

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE
DEPARTEMENT DU GENIE DE L'ENVIRONNEMENT



Laboratoire des Biotechnologies Environnementales et Génie des Procédés

Mémoire de projet de fin d'études

Pour l'obtention du diplôme d'Ingénieur d'Etat en génie de

L'Environnement

THEME

Biostimulation d'une boue dénitrifiante par les ultrasons

Présenté par : M. Ali Guechi Mehdi

Devant le jury :

Président:	Mr. N.MAMERI	Professeur ENP
Examineur :	Mr. H.LOUNICI	Professeur UMOB
Promoteur:	Mme. N.ABDI	Professeur ENP
Co-promoteur:	Mr. N.BENYOUCEF	M.A.A UMBIBBA

PROMOTION 2013

Dédicaces

Je dédie ce travail :

A mes très chers parents ;

*A mes très chères frères : **Yacine et Slimane;***

*A une personne très chère à mon cœur qui était tout le temps présente pour
moi : **Sara***

A toute ma famille grands et petits

A mes meilleures amies :

***Saber, Aness, Hakim, Mohammed, Oussama, Meriem, Ilyes, Tarek, Linda, Melissa,
Imene***

A tous mes amis;

Et toute personne chère à mon cœur.

Remerciements

Ces quelques semaines au sein du laboratoire BioGep 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 : Mme ABDI. N, professeur à l'ENP, pour sa disponibilité et sa bienveillance à me faciliter la tâche à l'élaboration de ce travail, ainsi que pour l'aide apportée à la rédaction de ce modeste mémoire.

Que dire de M. Benyoucef, mon co-promoteur Maître-assistant à Bordj Bou-Argeridj que je ne remercierais jamais assez, qui n'a ménagé ni son temps ni ses efforts et n'a cessé de me prodiguer ses précieux conseils, son soutien et sa disponibilité afin d'aboutir à ce travail.

Je tiens également à dire un grand merci à M. LOUNICI H. professeur à l'université de Bouira et à M. MAMERI N. professeur à l'ENP pour avoir accepté d'être membres au sein de mon jury. Je les remercie également pour leur dévouement et leur bonne volonté dans la résolution des problèmes de logistique.

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.

Liste des figures

Figure I.1: cycle de l'azote.....	3
Figure I.2: Réaction de dénitrification catalysée par des nitrate (NAR), nitrite (NIR), oxyde nitrique (NOR), et oxyde nitreux (N2OR) réductases, oxydation de l'oxyde nitrique en NO2, (OX) par une oxyde nitrique oxydase.....	12
Figure I.3: Métabolisme de la dénitrification.....	14
Figure I.4 : Schéma de la dénitrification complète chez <i>Paracoccus denitrificans</i>	16
Figure I.5 : génération, croissance et éclatement de bulles résultante du phénomène de cavitation	18
Figure I.6 : Gamme des fréquences du son en Hertz	21
Figure I.7. L'effet des ultrasons sur le transfert de phases lors d'une réaction : le pouvoir homogénéisateur	22
Figure I.8 : système à sonde immergée.....	26
Figure II.1 : Le Montage expérimental.....	37
Figure II.2 : Evolution des concentrations en nitrates en fonction du temps à différentes intensités d'ultrasons.....	39
Figure II.3. Evolution des concentrations en nitrites en fonction du temps à différentes intensités d'ultrasons.....	41
Figure II.4. Evolution du taux d'abattement des nitrates en fonction du temps à différents temps de traitements aux ultrasons.....	42
Figure II.5. Evolution des nitrites en fonction du temps à différents temps de traitements aux ultrasons.....	42
Figure II.6. Evolution des taux d'abattement des nitrates en fonction du temps à différentes concentrations initiales en nitrates.....	45
Figure II.7. La concentration des nitrites en fonction du temps à 100 mg/L.....	45

Figure II.8. La concentration des nitrites en fonction du temps à 150mg/L.....46

Figure II.9. La concentration des nitrites en fonction du temps à 200 mg/L.....46

Figure II.10. Evolution des concentrations en nitrates en fonction du temps à différentes valeurs de pH dans le milieu dénitrifiant. Concentration initiale en $\text{NO}_3^- \text{ N}$ de 100mg/l.47

Figure II.11. Evolution des concentrations en nitrites en fonction du temps à différentes valeurs de pH dans le milieu dénitrifiant. Concentration initiale en $\text{NO}_3^- \text{ N}$ de 100mg/l.48

Figure II.12. Courbe d'étalonnage nitrates en mg/L

Figure II.13 : courbe d'étalonnage nitrites en mg/L

Liste des tableaux

Tableau I.1: Résumé des normes et recommandations (Institut national de santé publique du Québec, Québec, 2003).....7

Tableau II.1: Composition de l'alimentation en discontinu.....36

Liste des abréviations

NOR: Oxyde nitrique réductases.

SBR: Réacteur Séquentiel en Batch.

DCO : demande chimique en oxygène

DBO : demande biochimique en oxygène

TS: Total Solids

MVS: Matière volatile sèche

Sonar: Sound navigation ranging

OMS: Organisation Mondiale de la Santé.

N₂OR: Oxyde nitreux réductases.

NAR: Nitrates réductases.

NIR: Nitrites réductases.

SP: sonicated sludge proportion

PCD: prommagable cell death

SVI: sludge volume index

Sommaire

Introduction.....	1
I. Synthèse bibliographique.....	3
Chapitre 1 : La dénitrification.....	3
I.1 Le cycle de l'azote.....	3
I.1.1 La fixation.....	3
I.1.2 L'assimilation.....	3
I.1.3 L'ammonification.....	3
I.1.4 La nitrification.....	4
I.1.5 La dénitrification.....	4
I.2 Origine des nitrates dans les eaux.....	5
I.2.1 Origine humaine.....	5
I.2.1.1 Origine agricole.....	5
I.2.1.2 Origine domestique.....	6
I.2.1.3 Origine industrielle.....	6
I.3 Conséquences sur la santé humaine et l'environnement.....	6
I.3.1 Effet sur la santé humaine.....	6
I.3.1.1 La méthémoglobinémie.....	7
I.3.1.2 Risque cancérigène.....	7
I.3.2 Sur l'environnement.....	8
I.3.2.1 Eutrophisation.....	8
I.4 Normes et recommandations.....	8
I.5 Méthodes de traitements des nitrates.....	9

I.5.1 Les Méthodes physico-chimiques et membranaires.....	9
I.5.1.1 L'osmose inverse.....	9
I.5.1.2 La Nanofiltration.....	10
I.5.1.3 L'électrodialyse.....	10
I.5.2. Les méthodes de dénitrification biologiques.....	11
I.5.2.1 Dénitrification hétérotrophe.....	11
I.5.2.2 Principe.....	11
I.5.2.3 Bactéries dénitrifiantes.....	12
I.5.2.4 Les paramètres essentiels jouant sur la vitesse de dénitrification.....	14
I.5.2.4.1 L'oxygène dissous.....	14
I.5.2.4.2 Le pH.....	14
I.5.2.4.3 La température.....	15
I.5.2.4.4 La concentration en nitrates.....	15
I.5.2.4.5 Nature de la source carbonée (rapport DBO : DCO).....	15
I.5.2.5 Stœchiométrie de dénitrification.....	15
I.5.2.6 Biologie moléculaire de la dénitrification.....	16
Chapitre II : Les ultrasons	
II.1 Généralités sur les ultrasons.....	17
II.2 La cavitation.....	17
II.2.1 Types de cavitation.....	19
II.2.2 Les facteurs affectant la cavitation.....	20
II.2.3 Relation entre la cavitation et la chimie.....	20
II.3 La sonochimie.....	21

II.4 Les réactions sonochimiques.....	22
II.5 Types d'ultrasons.....	23
II.5.1 L'industrie.....	24
II.5.2 La Biologie et biochimie.....	24
II.5.3 La Médecine.....	24
II.6 L'Application des ultrasons à la biologie.....	24
II.7 Les différents systèmes d'ultrasons.....	25
II.7.1 Système de bain.....	25
II.7.2 Système à sonde immergé.....	25
II.7.2.1 Les composantes d'un système d'ultrason à sonde immergé.....	27
II.8 L'efficacité de désintégration des ultrasons.....	27
II.9 Les facteurs affectant l'efficacité de la biostimulation.....	29
Chapitre III. Travaux récents sur la biostimulation ultrasonique.....	30
III.1 Introduction.....	30
IV. Matériels et méthodes.....	35
IV.1 Introduction.....	35
IV.2 Sélection des bactéries dénitrifiantes.....	35
IV.2.1 Composition de l'alimentation en discontinu.....	36
IV.2.2 Essai de dénitrification.....	36
IV.3 Méthodes d'analyses physico-chimiques.....	36
IV.4 Description du montage.....	36
IV.5 L'eau d'alimentation.....	38
IV.6 Résultats et discussions.....	39

IV.6.1 L'évaluation de l'effet des ultrasons sur l'activité dénitrifiante.....	39
IV.6.2 Optimisation du rapport temps de traitement/temps de repos.....	42
IV.6.3 Effet de la concentration en nitrates de l'effluent.....	43
IV.6.4 Effet de la variation du pH sur le processus de dénitrification.....	47
V.Conclusion.....	49

Introduction :

Les nitrates sont parmi les contaminants les plus communs des eaux souterraines. Une grande concentration en nitrates dans les eaux potables pose un risque considérable sur la santé (**Ward et al., 2005**). De plus, un niveau élevé de nitrates dans les eaux de surfaces constitue une sérieuse menace pour les écosystèmes aquatiques et ce à travers la croissance d'algues qui contribue à l'eutrophisation.

La dénitrification est le processus le plus considéré pour l'élimination des nitrates dans un environnement naturel. La dénitrification se produit naturellement quand certaines bactéries utilisent les nitrates comme accepteur d'électrons dans leur processus respiratoires en absence d'oxygène (**Zumft, 1997**). Le plus souvent les bactéries dénitrifiantes sont hétérotrophes et utilisent le carbone organique comme donneur d'électrons. Cependant la dénitrification dans les milieux naturels se produit très lentement et elle n'est pas très efficace pour diminuer les concentrations de nitrates dans les aquifères. C'est pourquoi plusieurs technologies ont été développées pour augmenter l'efficacité des bioprocédés traitant les eaux chargées en nitrates tel que la biostimulation électromagnétique (**Fojt et al, 2007**), le champs électrique (**Beschkov et al, 2004**) la stimulation par les rayonnement gamma et les ultrasons (**Della Rocca et al., 2007**).

Les systèmes biologiques (cellules) peuvent communiquer et interagir avec l'environnement avoisinant par le biais de plusieurs mécanismes à différents niveaux dépendant de la complexité du système biologique et de la nature de l'information communiquée. Les mécanismes de communication cellules-cellules les plus connus dans la littérature impliquent des signaux chimiques ou électriques.

Les processus sonochimiques sont connus comme étant des réactions induisant une élévation de la pression et de la température due à l'éclatement des bulles générer par les ondes ultrasons. Depuis que Suslick a eu l'idée innovante de conduire une réaction chimique sous l'irradiation ultrasonique (**Suslick, 1990**), beaucoup d'études ont été mené dans différents champs; en particulier, dans celui de l'environnement, beaucoup de techniques traitant de la dégradation des polluants environnementaux par les processus sonochimiques ont été étudié (**Gonzalez-Garcia et al, 2010 ; Kobayashi et al, 2011 ; Adewuyi, 2001**)

La présente étude a pour objectif l'étude de la possibilité de stimuler la réaction de dénitrification d'une biomasse bactérienne dans un réacteur séquentiel en batch .

Introduction

Le présent travail a été réalisé au laboratoire des Biotechnologies Environnementales et Génie des Procédés (BIOGEP) et 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 de l'effet des ultrasons.
- La troisième partie est consacrée aux résultats obtenus et leurs discussions.
- Une conclusion finale.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : La dénitrification

I.1 Le cycle de l'azote :

L'azote est un élément chimique très répandu dans la nature. Il constitue 78 % de l'atmosphère. C'est un élément essentiel qui compose la matière vivante et est indispensable à la vie de l'homme. Dans l'eau, l'azote se trouve en solution sous forme combinée : nitrates (NO_3^-), nitrites (NO_2^-), azote ammoniacal (NH_3 , NH_4^+), azote organique (**Boeglin, 2007**).

Le cycle de l'azote implique une série de transformations chimiques qui sont l'œuvre d'un petit nombre d'organismes spécialisés. Ces mécanismes biologiques peuvent être brièvement résumés comme suit (**Kevin, 2005**) :

I.1.1 La fixation :

Elle correspond à l'aptitude que possèdent certains organismes à fixer l'azote atmosphérique qui est alors réduit à l'état d'ammoniaque avant d'être assimilé. La fixation biologique de l'azote est réalisée par des bactéries, algues bleues et certains champignons, la majeure partie fait intervenir les bactéries du genre *Rhizobium* qui forment des nodules dans les racines de légumineuses. Il existe aussi des formes de bactéries libres capables d'effectuer cette opération en aérobiose (*Azotobacter*), ou en anaérobiose (*Clostridium*) (**Barbault 2000**).

I.1.2 L'assimilation :

C'est la transformation de la matière azotée minérale ou organique inerte en matière vivante. La forme assimilable est l'azote ammoniacal qui est transformé, par exemple, en acides aminés.

I.1.3 L'ammonification :

C'est la libération d'ammoniaque à partir des matières azotées organiques. Cette étape du cycle de l'azote conduit à partir des matières organiques azotées à la libération d'ammoniaque. Elle peut être également appelée : minéralisation dans la mesure où l'azote impliqué dans des molécules organiques est transformé en azote minéral.



I.1.4 La nitrification :

Consiste en l'oxydation de l'azote ammoniacal en nitrate par l'intermédiaire de bactéries nitrifiantes. La nitrification se déroule en deux étapes :

- La nitrosation (nitritation) ou conversion de l'ammonium en nitrite ($\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^-$).
- La nitratisation ou conversion du nitrite en nitrate ($\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$).

Chacune est contrôlée par des micro-organismes spécifiques, tels que les Nitrosomonas dans un premier temps et les Nitrobacters dans un second.

I.1.5 La dénitrification :

C'est la réduction des nitrates en azote gazeux par l'intermédiaire de bactéries dénitrifiantes. Les nitrates présentent certaines caractéristiques qui permettent de mieux comprendre les teneurs observées dans les nappes ces dernières années:

- Les nitrates sont très stables et très solubles dans l'eau.
- Leur pénétration dans le sol est lente. La vitesse de migration serait d'environ 1 mètre par an.

L'azote des nitrates retourne ainsi sous sa forme primitive dans l'atmosphère, les nitrates sont transformés en nitrites puis en oxydes (NO, N₂O), et enfin en N₂. La réaction peut se schématiser ainsi :



Les nitrates jouent le rôle d'accepteur final d'électrons à la place de l'oxygène. Les bactéries impliquées présentent un métabolisme hétérotrophe. La dénitrification implique nécessairement la présence d'une pollution carbonée qui peut être directement puisée à partir d'une eau brute ainsi qu'une concentration en oxygène dissoute nulle (milieu anoxie) (Boeglin 2007, Pelmont 2005).

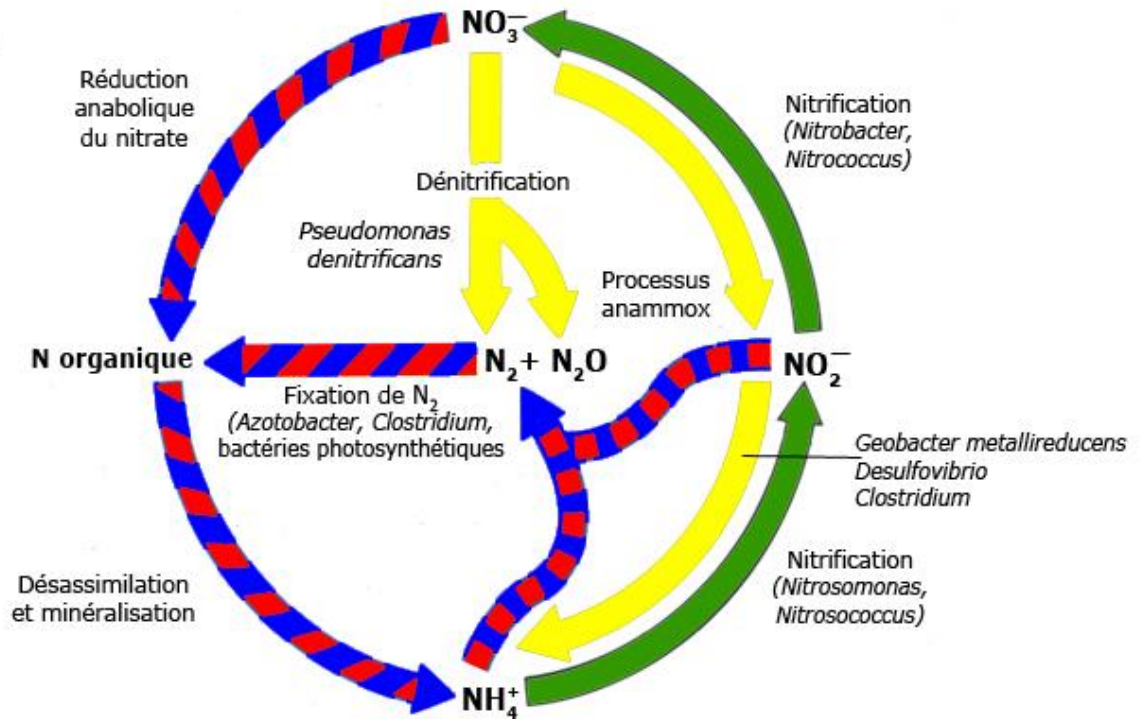


Figure I.1: cycle de l'azote (McKague et al. 2005)

I.2 Origine des nitrates dans les eaux :

Les nitrates existent dans les eaux à l'état naturel en absence de pollution. En général leurs concentrations, n'excède pas 3 à 5 mg/L dans les eaux superficielles et quelques mg/L dans les eaux souterraines.

I.2.1 Origine humaine :

Les teneurs en nitrates sont en augmentation ces dernières années. Leur progression dans les eaux a diverses origines qui sont :

I.2.1.1 Origine agricole :

Les nitrates sont indispensables au développement des plantes, c'est pourquoi l'homme en apporte à ses cultures afin de favoriser leurs croissances, par exemple lors d'une culture intensive les réserves naturelles ne sont pas suffisantes (Tallec, 2005) et les nitrates sont ajoutés sous formes d'engrais soit naturels, comme le fumier et le lisier ou artificiels tel que les engrais chimiques à base d'azote (Clément & Yan, 2005).

Dans ces deux cas les nitrates en excès pénètrent dans le sol et étant très solubles finissent par atteindre et rejoindre les cours d'eau et les nappes phréatiques. Il peut également arriver

qu'il pleuve après un apport d'engrais, la pluie va donc provoquer un lessivage entraînant tous les nitrates présent dans l'eau. Une autre activité agricole comme l'élevage entraînent un apport en nitrates. Une très forte concentration d'élevage à un endroit peut provoquer une saturation de la capacité d'autoépuration du sol et les nitrates en excès finissent dans les nappes souterraines d'eau (**Tallec, 2005**).

