	5,16	2,26	95,04	4,65	1,76	95,54	0,00	0,95	100
	traité	41,00	11,85	61,54	4,82	7,51	95,47	0,00	0,01	100	0,00	0,00	100	0,00	0,00	100	0,00	0,00	100
55	N.traité	94,24	0,20	9,73	80,29	2,57	23,09	43,07	6,85	58,74	22,22	4,81	78,71	12,92	4,21	87,62	12,06	2,79	88,44
	traité	44,10	8,30	57,33	2,58	3,45	97,50	0,00	0,10	100	0,00	0,08	100	0,00	0,00	100	0,00	0,00	100

III.5.2.2 Influence de la concentration initiale en nitrates

La réduction des nitrates à travers le réacteur à support non traité au temps de rétention optimal est légèrement influencée par la concentration en nitrates de l'affluent (tableau III.7) car un rendement de 97% est atteint à une hauteur de 75cm pour des concentrations initiales de 50, 150 et 200mg/l de NO_3^- . L'influence de la concentration initiale pour le pilote à support traité est très apparente car le rendement de dénitrification est de 100% à 30cm, 60cm, 90cm de hauteur du milieu filtrant pour des concentrations en nitrates de 50mg/L, 150mg/l et 200mg/l respectivement.

Dans une étude comparative entre la paille de blé, la sciure du bois et le polyéthylène haute densité comme support de fixation des bactéries dénitrifiantes, Saliling et al.(2007) ont utilisé le méthanol comme source de carbone et ont montré que la concentration initiale en nitrates ne produit aucune influence sur le rendement de dénitrification en fonction de la hauteur du milieu filtrant, et que 50 à 70% des nitrates sont éliminées dans les 10 premiers centimètres quelque soit le type du support utilisé.

Dans le cas de la présente étude, la différence observée entre les deux supports (Figure III.7 et III.8) est due à la plus grande disponibilité de la source de carbone améliorée par le traitement chimique, car d'une déficience en carbone il en résulte une mauvaise réduction des nitrates et une forte accumulation des nitrites.

La différence observée entre l'allure des courbes issues des deux pilotes, est le fait que le temps nécessaire pour dégrader la cellulose et la convertir en sucres assimilables est très long pour le support non traité comparativement au support traité, ou le bouclier protecteur de la cellulose est interrompu par le traitement alcalin, ce qui rend la cellulose plus accessible aux enzymes cellulolytiques et par voie de conséquence une meilleure utilisation de la source de carbone contenue dans le support.

Il est donc nécessaire de prendre en considération la hauteur du milieu filtrant dans le cas où nous optons sur l'amélioration de la capacité productive de l'installation.

III.5.2.3 Influence du pH

La majorité des études portant sur l'influence du pH du milieu environnent le processus de dénitrification rapportent que le pH optimum de dénitrification se situe

entre 7 et 8. Des valeurs de pH inférieures à 6 ou supérieures à 9 peuvent être à l'origine d'une déchéance considérable et même arrêt du processus de dénitrification (Oh et al., 2000).

Dans une étude portant sur la dénitrification biologique des eaux par *Pseudomonas stutzeri* immobilisée sur une cellulose microbienne, Rezaee et al. (2008) ont observé que le taux de bioconversion des nitrates à un pH de 7,2 est nettement meilleur par rapport à celui obtenu avec des pH de 5 et 9.

Dans le cas de notre travail, les profils verticaux obtenus aux conditions optimales (TRH et concentration initiale en nitrates) des deux pilotes à différents pH (Figure III.9 et III.10) montrent clairement que le processus de dénitrification est restreint de part et d'autre du pH neutre. L'eau à la sortie des réacteurs contient encore des nitrates et la concentration en ions nitrites dépasse dans la majorité des cas les valeurs limites (Tableau III.8). La variation des rendements épuratoires observée au niveau des piquages intermédiaires à la suite d'une variation du pH est lié probablement à une déficience en matière de source de carbone facilement assimilable car l'influence du pH est reliée au concept de force protomotrice (pmf), qui désigne un gradient chimiosmotique de part et d'autre de la membrane des bactéries, dont les deux composantes sont le potentiel électrique membranaire $\Delta\psi$ et le gradient de pH dû à l'acidité relative du milieu extracellulaire par rapport au cytoplasme bactérien. Comme la cellule maintient la force protomotrice et son pH interne constant, une variation du pH externe modifie le potentiel membranaire $\Delta\psi$. Plus le pH extracellulaire est élevé, et plus $\Delta\psi$ devient négatif, de sorte que l'entrée d'un substrat chargé négativement comme les nitrates demande plus d'énergie (Smolders et al., 1994b).

Les résultats de l'étude verticale, montrent que le traitement chimique des matériaux lignocellulosiques est nécessaire, pour pouvoir éliminer la totalité des nitrates et éviter la présence des nitrites dans l'eau traitée. Ces objectifs peuvent être réalisés sans faire recours au traitement du support, par une augmentation de la hauteur de ce dernier.

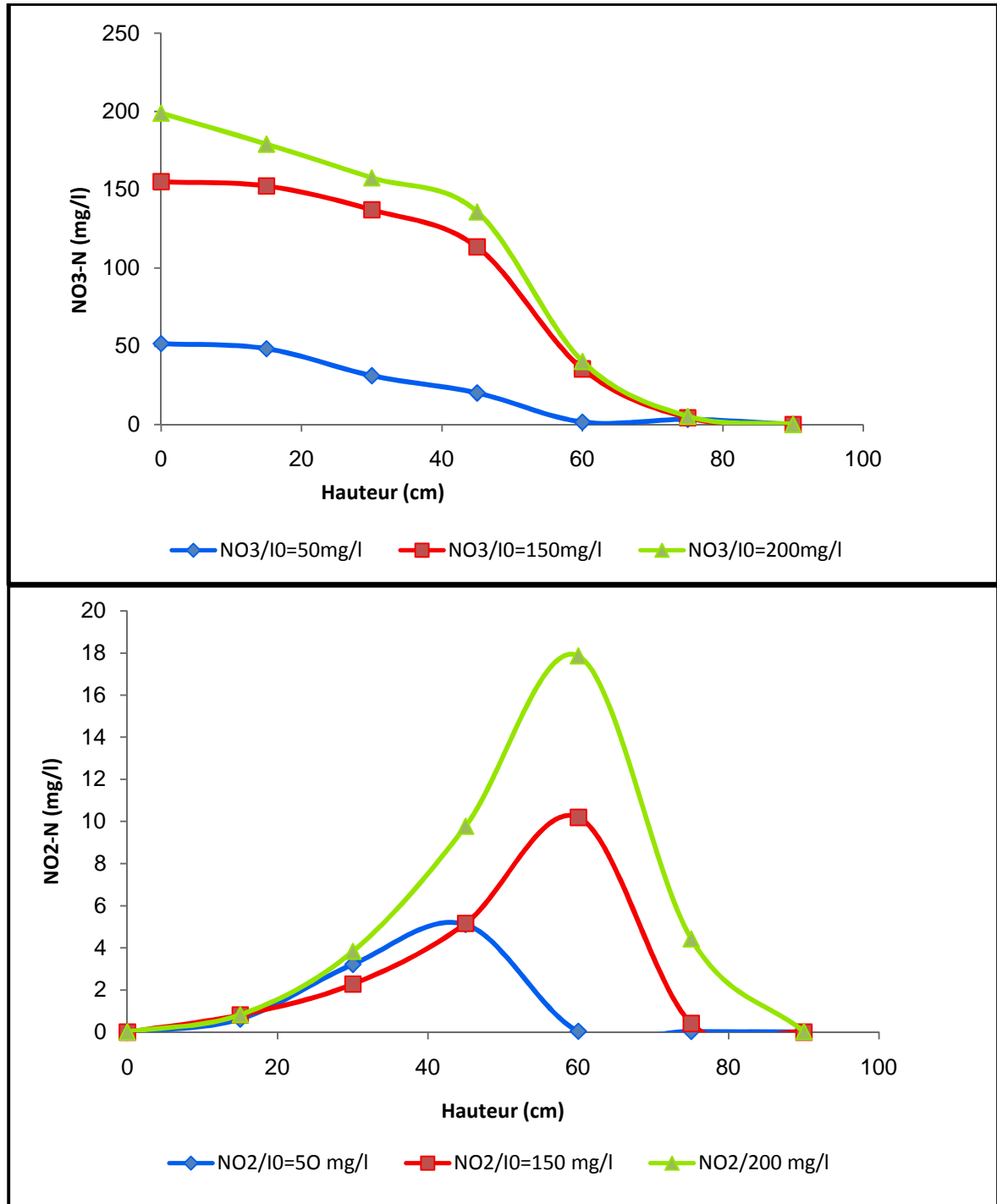


Figure III.7: Evolution des concentrations en nitrates et nitrites en fonction de la hauteur du milieu filtrant (support non traité) à différentes concentrations initiales en nitrates au temps de rétention optimum (100min), pH= 7,5-7,9.