I.2.1.2 Origine domestique :

Cette pollution azotée provient d'une part des eaux résiduaires, notamment des rejets d'urines (un individu adulte rejette jusqu'à 10g d'azote par jour soit 16 Kg de nitrates par an), et d'autre part, du dépôt d'ordures ménagères entraînant une pollution des eaux souterraines d'une manière directe si les déversements sont réalisés dans l'affleurement de la nappe, ou indirectement par lessivage des eaux pluviales (**Martin, 1979**).

I.2.1.3 Origine industrielle:

Les quantités de produits azotés rejetés par les eaux résiduaires industrielles varient énormément d'une industrie à l'autre. Les rejets les plus importants concernent les secteurs suivants : bois, papier, engrais chimiques, produits chimiques, fer et acier, cokeries, cuir, textile, fabrications agroalimentaires (**Martin, 1979**).

I.3 Conséquences sur la santé humaine et l'environnement:

I.3.1 Effet sur la santé humaine:

L'OMS a fixé la Dose de nitrates Journalière Admissible (DJA) en fonction des risques mesurés ou supposés à 3,65 mg/kg de poids corporel. La limite maximale autorisée de 50 mg de nitrates par litre dans les adductions d'eau potable a été fixée en fonction des recommandations suivantes :

Le seuil d'ingestion des nitrates par l'homme est fixé à 3,65 mg/kg du poids corporel (dose journalière admissible), soit un seuil de 250 mg/jour pour un poids moyen de 70 kg

Le principal risque pour la santé humaine associé à l'ingestion des nitrates est lié à la capacité de l'organisme humain à transformer les nitrates en nitrites. Cette réduction revient à la capacité des bactéries ayant une activité nitrate réductase (**Lahmeur, 2006**). Les nitrates ingérés traversent la bouche puis l'œsophage avant d'arriver dans l'estomac. Ils sont ensuite rapidement et presque totalement absorbés dans la partie haute de l'intestin grêle.

La plus grande partie des nitrates absorbés dans le tube digestif est éliminés dans les urines grâce au travail des reins. Cependant une fraction non négligeable peut être réduite en nitrites par des enzymes bactériennes avant élimination. La quantité de nitrites ainsi formés dépend directement de la masse de nitrates ingérés et aussi de l'état du tube digestif et de la capacité de l'organisme à éliminer rapidement les nitrates (**Gulis et al, 2001**).

I.3.1.1 La méthémoglobinémie :

La méthémoglobinémie est une diminution héréditaire ou acquise (par une toxine) de la capacité des globules rouges à transporter l'oxygène. L'ingestion massive d'engrais, l'inhalation de nitrites volatils, la présence de nitrates dans l'eau peuvent entraîner cette méthémoglobinémie (**Schwartz et al, 2005**).

On parle de méthémoglobinémie quand les globules rouges contiennent des quantités anormalement élevées de méthémoglobine (à partir de 10 à 15% par rapport à la bonne hémoglobine). On définit sa proportion par rapport à la quantité totale d'hémoglobine. Son taux normal chez un sujet sain est de 1 à 2 %. Cet équilibre est contrôlé par un système enzymatique grâce à la méthémoglobine réductase. L'enfant de moins de 6 mois et plus particulièrement de moins de 3 mois est plus prédisposé à la méthémoglobinémie car il est dépourvu de l'enzyme clé comme la NADH-cytochrome b5 réductase qui convertit la méthémoglobine en hémoglobine (**CY et al, 2009**).

I.3.1.2 Risque cancérigène :

Les nitrates sont susceptibles de présenter un risque lié à leur transformation en nitrites et éventuellement en nitrosamines dans le tractus digestif. Les propriétés cancérigènes de ces substances ont été découvertes il y a un demi-siècle (**Magee et Barnes, 1956 ; Magee et Barnes, 1967**). Il n'existe pas de données qui démontrent avec certitude les effets cancérigènes 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 de nitrates et le risque de cancer (**Cantor, 1997 ; 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 les 20 ans (**Hill, 1991**).

Cette démonstration est rendue encore plus ardue par la grande variabilité dans la durée et l'espace des teneurs en NO_3^- dans l'eau et les aliments. Cependant, les tests chez de

nombreuses espèces animales ont montré l'effet cancérigène d'un grand nombre de nitrosamines (WHO, 1995). Diverses études permettent de suspecter fortement la responsabilité de teneurs élevées en nitrates dans l'eau et les aliments, et le développement de cancers de la prostate, du pharynx, de l'œsophage ou du colon (Cantor, 1997 ; Gulis et al 2001). En absence de certitudes absolues, ces résultats imposent de prendre les précautions nécessaires afin de préserver la santé humaine.

I.3.2 Sur l'environnement :

L'azote est un nutriment essentiel à l'activité biologique de l'eau. Cependant, au-dessus d'une certaine concentration, sa présence peut entraîner de sérieux problèmes de pollution, parmi ces problèmes on peut citer :

I.3.2.1 Eutrophisation :

L'eutrophisation a lieu dans les rivières à faible débit, dans les lacs, dans les plans d'eau, même salés. L'excès de nutriments en nitrates, phosphates, sulfates et matières organiques favorise une rupture de l'équilibre biologique qui se manifeste par la prolifération d'algues, voire de plantes vertes. Ces végétaux consomment beaucoup et se décomposent. Le fond des lacs composés de vase sans oxygène devient le siège de fermentations anaérobies avec formation de produits putrides et toxiques, les poissons asphyxiés par manque d'oxygène, meurent ou fuient. Finalement, l'accumulation de débris organiques dans les fonds sans oxygène entraîne la dégradation de ces eaux stagnantes (Pousset, 2008).

I.4 Normes et recommandations :

L'organisation mondiale de la santé précise que les concentrations en nitrates dans l'alimentation doivent être inférieures à 10 mg.L^{-1} , l'exposition par ingestion de légumes est la plus élevée. Cependant, l'eau devient la principale source de nitrates lorsque les concentrations dépassent la concentration maximale fixée par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé). Dans les eaux de boisson elle est fixée à 50 mg.L^{-1} (WHO, 2003).

Tableau I.1: Résumé des normes et recommandations (**Institut national de santé publique du Québec, Québec, 2003**)

Norme	Agent chimique (mg-N/L)		
	Nitrates	Nitrites	Nitrates+Nitrites
Norme québécoise	/	1	10
Recommandation canadienne	10	1	/
Norme américaine	10	1	10
Critères OMS	11.3	0.9	/

I.5 Méthodes de traitements des nitrates :

Les méthodes de traitement d'une eau chargée en nitrates varient selon les disponibilités économiques et géographiques pour la mise en place du procédé de traitement. Au cours de ces dernières décennies il y a eu un développement important dans les procédés et techniques d'épuration de l'eau et l'on a souvent une combinaison de plusieurs procédés mécaniques, biologiques, physiques et chimiques. On peut classer ces techniques d'enlèvement des nitrates en deux grandes catégories :

I.5.1 Les Méthodes physico-chimiques et membranaires :

Ces procédés s'étant avérés trop coûteux par rapport aux techniques de dénitrification biologique, nous en décrivons brièvement les principes. On utilise les propriétés de membranes spécifiques afin de séparer la solution et le solvant sous l'effet d'une force extérieure ; pour l'osmose inverse : c'est la mise sous pression de l'effluent à traiter ; pour l'électrodialyse c'est l'application d'un champ électrique.

I.5.1.1 L'osmose inverse

L'osmose inverse est utilisée pour l'obtention d'une eau déminéralisée en faisant passer l'eau à traiter riche en nitrates par une membrane sous une pression supérieure à la pression osmotique. L'eau pure traverse la membrane, de la solution la plus concentrée en espèces dissoutes, vers le second compartiment, pour former le perméat (**Bae et al 2002**). L'osmose inverse utilise des membranes denses qui laissent passer le solvant (eau dans la plupart des cas) et arrêtent à peu près tous les solutés, y compris les sels. Cette technique est typiquement utilisée dans :

- Le dessalement de l'eau de mer et des eaux saumâtres
- L'élimination de pesticides et herbicides

- La production d'eau ultra-pure pour l'industrie électronique, la pharmacie, etc.
- La concentration d'antibiotiques (**Aimar et al, 2006**)

I.5.1.2 La Nanofiltration:

L'histoire de la nanofiltration date d'avant les années 1970. Lorsque les membranes d'osmose inverse opérant à de basses pressions et à des débits raisonnables étaient développées. Ces dernières sont connues sous le nom de membranes de nanofiltration. A la moitié des années 1980 les premières applications sont rapportées par (**Conlon and McClellan, 1989; Eriksson, 1988**).

La Nanofiltration est utilisée pour traiter les nitrates dans l'eau (**Van der Bruggen et al. 2001**) et désigne une technique de séparation à membranes permettant la rétention de composés ayant une taille en solution voisine de celle du nanomètre (soit 10 Å),

Les possibilités d'applications sont nombreuses (**Aimar et al, 2006**) :

- Déminéralisation sélective (adoucissement des eaux).
- Concentration de composés organiques de faible masse molaire (antibiotiques).
- Le recyclage d'eau dans les effluents de teinturerie.
- La déminéralisation du lactosérum.
- Le traitement des eaux de blanchiment de la pâte à papier
- Elimination des pesticides.

I.5.1.3 L'électrodialyse

L'électrodialyse est décrite par l'application d'un courant continu entre les électrodes d'une cellule, constituée par un empilage de membranes semi-perméables et alimentée par une eau riche en nitrates. C'est l'un des processus électro-membranaires le plus fiable et le plus efficace dans de nombreuses applications, comme :

- Le dessalement des eaux saumâtre (**Crini, Badot 2007**)
- La séparation des aminoacides et autres solution organiques
- Le traitement des effluents
- La production de sels (**Menkouchi et al 2008**)
- L'élimination des nitrates de l'eau (**Ortiz 2005**).

I.5.2 Les méthodes de dénitrification biologiques :

La Dénitrification est un terme qui décrit la réduction biologique des nitrates en oxyde nitrique, oxyde nitreux et puis en azote gazeux (**Metcalf et Tourbillonne, 2003 ; Metcalf et Remous 2003**)

Le processus de dénitrification biologique ou réduction des nitrates implique dans les traitements de l'eau l'oxydation biologique de beaucoup de substrats organiques, les nitrates et nitrites sont les accepteurs d'électrons au lieu de l'oxygène dissous en aérobie (**Metcalf et Tourbillonne, 2003**).

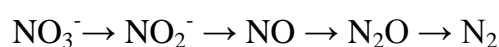
Il existe deux classes de bactéries dénitrifiantes celles qui se développent en présence d'un substrat organique dont elle utilise l'énergie d'oxydation et le carbone et sont appelées chimioorganotrophes ou hétérotrophes et celles qui tirent leur énergie et leur carbone de l'oxydation de substances minérales ce sont des chimiolithotrophes ou autotrophes.

I.5.2.1 Dénitrification hétérotrophe :

Ce processus de dénitrification est connu depuis fort longtemps, depuis les travaux de **Schonbein en 1868** et ceux de **Gayon et Dupetit en 1882**. La dénitrification se produit sous des conditions anoxiques sous l'action de bactéries hétérotrophes qui utilisent l'oxygène des nitrates pour oxyder un substrat carboné organique.

I.5.2.2 Principe :

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 N₂ à partir du nitrate, selon la chaîne de transformation suivante (**Bothe et al., 2000**):



Certains organismes, ne produisant pas certaines réductases, doivent utiliser un oxyde d'azote partiellement réduit comme premier accepteur d'électrons ou ne peuvent tout simplement pas se rendre jusqu'au N₂. 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**).

I.5.2.3 Bactéries dénitrifiantes :

Une grande gamme de bactéries montre qu'elles sont capables de dénitrifier, cependant une même capacité de dénitrification a été trouvée chez les algues et les moisissures. Les Bactéries capables de dénitrifier sont hétérotrophes et autotrophes. Beaucoup d'organismes hétérotrophes sont dénitrifiants et ceci inclut les espèces suivantes :

Achromobacter, Acinetobacter, Agrobacterium, Alcaligenes, Arthrobacter, Bacillus, Chromobacterium, Corynebacterium, Flavobacterium, Hypomicrobium, Moraxella, Neisseria, Paracoccus, Propionibacterium, Pseudomonas, Rhizobium, Rhodospseudomonas, Spirillum, et Vibrio (**Metcalf et Eddy, 2003**).

En absence d'oxygène moléculaire, ces organismes utilisent les nitrates ou nitrites comme accepteurs d'électrons, et la matière organique pour l'apport en énergie. Ce processus métabolique appelé : dissimilation des nitrates, résulte dans la réduction éventuelle de nitrates en azote gazeux. A de plus grandes concentrations en oxygène dissous approximativement 0.5 mg/l, l'oxygène sera utilisé préférentiellement comme accepteur final d'électrons. La dénitrification sera donc inhibée quand la concentration en oxygène dissous dépasse les 0.5 mg/L (**Cheremisinoff, 1998**). L'oxydation de l'ammoniaque par les bactéries hétérotrophes exige une énergie qui peut être obtenue par la réduction du nitrate ou nitrite par *Pantotropha sp.*, sous des conditions aérobies. Un substrat aisément disponible tel que l'acétate est aussi exigé.

Les Pseudomonas sont les plus communément et largement distribués parmi tous les microorganismes dénitrifiants et ont montré l'utilisation d'une large collection de composés organiques y compris l'hydrogène, le méthanol, les hydrates de carbone, les acides organiques, les alcools, les benzoates, et autres composés aromatiques (**Metcalf et Tourbillonne, 2003**). La Dénitrification avec le méthanol est très sélective pour les espèces du genre *Hyphomicrobium*. Deux types de ce dernier à savoir les W.-C. et B522, sont aussi

capables de croître et de dénitrifier avec d'autres sources de carbone incluant: le n-propanol, l'éthanol, le n-butane, l'acétate ... (**Sperl et Hoare, 1971**)

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 produisent 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 présent 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 (nitricoxyde réductase: NOR) selon la réaction suivante:



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



Elle 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**).

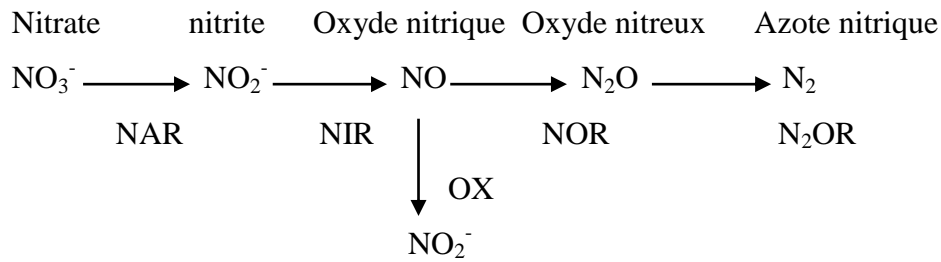


Figure I.2 : Réaction de dénitrification catalysée par des nitrates (NAR), nitrite (NIR), oxyde nitrique (NOR), et oxyde nitreux (N₂OR) réductases, oxydation de l'oxyde nitrique en NO₂(OX) par une oxyde nitrique oxydase.

I.5.2.4 Les paramètres essentiels jouant sur la vitesse de dénitrification :

I.5.2.4.1 L'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, les nitrites ou nitrates. 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 les nitrites ou nitrates, permet de produire d'avantage d'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 3 mg/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 3 mg/l d'O₂ sont mesurés dans le liquide interstitiel.

I.5.2.4.2 Le pH :

Les microorganismes réalisant la dénitrification sont moyennement sensibles aux fluctuations du pH. Le pH optimum semble se situer entre 7 et 8,7. La réaction de dénitrification entraîne une élévation du pH, qui doit être contrôlé puisqu'il peut y avoir inhibition de la réaction au-delà d'une valeur de pH égale à 9. Les travaux de **Gee et Kim, 2004** montrent toutefois que la dénitrification est possible à un pH de 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 à dégrader les nitrates.

Cependant, sans acclimatation et à des pH trop acides, la réduction des nitrates est incomplète, induisant la production d'oxyde nitreux (N₂O) voir nitrique (NO) comme le montre **Knowles, 1982**.

I.5.2.4.3 La 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 5 °C et 75 °C (**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 de dénitrification.

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**).

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

Ou :

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

θ = Coefficient de température.

I.5.2.4.4 La concentration en nitrates :

L'effet de la concentration en substrat sur le taux de dénitrification est assez controversé. Des auteurs ont montré que la présence des nitrates diminuait l'efficacité de l'enlèvement des nitrites (**çeçen et Gonenc, 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 ions nitrates.

I.5.2.4.5 Nature de la source carbonée (rapport DBO : DCO)

Le taux de dénitrification est fortement influencé par la nature de la source carbonée. 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 leur élimination par 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.

I.5.2.5 Stœchiométrie de dénitrification :

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

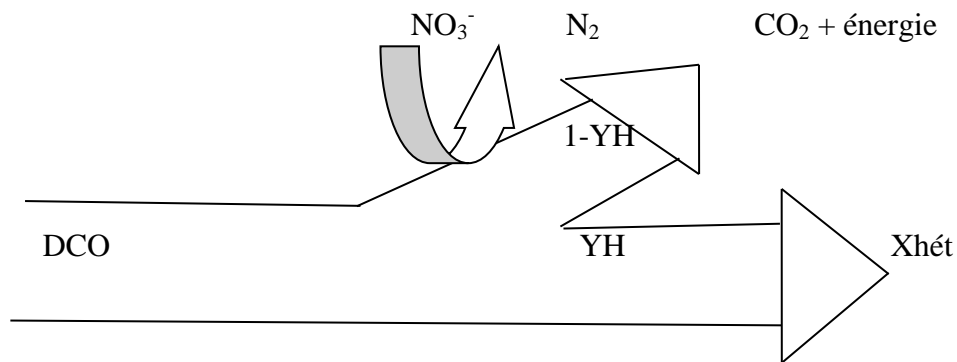


Figure I.3: Métabolisme de la dénitrification

Avec:

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

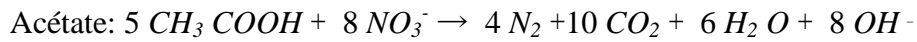
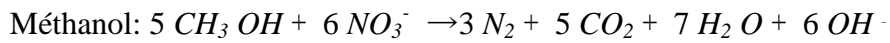
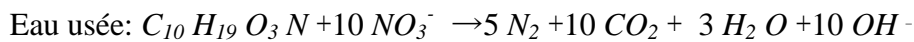
1-YH: consommation de la DCO pour la réduction des nitrates en $g \text{ de DCO} \cdot g^{-1} \text{ NO}_3^-$

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

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

Dans les processus d'élimination biologique des nitrates le donneur d'électron est typiquement une des trois sources : la DBO dans les eaux usées, la DBO produite pendant une dégradation endogène, ou les sources de carbone, tel que : le méthanol ou l'acétate.

La stœchiométrie de la réaction pour différents donneurs d'électrons est montrée comme suit :



I.5.2.6 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 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'électrons 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 côtés 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 fourni 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 permet la pénétration des nitrates dans la cellule et par conséquent 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 localisés dans celui-ci. Chez *Paracoccus denitrificans* les nitrites réductases sont de type cytochrome cd_1 , et 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**).