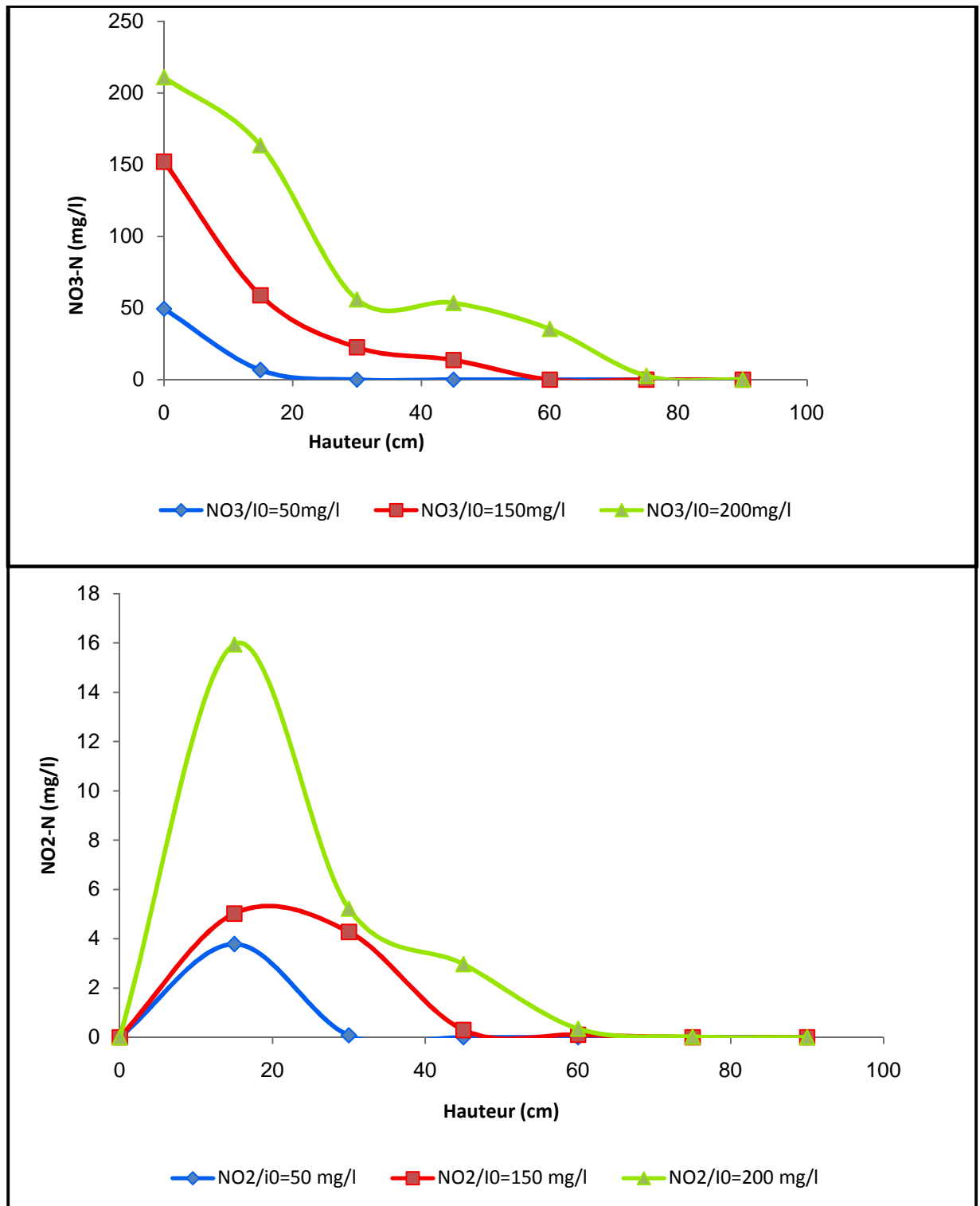


Figure III.8: Evolution des concentrations en nitrates et nitrites en fonction de la hauteur du milieu filtrant (support traité) à différentes concentrations initiales en nitrates au temps de rétention optimum (55min), pH= 7,5-7,9.

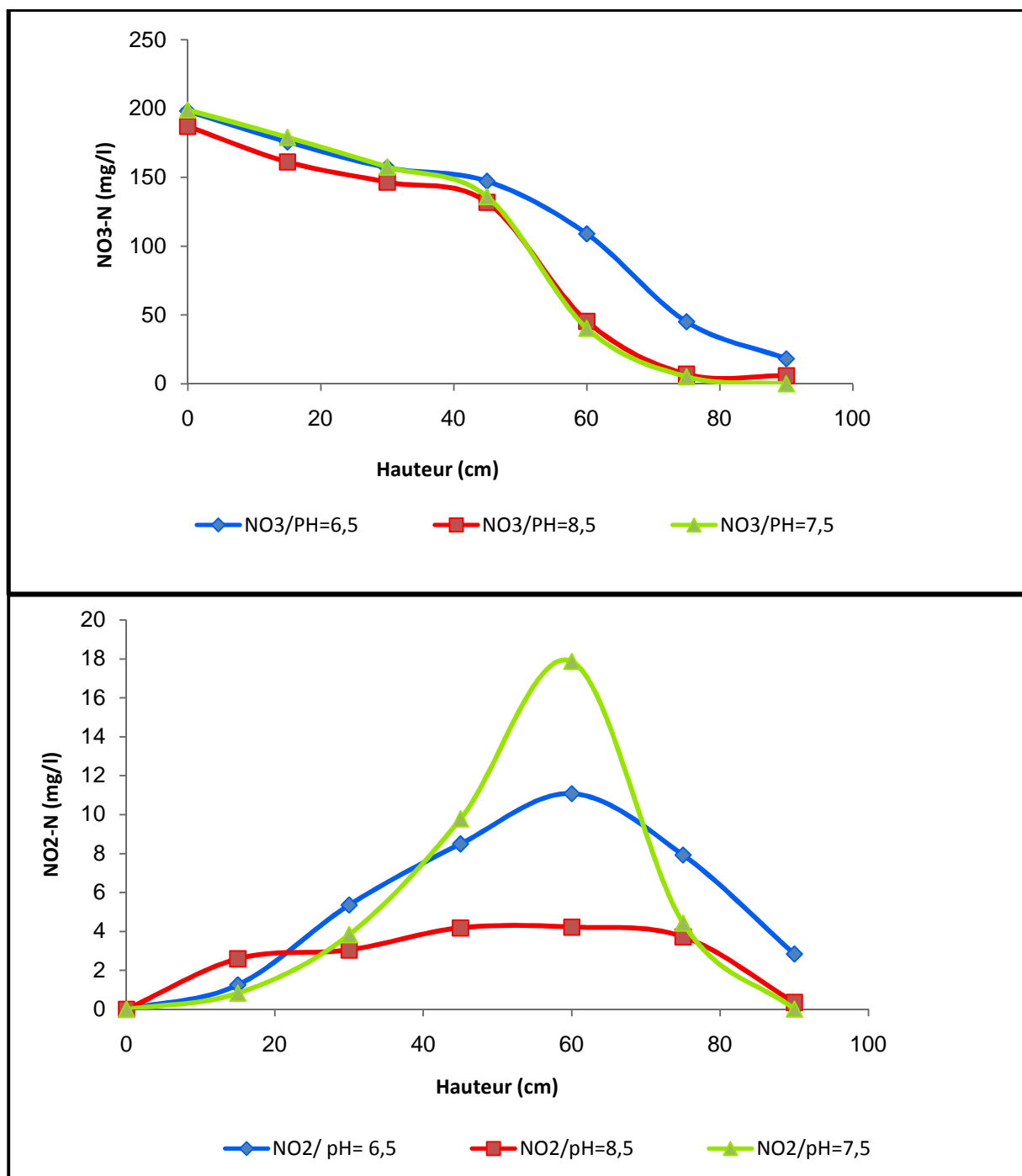


Figure III.9: Evolution des concentrations en nitrates et nitrites en fonction de la hauteur du milieu filtrant (support non traité) à différents pH aux conditions de fonctionnement optimales (TRH=100min; NO₃-N=200mg.l⁻¹).

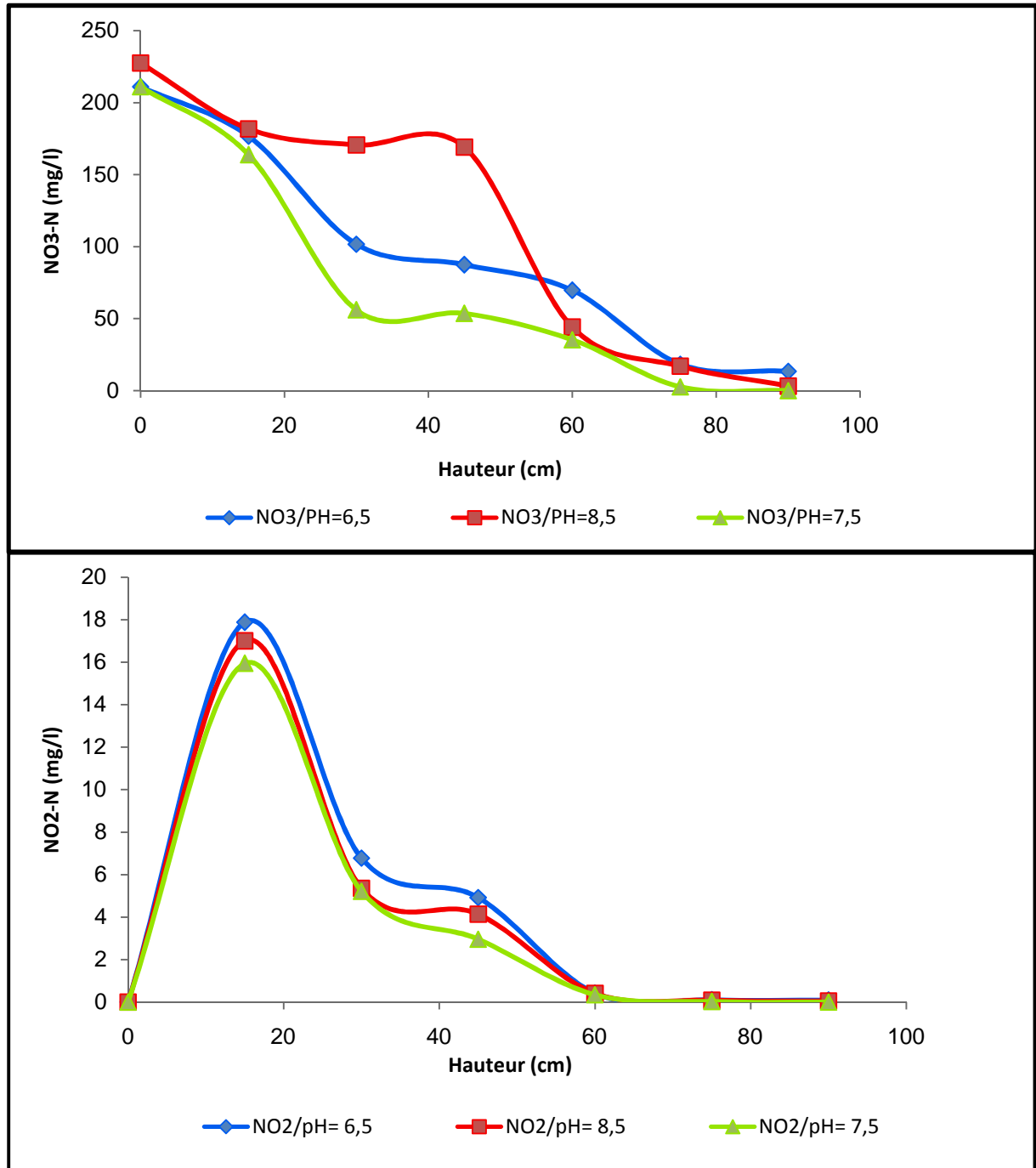


Figure III.10: Evolution des concentrations en nitrates et nitrites en fonction de la hauteur du milieu filtrant (support traité) à différents pH aux conditions de fonctionnement optimales (TRH=55min; NO₃-N=200mg.l⁻¹).

Tableau III.7: récapitulatif des concentrations en nitrates, nitrites et rendement de dénitrification des piquages intermédiaires à différentes concentrations initiales en nitrates de l'affluent.

Concentration en nitrates de l'affluent (mg/l)	Support	A			B			C			D			E			F		
		NO ₃ ⁻ (mg/l)	NO ₂ ⁻ (mg/l)	Rd (%)	NO ₃ ⁻ (mg/l)	NO ₂ ⁻ (mg/l)	Rd (%)	NO ₃ ⁻ (mg/l)	NO ₂ ⁻ (mg/l)	Rd (%)	NO ₃ ⁻ (mg/l)	NO ₂ ⁻ (mg/l)	Rd (%)	NO ₃ ⁻ (mg/l)	NO ₂ ⁻ (mg/l)	Rd (%)	NO ₃ ⁻ (mg/l)	NO ₂ ⁻ (mg/l)	Rd (%)
50	Non traité	48,41	0,61	6,33	31,18	3,21	39,66	20,15	5,10	61,00	3,27	0,03	93,66	1,55	0,04	97,00	0,00	0,08	100
	Traité	6,71	3,78	86,41	0,00	0,08	100	0,00	0,00	100	0,00	0,00	100	0,00	0,00	100	0,00	0,00	100
150	Non traité	152,31	0,81	1,73	137,15	2,28	11,51	113,37	5,15	26,85	35,49	10,19	77,10	4,30	0,40	97,22	0,00	0,00	100
	Traité	58,92	5,02	61,26	22,57	4,27	85,16	13,78	0,29	90,93	0,00	0,10	100	0,00	0,00	100	0,00	0,00	100
200	Non traité	179,19	0,83	9,95	157,65	3,83	20,77	135,94	9,77	31,68	40,31	17,85	79,73	5,16	4,42	97,40	0,00	0,009	100
	Traité	163,68	15,94	22,44	55,99	5,22	73,46	53,58	2,96	74,61	35,32	0,35	83,26	2,58	0,02	98,77	0,00	0,00	100

Tableau III.8 : récapitulatif des concentrations en nitrates, nitrites et rendement de dénitrification des piquages intermédiaires à différents pH de l'affluent.

pH de l'affluent	Support	A			B			C			D			E			F		
		NO ₃ ⁻ (mg/l)	NO ₂ ⁻ (mg/l)	Rd (%)	NO ₃ ⁻ (mg/l)	NO ₂ ⁻ (mg/l)	Rd (%)	NO ₃ ⁻ (mg/l)	NO ₂ ⁻ (mg/l)	Rd (%)	NO ₃ ⁻ (mg/l)	NO ₂ ⁻ (mg/l)	Rd (%)	NO ₃ ⁻ (mg/l)	NO ₂ ⁻ (mg/l)	Rd (%)	NO ₃ ⁻ (mg/l)	NO ₂ ⁻ (mg/l)	Rd (%)
pH=6,5	Non traité	175,74	1,25	11,30	156,93	5,35	20,78	147,14	8,49	25,73	108,89	11,07	45,04	44,97	7,92	77,30	18,09	2,83	90,86
	Traité	176,60	17,88	16,32	101,65	6,78	51,83	87,35	4,92	58,61	69,60	0,42	67,01	18,26	0,09	91,34	13,43	0,08	93,63
pH=7,5-7,9	Non traité	179,19	0,83	9,95	157,65	3,83	20,77	135,94	9,77	31,68	40,31	17,85	79,73	5,16	4,42	97,40	0,00	0,01	100
	Traité	163,68	15,94	22,44	55,99	5,22	73,46	53,58	2,96	74,61	35,32	0,35	83,26	2,58	0,02	98,77	0,00	0,00	100
PH=8,5	Non traité	161,10	2,59	13,82	146,45	3,05	21,65	131,80	4,17	29,49	45,31	4,21	75,75	6,89	3,72	96,31	5,85	0,349	96,86
	Traité	181,77	17,01	20,07	170,57	5,35	24,99	169,02	4,14	25,67	44,10	0,41	80,60	17,05	0,08	92,49	3,10	0,05	98,63

III.6 Caractérisation des réacteurs

L'objectif de cette partie du travail est de caractériser le comportement des réacteurs en utilisant la détermination de la distribution des temps de séjours (DTS) avant et après ensemencement.

III.6.1 Distribution des temps de séjour hydraulique des réacteurs

Cette partie concerne la caractérisation hydrodynamique des deux installations pilotes. L'étude a été réalisée sur des réacteurs, qui ne diffèrent que par la disponibilité de la source de carbone contenu dans le support. Rappelons que l'analyse de la DTS permet, pour un réacteur donné, de déterminer son comportement hydraulique et également de mettre en évidence les dysfonctionnements des réacteurs tels que les courts circuits et les zones mortes. La valeur de la conductivité a été déterminée à raison d'une mesure toutes les 5 minutes.

III.6.1.1 Temps de séjour

En exploitant les résultats obtenus selon le protocole défini au chapitre II, nous comparons le temps de séjour moyen (τ_s) et du rapport $\tau = V_0 / Q_0$ permet de déterminer la présence de courts-circuits ou des zones mortes selon les différentes conditions expérimentales.

A partir de la forme des courbes obtenues (Figure III.11 Et III.12), on peut noter qu'il existe des zones mortes (inaccessibles au fluides) des deux réacteurs. Les résultats du tableau III.9 montrent la présence de zones mortes dûe au fait que le biofilm tapisserait la microporosité des supports; ce qui suggérerait l'hypothèse de passages préférentiels de l'eau dans les réacteurs (Menoret, 2001).

La présence du biofilm rend différent les comportements hydrodynamiques des deux types de support, en créant des passages préférentiels.

Des différences de volumes injectés ou sur la concentration initiale de la solution mère du traceur peuvent entrainer une différence sur la hauteur des pics, bien que le protocole expérimentale ait été rigoureusement respecté.

Tableau III.9 : Synthèse des résultats de l'étude hydrodynamique pour

$Q_0 = 23,8 \text{ ml/min}$

Réacteur	Volume du réacteur (L)	Temps de passage à vide $\tau = V_0 / Q_0$ (min)	Temps de séjour moyen avant colonisation (min)	Temps de séjour moyen après colonisation (min)
Pilote à support non traité	1,3	55	70	40
Pilote à support traité	1,3	55	65	35

III.6.1.2 Influence du biofilm sur l'hydrodynamique des réacteurs

On remarque à partir de la Figure III.11 et III.12 que la formation du biofilm dans les réacteurs semble avoir une influence significative sur l'allure des courbes de la DTS notamment sur la position du pic et sur la trainée.