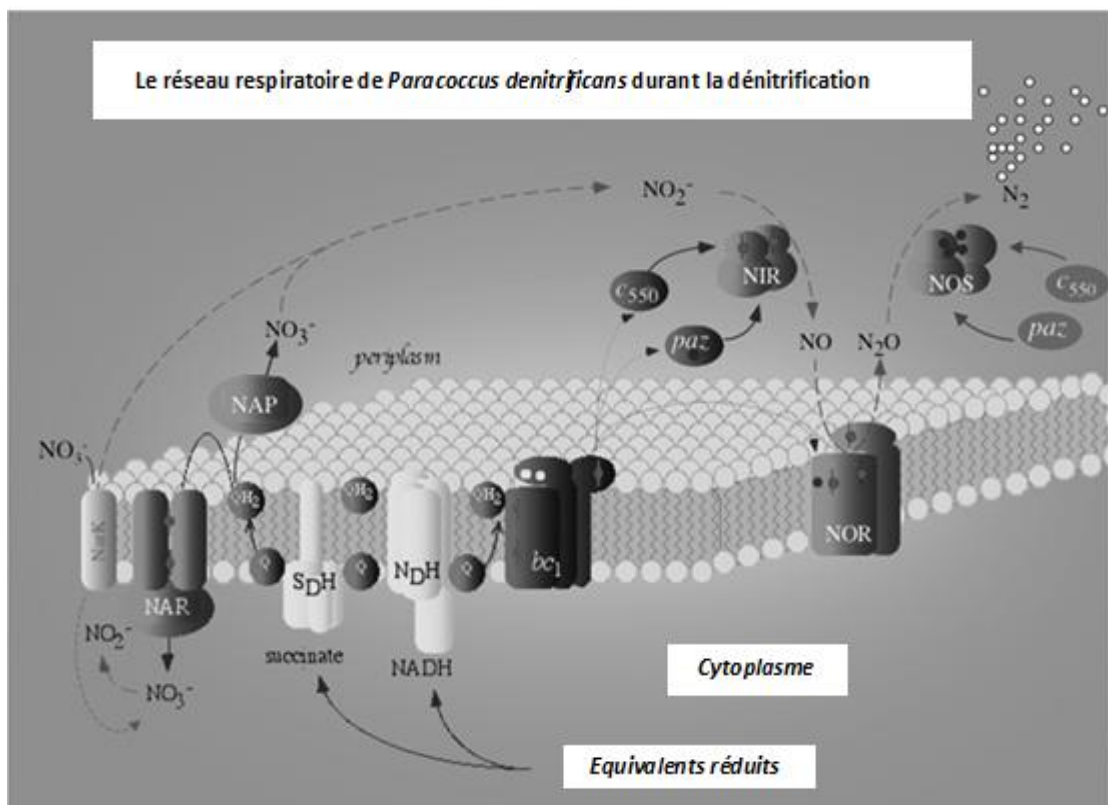


Figure I.4 : Schéma de la dénitrification complète chez *Paracoccus denitrificans*.

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.

II.1 Généralités sur les ultrasons

L'irradiation par les ultrasons est largement utilisée en chimie et autres. Les techniques de prise d'images utilisent l'écholocalisation, tel que les systèmes de SONAR pour la détection de cibles ou l'échographie en médecine considéré comme le meilleur usage connu des ultrasons. Les applications chimiques s'étendent à de nombreux domaines comme la chimie organique et organométallique, les sciences de la matière, l'agroalimentaire et la recherche médicale (**Mason et al, 2001; Luche et al, 1998; Mason et al 2002**).

La sonochimie partage avec la chimie qui va dans la direction du développement durable les mêmes buts à savoir l'usage de moins de produits chimiques et de solvants, réduction de la consommation d'énergie et augmentation des produits et métabolites (**Mason, 2003 ; Mason et al, 2002**). Ceci nous amène à remarquer, que les ultrasons et la chauffe par micro-ondes sont dans beaucoup de cas des techniques complémentaires pour la conduite de réactions chimiques. La sonochimie est en fait une chimie unique et distinctive dans laquelle les propriétés physiques du milieu jouent un rôle décisif sur la réactivité chimique.

Les ultrasons ne réagissent pas directement avec les liquides lors d'une réaction chimique mais ils induisent plusieurs effets physiques dans le liquide qui aident à augmenter le taux de la réaction; à savoir la cavitation.

II.2 La cavitation :

La pression d'une onde acoustique consiste en compressions alternatives dans un milieu transmettant la propagation au milieu le long de la direction de l'onde. Quand une grande pression négative est appliquée à un liquide, les forces intermoléculaires de Van der Waals ne sont pas assez fortes pour maintenir la cohésion, des petites cavités ou des microbulles remplis de gaz sont formés. La rapide nucléation, l'augmentation et l'éclatement de ces bulles de l'ordre du micromètre constitue le phénomène de cavitation, accidentellement observé par hasard à la fin du 19e siècle par Thorneycroft et Barnaby ; les dégâts ainsi causés par une violente agitation et une rapide formation et éclatement de bulles, transforment le liquide en deux phases liquide/vapeur H.M.S. Daring. (**Bremner, 1990 ; Thorneycroft, 1895**)

À très basse pression, les espaces intermoléculaires dépassent la distance intermoléculaire critique ainsi des bulles microscopiques se forment, oscillent avec le

mouvement de l'onde et grandissent en dimension en emprisonnant de la vapeur du milieu liquide environnant et par agrégation avec les autres bulles du milieu (Mason, 1999). Après quelques cycles elles grandissent et acquièrent une dimension instable et éclatent violemment en dégageant une énergie considérable en créant une température localisée pouvant aller jusqu'à 5000 °K (Flint et al, 1991).

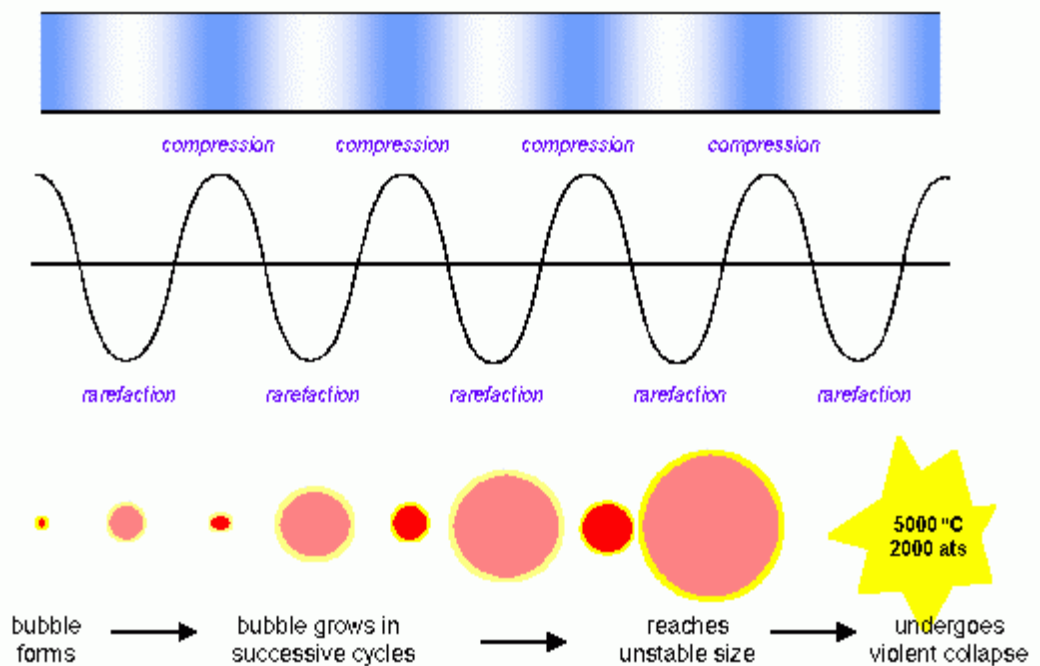


Figure I.5 : génération, croissance et éclatement de bulles résultante du phénomène de cavitation (Chang, 2006)

La fréquence appliquée est un facteur important dans le contrôle de l'efficacité des traitements par les ultrasons. L'effet de la cavitation diminue quand on opère à hautes fréquences et augmente aux basses fréquences. Par conséquent, presque tous les tests de désintégration de boue sont menés à des fréquences avoisinant les 20 kHz (Petrier, 1992). Deux paramètres physiques, la fréquence et l'intensité des ultrasons, sont souvent très peu considérées lors d'une réaction chimique. Contrairement à la radiation électromagnétique le son n'est pas quantifiable, par conséquent un rapport direct entre son intensité et sa fréquence ne peut pas être établi. Une formule simplifiée de l'évolution temporelle de la pression $P(t)$ à un point donné d'un milieu est donnée par:

$$P(t)=P_A \sin (2\pi ft + \Theta)$$

Où P_A : est l'amplitude de la pression acoustique donné en Pa ou bar

f : la fréquence de la pression d'onde.

Quand on augmente la fréquence, il est nécessaire d'augmenter aussi l'amplitude (ou l'intensité) de l'irradiation pour maintenir la même énergie de cavitation. C'est pourquoi il devient plus difficile d'avoir le phénomène de la cavitation aux hautes fréquences, surtout dans le domaine du MHz.

La Cavitation ne se produit pas seulement pendant un courant turbulent, mais aussi sous l'irradiation ultrasonique. Les ultrasons à hautes intensités, au-dessus et en dessous du seuil de cavitation, peuvent être utilisés pour rehausser des réactions chimiques et pour réduire le temps de la réaction ou changer la structure moléculaire d'un produit. Les transducteurs d'ultrasons qui peuvent opérer en dessous de 100 kHz sont utilisés habituellement dans ce but. De plus, les ultrasons produisent les deux oxydes (OH^\cdot) et radicaux réducteurs (H^\cdot) sous certaines conditions (**Suslick, 1988**).

II.2.1 Types de cavitation :

En général, les sonochimistes distinguent entre deux types de cavitation: stable et transitoire. La cavitation stable se produit quand les microbulles contiennent principalement un gaz (par exemple : l'air) et leur vie moyenne est beaucoup plus longue qu'un cycle d'ultrasons, du fait de l'augmentation, de la fréquence de résonance. Les microbulles conduisent à des pressions anodiques où ils induisent des réactions chimiques (**Leighton, 1994**).

Inversement, la cavitation transitoire est un phénomène de plus courte durée: une cavité est plus rapidement formée elle contient principalement de la vapeur du liquide et éclate après quelques cycles. À une intensité d'ultrason de quelques w.cm^{-2} , probablement les deux types de cavitation se produisent ; Comme la plupart des travaux ont été consacré à la cavitation transitoire, elle est aussi souvent considérée comme la plus efficace pour promouvoir des réactions chimiques, ce qui est probablement vrai pour les expériences menées à de hautes intensités d'ultrasons qui permettent d'éviter la formation d'ondes stationnaires. Néanmoins, à de basses intensités, là où la formation d'ondes vagues a le plus de chance de se produire et

que l'on atteint un nombre de bulles et de rendements considérables, la plupart des réactions chimiques sont conduites à travers la cavitation stable (**Lepoint et al, 1998**).

II.2.2 Les facteurs affectant la cavitation

La Cavitation se fait en trois étapes par les processus de nucléation, l'augmentation, puis la rupture des bulles de gaz ou vapeur dans l'enceinte du liquide. Pendant l'implosion des bulles une chaleur intense se dégage. Les points chauds localisés ont une température de 5000°C, la pression est approximativement de 500 atmosphères, avec un temps de quelques microsecondes. Ce sont ces hautes températures et pressions qui affectent les réactions chimiques. Les facteurs affectant l'intensité de la cavitation sont décrits comme suit (**Kappe, 2004**):

- Température
- Pression statique dans le liquide
- Dimension des bulles, nombre de nucléons, et la fréquence du son appliquée
- Intensité du son
- Atténuation des caractéristiques de bulles
- La tension de Surface du liquide
- Pression de vapeur
- Concentration et taux de diffusion des gaz dissous
- Viscosité, force de cohésion, et densité du liquide
- Taux de transfert de chaleur dans le fluide
- Distribution locale de l'intensité du son la

II.2.3 Relation entre la cavitation et la chimie :

Bien que les principes de la cavitation paraissent sans rapport d'un point de vue pratique avec la chimie, la sonochimie met en valeur et montre comment une énergie aussi importante peut être appliquée dans un simple erlen. Le plus important dans la sonochimie est que son effet sur un solvant ne devraient pas être évalué sur des paramètres comme : l'acidité, basicité, le moment dipolaire, etc., mais prendre plutôt en compte la viscosité, la volatilité et les gaz dissous, qui sont tous directement impliqués dans la formation de bulles et donc de l'énergie produite (**Mason, 1991**).

II.3 La sonochimie :

La Sonochimie est une branche de recherche en chimie qui allie les effets chimiques et les applications des ondes d'ultrasons, c'est-à-dire l'utilisation du son possédant des fréquences au-delà de 20 kHz dépassant la limite d'audition humaine. La gamme de fréquences des ultrasons peut être étendue jusqu'à 100 MHz.

L'utilisation des ultrasons remonte à plus de 80 ans, depuis que Richards et Loomis ont publié le premier rapport qui décrit l'influence des ultrasons sur le taux des réactions chimiques (**Richards et al, 1927**). Il n'est pas surprenant que leur étude a attiré l'attention car ces pionniers ont travaillé à de très hautes fréquences, de 100 à 500 kHz. Il est intéressant de signaler que cette équipe de chercheurs a rapporté les effets physiques des ultrasons pour les modifications biologiques causé sur les animaux (**Richards et al 1927 ; Wood et al, 1927**).

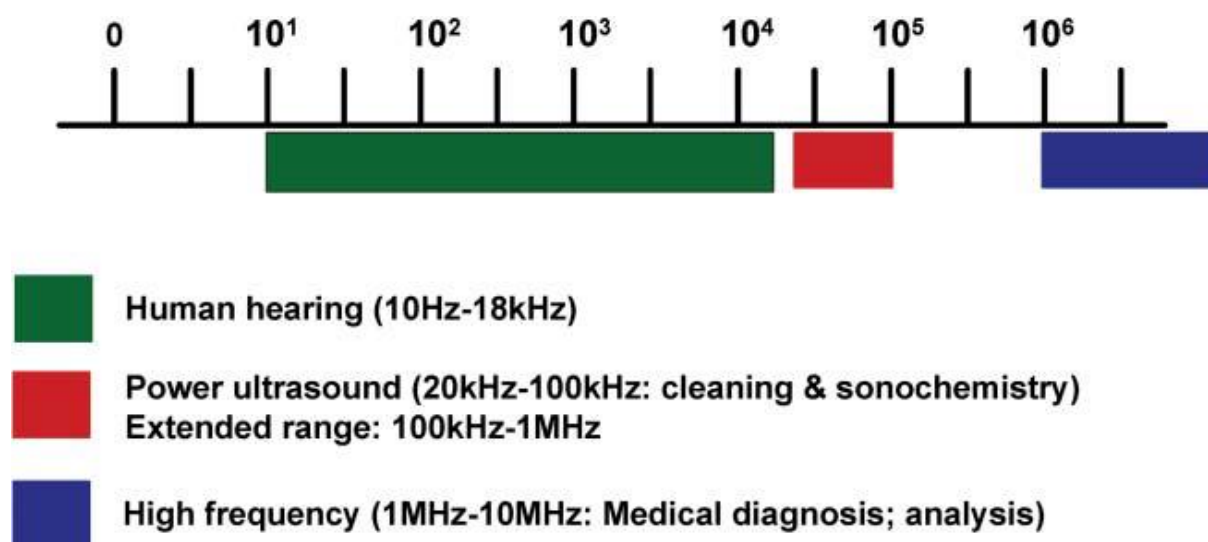
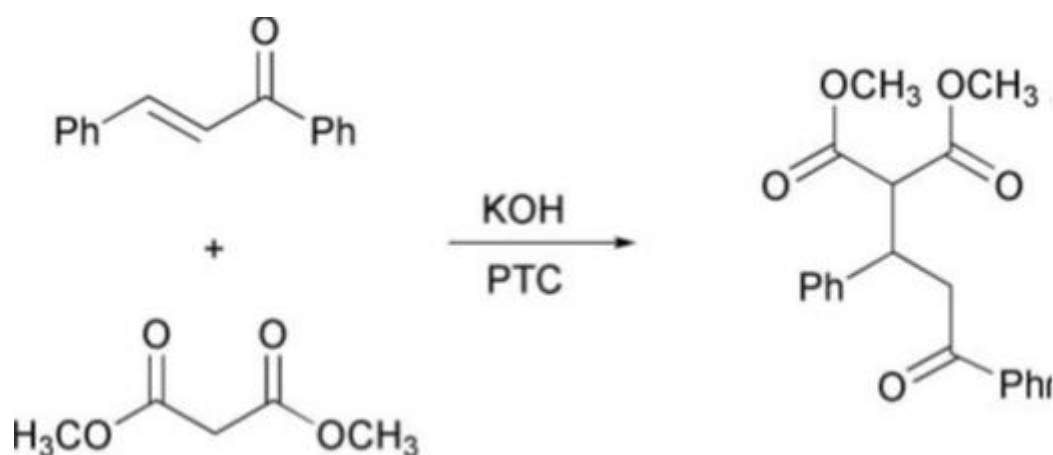


Figure I.6 : gamme des fréquences du son en Hertz (**Cravotto et al, 2006**)

Un travail supplémentaire a porté sur les effets mécaniques et chimiques des ultrasons tels que le nettoyage des surfaces et la formation de radicaux libres par la sono-lyse de l'eau. Des similarités entre la sonochimie et la chimie de la radiation ont été explorées par de nombreux chercheurs au début des années 1950s. L'éclatement des bulles dû à la cavitation, produit des radicaux libres; dans le cas de l'eau ce sont les H⁺ et les OH⁻ qui peuvent se combiner pour donner de l'hydrogène et du peroxyde d'hydrogène Ils peuvent aussi réagir avec les autres substances pour induire des réductions secondaires et des réactions d'oxydation (**Bremner, 1990**).

II.4 Les réactions sonochimiques :

De nombreuses expériences ont révélé que les ultrasons n'ont aucun effet sur les mécanismes d'une réaction chimique ; les taux des réactions étaient souvent comparables aux processus non-irradiés. En effet dans beaucoup de réactions hétérogènes l'application des ultrasons, par les systèmes de bains ou à sonde immergé, a le même effet qu'un agitateur ultra-rapide ou un homogénéisateur dans lequel les fluides ne subissent pas de cavitation (**Kegelaers et al, 2001**), ainsi l'augmentation des taux et rendements peut être observé à cause des effets mécaniques d'ondes de chocs.



conditions	Temps (min)	Rendement(%)
agitation	5	91
Agitation par ultrasons	2	97
Agitation, toluene	10	52
Agitation par ultrasons, toluène	2	98
Volume : 50 cm ³ Bain hexagonal : 750 cm ³		

Figure I.7 : Effet des ultrasons sur le transfert de phases lors d'une réaction : le pouvoir homogénéisateur

L'effet chimique dû aux ultrasons (la vraie sonochimie) se produira uniquement si une grande énergie provenant de l'éclatement des bulles résultant du phénomène de cavitation aura lieu et devient ainsi intermédiaire de la réaction. Dans ce contexte, il est approprié de

parler d'activation par les ultrasons ou de sonocatalyse. Alors des changements dans la distribution du produit sous irradiation modifient les mécanismes, comme par exemples dans les cas de la diastéréoselectivité (**Luche et al, 1999**). Ces chercheurs suggèrent, qu'une vraie activation par les ultrasons se produit bien que la diastéréoselectivité ne soit pas explicitement prouvée.