Dans une étude portant sur l'influence du garnissage sur l'hydrodynamique d'un réacteur cascade, Tizghadam (2007) a montré qu'à faible volume du garnissage, la formation du biofilm est de faible influence sur le comportement hydrodynamique du réacteur d'où la relation entre le volume du garnissage, la formation du biofilm et les caractéristiques hydrodynamiques.

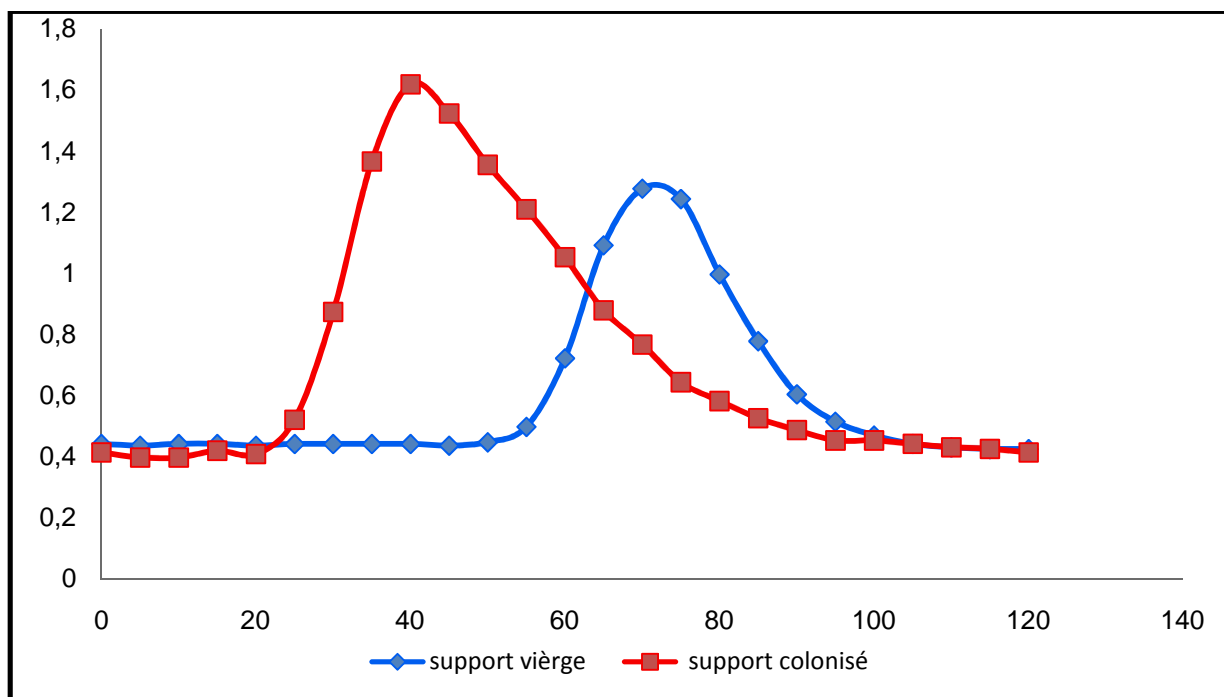


Figure III.11: Courbe de DTS du pilote à support non traité

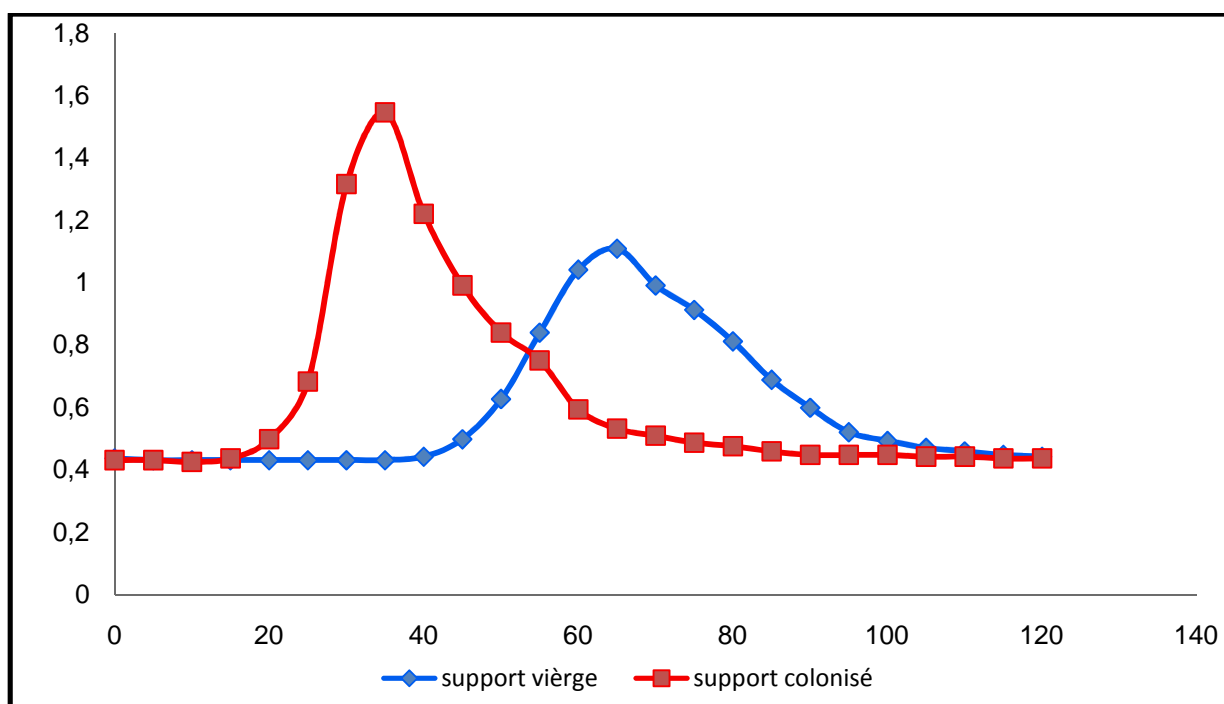


Figure III.12: Courbes de DTS du pilote à support traité.

CONCLUSION GENERALE

Conclusion

Notre étude se situe dans le cadre des traitements biologiques de la pollution des eaux générées par les activités agricoles et industrielles. Parmi ces traitements : la dénitrification biologique, utilisée pour traiter efficacement la pollution des eaux souterraines par les nitrates. En effet l'enquête menée sur l'état de pollution de la nappe phréatique de la Mitidja à révélé que la concentration en nitrates dépasse énormément les valeurs limites.

Pour traiter efficacement la pollution des eaux souterraines par les nitrates, nous avons mis en fonctionnement un réacteur à biofilm utilisant les fibres de cellulose de la drèche comme support de fixation et source de carbone.

Les performances du réacteur à biofilm ont été optimisées en utilisant deux pilotes à l'échelle de laboratoire, l'un rempli de drèche et l'autre de drèche traité à l'hydroxyde de sodium. Les résultats obtenus se résument comme suit:

- Le temps de rétention optimal est de 100minutes pour le pilote à support non traité et de 55minutes pour le pilote à support traité. L'intérêt de ce facteur est que la performance de la dénitrification est associée à ce paramètre (temps de contact bactérie-polluant).
- Les deux pilotes ont permis l'élimination d'une concentration initiale en nitrates de 200mg/l.
- Un pH optimum de 7,5 à 7,9 est nécessaire pour atteindre un meilleur rendement.

L'étude verticale a permis de tirer les conclusions suivantes:

- ❖ Un important temps de contact affecte positivement l'élimination des nitrates (contact bactérie-substrat). La concentration des nitrates et nitrites aux différents plateaux est fonction du temps de rétention hydraulique.
- ❖ La concentration initiale en nitrates est sans influence sur le rendement de dénitrification en fonction de la hauteur du milieu filtrant, et que plus de 50% des nitrates sont éliminées dans les 15 premiers centimètres pour le pilote à support traité; pour le pilote à support non traité la hauteur du support serait de 75 centimètres. La différence observée entre les deux bioréacteurs est le fait

que le traitement à l'hydroxyde de sodium des matériaux ligno-cellulosiques facilite leurs dégradations par les enzymes cellulolytiques d'origine bactérien. La source de carbone nécessaire à la dénitrification (donneur d'électrons) serait donc en quantité suffisante d'où une éventuelle amélioration des performances de la biofiltration.

- ❖ La dénitrification biologique est restreinte de part et d'autre du pH neutre, les nitrites à la sortie des réacteurs dépassent les valeurs limites.

La comparaison des cinétiques de dénitrification des deux matériaux utilisés a montré une meilleure efficacité de la drèche traitée, car cette dernière relargue de la matière organique en quantités suffisantes nécessaires pour la dénitrification.

La distribution des temps de séjour (DTS) des deux réacteurs avant et après colonisation montre que la formation du biofilm modifie d'une manière significative l'allure des courbes de la DTS, notamment la position du pic et la traînée. La grande différence entre les courbes obtenues avant et après colonisation est reliée à la formation du biofilm.