II.5 Types d'ultrasons

L'ultrason peut être divisé en deux catégories (**Mason et al, 2002**):

- L'ultrason à haute intensité: Ces ondes d'ultrasons ont un grand pouvoir et typiquement une basse fréquence. Si ces ondes sont appliquées aux liquides, elles ont la possibilité de produire des changements physiques et chimiques dans ces derniers. Elles sont utilisées dans l'industrie pour le soudage, le nettoyage et la réalisation des réactions chimiques. Ces ondes ont une gamme de fréquence qui s'étale de 20 KHz à 100 KHz
- L'ultrason à basse intensité: Ces ondes d'ultrasons possèdent de hautes fréquences et une faible intensité. Elles ne causent pas de changements physiques ainsi que chimiques. Elles sont utilisées pour la mesure de la vitesse et le coefficient d'absorption des ondes dans un milieu, dans l'imagerie médicale, les soins dentaires etc. Les hautes fréquences d'ultrasons ont de petites longueurs d'ondes qui permettent la détection et l'imagerie de petites surfaces à haute définition, dans ce cas des fréquences de 1 à 10 MHz sont utilisées.

Les chiens et les souris ont une limite de fréquence audible supérieure à celle de l'oreille humaine. Le son de l'ultrason peut être utilisé pour rappeler un chien ou pour effrayer des rongeurs et des insectes. Les plus jeunes individus peuvent entendre des sons aigus alors que les adultes en sont incapables. Pour les êtres humains la limite supérieure d'audition s'amointrit avec l'âge.

Les ondes ultrasons sont utilisées dans l'industrie depuis de nombreuses années. La première application commerciale des ultrasons remonte en 1917, pour estimer la profondeur d'eau à travers une technique d'écho-son. L'ultrason a trouvé son application dans beaucoup de champs, y compris (phrase incomplète (**Chand, 2008**):

II.5.1 L'industrie:

La soudure et le nettoyage par ultrasons sont les applications les plus communes des grandes intensités d'ultrasons. Les ultrasons sont aussi utilisés dans le forage, le broyage ainsi que le découpage. Les applications à basses intensités incluent des essais non-destructeurs.

II.5.2 La Médecine:

La prise d'images par les ultrasons (2-10 MHz) est utilisée en obstétrique, en nettoyage, dans les soins dentaires et dans les traitements du muscle (20-50 kHz).

II.5.3 La Biologie et biochimie:

L'ultrason à grande intensité est utilisé pour la perturbation des cellules et la filtration (par exemple obstruction réductrice des filtres et l'augmentation du taux de la filtration), le dégazage de liquides, la cristallisation (en produisant des cristaux plus constants et plus petits dans les solutions sursaturées), et la dispersion de solides. La recherche a montré que les ultrasons peuvent accélérer le taux de réaction dans beaucoup de réactions chimiques et biochimiques. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à la biostimulation des cultures vivantes dans le domaine de la biotechnologie.

II.6 L'Application des ultrasons à la biologie :

Le principe de traitement ultrasonique dépend du processus de cavitation pour désintégrer les parois cellulaires. Les chercheurs ont trouvé que de hautes intensités d'énergie rehaussent la désintégration des particules qui est manifesté par une réduction dans les dimensions de la particule et l'augmentation de la fraction de la matière soluble (**Wang et al, 2005**). **Tiehm et al, 2009** ont démontré que le traitement de la boue activée par les ultrasons améliore considérablement la lyse de la cellule microbienne et augmente la dégradation des solides volatiles aussi bien que la production de biogaz.

L'énergie émise par les ultrasons diffère des autres sources d'énergie traditionnelles (la chaleur, l'énergie d'ionisation, la lumière et la pression) de par les grandes températures, les pressions immenses et les flux extraordinaires de chaleur générés par l'éclatement des bulles dû à la cavitation. Les ultrasons donnent lieu à un mécanisme inhabituel qui fournit une grande énergie chimique. Comme dans la photochimie, de très grandes énergies sont

introduites dans un temps très réduit. La réaction est plus thermique comparé à une excitation électronique (Ley, 1989).

Les effets chimiques des ultrasons sont divers et incluent des améliorations substantielles dans les réactions chimiques et catalytiques. Dans certain cas, l'irradiation ultrasonique peut augmenter la réactivité de presque un million de fois (Ley, 1989).

La dynamique d'augmentation et diminution des cavités est remarquablement dépendante de l'environnement local. Comme les ultrasons passent à travers un milieu liquide, les cycles d'expansion exercent une pression négative sur le liquide, et tirent les molécules loin les unes des autres. Si les ultrasons sont suffisamment intenses, les cycles d'expansion peuvent créer des cavités dans le liquide, cela se produira quand la pression négative dépasse la résistance à la tension locale du liquide qui varie d'après le type et la pureté du liquide. Normalement, la cavitation est un processus nucléique qui se produit dans les zones faibles du liquide, comme par exemple les fentes de gaz dans des particules en suspension. La plupart des liquides contiennent suffisamment de petites particules en suspension dans ce cas les cavitations peuvent se produire aisément à des pressions modérés (Chen, 1998).

II.7 Les différents systèmes d'ultrasons :

II.7.1 Système de bain :

Les bains ultrasoniques ont été fabriqués à l'origine à des fins de nettoyage. Le réacteur de nettoyage ultrasonique se trouve à l'intérieur mais l'on peut directement utiliser l'enceinte de l'appareil tout entier comme réacteur ce qui exigera une agitation mécanique supplémentaire

Le système d'ultrasons à bain présente une intensité inférieure comparé à d'autres systèmes d'ultrasons comme le système à sonde immergé ; les résultats peuvent être difficilement reproductibles à cause de l'emplacement de l'échantillon et de la variation de la chauffe dans le réacteur (Lickiss and McGrath, 1996). Un autre inconvénient des systèmes à bain est que le fluide qui entoure le réacteur peut monter en température, et rendre l'entretien des conditions isothermes difficiles.

II.7.2 Système à sonde immergé :

Les systèmes à sonde immergée, aussi appelés systèmes de la corne, sont utilisés plus fréquemment pour les recherches sonochimiques dans le laboratoire, parce qu'ils peuvent atteindre de plus grandes amplitudes vibratoires. Le système à sonde immergée peut délivrer

directement au mélange réactionnel de grandes intensités d'ondes d'ultrasons et ce en variant l'amplitude au transducteur.

Les transducteurs modernes qui sont utilisés dans les systèmes ultrasoniques sont presque tous basés sur un schéma piézoélectrique accentué.

Les éléments du piézoélectrique seraient une composition du zirconate de titanate dont le rôle est d'avoir une haute activité associé à des pertes minimales. Ils conviennent parfaitement pour former la base d'un transducteur effectif et accidenté (Grewell, 2003).

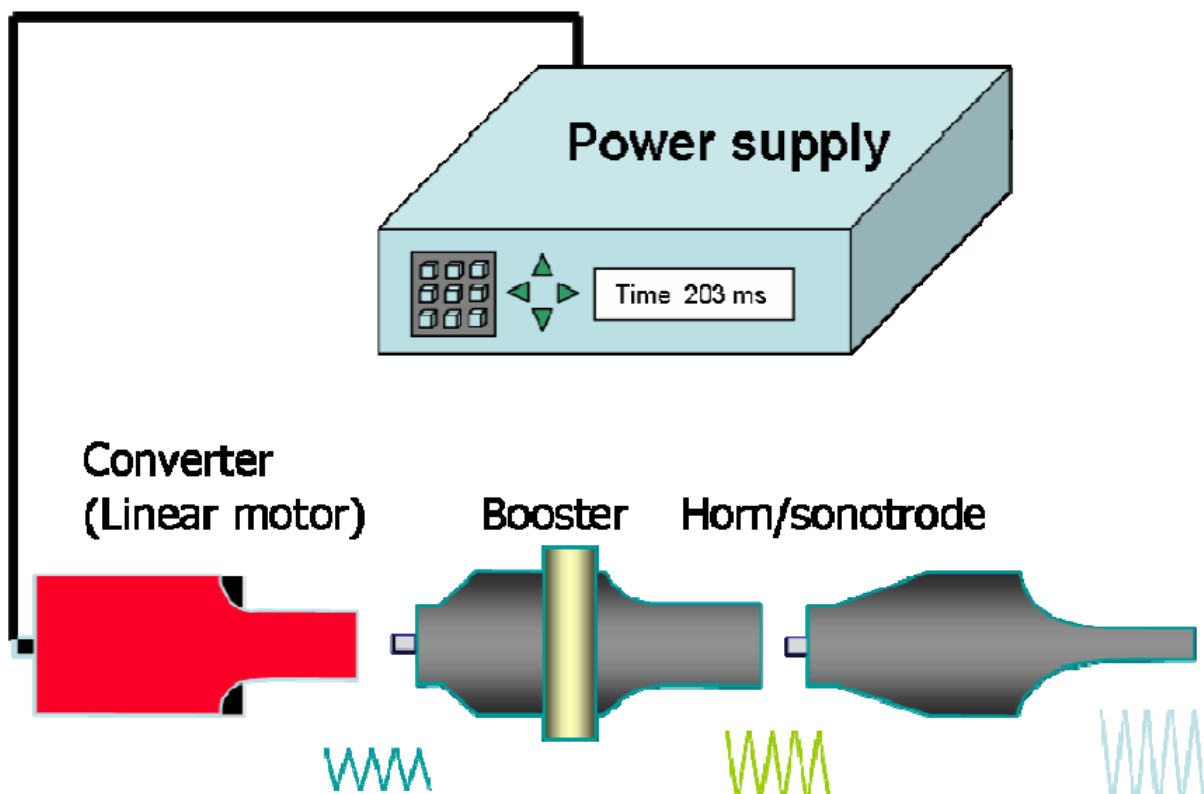


Figure I.8 : système à sonde immergée (Chand, 2008)

Plusieurs expériences ont été effectuées pour déterminer les caractéristiques du son dans un système à sonde immergé. La région d'intensité ultrasonique dans un fluide est très dépendante de l'énergie délivrée au transducteur. Contamine et al, 1994 ont observé que quand l'énergie délivrée au système est basse, la distribution de l'intensité des ultrasons est caractéristique d'une onde stationnaire dans la direction axiale.

Cependant, quand le pouvoir délivré au système augmente, l'intensité devient plus grande au centre du réacteur puis se dissipe dans la direction radiale. Par exemple à une énergie délivrée de 200 w, la région active dans la direction radiale est égale à celle de la sonde (la direction

radiale avait une activité négligeable). Une hauteur minimale d'un (01) centimètre de liquide doit être maintenue dans le réacteur en-dessous de laquelle le transducteur ne fonctionne pas correctement (**Ratoarinoro et al, 1995**).

Utiliser les systèmes d'ultrasons à sonde immergée présente les inconvénients suivants:

- Une érosion et un effritement de la pointe de la sonde, ce qui pourrait occasionner une contamination de la solution en réaction.
- À cause de pertes géométriques et des problèmes de découplage acoustiques, il est impossible de transmettre des intensités de cavitation à une immersion de la sonde à moins de 2-5 centimètres.
- Les systèmes à sonde immergée ne peuvent pas transmettre des ultrasons à un grand volume réactionnel.
- Les hautes intensités augmentent la possibilité d'altérer et d'endommager l'appareil et le fait qu'il puisse tomber en panne.

II.7.2.1 Les composantes d'un système d'ultrason à sonde immergée :

Il existe quatre composantes majeures d'un système d'ultrasons à sonde immergée qui sont : la source d'énergie, le convertisseur (transducteur), l'amplificateur et la sonde. L'énergie électrique fournie par la source d'énergie est transformée par le convertisseur en fréquences d'ultrasons.

Les fréquences d'ultrasons sont par la suite transmises à travers un amplificateur à la sonde. L'amplificateur aide à augmenter l'amplitude produite par le convertisseur. La sonde est un outil acoustique qui transfère l'énergie vibratoire directement au milieu réactionnel.

II.8 L'efficacité de désintégration des ultrasons :

Le but d'un traitement par les ultrasons est de détruire la paroi cellulaire et d'accéder aux composantes Intracellulaires. De plus, le traitement par les ultrasons permet de désintégrer les floes de boue et de casser les grandes particules organiques en de plus petites dimensions.

Différents paramètres ont été appliqués pour évaluer l'efficacité de désintégration de la boue ce qui inclut les analyses physiques (analyse des dimensions des particules) et chimiques (Mesure de la DCO) (**Guangming et al, 2006**). L'analyse de la dimension des particules est l'une des techniques adoptées pour évaluer l'efficacité de désintégration des ultrasons.

Show et al, 2007 ont étudié l'effet des ultrasons et leurs temps d'application sur la distribution des dimensions des particules et ont trouvé que cette distribution dans les dimensions des particules atteint son sommet à 30 μm , et le volume occupé par de plus petites particules augmente avec l'énergie fournie. Pour mieux comprendre l'effet du temps de traitement par ultrasons les distributions des dimensions des particules sont analysées respectivement pour leur temps d'exposition aux ultrasons. Il a été mis en évidence que les particules de taille supérieure à 4.4 μm ont été intensément désintégrer à un temps d'une (01) minute.

De plus, le volume occupé par les plus grandes particules (100 μm) était la résultante du phénomène du re-floculation. Ces auteurs ont conclu que l'énergie minimale exigée pour casser les parois cellulaires est approximativement de 1000 kJ/kg TS.

Chu et al, 2001 ont étudié l'effet des différentes densités d'ultrasons et du temps d'exposition sur la taille des floes à une fréquence de 20 kHz. Ils ont observés qu'au-delà d'une intensité de 0.22 W/ml il se produit une diminution dans les dimensions des particules et qu'à 0.44 W/ml, la dimension des floes était réduite à moins de 3 μm au bout de 20 min. Cependant une intensité supplémentaire d'ultrasons réduirait légèrement la dimension des floes.

Une autre étude menée par **Tiehm et al, 1997** a montré que le traitement par ultrasons appliqué à une fréquence de 31 kHz pendant 29.5 et 96 s pourrait diminuer la dimension des particules de boue de 165 μm à 135 μm et 85 μm , respectivement.

La DCO est un autre paramètre qui est utilisé pour évaluer l'efficacité de désintégration de la boue .C'est une mesure beaucoup plus quantitative comparée à l'analyse des dimensions des particules. Cependant, le traitement par ultrasons désintègre aussi les macromolécules extracellulaires (**Khanal et al, 2007**). Par conséquent la DCO est un paramètre clé pour mesurer la solubilisation de la boue. Presque toute la littérature traitant la désintégration par ultrasons utilise la DCO comme paramètre d'efficacité de désintégration de la boue (**Khanal et al, 2007**).

II.9 Les facteurs affectant l'efficacité de la biostimulation:

Beaucoup de facteurs pourraient affecter la biostimulation par les ultrasons y compris les caractéristiques de la boue (contenu TS, température, pH, et dimension des particules) et les paramètres reliés aux ultrasons eux-mêmes à savoir : le temps de traitement, l'intensité, la densité, la fréquence, et l'amplitude.

Grönroos et al, 2005 ont rapporté que la biostimulation d'une boue qui se traduit par l'étape de désintégration assistée par ultrasons augmente clairement le taux de DCO de la boue. Cependant, l'intensité des ultrasons, le TS de la boue, la température de la boue, et le temps du traitement par ultrasons représentent les paramètres les plus significatifs sur la désintégration. Ils ont aussi remarqué qu'une grande intensité d'ultrason associée à un court traitement était plus efficace et meilleure qu'une basse intensité d'ultrasons associé un temps de traitement plus prolongé.

III. Travaux récents sur la biostimulation ultrasonique

III.1 Introduction :

Dans les premiers temps les ondes sonores étaient utilisées par les sous-marins pendant la guerre, causant la mort des poissons ; et ceci a donné naissance aux méthodes de désactivation des cellules biologiques par les ultrasons. ; **Hughes et Nyborg, 1975** et **Alliger, 1962** ont étudié le mécanisme d'interaction des ultrasons avec les cellules microbiennes et ont observé qu'une brève exposition aux ultrasons peut amincir la paroi cellulaire attribué à la présence de cytoplasme en dehors de la paroi cellulaire.

Selon la fréquence, les ultrasons sont divisés en: basses fréquences d'ultrasons (20-100 kHz), hautes fréquences d'ultrasons (100-1 MHz), les fréquences pour les diagnostics (1-500 Mhz). L'application des ultrasons en médecine a commencé pendant le deuxième Guerre Mondiale et a été utilisé dans la technique de massage remplaçant les mains du masseur pour les malades qui souffrent de fractures (**Mason et al, 2002**). Avec les avancements de la technologie et la modernisation, les ultrasons (>20 kHz) sont utilisé dans plusieurs champs d'activité. Les ultrasons qui varient de 20 kHz à 100 kHz sont utilisé pour les systèmes chimiques (**Hall, 2000; Rucroft, 2005**). La gamme d'ultrasons allant de 1 MHz à 10 MHz sont employés dans différents domaines tels que la biologie animal, la navigation et la communication, le traitement des tumeurs bénignes et malignes, etc. (**Raichel, 2000; Kapucu, 2000**) ainsi que la rupture cellulaire pour la récupération des composantes intracellulaires (**Harrison, 1991**). Les vagues acoustiques moins que 20 Hz jusqu'à 0.001 Hz sont utilisées dans la sismologie (**Scruby, 1990**).

Afin d'améliorer les performances de production d'hydrogène une étude a été réalisé par **Wang et al, 2012** qui utilisent un photo-bioréacteur en continu avec *Rhodospseudomonas palustris* CQK 01 en suspension soumise à un traitement aux ultrasons après une période de start-up, à une fréquence de 20 kHz et la performance de production d'hydrogène a été évalué. En effet l'agitation par les ultrasons à fait considérablement chuter la concentration de substrat (glucose) dans la suspension de 300 à 50 $\mu\text{mol/L}$, et a fait augmenter considérablement le taux de conversion et le rendement de production d'hydrogène de comparativement à un photo-bioréacteur conventionnel. Par ailleurs les effets de l'intensité et du temps d'application des ultrasons, l'influence du débit de circulation du substrat et sa concentration, ont été étudiés et discuté. La production maximale d'hydrogène dans le

photo-bioréacteur en continu avec un traitement aux ultrasons a été obtenu sous les conditions suivantes : une d'intensité d'ultrasons de 40 w, un rapport agitation/temps de repos de 3/7 s, une concentration en substrat de 75 mmol/L et un débit de circulation du substrat de 40 ml/h, conduisant à un taux de production d'hydrogène de 1.12mmol/L/h et un rendement d'hydrogène de 0.23 H₂/mol- glucose .

Les deux formes de réacteurs (en batch et continu) ont fait l'objet d'une étude réalisée par **Guo et al, 2011**. Les deux réacteurs ont été soumis à de basses fréquences d'ultrasons afin d'augmenter la production d'hydrogène par une biomasse bactérienne. Le temps et l'intensité optimale de traitement aux ultrasons a été étudié par les expériences en batch et correspondent respectivement à 10 s et 100 W.

La production d'hydrogène a été augmenté de 20% alors que le temps de réaction en batch a été réduit par les ultrasons sous des conditions optimisées. Des expériences en continu ont été menées en parallèle sur deux lits granuleux de boue étendus (réacteurs EGSB).

Le réacteur EGSB traité aux ultrasons a donné un taux de production d'hydrogène spécifique de 4.38 L/g MVS.j soit l'équivalent de 32% d'augmentation du rendement de bioconversion par rapport à un réacteur témoin. La fermentation produisant de l'éthanol a été accomplie rapidement à un taux de 72.7% avec un temps de start-up réduit du fait de l'utilisation des ultrasons. L'activité microbienne ayant subi un traitement par ultrasons montre une résistance pour des milieux à faible valeur de pH et maintient un taux de production d'hydrogène satisfaisant.

Dans le but d'atteindre une meilleure réduction de l'excès de boue en utilisant les ultrasons, **He et al, 2010** ont utilisé un réacteur séquentiel en batch avec un temps de rétention hydraulique de 8 h soumis à des ondes ultrasoniques caractérisé par une énergie spécifique de 20 kWh/kg TS pour le traitement des eaux usées urbaines et lyse de la boue. Un nouvel index, EE, a été défini pour évaluer l'efficacité de l'intensité dans le système de réduction de la boue par les ultrasons. Les résultats ont montré que le paramètre opérationnel le plus important était la proportion de boue traitée par ultrasons (SP : sonicated proportion) sur laquelle l'intensité d'ultrasons a été appliqué et qui montre un impact direct et considérable sur l'efficacité de l'intensité ainsi appliquée. La limite supérieure de la proportion de boue soumise aux ultrasons SP dans cette étude était de 30%, au-delà de laquelle la qualité de l'effluent est inacceptable. Augmenter la proportion de boue traitée SP engendre une réduction de l'excès de boue plus importante associée à une consommation

supplémentaire d'énergie. Quand cette SP était de 30%, la réduction de l'excès de boue présentait la plus grande valeur (67.6%) et la consommation d'énergie était la plus grande (0.101 kWh/j). Avec un SP donné, la lyse fréquente de la boue ralentissait la réduction de boue.

Un traitement combinant les microbulles, et les hautes fréquences d'ultrasons correspondant à de faibles intensités a été appliqué sur un système traitant une eau industrielle. Il a montré d'excellents résultats dans le contrôle des bactéries et algues. À travers l'environnement hautement stressant créé par les ondes d'ultrasons, les populations biologiques de planctons peuvent subir une mort cellulaire programmée (PCD).

En outre, l'instabilité et la réduction du biofilm ont été observées dans les systèmes traités aux ultrasons et peut être attribué au stress lié à l'épuisement de la nourriture et au manque de sites de liaisons disponibles dans le biofilm (**Broekman et al, 2009**).

L'effet des ondes ultrasons sur la lyse de boue et son rendement a été étudié par **Mohammadi et al, 2011** à l'échelle pilote à l'aide d'un réacteur séquentiel en batch(SBR). Les résultats ont révélé que la réduction de l'excès de boue est affectée par de multiples facteurs: l'intensité fournie aux micro-organismes de la boue, l'énergie utilisée pour la génération des ondes d'ultrasons, la durée du traitement, et le pourcentage de boue exposé au traitement. L'augmentation de l'intensité fournie aux micro-organismes de la boue a montré une réduction de l'excès de boue, mais les énergies supérieures à 35,000 kJ/kg MVS produisent aucun effet significatif. De plus, l'augmentation du temps de rétention combiné à une intensité moindre donne de meilleures performances dans la réduction de l'excès de boue.

L'utilisation d'ondes ultrasons pour la réduction de l'excès de boue détériore la qualité de l'effluent du réacteur et permet aussi d'augmenter le volume de boue lysé par les ultrasons. Ces dernières années, les technologies liées aux ultrasons ont été utilisés comme une option alternative au traitement par la chaleur comme moyen de conservation de la nourriture, ceci en désactivant les micro-organismes et enzymes. Les traitements thermiques présentent des méfaits qui sont de tuer les micro-organismes végétatifs et de détruire les spores, et font disparaître les propriétés organoleptiques.

Chandrapala et al, 2012 ont étudié la possibilité d'utilisation des ultrasons comme technique de pasteurisation et de conservation des aliments en désactivant beaucoup d'enzymes et micro-organismes à basse température : condition dans laquelle la qualité des

aliments peut être améliorée, et de leur garantir la stabilité et la sécurité du consommateur. De plus, les changements des propriétés physiques des ultrasons, tel que la désintégration causée par les constituants des aliments sont utilisés dans des applications de contrôle de qualité des aliments.

Le taux de libération des protéines intercellulaires en provenance des cellules de levures sous l'action d'ultrasons est proposé comme un modèle d'évaluation des effets physiques (mécaniques) causés par les ultrasons. La concentration de la protéine a été quantitativement déterminée en utilisant la spectrophotométrie. Différents paramètres ont été examinés à savoir : l'effet de l'origine des cellules de levure, le prétraitement des cellules, et les longueurs d'ondes pour la détermination par spectrophotométrie du contenu de la protéine. L'efficacité de la méthode d'évaluation proposée a été démontrée expérimentalement en changeant les conditions d'irradiation par ultrasons (la concentration des cellules de levure, la température, l'intensité des ultrasons, les types de sondes d'ultrasons, en plus de l'agitation mécanique). Les résultats ont ainsi confirmé les effets physiques des ultrasons sur la production de protéines qui a augmenté linéairement avec l'augmentation de l'intensité des ultrasons pour atteindre un maximum de 80 mg par gramme de levure à une intensité de 90 w. **(Iida et al, 2008).**

Dans le but de mettre en évidence l'effet stimulant et/ou stressant des ultrasons sur les cellules ou les tissus cellulaires, **Liu et al, 2002** ont étudié la croissance et la prolifération des cellules d'*Oryza sativa* Nipponbare (cellules du riz) dans une culture en suspension irradiée aux ultrasons. Après que les échantillons aient été soumis aux ultrasons à 28 kHz, des mesures de la croissance et la prolifération par le biais d'un essai colorimétrique MTT ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl bromure du tétrazolium) ainsi que le poids frais des cellules ont été déterminés à différents temps de traitement allant de 2 à 120 s. Dans la méthode du MTT, la densité optique a été déterminée à 570 nm dans la culture cellulaire en suspension pendant dix(10) jours après l'agitation ultrasonique. Lorsque l'agitation aux ultrasons va Jusqu'à cinq (05 secondes) la DO à 570 nm a augmenté; elle a diminué pour une stimulation plus prolongée. En effet la stimulation par les ultrasons peut promouvoir la croissance et la prolifération des cellules d'*Oryza sativa* Nipponbare dans une culture en suspension avec une stimulation optimale de 5 s, alors qu'avec une plus longue agitation, sa croissance et prolifération est inhibé.

Il se passe que le mécanisme des ultrasons peut activer ou détruire la structure cellulaire, tel que la membrane cellulaire, cytosquelette (paroi cellulaire) et mitochondrie dans lesquels beaucoup d'enzymes et canaux d'ions sont affectés. De plus, l'amélioration de la perméabilité de la membrane cellulaire et fluidité membranaire peuvent être des facteurs qui encouragent la croissance cellulaire en cinq(05) secondes de stimulation ultrasonique.

Un flux continu de traitement ultrasonique a été mis en place par **Villamiel et al, 2000** afin de générer et d'imposer de hautes intensités d'ultrasons pour la désactivation des bactéries les plus importantes dans l'industrie laitière. Une étude comparative a été établie en utilisant un échangeur de chaleur tubulaire conventionnel sous des conditions des similaires. Les germes *Pseudomonas fluorescens* et *Streptococcus thermophilus*, inoculés dans le TrypticaseO Soy Broth(TSB), ont été désactivés par les ultrasons, la forme (Gram-Négative) étant moins résistante que la (Gram-Positive). L'efficacité des ultrasons peut être diminuée avec l'augmentation de la température pendant le traitement, un effet supplémentaire a été observé entre la chaleur et les ultrasons. Ce résultat a été prouvé par simulations sur ordinateur qui comparent les ultrasons avec un traitement thermique conventionnel. Les résultats Préliminaires obtenus sur le lait ont démontré que le traitement ultrasonique en flux continu pourrait être une technique prometteuse pour la pasteurisation. Cette méthode a plusieurs avantages tels : l'homogénéisation du lait et une consommation moindre d'énergie comparée aux systèmes thermique conventionnels.

Matériels et Méthodes

IV. Matériels et méthodes :

IV.1 Introduction :

Ces dernières années la dynamique des travaux de recherches dans le domaine du traitement des eaux potables vise à réduire et optimiser le facteur temps. Ceci passe par la biostimulation des procédés par différentes méthodes à savoir : le champ magnétique, les rayons x et les rayons gamma afin d'améliorer le rendement des systèmes microbiologiques. Notre contribution innovatrice est que ce travail se propose d'étudier la biostimulation de la dénitrification par les ondes ultrasons sur une biomasse bactérienne en suspension.

Etant donné que l'efficacité de ce procédé dépend de la capacité des microorganismes (bactéries dénitrifiantes) à transformer les nitrates en azote gazeux nous avons déterminé et comparé les paramètres d'exploitation du procédé à celui d'un réacteur conventionnel. Nous avons utilisé les paramètres suivants : l'intensité des ultrasons, le rapport entre le temps de traitement par ultrasons et temps de repos, la concentration initiale en nitrate appliquée ainsi que le pH de l'eau.

IV.2 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 dans les conditions de fonctionnement est nécessaire pour la mise en marche du bioréacteur. La source de bactéries dénitrifiantes est une boue activée prélevée au niveau de la station d'épuration des eaux usées de Baraki dans la wilaya d'Alger.

Le réacteur d'acclimatation de la boue est composé d'un erlenmeyer de 02 litres, d'un barreau magnétique, d'une plaque d'agitation chauffante et d'un bouchon. Une quantité de boue (environ 1litre) est introduite dans l'erien et complétée avec une alimentation riche en nitrates afin de favoriser le développement de la biomasse dénitrifiante. Le dispositif fonctionne en anoxie à la température du laboratoire (20-25 °C) avec des quantités suffisantes d'acétate de calcium comme source de carbone ainsi qu'une agitation modérée pour homogénéiser le milieu. 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.

IV.2.1 Composition de l'alimentation en discontinu :

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

Composé	Alimentation en discontinu
NaNO ₃	1645 mg/L = 1200 mg de NO ₃ ⁻
KH ₂ PO ₄	2 g/L
FeSO ₄	10 mg/L
MgCl ₂	25 mg/L
Acétate de calcium	En excès

IV.2.2 Essai de dénitrification :

Préalablement à des essais à l'échelle industrielle, une étude au laboratoire doit être réalisée afin de déterminer les conditions de fonctionnement. Deux réacteurs séquentiels en batch ont été mis en fonctionnement:

- L'un est soumis à un traitement aux ultrasons.
- L'autre sans être exposé aux ultrasons.

Ces deux pilotes de laboratoire ont été mis en fonctionnement dans des conditions identiques d'alimentation et de concentration initiale en nitrates.

IV.3 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).

IV.4 Description du dispositif expérimental :

Les expériences de dénitrification sont réalisées dans un réacteur séquentiel en batch de 500 ml soumis à une agitation mécanique en continu. Une sonde de forme piézométrique se terminant par une tête faisant six(06) mm de diamètre (JY92-IIN, China) émet des ultrasons est plongée dans le mélange réactionnel à une profondeur de deux centimètres.

Un traitement intermittent aux ultrasons avec un temps spécifique est communiqué au réacteur et des prélèvements sous agitation sont effectués chaque trente (30) minute et dosés à l'aide d'un spectrophotomètre (optizen view, China).

Les performances du réacteur soumis aux ultrasons sont mesurées à différentes intensités d'ultrasons, différents temps d'exposition aux ultrasons, différentes concentrations en nitrates et différentes valeurs de pH du milieu réactionnel.

L'unité opère à température ambiante. L'alimentation est mélangée à la boue (concentration en biomasse bactérienne égal à 0.29 % de matière sèche) et introduite dans le réacteur. Le réacteur fonctionne ainsi en absence d'oxygène. Le réacteur, fermé à l'atmosphère, est muni d'un point de prélèvement pour la prise d'échantillon. Ceci permettra de déterminer la concentration en nitrates à divers temps lors du déroulement de la dénitrification et donc d'évaluer les rendements d'élimination des nitrates en fonction du temps. Le dispositif expérimental est représenté à la **Figure II.1**

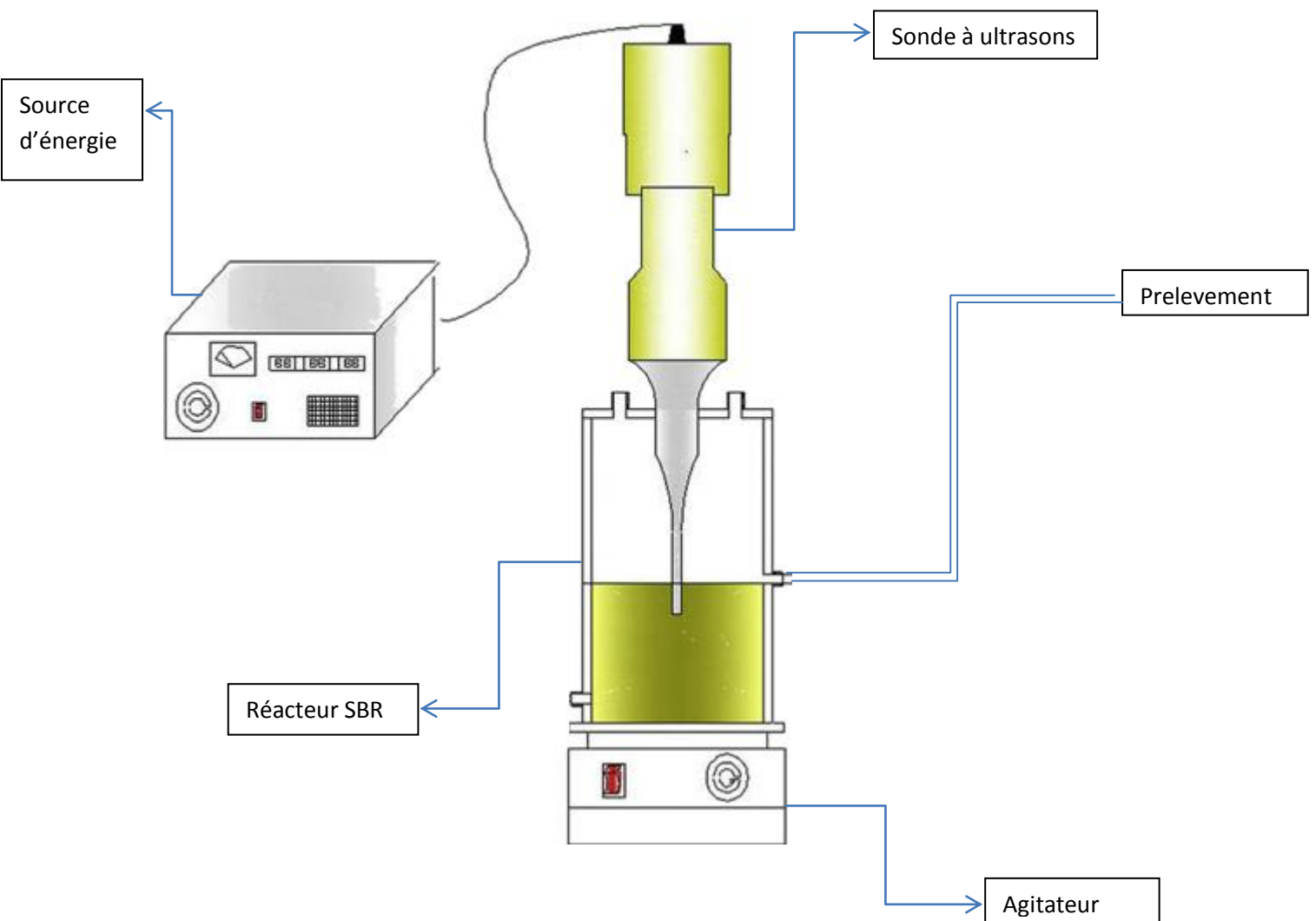


Figure II.1 : Le Montage expérimental

Selon l'étude réalisée par **Wang et al, 2012** portant sur la production d'hydrogène par *Rhodospseudomonas palustris CQK 01* dans un photobioréacteur en continu avec un traitement aux ultrasons nous avons choisi une intensité de départ de 40 w et un rapport temps de traitement/temps de repos de 03 s/07 s, dans le but de tester la faisabilité du procédé. Par la suite ces deux paramètres seront optimisés pour notre réacteur séquentiel en batch.

IV.5 L'eau d'alimentation :

Le réacteur est alimenté par l'eau du robinet dopé en nitrates. Le pH est ajusté en ajoutant un volume d'acide chlorhydrique pour varier l'acidité du milieu et de la soude pour la basicité.

Résultats et discussions

IV.6 Résultats et discussions :

IV.6.1 L'évaluation de l'effet des ultrasons sur l'activité dénitrifiante :

Pour évaluer le potentiel de dénitrification avec un traitement aux ultrasons, deux expériences en parallèle ont été conduites, la première a été réalisée dans un réacteur en batch soumis aux ultrasons et la deuxième dans un réacteur conventionnel sans traitement aux ultrasons et servant de témoin. Les deux bioréacteurs ont opéré dans les mêmes conditions.

Le traitement par ultrasons, change et altère la perméabilité de la membrane cellulaire et les alentours vivants ce qui affecte sûrement le cycle de croissance et les chemins métaboliques des cellules et induit des changements des performances de la bioconversion. Dans nos expériences, le traitement par ultrasons a été appliqué en intermittence à des intervalles de temps bien définis. En ce qui concerne le traitement intermittent par les ultrasons, l'intensité et le temps d'application des ultrasons sont deux paramètres clés. Les résultats sont illustrés sur la **Figure II.2** :

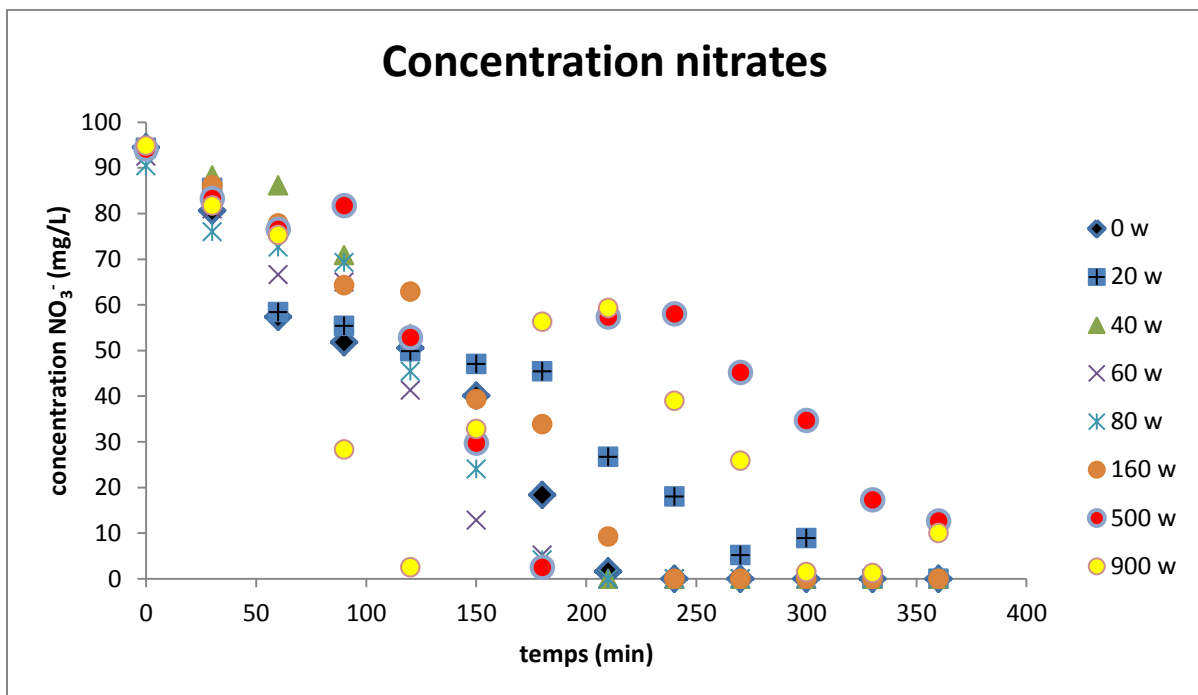


Figure II.2 : Evolution des concentrations en nitrates en fonction du temps à différentes intensités d'ultrasons.