La performance de la biodénitrification des eaux chargées en nitrates en utilisant la drèche comme support de fixation et source de carbone dépend très largement des conditions hydrodynamiques (TRH), du pH et de la disponibilité de la source de carbone.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

Références bibliographiques

Abuja P.M., Schmuck M., Pilz I., Tomme P., Claeysens M., Esterbauer H. (1988). Structural and functional domains of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. European Biophysics Journal, 15, 339–342.

AFNOR. (1990). Recueil de normes françaises: Granulométrie, tamis, tamisage et autres méthodes d'analyses granulométriques.

Agence Nationale des Ressources Hydriques (2005).

Alves M.M., Pereira M.A., Novais J.M., Polanco F. F. & Mota M. (1999). A new device to select microcarriers for biomass immobilization: application to an anaerobic consortium. Water Environ. Res., 71(2), 209-217.

Andersson B., Aspergren H., Nyberg U., La cour jansen J., Odegaard H., (1998). Increasing the capacity of an extended nutrient removal plant by using different techniques. Water Sci. Technol., 37 (9), 175-183.

Annachhatre A. P., Bhamidimarri S. M. R. (1992). Microbial attachment and growth in fixed-film reactors: Process start up considerations. Biotechnol. Advances 10 (1), 69-91.

Apilanez I., Gutidérrez A., Diaz M. (1998). Effect of surface materials on initial biofilm development. Bioresource Technol., 66, 225-230.

Aslan S. (2005). Combined removal of pesticides and nitrates in drinking waters using biodenitrification and sand filter system. Process Biochem., 40, 417–424.

Aslan S., Cakici H. (2007). Biological denitrification of drinking water in a slow sand filter. J. Hazard. Mater., 148,253–258.

Aslan S., Turkman A. (2003). Biological denitrification of drinking water using various natural organic solid substrates. Water Sci. Technol., 48 (11–12), 489–495.

Aslan S., Turkman A. (2005). Combined biological removal of nitrate and pesticides using wheat straw as substrates. Process Biochem., 40, 935–943.

Atlas R.M., Bartha R. (1998). Microbial Ecology - Fundamentals and applications. 4^{eme} édition. Menlo Park, Ca: Benjamin/Cummings Publishing Company. 694 pages.

Baynast R., Brouard F., Thierry A. (1989). Hydrolysis of biornass for the production of fermentable substrates, **Application** to ethanol production. Biomass for Energy and **Industry**, 5th E.C. Conference, 2323-2327pp.

- Bazus A. (1991).** Raffinage des agroressources: extraction et caractérisations des glucuronoxylanes des coques de tournesol. Thèse Doctorat INP Toulouse.
- Belkhadir R. (1986).** Etude fondamentale des biomasses fixées : description et modélisation des films biologiques anaérobies. Thèse de doctorant, INSA Toulouse.
- Blowes D.W., Robertson W.D., Ptacek C.J., Merkley C. (1994).** Removal of agricultural nitrate from tile drainage effluent water using in-line bioreactors. *J. Contam. Hydrol.*, 15, 207–221.
- Bode H., Seyfried C.F. (1987).** High-Rate Denitrification of Concentrated Nitrate Wastewater. *Water Science and Technology*. 19, 163- 171.
- Bothe H., Jost G., Schloter M., Ward B.B., Witzel, K.P. (2000).** Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments. *FEMS Microbiology Reviews*, 24: 673-690.
- Boudjadja A., Messahel M., Pauc H. (2003).** Ressource hydriques en Algérie du nord. *Sci. Eau*, 16(3), 285-304.
- Buffière P., Steyer J.P., Fonade C., Moletta R. (1995).** Comprehensive modeling of methanogenic biofilms in fluidized bed systems. *Biotechnol. Bioeng.*, 48 (6) 725-736.
- Carrera J., Vicent T., Lafuente J., (2003).** Influence of temperature on denitrification of an industrial high-strength nitrogen wastewater in a two-sludge system. *Water SA*, 29 (1), 11-16.
- Ceçen. F., Gonenc. LE. (1994).** Nitrogen removal characteristics of nitrification and Denitrification. *Water Science and Technology*. 29, (10- 11), 409-4 16.
- Chaussé K., Phaneuf D., Levallois P. (2003).** Nitrates/Nitrites. In Fiche synthèse sur l'eau potable et la santé humaine, Institut national de la santé publique du Québec, 12p.
- Cheng K.C., Lin Y.F. (1993).** Relationship between denitrifying bacteria and methanogenic bacteria in a mixed culture system of acclimated sludges. *Water Research*, 27 (1212), 1749–1759.
- Chu L.B., Yang F.L. (2005).** Simultaneous removal of organic substances and nitrogen using a membrane bioreactor seeded with anaerobic granular sludge under oxygen-limited conditions. *Desalination*, 172, 271-280.
- Chudoba P., Pannier M., Truk A., Pujol R. (1998).** A new fixed-film bed bioreactor for denitrification of wastewaters . *Wat. Sci. Tech.*, 38, 233-240.
- Constantin H., FICK M. (1997).** Influence of C-sources on the denitrification rate of high-nitrate concentrated industrial wastewater. *Water Res.*, 31 (3), 583-589.

- Constantin H., Fick M. (1997).** Influence of C-sources on the denitrification rate of high-nitrate concentrated industrial wastewater. *Water Res.*, 31 (3), 583-589.
- Couillard D. (1994).** The use of peat in wastewater treatment. *Water Research* 28, 1261-1274.
- Din N., Gilkes N.R., Tekant B., Miller R.C. Jr., Warren R.A., Kilburn D.G. (1991).** Non-hydrolytic disruption of cellulose fibres by the binding domain of a bacterial cellulase. *Bio. Technolog.*, 9, 1096–1099.
- Dussert B. W., Tramposch W. G. (1996).** Impact of support media and properties on the biological treatment of drinking water. In *Advances in Slow Sand and Alternative Biological Filtration*, eds. Graham, N. J. D. and R. Collins; John Wiley: Chichester, New York.
- Einsle O., Kroneck P.M. (2004).** Structural basis of denitrification. *Biol. Chem.* 385, 875–883.
- Fan B., Qu J.H., Lei P.J., Li D.P. (2001).** Studies on nitrate removal by a combined heterotrophy electrode biofilm reactor. *Acta scientiae Circumstantiae*, 21 (3), 257-262.
- Foglar L., Briski F. (2003).** Wastewater denitrification process - the influence of methanol and kinetic analysis. *ProcessBiochemistry* 39 (1), 95-103.
- Forteach N. (1991).** Biofilters-Structure and Function. *Austasia Aquaculture*, 5, 33-34.
- Gan Q., Allen S.J., Taylor G. (2002).** Design and operation of an integrated membrane reactor for enzymatic cellulose hydrolysis. *Biochem. Eng. J.*, 12, 223–229.
- Garzôn-Zúfiiga M., Lessard P., Aubry G., Buelna G. (2005).** Nitrogen élimination mechanisms in an aerated peat biofilter treating pig manure. *Environmental Technology*, 26(4), 361-371.
- Gee C.S., Kim J.S. (2004).** Nitrite accumulation followed by denitrification using sequencing batch reactor. *Wat. Sci. Tech.* 49 (6), 47-55.
- Gilkes N.R., Henrissat B., Kilburn D.G., Miller R.C. Jr., Warren R.A.J. (1991).** Domains in microbial *b*-1,4-glycanases: sequence conservation, function, and enzyme families. *Microbiological Reviews*, 55,303–315.
- Gjaltema A., van der Marel N., van Loosdrecht M.C.M., Heijnen J.J. (1997).** Adhesion and biofilm development on suspended carriers in airlift reactors: hydrodynamic conditions versus surface characteristics. *Biotechnol. Bioeng.*, 55(6), 880-889.

- Glass C., Silverstein J. (1998).** Denitrification kinetics of high nitrates concentration water: pH effect on inhibition and nitrites accumulation. *Water Res.*, 32, (3), 831-839.
- Gomez, M.A., Gonzalez-Lopez, J., Hontoria-Garcia E. (2000).** Influence of carbon source on nitrate removal of contaminated groundwater in a denitrifying submerged filter. *J. Hazard. Mater.*, 80, 69–80.
- Grady C.P.L., Daigger G.T., Lim H.C. (1999).** *Biological wastewater treatment*, 2nd édition. Marcel Dekker, New York. 1076 p.
- Gulis G., Czompolyova M., Cerhanw J. R. (2001).** An Ecologic Study of Nitrate in Municipal Drinking Water and Cancer: Incidence in Trnava District, Slovakia. *Environ. Res. Section A*, 88, 182-187.
- Hagedorn-Olsen C., Moller I.H. (1994).** Oxygen Reduces Denitrification in Bio film Reactors. *Water Science and Technology*, 29, (10-11), 83-91.
- Heijnen J.J., Mulder A., Enger W., Hoeks F. (1989).** Review on the application of anaerobic fluidized bed reactors in wastewater treatment. *Chem. Eng. Journal*, 41, 37-50.
- Heiner A.P., Teleman O. (1997).** On the structure of crystalline cellulose I. In: Claeyssens M, Nerinckx W, Piens K (eds) *Tricel 97, Carbohydrases from Trichoderma reesei and other microorganisms*. Ghent, Belgium, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, p 204
- Henry Y. (1999).** Démonstration de faisabilité de la nitrification et de la dénitrification d'un lixiviat de lieu d'enfouissement sanitaire avec de la tourbe granulaire. Mémoire de Maîtrise, Ecole Polytechnique de Montréal. 258p.
- Hochstein L.L., Tomlinson G.A. (1998).** The enzymes associated with denitrification. *Annual Review of Microbiology*, 42, 231-261.
- Hodkinson B., Williams J.B., Butler J.E. (1999).** Development of biological aerated filters. *Journal of the Chartered Institution of Water and Environmental Management*, 13(4), 250-254.
- Hwang R. H., Kennedy J.F., Melo E.H.M. (1989).** A probable, lignin structure by conformational analysis. *Carbohydrate Polymers*, 10, 15-30.
- ISO-567. (1995).** Détermination de la masse volumique en vrac dans un récipient de petites dimensions.
- Jin Z.F., Chen Y.X., Norio O. (2004).** Denitrification of Groundwater Using Cotton as Energy Source. *Journal of Agro-Environmental Science* 23 (3), 512–515.