L'analyse des résultats obtenus montre que le taux d'élimination des nitrates était relativement bas à une intensité d'ultrason de 20 W et a connu par la suite une augmentation considérable avec l'augmentation de l'intensité des ultrasons.

Quand l'intensité des ultrasons a été augmentée les performances de dégradation des nitrates ont été améliorées. Le temps d'élimination et de dégradation des nitrates a atteint ses meilleures valeurs pour une intensité d'ultrasons de 60 w et ce pour une concentration en nitrates de 100 mg/L ; il est de 210 minutes pour le réacteur soumis aux ultrasons et de 240 min pour le témoin. D'après **Liu et al, 2002** le mécanisme des ultrasons peut activer ou détruire la structure cellulaire, tel que la membrane cellulaire, le cytosquelette (paroi cellulaire) et les mitochondries dans lesquels beaucoup d'enzymes et canaux d'ions sont affectés. De plus, l'amélioration de la perméabilité de la membrane cellulaire et la fluidité membranaire peuvent être des facteurs qui encouragent la croissance cellulaire

Quand l'intensité des ultrasons atteint les valeurs de 500 et 900 w. le temps d'élimination des nitrates s'est vu augmenter jusqu'à atteindre le double du temps mis pour l'optimum de la dénitrification (60 w). Ceci peut être attribué à la sur-stimulation des cellules traitées par ultrasons à de hautes intensités induisant des dégâts cellulaires, des pertes en biomasse et désactivation d'enzymes intracellulaire traduit par une suraccumulation des nitrites qui persistent suite à une inhibition de la nitrite réductase affectant ainsi la croissance des cellules et le chemin métabolique du substrat (**Bidlas et al, 2008 ; Mellefont et al, 2008**).

Il est à noter que la diminution du temps de dégradation des nitrates dans la gamme d'intensités allant de 40w à 120 w représente un des signes de changement dans le chemin métabolique. Il semblerait qu'une intensité convenable d'ultrasons agissant sur notre biomasse en suspension pourrait assurer une rapide conversion nitrates/azote gazeux et une activité bactérienne intense.

D'autre part il existe beaucoup d'effets biologiques dû à la cavitation. Pour la cavitation stable l'agitation due aux ultrasons augmente le transport du substrat (**Nyborg et al, 2001**). De plus la technique basée sur les ultrasons utilisés pour le contrôle et la rupture réversible de la membrane est appelé sonoporation (**Deng et al, 2004**). C'est une technique où la cavitation induite par microbulles permet d'ouvrir les pores situés dans la membrane cellulaires ce qui fait augmenter la perméabilité des microorganismes suivi par un retour et un recouvrement de la cellule à son état initial (**Ohl et al, 2006**)

Cependant, la sonoporation devrait être utilisée avec prudence; bien que les cellules ayant subi la sonoporation recouvrent leur état initial et restent viables (**Karshafian et al, 2009**), car une étude récente montre que la sonoporation peut mener à un arrêt dans les échanges cellulaires (**Zhong et al, 2011**)

Pour la dénitrification en batch traitée par de grandes intensités en ultrasons, la cinétique de dénitrification a été perturbée, car les nitrates ont été accumulés à l'intérieure de la cellule bactérienne. Nous avons observé une disparition total des nitrates dans le milieu réactionnel suivi par leur réapparition due au transfert réversible des nitrates entre les deux milieux intra et extra cellulaires.

On peut observer sur la **Figure II.3** du graphe nitrites que pour les différentes intensités appliquées les allures des courbes de nitrites sont similaires pour les intensités allant de 0 à 160 w avec des pics correspondants à des concentrations maximales de nitrites comprises entre 0.6 et 1 mg/L. Pour les grandes intensités de 500 et 900 w les nitrites produits ont tendance à s'accumuler dans le milieu. En effet le temps nécessaire à leur élimination est suffisamment élevé, il est de l'ordre 500 min et ce pour les deux intensités. Dans ces conditions la génération de microbulles permet d'ouvrir les pores situés dans la membrane cellulaire ce qui fait augmenter la perméabilité des microorganismes suivi par un retour et un recouvrement de la cellule à son état initial (Ohl et al, 2006)

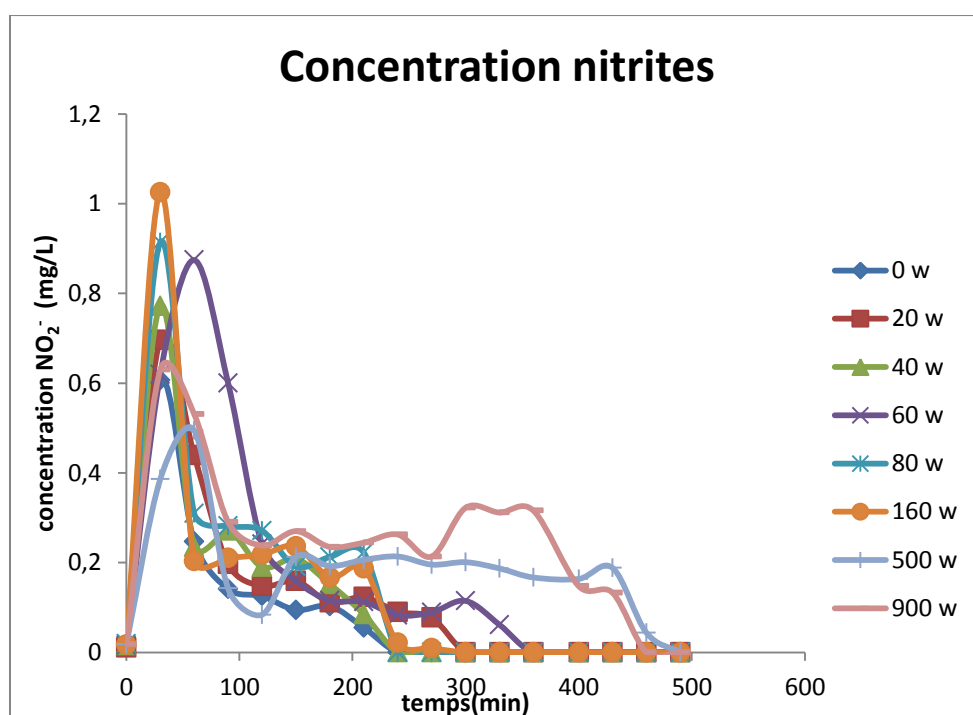


Figure II.3 : Evolution des concentrations nitrites en fonction du temps à différentes intensités d'ultrasons.

IV.6.2 Optimisation du rapport temps de traitement/temps de repos :

Le temps d'agitation des ultrasons pendant un traitement joue aussi un rôle crucial dans l'influence de l'élimination des nitrates (**Khanal, 2007**). Par conséquent l'effet du temps d'agitation par les ultrasons a été étudié pour notre réacteur (SBR) et les résultats sont illustrés sur la Figure II.4

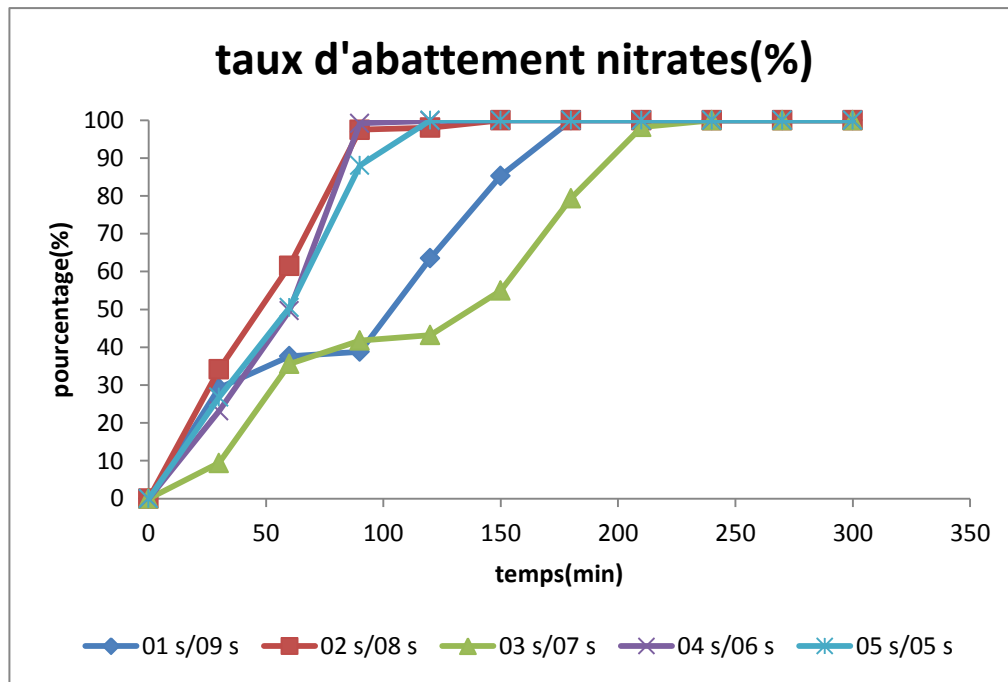


Figure II.4. Evolution du taux d'abattement des nitrates en fonction du rapport temps de traitement/temps de repos par les ultrasons.

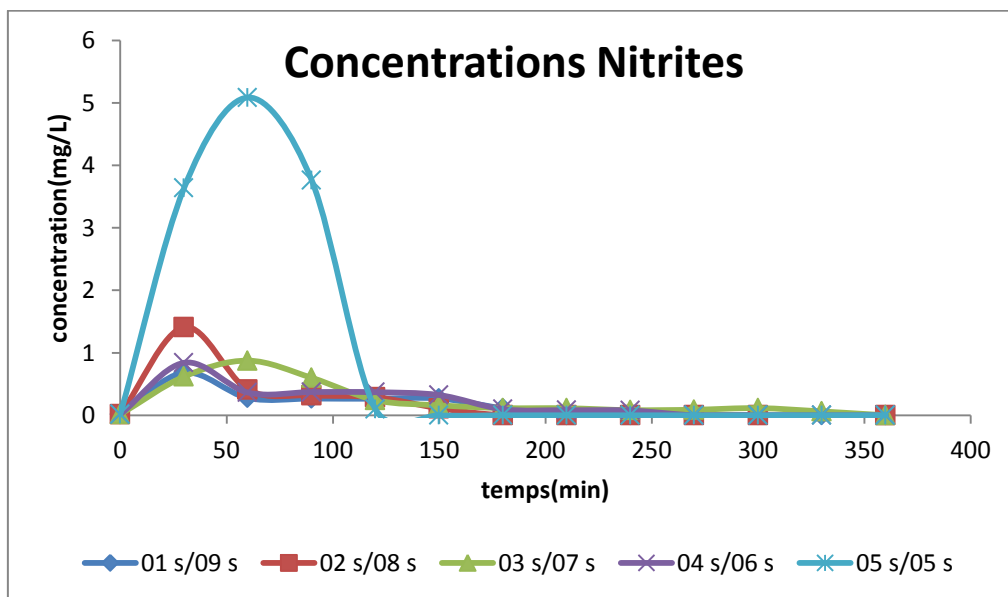


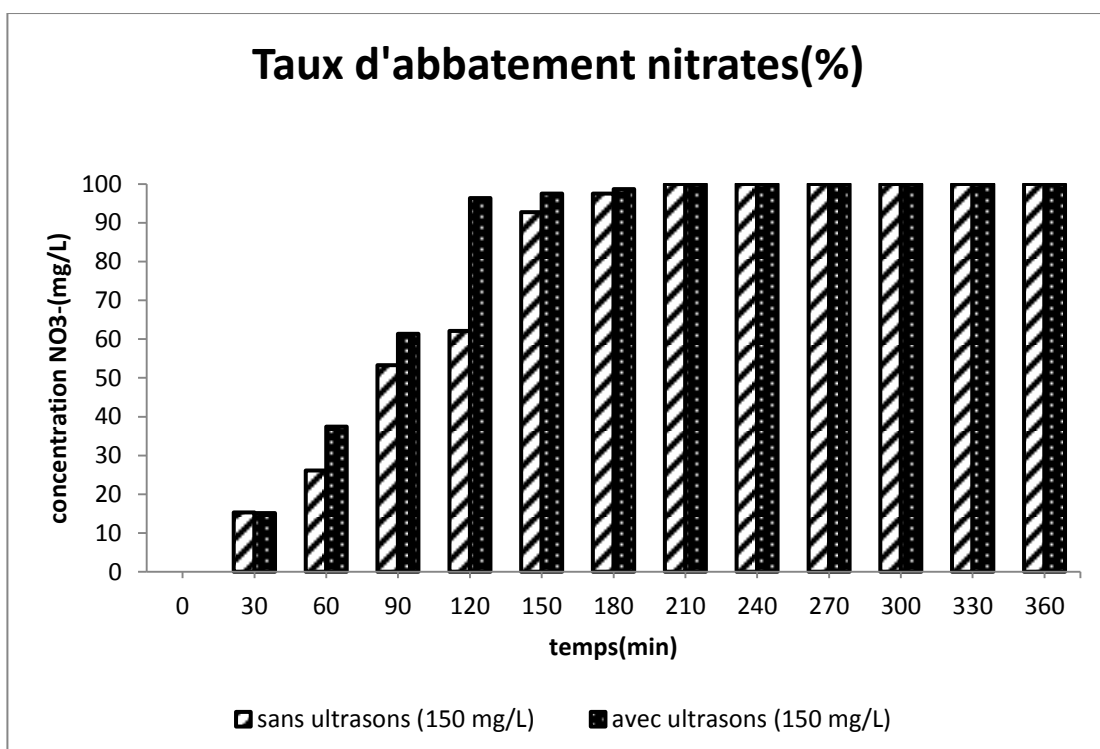
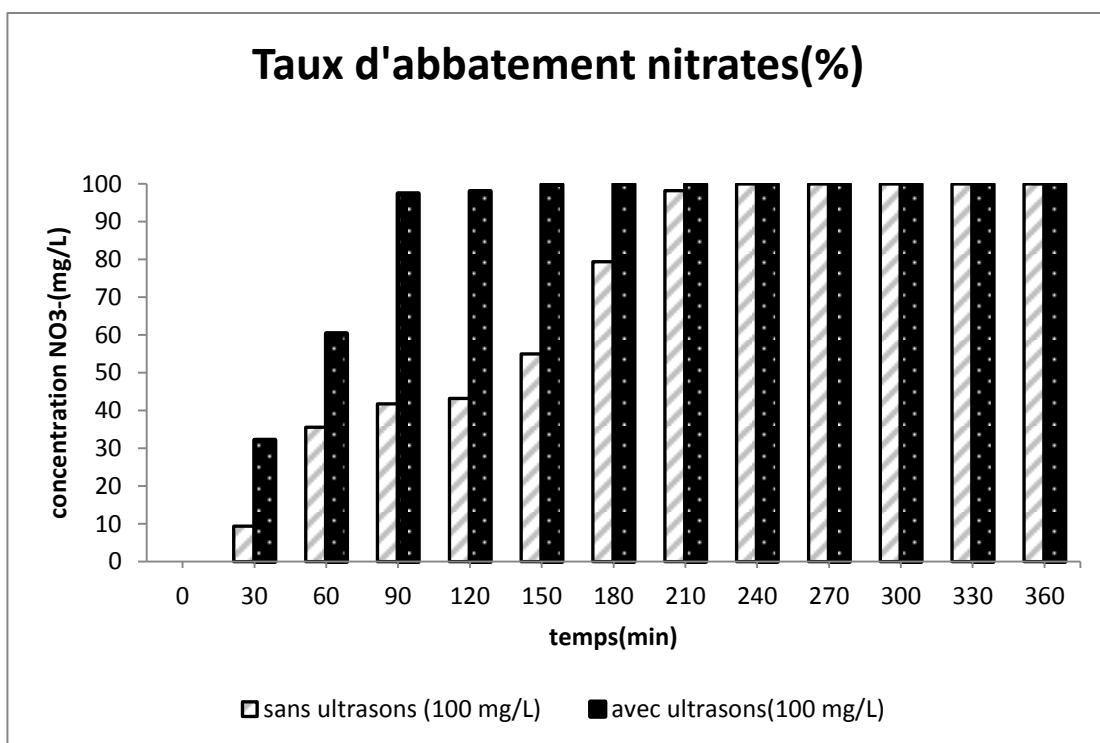
Figure II.5. Evolution des nitrites en fonction du rapport temps de traitement/temps de repos par les ultrasons.

Le temps d'exposition et traitement par les ultrasons a été varié de 01 s à 05 s et le temps de repos de 09 s à 05 s dans le but d'obtenir une variation du rapport temps de traitement/temps de repos allant de 0 à 1 . Quand le temps de traitement par ultrasons est passé de 1 s à 2 s, le taux d'élimination des nitrates a atteint sa valeur maximale en un temps relativement court remarqué par une pente très accentuée de la courbe des taux d'abattements des nitrates en fonction du temps (**Figure II.4**). Par la suite une exposition supérieure à 03 s a montré un ralentissement de la cinétique de dénitrification comparé à celle obtenu avec un temps de traitement de 02 s. En effet l'optimum de dénitrification est atteint avec un temps d'exposition optimal de 02 s correspondant à un taux d'élimination de 100 % en 150 min de réaction. On remarque pour les nitrites dont les variations au cours du temps sont représentées par la **Figure II.5**. Un pic prononcé pour un temps d'exposition de 05 s signifie que, la réduction d'une quantité importante de nitrates a eu lieu suite au phénomène cité précédemment (perméabilité améliorée dû à la sonoporation) ce qui met en évidence la relation entre le temps de traitement et l'efficacité du procédé.

Ceci montre que même avec l'augmentation du temps de traitement par ultrasons, le taux d'élimination des nitrates et la perméabilité de la membrane sont toujours meilleurs comparé à une dénitrification conventionnelle.