- Jin Z.F., Chen Y.X., Norio O. (2004a).** Denitrification of Groundwater Using Cotton as energy source. *Journal of Agro-Environmental Science*, 23 (3), 512–515.
- Jin Z.F., Chen Y.X., Norio O. (2004b).** Using paper as carbon source for groundwater nitrate removal. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 15 (12), 2359–2363.
- Joseleau J.P. (1980).** "Les hémicelluloses", *Les Polymères Végétaux, Polymères Pariétaux et Alimentaires Non Azotés*. Ed. Monties B., Bordas, **Paris**, 87 – 121.
- Kappelmeyer U., Kusch P., Stottmeister U. (2003).** Model experiments on the influence of artificial humic compounds on chemodenitrification. *Water, Air, and Soil Pollution*, 147, 317-330.
- Kim H.E., Seagren A., Davis A.P. (2003).** Engineered bioretention for removal of nitrate from stormwater runoff. *Water Environ. Res.*, 75, 355–367.
- Knowles R. (1982).** Denitrification. *Microbiol. Rev.* 46 (1), 43-70.
- Kowalchuk G.A., Stephen J.R. (2001).** Ammonia-oxidizing bacteria: A model for molecular microbial ecology. *Annual Review of Microbiology*, 55, 485-529.
- L'hirondel J., L'hirondel J. L. (2002).** Nitrate and Man: Toxic, Harmless or Beneficial? CABI Publishing, New York, 168 pp.
- Ladisch M.R., Lin K.W., Voloch M., Tsao G.T. (1983).** Process considerations in the enzymatic hydrolysis of biomass. *Enzyme and Microbial Technology*, 5, 82–102.
- Ladisch M.R., Lin K.W., Voloch M., Tsao G.T. (1983).** Process considerations in the enzymatic hydrolysis of biomass. *Enzyme and Microbial Technology*, 5, 82–102.
- Lafrance C., Lessard P., Buelna G. (1996).** Évaluation de la filtration sur tourbe et compost pour le traitement de l'effluent d'une usine de compostage de résidus verts *Canadien Journal of Civil Engineering*, 23, 1041 – 1050.
- Lazarova V., Manem J. (1995).** Biofilm characterization and activity analysis in water and wastewater treatment. *Water Res.*, 29 (10), 2227-2245.
- Leclerc J.P., Detrez C., Bernard A., Schweich (1995).** DTS un logiciel d'aide à l'élaboration de modèles d'écoulement dans les réacteurs. *Revue de l'institut français du pétrole*, 50(5), 641-656.
- Lee Y.H., Fan L.T. (1982).** Kinetic studies of enzymatic hydrolysis of insoluble cellulose I. *Biotechnology and Bioengineering*, 24, 2383–2406.
- Levallois P., Phaneuf D., (1994).** La contamination de l'eau potable par les nitrates: analyse des risques à la santé. *Revue canadienne de la santé publique*, 85 (3), 192-196.

- Li H, Parent LE, Karam A, Tremblay C. (2003).** Efficiency of soil and fertilizer nitrogen in a humid, cool, and acid sod– potato system. *Plant Soil*, 251,23– 36.
- Linder M., Mattinen M-L., Konttelli M., Lindeberg G., Sthlberg J., Drakenberg T., Reinikainen T., Pettersson G., Annila A. (1995).** Identification of functionally important amino acids in the cellulose-binding domain of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I. *Protein Science*, 4,1056–1064.
- Liu X. (2006).** Removal of nitrogen and organics from mild-polluted surface water using biofilm-electrode process. Thèse de Doctorat, Harbin Institute of Technology, China.
- Lowengart A., Diab S., Kochba M., Avnimelech Y. (1993).** Development of a biofilter for turbid and nitrogen-rich irrigation water. A: Organic carbon degradation and nitrogen removal processes. *Bioresour. Technol.*, 44, 131–135.
- Madison R. J., Brunett J. D. (1985).** Overview of the occurrence of nitrates in groundwater of the united states. US geological Survey. Water supply paper, 2275, 93-105.
- Mansell B.O., Schroeder E.D. (1999).** Biological denitrification in a continuous flow membrane reactor. *Water Research*, 33 (8), 1845–1850.
- Marchessault R.H., Sundararajan P.R., (1983).**"Cellulose",The Polysaccharides, Molecular Biology Series, Ed. (3.0. Aspinall, Academic Press, XNC. London, 2,11-95.
- Martin G. (1979).** Le problème de l'azote dans les eaux. Ed. Tech & Doc, Lavoisier Paris, France.
- Mateju V., Cizinska S., Krejci J.Janoch T. (1992).** Biological water denitrification. *Enzy. Microb. Technol.*, 14, 170-183.
- McMillan J.D. (1994).** Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: Himmel ME, Baker LO, Overend RP (eds) Conversion of hemicellulose hydrolyzates to ethanol, American Chemical Society Symposium, Washington, pp 292–324.
- Melo L.F, Oleveira R. (2005).** Biofilm reactors..In *Multiphase Bioreactor Design*, eds. Cabral J. M.S., Mota M., Tramper J.; Taylor & Francis Inc, New York. pp 288-327.
- Menoret C. (2001).** Traitement d'effluents concentrés par culture fixe sur gravier ou pozolane. Thèse de Doctorat, Université de Montpellier II, France.
- Messinga T. T., Speijers G. J. A., Meulenbelt J. (2003).** Health implications of exposure to environmental nitrogenous compounds. *Toxicol. Rev.*, 22, 41-51.

- Metcalf et Eddy. (2003).** Wastewater engineering, treatment and reuse, 4th édition. McGraw Hill, New York. 1819 p.
- Moir J.W., Wood N.J. (2001).** Nitrate and nitrite transport in bacteria. *Cell Mol. Life Sci.* 58, 215–224.
- Mussatto S.I., Dragone G., Fernandes M., Milagres A.F.M., Roberto I.C. (2008).** The effect of agitation speed, enzyme loading and substrate concentration on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. *Cellulose*, 15, 711–721.
- Mussatto S.I., Dragone G., Rocha G.J.M., Roberto I.C. (2006b).** Optimum operating conditions for brewer's spent grain soda pulping. *Carbohydr. Polym.*, 64,22–28.
- Nakhla G., Farooq S. (2005).** Simultaneous nitrification–denitrification in slow sand filter. *J. Hazard. Mater.*, B 96, 291–303.
- Nichols. D.S. (1983).** Capacity of Natural Wetlands to Remove Nutrients from Wastewater. *Journal WPCF*, 55, 495-505.
- Nicolella C., Di Felice R., Rovatti M. (1996).** An experimental model of biofilm detachment in liquid fluidized bed biological reactors. *Biotechnol. Bioeng.*, 51, 713–719.
- Nicolella C., van Loosdrecht M.C.M., Heijnen J.J. (2000).** Wastewater treatment with particulate biofilm reactors. *Journal of biotechnology*, 80, 1-33.
- Oh J., Yoon S.M., Park J.M. (2000).** Denitrification in submerged biofilters of concentrated-nitrates wastewater. *Water Sciences and Technology*, 43 (1), 217-223.
- Organisation Mondiale de la Santé. (2000).** Nitrates et nitrites. In Directives de la qualité pour l'eau de boisson; Volume 2- Critères d'hygiènes et documentation à l'appui de l'organisation mondiale de la santé, Genève, pp. 324-336.
- Orhon D., Genceli E.A., Sözen S. (2000).** Experimental evaluation of the nitrification kinetics for tannery wastewaters. *Water SA*, 26 (1), 43-50.
- Rezaee A., Godini H., Dehestani S., Yazdanbakhsh A. R., Mosavi G., Kazemnejad A. (2008).** Biological denitrification by *Pseudomonas Stutzeri* immobilized in microbial cellulose. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24, 2397–2402.
- Richardson DJ., Watmough, N.J. (1999).** Inorganic nitrogen metabolism in bacteria. *Current Opinion in Chemical Biology*, 3, 207-219.
- Robertson W.D., Ford G.I., Lombardo P.S. (2005).** Wood-based filter for nitrate removal in septic systems. *Trans. ASAE*, 48 (1), 121–128.

- Rouse J. D., Bishop C. A., Struger J. (1999).** Nitrogen pollution: An assessment of its threat to amphibian survival. *Environ. Health Perspect.*, 107, 799-803.
- Saka S. (2001).** Chemical Composition and Distribution. *In* Wood and Cellulosic Chemistry. Eds. D.N.S. Hon, N. Shiraishi, Marcel-Dekker, Inc. New York. Pp 71-72.
- Saliling W. J. B., Westerman P. W., Losordo T. M. (2007).** Wood chips and wheat straw as alternative media biofilter for denitrification reactors treating aquaculture and other wastewaters with high nitrate concentration. *Aquacultural Engineering*, 37, 222-233.
- Santé Canada. (1992).** Le nitrate et le nitrite. Consulté sur le site : http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/alt_formats/hecs-sesc/pdf/pubs/water-eau/doc-sup/appui/nitrate_nitrite/nitrate_nitrite_f.pdf.
- Silvan N., Regina K., Kitunen V., Vasander H., Laine J. (2002).** Gaseous nitrogen loss from a restored peatland buffer zone. *Soil Biol. Biochem.*, 34, 721– 8.
- Smolders G.J.F., van der Meij. J., van Loosdrecht M.C.M. et Heijnen J.J. (1994b).** Model of the anaerobic metabolism of the biological phosphorus removal process : stoichiometry and pH influence. *Biotechnol. Bioene.*, 43,46 1470.
- Soarcs, M.I.M., Abeliovich, A. (1998).** Wheat straw as substrate for water denitrification. *Water Research*, 32 (12), 3790–3794.
- Son H. J., Park Y. H., Lee J. H. (2004).** Development of supporting materials for microbial immobilization and iron oxidation. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 112: 1-12.
- Songliu L., Hongying H., Yingxue S., Jia Y. (2009).** Effect of carbon source on the denitrification in constructed wetlands. *Journal of Environmental Sciences*, 21, 1036-1043.
- Sriwiriyarat T., Randall C.W. (2005).** Performance of IFAS wastewater treatment processes for biological phosphorus removal. *Water Res.*, 39 (16), 3873-3884.
- Stryer L. (1988).** *Biochemistry*, 3rd edn. Freeman, New York.
- Testud F. (2004).** Engrais minéraux. *Toxicol. Pathol.*, 1, 21-28.
- Tizghadam G. M. (2007).** Etude des performances et optimisation d'un réacteur Cascade à biomasse hybride pour le traitement des eaux usées urbaines. Thèse de doctorat en Chimie et Microbiologie de l'eau. Université de Limoge, France.
- Tohrai N., Torashima Y. (1978).** Effects of ammonia treatment on cellulase digestion and sugar production of the low quality roughage. *Jap. J. Zootechnol. Sci.*, 50, 189-194.

- Trulear M.G., Characklis W.G. (1982).** Dynamics of biofilm Processes. Journal of Water Pollution Control Federation, 54(9), 1288-1301.
- Van Loosdrecht M.C.M., Heijnen J.J. (1996).** Biofilm processes in immobilised living cell systems, R.G. Willaert, G.V. Baron and L. De Backer Eds, Wiley, 255-271.
- Van Spanning Rob J.M., Richardson D. J., Ferguson S. J. (2007).** Introduction to the biochemistry and molecular Biology of Denitrification. In Biology of the Nitrogen cycle, eds. Bothe H., Ferguson S.J., Newton W.E; Elsevier. UK. pp 3-20.
- Van Tilbeurgh H., Tomme P., Claeysens M., Bikhabei R., Pettersson G. (1986).** Limited proteolysis of the cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*: separation of the functional domains. FEBS Letters, 204, 223–227.
- Vidaud C., Roussos S., Raimbault M., Deschamps F. (1982).** Effet de divers prétraitements sur l'accessibilité de la cellulose de la paille de blé aux cellulases de *Trichoderma harzianum*. séri. Biol., 4, 17-23.
- Volokita M., Belkin S., Abeliovich A., Soares M. (1996).** Biological denitrification of drinking water using newspaper. Water Res., 30 (4), 965–971.
- Walton G. (1951).** Survey of literature relating to infant methemoglobinemia due to nitrates –contaminated water. American Journal of Public Health, 41, 986-996.
- Wang Q., Feng C., Zhao Y., Hao C., (2009).** Denitrification of nitrate contaminated groundwater with a fiber-based biofilm reactor. Bioresource Technology, 100, 2223-2227.
- Watmough N.J., Butland G., Cheesman M.R., Moir J.W.B., Richardson D.J., Spiro S. (1999).** Nitric oxide in bacteria: synthesis and consumption. Biochimica et biophysica acta, 1411, 456-474.
- WHO (1995).** Concern for Europe's Tomorrow, Health and the environment in the WHO European region. World Health Organization (WHO), Rapport WHO European Centre for Environment and Health, Stuttgart, 537 pp.
- Wilson D.B., Irwin D.C. (1999).** Genetics and Properties of Cellulases. In Advances in Biochemical Engineering Biotechnology, Vol. 65 Managing Editor: Th. Scheper Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 1-21.
- Wisjnuprpto. (1981).** Mise au point d'un procédé biologique compact de dépollution (Etude de l'élimination du carbone de l'azote et du phosphore). Thèse de doctorat en Chimie Industrielle. INSA de Toulouse.

Wojnowska-Baryła I., Zielińska M. (2002). Carbon and Nitrogen Removal by Biomass Immobilized in Ceramic Carriers. *Polish Journal of Environmental Studies* 11, (5), 577-584.

Zhou, M.H., Fu, W.J., Gu, H.Y., Lei, L.C. (2007). Nitrate removal from groundwater by a novel three-dimensional electrode biofilm reactor. *Electrochimica Acta*, 52, 6052–6059.

Zumft W.G. (1997). Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and Molecular Biology*, 61(4), 533-616.

ANNEXES

Annexes

DETERMINATION DE LA COMPOSITION DES DIFFERENTES MATIERES VEGETALES

1. Détermination des matières sèches

La matière sèche est déterminée sur l'échantillon broyé, La matière lignocellulosique est introduite dans un creuset préalablement séché, puis pesé (P_0) et place dans l'étuve à 105°C jusqu'à poids constant. Après refroidissement dans un dessicateur, le creuset contenant la matière sèche est pesé (P_1). Le taux de matière sèche est alors :

$$\frac{P_1}{P_0} \cdot 100$$

2. Détermination des quantités de lignine, hémicelluloses et cellulose

Les méthodes, de type gravimétrique, permettent d'apprécier le potentiel en polyholosides. Elles se basent sur la différence de solubilité des constituants des parois cellulaires.

- **Le taux de lignine** est déterminé suivant la norme ASTM D 1106 - 84 (reapproved 1990).

Les matières extractibles de l'échantillon (huiles, résines, tannins ...) sont tout d'abord enlevées par différents solvants :

- l'éthanol (95%) pour l'extraction des tannins
- le mélange éthanol-toluène (1: 2 en volume) pour l'extraction des résines, cires, huiles, corps gras
- et l'eau chaude pour extraire les fractions solubles dans l'eau comme les sucres libres.

Ensuite, 15ml d'une solution d'acide sulfurique à 72% sont ajoutés à 1 g de matière végétale sèche ayant préalablement subit les extractions précédentes. L'échantillon est agité pendant au moins 1 minute puis est laissé 2 heures au repos interrompu par des agitations fréquentes. Le mélange est ensuite dilué à 3% avant d'être porté à reflux pendant 4 heures. L'échantillon est alors filtré puis lavé à l'eau chaude. Après séchage à l'étuve à 105°C pendant 12 heures, une première pesée est effectuée. La seconde pesée détermine la masse de matière minérale obtenue après incinération de

l'échantillon dans un four à 550°C pendant 5 heures. La masse de lignine représente la différence entre les deux pesées.

La méthode de VAN SOEST et WINE connue sous le nom de **méthode A.D.F.-N.D.F.** (Acid Detergent Fiber – Neutral Detergent Fiber), consiste à soumettre la matière végétale à l'action successive de deux détergents anionique et cationique.

Le détergent N.D.F. élimine en particulier les protéines et les complexes tanins protéines et solubilise les substances pectiques, Cette méthode permet d'évaluer l'ensemble des **hémicelluloses, cellulose et lignine**. Le réactif N.D.F. est préparé à l'aide de 150 g de lauryl sulfate de sodium, 93,05 g d'éthylène diamine tétraacétate de sodium (EDTA), 22,80 g de phosphate disodique, 34,05 g de tétraborate de disodium, 10 H₂O, 50 ml d'éthyl cellulose. Le mélange est complété 5 litres avec de l'eau distillée. 1 g de matière végétale finement broyée (dont on déterminera parallèlement la teneur en matière sèche), est introduit dans un erlenmeyer de 500 ml muni d'un réfrigérant ascendant. 100 ml de réactif N.D.F. y sont ajoutés. Après 1 heure d'ébullition, le résidu est filtré sur un creuset de Gooch de porosité 1, abondamment rincé à l'eau bouillante et séché dans l'étuve à 105°C pendant 12 heures, Après refroidissement dans un dessicateur, le creuset est pesé. La masse de matière minérale du résidu est déterminée comme précédemment. La différence entre les deux pesées représente le poids total de cellulose + hémicelluloses + lignine.