IV.6.3 Effet de la concentration en nitrates de l'effluent :

L'influence de la concentration en substrat est un facteur prépondérant qui affecte d'une manière directe les performances d'un réacteur de dénitrification. Par conséquent, l'effet de la concentration initiale sur la performance d'élimination des nitrates a été étudié et les résultats sont montrés sur la **Figure II.6** :



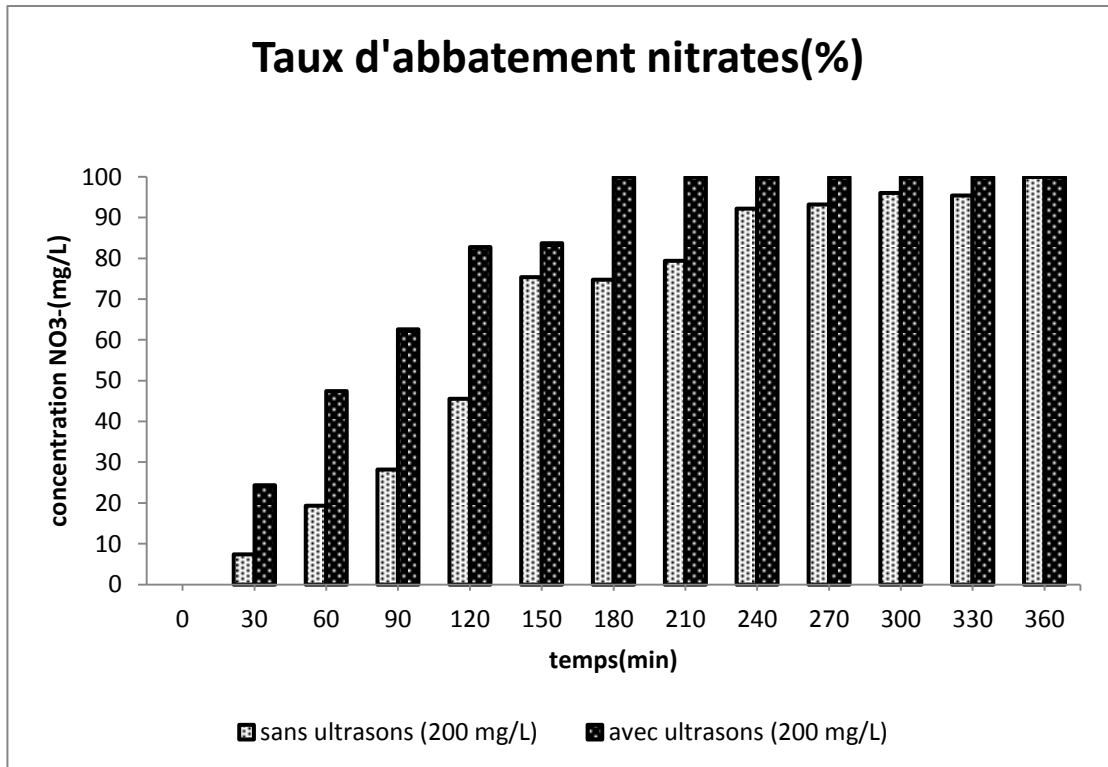


Figure II.6. Evolution des taux d'abattement des nitrates en fonction du temps à différentes concentrations initiales en nitrates

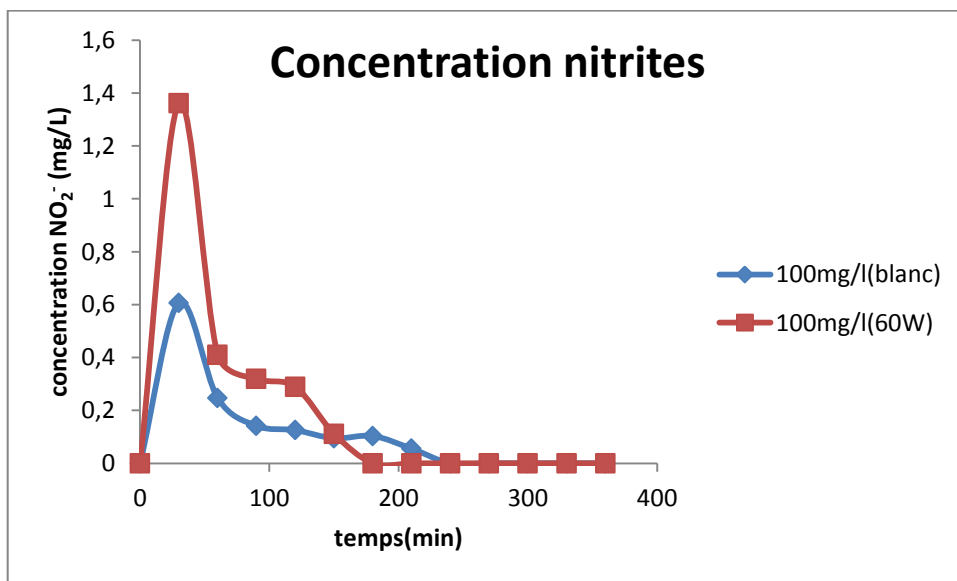


Figure II.7. La concentration des nitrites en fonction du temps à 100 mg/L

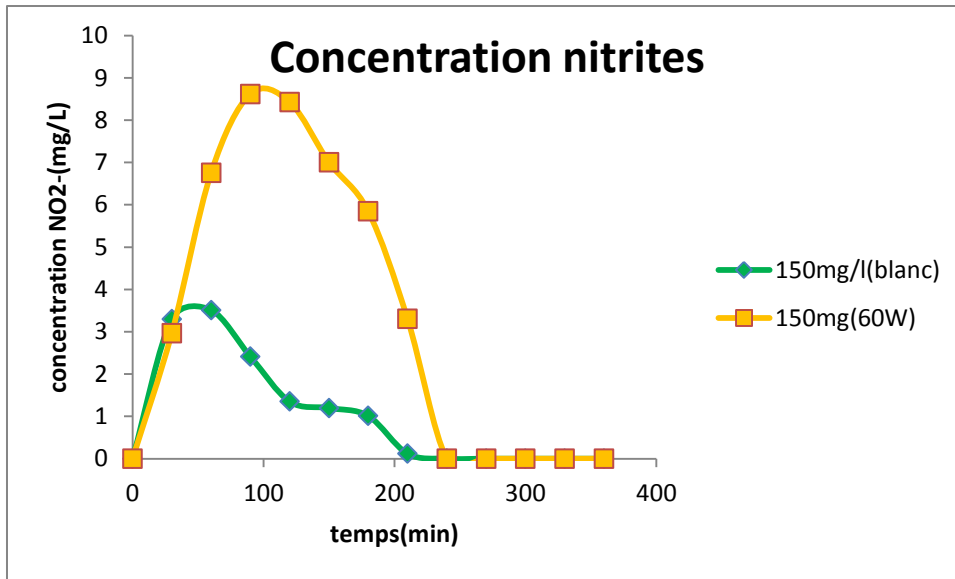


Figure II.8. La concentration des nitrites en fonction du temps à 150 mg/L

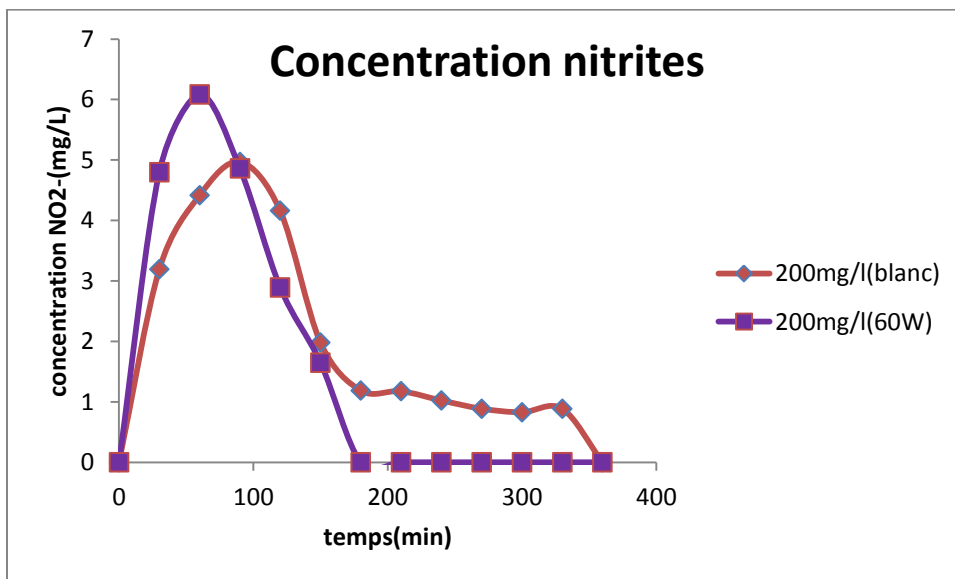


Figure II.9. La concentration des nitrites en fonction du temps à 200 mg/L

Pour une gamme de concentration initiale en nitrates allant de 100 à 200 mg/L, un rendement de dénitrification de 100 % est atteint en un temps deux fois moins par rapport à une dénitrification conventionnelle ceci quel que soit la concentration initiale. Cela peut être attribué à une haute activité des cellules traitées par les ultrasons. La concentration des nitrates serait le facteur dominant dans les pertes cellulaires dû à la toxicité des nitrites

(Akkerman et al, 2002). Cependant le temps de dégradation des nitrates augmente et se rallonge pour de grandes concentrations initiales en nitrates.

Pour les nitrites on observe pour toutes les variations dans les concentrations initiales en nitrates un pic de production plus important lors de l'application des ultrasons pour les concentrations de 100 et 150 mg/L (Figure II.7. et Figure II.8.) Qui s'expliquerait par une perturbation de la biomasse bactérienne et au stress occasionné par les phénomènes de cavitation résultant de l'application des ultrasons

IV.6.4 Effet de la variation du pH sur le processus de dénitrification :

Dans notre étude, il est apparu que le temps d'élimination des nitrates dans l'effluent augmente avec l'augmentation du pH. Il est meilleur pour les pH basiques : optimal à la valeur pH=08 (Figure II.10). La concentration des nitrites dans les deux réacteurs de dénitrification fonctionnant à pH basique, dépasse énormément la valeur standard (> 0,1mg/L). En effet les concentrations en nitrites ont atteint des pics à 6 et 10 mg/L. Il y'a donc accumulation des nitrites résultant d'un blocage de la fonction dénitrifiante, comme le montre la Figure II.11 :

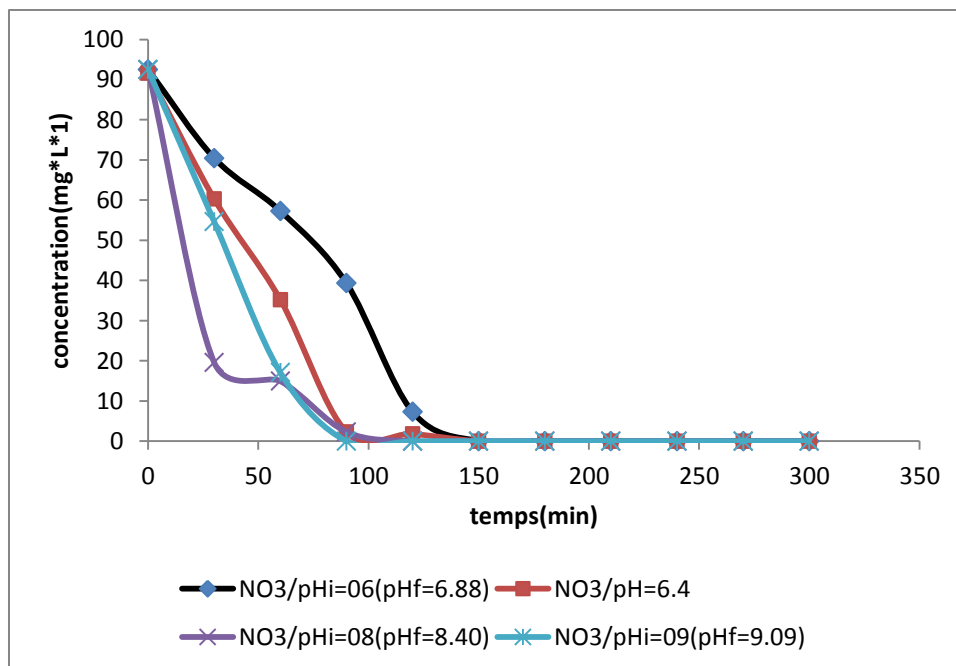


Figure II.10. Evolution des concentrations en nitrates en fonction du temps à différentes valeurs de pH dans le milieu dénitrifiant. Concentration initiale en NO₃⁻ N de 100mg/l.

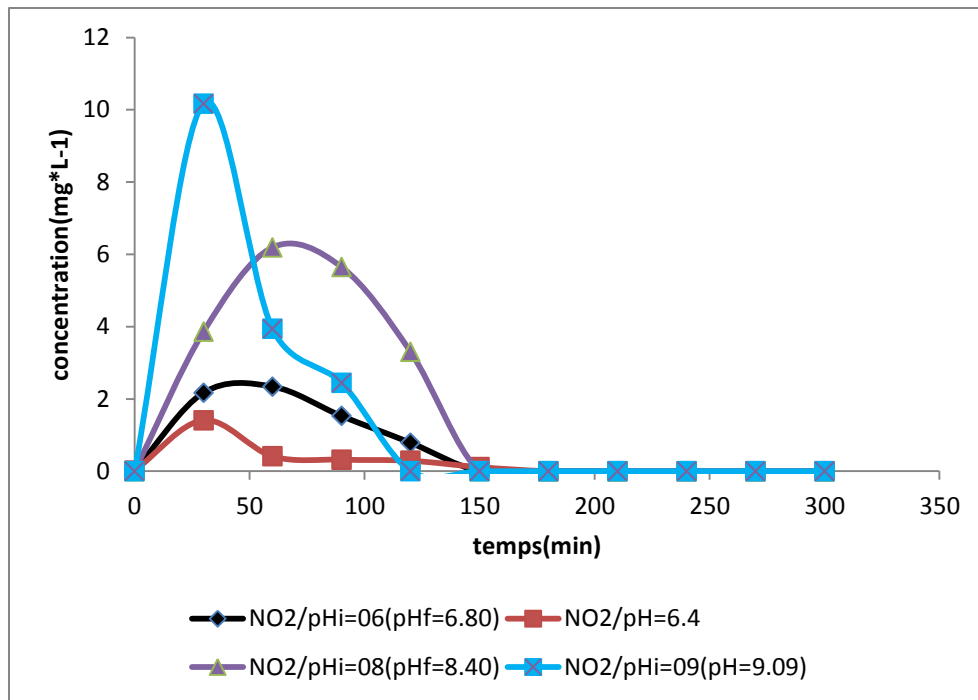


Figure II.11. Evolution des concentrations en nitrites en fonction du temps à différentes valeurs de pH dans le milieu dénitrifiant. Concentration initiale en NO₃⁻ N de 100mg/l.

Ces résultats montrent que l'activité dénitrifiante est maximale aux pH légèrement basiques (7,5-7,9). Ils sont en concordance avec ceux trouvés par **Wang et al, 2009**. 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 restreints 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 en étroite relation avec le pH. Un pH neutre (7,5-7,9) est nécessaire pour que la rentabilité du procédé soit maximale.

L'application des ultrasons conduit à la cavitation qui se manifeste par d'intenses effets physicochimiques : sonoluminescence et l'augmentation brutale de la température locale, qui donnent lieu à la formation de radicaux libres (La sonolyse de l'eau produit des radicaux hydroxyles (OH[•]) et du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)) (**Fang et al, 1996**)

Le changement de la valeur du pH dans le milieu avant et après irradiation aux ultrasons est directement causé par l'apparition des radicaux OH résultant du phénomène de cavitation, aussi les ultrasons produisent beaucoup plus de radicaux OH lorsque le pH du milieu tend à être acide améliorant ainsi les performances de dénitrification.

Conclusion générale

Conclusion :

Dans le but de traiter efficacement la pollution des eaux souterraines par les nitrates, nous avons mis en fonctionnement un réacteur séquentiel en batch avec des microorganismes en suspension soumis aux ultrasons. Le présent travail a permis d'évaluer le potentiel de la biostimulation ultrasonique de l'élimination des nitrates. Les expériences ont montré que l'exposition des microorganismes aux ultrasons a augmenté considérablement la vitesse de réduction des nitrates. Ce résultat montre que les ultrasons peuvent être utilisés comme système d'activation et d'amélioration des mécanismes d'échanges cellulaires des microorganismes endogènes dénitrifiants .

Le traitement aux ultrasons appliqué au réacteur séquentiel en batch permet d'améliorer la biodégradabilité de l'effluent comparativement à celle obtenue avec un réacteur conventionnel non irradié, de même que l'activité bactérienne se trouve améliorée par une stimulation des échanges membranaires.

Les performances du réacteur séquentiel en batch ont été optimisées en utilisant deux pilotes à l'échelle du laboratoire, l'un non traité et l'autre irradié aux ultrasons. Les résultats obtenus se résument comme suit :

- L'intensité de traitement pour l'élimination des nitrates a été optimisée et ceci en variant cette dernière de 0 à 900 w, l'intensité optimale est de 60 w qui permet une dégradation totale des nitrates en 180 min. L'intérêt de ce facteur est que la performance de la dénitrification est associée à ce paramètre (blocage de la fonction dénitrifiante)
- Les deux réacteurs ont permis l'élimination totale des nitrates pour des concentrations initiales de 100,150 et 200 mg/L.
- Un pH optimal de 08 est nécessaire pour réduire le temps de la réaction de dénitrification.

L'optimum du temps de dénitrification avec stimulation aux ultrasons est d'une demi-heure avec une intensité de traitement aux ultrasons de 60 w, un rapport entre le temps de traitement / temps de repos de 02 s / 08 s, une concentration en nitrates de 100 mg/L et un pH du milieu réactionnel de 08.

Conclusion

Enfin, le présent travail nous a permis de confirmer la possibilité d'utilisation des ultrasons comme moyen d'amélioration des performances des bioprocédés (dénitrification hétérotrophe). A l'égard de ces résultats, nous proposons :

- Etudier la possibilité d'utiliser le traitement ultrasonique comme start-up pour les procédés de dénitrification en continue en vue d'améliorer leurs performances épuratoires
- D'appliquer cette technique aux bioprocédés produisant des métabolites de hautes valeurs ajoutées utilisant des souches purs afin d'améliorer leur compétitivité par rapport aux procédés de synthèse.

Références bibliographiques

Adewuyi Y.G, Sonochemistry. (2001). environmental science and engineering applications, Ind. Eng. Chem. Res. 40 4681–4715.

Aimar P. Bacchin P. Maurel A. (2005).Filtration membranaire (OI, NF, UF, MFT), Aspects théoriques : mécanismes de transfert, Technique de l'ingénieur

Akkerman I, Janssen M, Rocha J, Wijffels RH. (2002). Photobiological hydrogen production: photochemical efficiency and bioreactor design. Int J Hydrogen Energy;27:1195-208.

Alliger H, (1975) . Ultrasonic disruption, Am. Lab. 10 75–85.

Bae B, Jung Y. Han W & Shin H. (2002). Improved brine recycling during nitrate removal using ion exchange, Water Research, 36, 3330–3340

Barbault R. (2000). Ecologie générale structure et fonctionnement de la biosphère, Paris, Eds Dunod,

Bidlas E, Du T, Lambert RJW. (2008). An explanation for the effect of inoculum size on MIC and the growth/no growth interface.Int J Food Microbiol; 126:140-52.

Boeglin J. (2007). Traitements biologiques des eaux résiduaires, Technique de l'ingénieur 2007, vol. G3, n°G6250

Bougrier C, Carrere H, Delgenes JP. (2005). Solubilization of waste-activated sludge byultrasound treatment. Chemical Engineering Journal, 106:163-169.