Le dosage A.D.F. est effectué par l'action d'un détergent acide. Le résidu obtenu dans ce cas est constitué de **lignine et de cellulose**, Le réactif A.D.F. comprend **100 g de** bromure de cétyl triméthyl ammonium dans 5 l d'une solution d'acide sulfurique à 3,5%. Le protocole opératoire est identique au précédent, le réactif N.D.F. étant remplacé par le réactif A.D.F. La différence entre les deux pesées représente ici le poids de lignocellulose.

Ainsi, la quantité de chacun des constituants des parois cellulaires est calculée par différences entre les trois résultats :

Quantité de cellulose = quantité lignine + cellulose (ADF) - quantité lignine

Quantité d'hémicelluloses = quantité lignine + cellulose + hémicelluloses (NDF) – quantité lignine + cellulose (ADF).

Les études de reproductibilité des résultats et de pureté des différentes fractions ont montré que cette méthode permet d'obtenir une évaluation fiable de la répartition des principaux constituants des parois cellulaires. L'écart type sur les résultats exprimés par rapport h la matière sèche est de ± 1 %.

DETERMINATION DES CARACTERISTIQUES PHYSIQUES

1. **la taille effective** (norme AFNOR X 11-507, 1990): c'est la taille des vides de mailles du tamis qui laisse passer 10% de matériau. Elle est déterminée à partir de la courbe de distribution granulométriques.

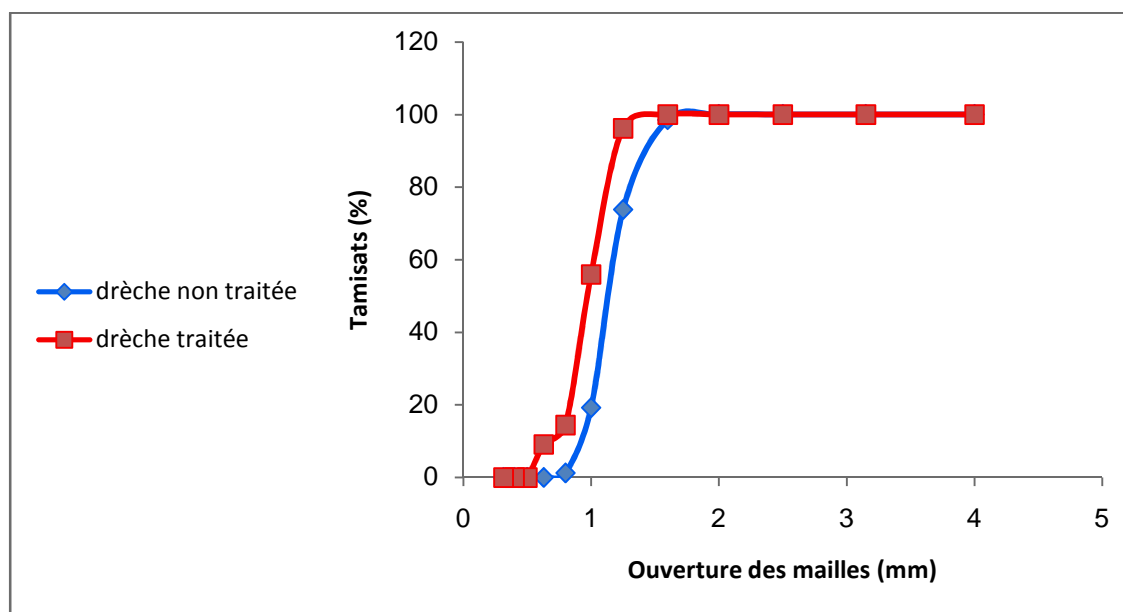
Principe:

Une colonne de tamisage est composée d'une série de tamis de contrôle empilés les uns sur les autres, par ordre croissant d'ouverture de maille (de bas en haut). Chaque tamis est formé d'un boîtier cylindrique dans le fond duquel est tendue une toile, généralement métallique, dont les ouvertures sont normalisées (normes NF ISO 565, Novembre 1990).

Un échantillon représentatif du matériau à analyser est déposé sur le tamis supérieur, et l'ensemble des tamis est soumis à des secousses conduisant à la répartition des particules le long de la colonne de tamisage. Ces secousses peuvent être provoquées manuellement ou grâce à une machine à tamiser. Chaque tamis divise les particules qui lui sont appliquées en deux fractions : un *refus*, correspondant aux particules retenues sur le tamis, et un *tamisat* (ou "passant"), correspondant aux particules appliquées au tamis inférieur. A l'issue de l'agitation, les refus de chaque tamis sont recueillis et pesés avec soin. L'exploitation des résultats est faite sous la forme de graphiques, en général des histogrammes cumulatifs. Ces histogrammes sont tracés en portant:

- En abscisse : les ouvertures nominales (mailles) des tamis employés pour l'analyse.
- En ordonnée : les refus et/ ou les tamisats cumulés, exprimés en pourcentages.

Prise d'essai (g)= 100			
N° Tamis AFNOR	Mailles (mm)	Tamisats % (drèche non traitée)	Tamisats % (drèche traitée)
37	4,00	100,00	100,00
36	3,15	100,00	100,00
35	2,5	100,00	100,00
34	2,00	100,00	100,00
33	1,60	98,54	100,00
32	1,25	73,81	96,21
31	1,00	19,22	55,98
30	0,80	1,22	14,46
29	0,63	0,00	9,11
28	0,50	0,00	0,00
27	0,40	0,00	0,00
26	0,315	0,00	0,00
Taille effective		TE=0,80	TE=0,68



Courbe granulométrique des deux support utilisés (la drèche avant et après traitement à l'hydroxyde de sodium).

- 2. La masse volumique vraie (ISO-567:1995):** c'est la masse du volume d'un corps ou seul le volume du solide est inclus dans les calculs. Nous avons déterminé la masse volumique vraie en introduisant 3g de la drèche dans un bécher et en versant dessus de l'eau distillée. L'air est chassé en les faisant bouillir et en agitant constamment pendant 5 minutes. Après refroidissement faire couler l'eau, la pesée du matériau mouillé est P. nous introduisant ensuite dans une éprouvette de 5 ml contenant 2 ml d'eau, soit V le volume lu sur l'éprouvette. La masse volumique vraie est donnée par:

$$\rho = \frac{3}{(V-P+1)} (g/cm^3) .$$

DOSAGE DES NITRATES ET DES NITRITES

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

I. DOSAGE DES NITRATES : Méthode au réactif SULFOPHINIQUE

(Norme AFNOR NFT 90 102)

Réactifs :

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

Préparation du réactif sulfophénique :

Dissoudre 12 g de phénol dans 144 ml d'acide sulfurique dans un bain-marie.

Appareillage :

- Photomètre UV-visible.
- Cellule de dosage.

Mode opératoire :

- Prendre 5 ml de l'échantillon à analyser, le faire évaporer à sec.
- Laisser refroidir et ajouter 2 ml de réactif sulfophénique.

- Attendre 10 minutes, puis ajouter 15 ml d'eau déminéralisée et 10 à 15 ml d'ammoniac qui développe la couleur jaune.
- Compléter à 50 ml avec de l'eau déminéralisée.
- Effectuer la lecture sur le photomètre à $\lambda = 440$ nm.
- La teneur en nitrates est déduite du graphe d'étalonnage.

II. DOSAGE DES NITRITES : Méthode au réactif de DIAZOTATION

(Norme AFNOR NFT 90 013)

Réactifs:

- ❖ Acide orthophosphorique concentré H_3PO_4
- ❖ Sulfanilamide $C_6H_8O_2N_2S$.
- ❖ Dichlorure de N-(1-naphtyl) éthylène diamine $C_{10}H_7NHCH_2CH_2NH_2, 2HCl$
- ❖ Nitrite de potassium $NaNO_2$ en poudre

Préparation du réactif de diazotation :

- ❖ Introduire dans une fiole de 250ml, contenant 150ml d'eau distillée, 25 ml d'acide orthophosphorique concentré,
- ❖ Ajouter 10g de Sulfanilamide,
- ❖ Ajouter, après dissolution, 0,5g de dichlorure de N-(1-naphtyl) éthylène diamine.
- ❖ Une fois le mélange totalement dissous, compléter à 250ml avec de l'eau distillée.
- ❖ Mettre le réactif dans un flacon brun et le conserver à 4°C à l'abri de la lumière.

Appareillage :

- ❖ Spectrophotomètre UV Visible.
- ❖ Cellule de dosage.

Mode opératoire :

- ❖ Introduire, dans une fiole jaugée de 50ml, 50ml d'échantillon à analyser.
- ❖ Ajouter 1 ml de réactif de diazotation.
- ❖ Agiter et attendre 10 minutes pour le développement de la couleur.
- ❖ Effectuer un essai à blanc en remplaçant l'échantillon à analyser par de l'eau distillée.
- ❖ Effectuer la lecture sur le spectrophotomètre à la longueur d'onde $\lambda = 537$ nm.
- ❖ La teneur en nitrites est déduite du graphe d'étalonnage.