Bremner D. (1990). Advances in Sonochemistry, ed. T. J. Mason, JAI Press, London, Vol. 1, pp. 1–37

Broekman S. Pohlmann. O. Beardwood. E.S. Cordemans de Meulenaer. E. (2010). Ultrasonics Sonochemistry Volume 17, Issue 6, Pages 1041–1048

Chand P. (2008) Enhancing biodiesel production from soybean oil using ultrasonics. Iowa State University, Ames, Iowa

Chaussé K., Phaneuf D, & Levallois P. (2003).Synthèses sur l'eau potable et la santé humaine, Nitrates/Nitrites, Institut national de santé publique du Québec, Québec,

- Chu CP, Chang B, Liao GS, Jean DS, Lee DJ. (2001).** Observations on changes in
- Clément B & Yan L. (2005).** Les nitrates, Licence biologie en traitement des eaux, Université catholique de l'Ouest, Bretagne Nord.
- Cravotto G, Cintas P. (2006).**The royal society of chemistry, 35,180-196
- Crini G. Badot P. (2007).**Traitement et épuration des eaux industrielles polluées, procédés membranaires bioadsorption, France .
- CY Lin, JM Yang, Chen CT, Hsu YW, Huang CJ, Chen CC, Tsai HJ.(2009).** Anesthetic management of a patient with congenital methemoglobinemia.Acta Anaesthesiol Taiwan; 47(3):143—6.
- Deng C. X., Sieling F. Pan H and Cui. (2004).**Ultrasound J. Med. Biol.30, 519–526.
- Digby M, Duck F.A, Lenz E.J, Price G.J. (1995).** Technical note: measurement of collapse cavitation in ultrasound fields, Brit. J. Radiol. 68 1244–1248.
- Fang X, Mark G, von Sonntag C. (1996).** OH radical formation by ultrasound in aqueous solutions part I: the chemistry underlying the terephthalate dosimeter, Ultrason. Sonochem. 3 57–63.
- Flint E.B and Suslick. K. S (1991).** “The temperature of cavitation” Science 253: 1397-1399
- Fojt L, Strašák L, Vetterl V. (2007).** Volume 70, Issue 1, Pages 91–95
- Gonzalez-Garcia J, Saez V, Tudela I, Diez-Garcia M.I, Esclapez M.D, Louisnard O. (2010).** Sonochemical treatment of water polluted by chlorinated organocompounds. A review, Water 2 28–74.
- Grewell D. A, Benatar A. and Park. J. B. (2003).**“Plastics and Composites Welding Handbook”, Hanser Gardner Publications New York).
- Grönroos A, Kyllönen H, Korpijärvi K, Pirkonen P, Paavola T, Jokela J, Rintala J.(2005)**Ultrasound assisted method to increase soluble chemical oxygen demand (SCOD) ofsewage sludge for digestion. Ultrasonic Sonochemistry, 12(1):115-120.
- Guangming Z Panyue Z. Yanming C. (2006).** Ultrasonic enhancement of industrial sludge setting ability and dewatering ability, Tshinghua Sci. Technol. 11 (2006) 373–378.

Guo Wan-Qian, Jie Ding, Guang-Li Cao, Nan-Qi Ren, Fu-Yi Cui. (2011).International Journal of Hydrogen Energy Volume 36, Issue 21, Pages 14180–14185

Hall C.S, Dent C.L, Scott M.J. Wickline S.A.(2000). High-frequency ultrasound detection of the temporal evolution of protein cross linking in myocardial tissue, IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control. 47 1051–1058.

Harrison S.T.L. (1991). Bacterial cell disruption: a key unit operation in the recovery of intracellular products, Biotechnol. Adv. 9 217–240.

He Junguo, Wan Tian, Zhan Guangming, Yang Jing. (2011). Ultrasonics Sonochemistry Volume 18, Issue 1Pages 99–103

Hughes D.E, Nyborg W.L. (1962). Cell disruption by ultrasound, Science 138 108–113.

Iida Yasuo , Tuziuti Toru, Yasui Kyuichi, Kozuka Teruyuki, Towata Atsuya.(2008). Ultrasonics Sonochemistry Volume 15, Issue 6, September, Pages 995–1000

Joshi RS, Mandhane PG, Diwakar SD, Gill CH. (2010). Ultrasound assisted green synthesis of bis (indol-3-yl) methanes catalyzed by 1-hexenesulphonic acid sodium salt. Ultrason Sonochem; 17:298-300.

Kappe C. O., Angew. (2004). Chem., Int. Ed., 43, 6250 and references therein.

Kapucu H, Gulsoy N, Mehmetoglu U, (2000). Disruption and protein released kinetics by ultrasonication of Acetobacter peroxydan cells, Biochem. Eng. J. 5 57–62.

Karshafian R. Bevan P. D,Williams R, Samac S. and Burns P. N.(2009) Ultrasound Med. Biol.,35, 847–860.

Kegelaers Y. Eulaerts O. Reisse J. and Segebarth N. (2001). Eur. J.Org. Chem.,3683.For a survey of stereochemical effects of ultrasounds:

Kevin McKague, Keith Reid et Hugh Simpson. (2005).Répercussions environnementales de l'utilisation d'azote en agriculture, fiche technique du ministère de l'agriculture, de l'alimentation et des affaires rurales, Canada,

Khanal S.K, Grewell D, Sung S, Van Leeuwen J. (2007). Ultrasound applications in wastewater sludge pretreatment: a review, Crit. Rev. Environ. Sci. Technol. 37 277–313.

- Khanal SK, Grewell D, Sung S, van Leeuwen J. (2007).** Ultrasound applications in
- Kobayashi D, Sano K, Takeuchi Y, Terasaka K. (2011).** Effect of irradiation distance on degradation of phenol using indirect ultrasonic irradiation method, *Ultrason. Sonochem.* 18 1205–1210.
- Lahmeur M. (2006).** Dénitrification par électrodialyse en régime continu, Mémoire de fin d'étude, Ecole Nationale Polytechnique d'Alger, Alger.
- Leighton T. G. (1994).** *The Acoustic Bubble*, Academic Press, London,
- Lepoint T. and Lepoint-Mullie F. (1998).** *Synthetic Organic Sonochemistry*, ed. J.-L. Luche, Plenum Press, New York, pp. 1–49.
- Liu Yiyao , Yoshikoshi Akio , Wang Bochu, Sakanishi Akio.(2003).** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* Volume 27, Issue 4, 1, Pages 287–293
- Luche J.-L. And Cintas P (1999)** *Advances in Sonochemistry*, ed. T. J. Mason, JAI Press, London, Vol. 5, pp. 147–174.
- Luche J.-L. (1998).** *Synthetic Organic Sonochemistry*, ed., Plenum Press, New York,
- Luche J.-L. (1993).** *Advances in Sonochemistry*, ed. T. J. Mason.. JAI Press, London, , Vol. 3, pp. 85–124 and references therein.
- Martin. G. (1979).** *Les problèmes de l'azote dans les eaux*, Paris, Technique et documentation.
- Mason T and Lorimer J. (2002).** *Applied Sonochemistry: Uses of Power Ultrasound in Chemistry and Processing*, Wiley-VCH,
- Mason T. J and Cintas P. (2002).** *Handbook of Green Chemistry and Technology*, ed. J. Clark and D. Macquarrie, Blackwell Science, Oxford, pp. 372–396.
- Mason T. J. (1991).** *Practical Sonochemistry. User's Guide to Applications in Chemistry and Chemical Engineering*, Ellis Horwood, Chichester, pp. 17–51.
- Mason T. J. (2003).** *Ultrason. Sonochem.* 10, 175.
- Mason T.J and Lorimer J.P (1988).** "Sonochemistry", Ellis Horwood Limited New York

Mason T.J And Peters D. (2002). Practical Sonochemistry. Power Ultrasound: Uses and Applications, Ellis Horwood, Chichester,

Mason T.J, Lorimer J.P. (2002). Applied Sonochemistry. The Uses of Power Ultrasound in Chemistry and Processing, Wiley-VCH,

Mason, T. J. (1999). “Sonochemistry”, Oxford University Press New York

Mason. (2001). The most comprehensive treatment of sonochemistry and its applications is the series Advances in Sonochemistry, ed. T. J. Mason, JAI Press, London and Greenwich, CT.

Mellefont LA, McMeekin TA, Ross T. (2008). Effect of relative inoculum concentration on *Listeria monocytogenes* growth in co-culture. Int J Food Microbiol 121:157-68.

Menkouchi M.A, Annouar S, Mountadar M. Soufiane A & Elmidaouia A. (2008). Nitrate removal of brackish underground water by chemical adsorption and by electro dialysis Desalination, 227, 327–333

Mohammadi Ahmad Reza , Mehrdadi Nasser , Bidhendi Gholamreza Nabi , Torabian Ali.(2011).Desalination Volume 275, Issues 1–3, 15, Pages 67–73

Nyborg W. L. (2001). Ultrasound Med. Biol., 3, 301–333.

Ohl C.-D. Arora M, Ikink R. de Jong N. Versluis M. Delius M. and Lohse D. Biophys J. (2006) 91, 4285–4295.

Ortiz J.M. Sotoca J.A Exposito E, Gallud F. Garc V, Montiel & Aldaz A. (2005). Water desalination by electro dialysis: batch recirculation operation modeling, Membrane Science Brackish, 252, 65–75

Pelmont J. (2005). Biodégradations et métabolismes, les bactéries pour les technologies de l'environnement, France, Eds EDP Science.

Petrier C, Jeunet, Luche. J-L. And Reverdy. G. (1992).J. Am. Chem. Soc, 114, 3148.

Pousset J. (2008). Agriculture naturelle, Répondre aux nouveau défis, Paris, Eds Agrédicisions,

Raichel D.R. (2000). The Science and Applications of Acoustics, second ed., Springer, ISBN.

Richards W. T. and Loomis. A. L, Am. J. (1927). Chem. Soc.49,3086.

Ruecroft G, Hipkiss D, Ly T, Maxted N, Cains P.W, (2005). Sonocrystallization: the use of ultrasound for improved industrial crystallization, Org. Process Res.Dev. 9 923–932.

Schwartz L, Franck P, Debrulle C, Olivier JL, Vigneron C. (2005). Méthémoglobinémie congénitale récessive : une cause rare de cyanose du nouveau-né. Ann Biol Clin; 63:314—6.

Scruby C.B, Drain L.E.(1990). Laser Ultrasonics: Techniques and Applications, Adam Hilger,

Suslick K.S. (1990). Sonochemistry, Science 247 1439–1445.

Tallec G. (2005). Emissions d'oxyde nitreux lors du traitement de l'azote en station d'épuration Agglomération parisienne, Thèse de doctorat en science et techniques de l'environnement, Ecole Nationale des Ponts et Chaussées, France.

Techniques de l'ingénieur. Technologies de l'eau. (2006), vol. W2, noW4110 Paris, FRANCE (Revue)

Thorneycroft J. And Barnaby S. W. (1895). Inst. Civil Eng, 122, 51.

Tiehm A, Nickel K, Neis U. (1997). The use of ultrasound to accelerate the anaerobic ultrasonically treated waste-activated sludge. Water Research, 35(2):1038-1046.

Villamiel Mar, de Jong Peter. (2000). Journal of Food Engineering 45, 171-179

Walton D. J and Mason T. J, (1998). Synthetic Organic Sonochemistry, ed. J.-L. Luche, Plenum Press, New York, pp. 263–300 and references therein.

Wang Yong-Zhong, Xie Xue-Wang , Zhu Xun, Liao Qiang, Chen Rong, Zhao Xu, Duu-Jong Lee. (2012). International Journal of Hydrogen Energy Volume 37, Issue 20, Pages 15450–15457.wastewater sludge pretreatment: A review. Environmental Science and Technology, 37(4):277-313.

Wood R. W and Loomis. A. L. (1927).Philos. Mag.,4, 414.

Zhong, W, Hung W, Sit, Wan J. M. F. And. Yu A. C. H. (2011) Ultrasound Med. Biol, 37, 2149–2159.

Détermination de la concentration en matière sèche :

Mode opératoire :

- Bien homogénéiser la boue, par agitation du flacon dans lequel se trouve la boue
- Peser une coupelle de porcelaine, propre et sèche : poids p_0 en g
- Introduire dans cette coupelle un volume V_{ech} de boue
- Placer dans l'étuve à $105\text{ }^{\circ}\text{C}$, jusqu'à évaporation totale de l'eau contenue dans la boue, cette étape nécessite une nuit (12 heures environ)
- Peser la coupelle, après refroidissement : poids p_1 en g

Expression des résultats :

La concentration en MS de la boue analysée en g/L est donnée par la formule suivante :

$$(P_1 / P_0) * 100$$

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.

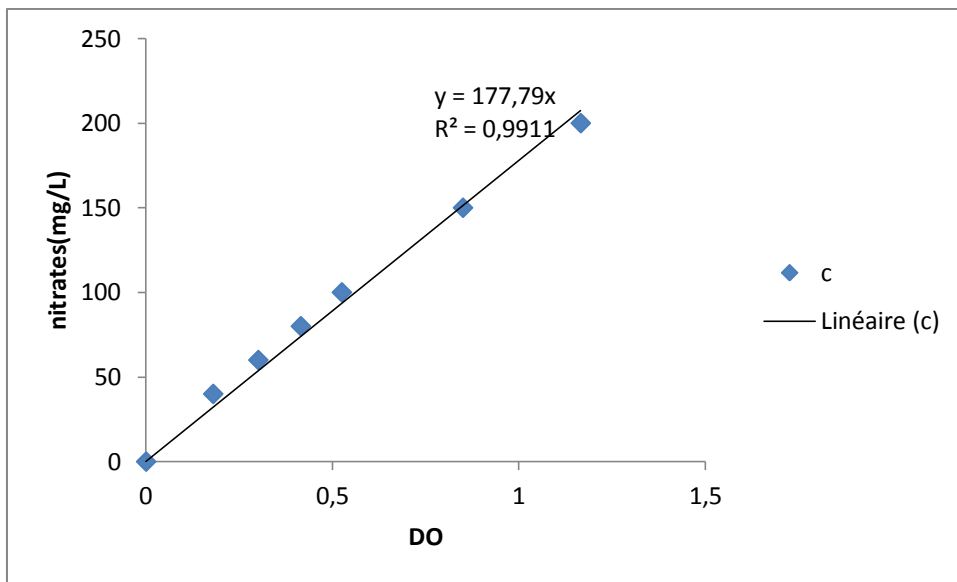


Figure II.12 : courbe d'étalonnage nitrates en mg/L

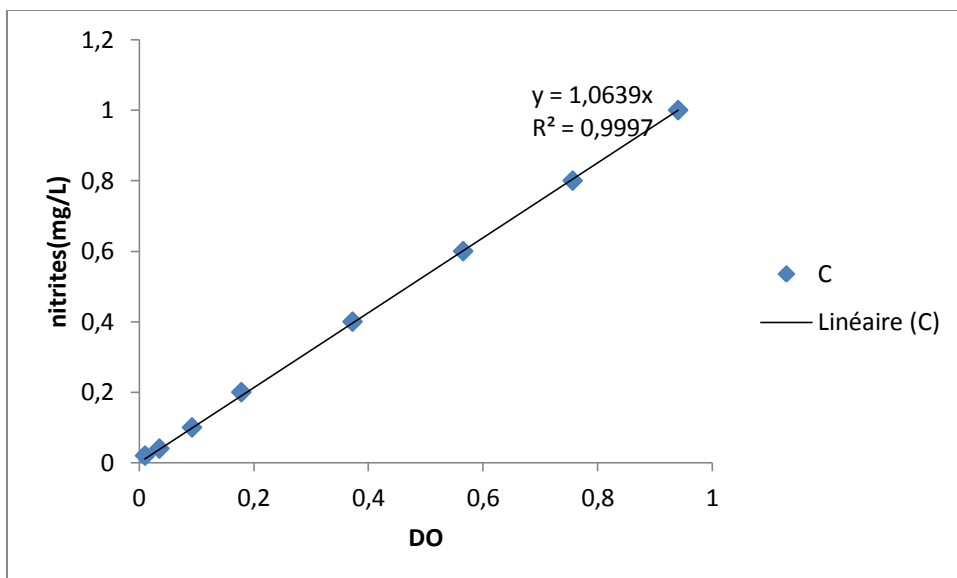


Figure II.13 : courbe d'étalonnage nitrites en mg/L

ملخص :

الغرض من هذا العمل دراسة امكانية ادخال تقنية تحريض بكتيريا معالجة المياه المحملة بشوارد النترات عن طريق استعمال الامواج فوق الصوتية. لهذا الغرض تم استعمال مفاعل حيوي مغلق بحيث البكتيريا الحية تم رجها بواسطة اشعة فوق صوتية ذات تواتر يقدر ب 20 كيلو هرتز وقد تم تحديد العوامل المثالية لتشغيل المفاعل : شدة الامواج فوق الصوتية، نسبة زمن العلاج / زمن الاستراحة، التركيز المولي الابتدائي للنترات و كذلك الحموضة الاولى للوسط التفاعلي. الرج بالامواج فوق صوتية سمح بتخفيض سريع لتركيز النترات في الوسط التفاعلي و مكن بذلك الى الوصول لمردود 100 % في ظرف زمني اقل بمرتين من الزمن اللازم لبلوغ نفس المردود باستعمال المعالجة في الشروط العادية. و لقد بينت الدراسة التجريبية انه افضل عوامل التشغيل كانت في حدود الستين واط للامواج فوق الصوتية مع نسبة 08/02 ثانية بين زمن المعالجة و زمن الاستراحة مع تركيز اولي للنترات يقدر ب 100 مغ/ل و عند حموضة الوسط الابتدائي المقدر ب 08.

الكلمات المفتاحية: نزع النترات، التحريض الحيوي، الأمواج فوق الصوتية

Résumé :

Une technique de traitement ultrasonique a été appliquée à un bioréacteur séquentiel en batch qui traite de l'eau à de grandes concentrations en nitrates avec de la biomasse activée. Après la période d'acclimatation, les bactéries dénitrifiantes en suspension dans le bioréacteur ont été agitées de façon intermittente avec des ondes ultrasons à une fréquence de 20 kHz. C'est alors que la performance de dégradation des nitrates a été évaluée. L'agitation ultrasonique a considérablement fait chuté la concentration des nitrates dans le milieu et a donc permis d'atteindre un rendement de 100% en un temps de réaction plus faible comparé avec celui d'un bioréacteur conventionnel. Par ailleurs, les effets de l'intensité et du temps de traitement par les ultrasons, la concentration initiale du substrat dans l'effluent et le pH initial du milieu réactionnel ont été étudiés et discutés, respectivement. Les meilleures performances dans un réacteur SBR traité ont été obtenues pour une intensité de 60 w et un rapport temps de traitement/temps de repos de 02 s/08 s, une concentration initiale en nitrate de 100 mg/L et un pH de 08.

Mots-clés : dénitrification, biostimulation, ultrasons

Abstract:

An ultrasonic treatment technique was applied to a sequencing batch bioreactor treating water at high nitrates concentrations with activated biomass.

After the acclimatation period, denitrifying bacteria suspension in the bioreactor was intermittently agitated by ultrasonic waves with a frequency of 20 kHz and then the biomass degradation performance was evaluated. The ultrasonic agitation significantly dropped the Nitrate concentration in the medium and thus decreased the denitrification time by nearly 2 times as compared with a conventional bioreactor. Furthermore, the effects of the ultrasonic power and the ratio treatment time/time off, influent substrate concentration, and initial pH were investigated and discussed, respectively. The best performances in the SBR reactor were obtained for a power and time treatment at 60 w and 02 s/08 s, an initial nitrate concentration of 100 mg/L, pH of 08.

Keywords: denitrification, biostimulation, ultrasounds