

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université des frères Mentouri Constantine 1
Faculté des sciences Exactes
Département de Chimie

N° d'ordre.....
Série.....



THESE De Doctorat en sciences filière Chimie
Option : Chimie Physique

Intitulé :

Dénitrification par l'utilisation de la Souche
“Enterobacter Hormaechei”
Prélevée de la station d'épuration Ibn Ziad

Présenté par :

AOUATI Mohamed Khelil

Soutenue le 11 Décembre 2017 devant le jury

| | | |
|-------------------|-----------------|--|
| Président | Mr A. MENNOUR | Pr. U. des frères Mentouri Constantine 1 |
| Rapporteur | Mr B. KEBABI | Pr. U. des frères Mentouri Constantine 1 |
| Examineur | Mme H.MOUSSER | Pr. ENS Univ. Constantine 3 |
| Examineur | Mme A.DJEDOUANI | Pr. ENS Univ. Constantine 3 |

Dédicace

En hommage à la mémoire de

Mon cher père et ma très chère maman.

A mon épouse et mes enfants.

A mes frères, mes sœurs et ma famille.

A tous mes collègues et amis.

A mes parents, ils m'ont tout donné, aussi je n'ai pas de mots pour leur signifier ma gratitude, merci aussi aux membres de ma famille.

*Ces études de doctorat ont été rendues possibles grâce à DIEU et le soutien moral de mon épouse **Soumia** et mes enfants **Ayoub, Khaoula, Taha Yacine, Anas Abdeldjaouad**.*

REMERCIEMENTS

Je rends tout d'abord grâce à Dieu le tout puissant.

*Ce travail a été réalisé au Laboratoire pollution et traitement des eaux, (LPTE),
Département de chimie, Faculté Sciences exactes. Université, Frères Mentouri,
Constantine1, Algérie.*

*Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à mon directeur de thèse, le
Professeur. **KEBABI Brahim**, qui a suivi l'évolution de ce travail avec compétence et
dévouement. Ses qualités humaines, sa disponibilité et ses encouragements ont rendu ce
travail moins pénible.*

*Mes remerciements s'adressent aux professeurs Mr **A.MENNOUR** président du jury,
Mme H. MOUSSER de ENSC de l'université SALAH BOUBENIDR Constantine 3 et
Mme A.DJEDOUANI de ENSC de l'université SALAH BOUBENIDR Constantine 3
membres de ce jury, pour avoir accepté de juger ce travail.*

*Je remercie également les Drs. **SIFOUR Mohamed** et **OULED HADDAR Houria** qui
ont mis leur laboratoire à ma disponibilité. Je les remercie aussi pour leurs judicieux
conseils, leurs discussions fructueuses, leur rigueur scientifique et leur disponibilité.*

*Mes remerciements s'adressent aussi à tous les professeurs des laboratoires de
toxicologie moléculaire, de pharmacologie et d'électrochimie de l'université de Jijel **Pr**
LAHOUAL, **Pr. KHELILI**, et **Pr. AZZOUZ** pour leur aide et mise de leurs laboratoires à
ma disponibilité ce qui a permis le bon déroulement de mes recherches.*

*J'adresse aussi mes remerciements à : **Dr. S. AISSAOUI** pour son aide dans la mise
au point des méthodes et l'analyse moléculaire des souches. Je ne saurais passer sous silence
l'aide également apportée par les Drs **SAID Mohamed El Mehdi** et **HAOUAT**
AMMAR, merci à vous deux.*

LISTE DES FIGURES

Chapitre 1

- Figure 1.1:** Processus majeurs du cycle de l'azote au sein de l'écosystème (d'après Rennenberg *et al*, 2009).....p14
- Figure 1.2 :** L'eutrophisation dans le lac Ghdir Beni Hamza (W de JIJEL) Mars 2014.
(photo :Aouati .M.K).....p20
- Figure 1.3 :** Schémas représentatifs du Principe de l'osmose et de l'osmose inverse
(Tansakul C, 2009).....p22
- Figure 1.4 :** Schémas représentatifs de l'électrodialyse pour la potabilisation de l'eau.....p23
- Figure 1.5:** Procédé classique à boues activées (d'après Barnard et al, 1998).....p29
- Figure 1.6:** modèle de Ludzack-Ettinger modifiée [Cooper et al, 1994].....p30
- Figure 1.7:** Modèle de Barnard de 1973.....p30
- Figure 1.8 :** Chenal d'oxydation (Cooper et al, 1994).....p31
- Figure 1.9:** Modèle et principe de fonctionnement du réacteur SBR
(Torrijos et al, 2000).....p31
- Figure 1.10** les principaux modèles de traitement de l'azote par immobilisation de la biomasse (Sorensen et Jorgensen, 1993).....p32
- Figure 1.11 :** Schema de principe du biofilm.....p32
- Figure 1.12 :** Echelle de pH reliés à quelques environnements [Madigan M. 2000].....p38
- Figure 1.13 :** Schéma reliant la croissance des micro-organismes à la température
[Madigan M. 2000].....p39
- Figure 1.14 :** technique de Dilutions successives.....p41
- Figure 1.15 :** technique de traitement sur boite de pétri..... p42

Figure 1.16 : technique turbidimétrique de mesure de la biomasse.....p43

Figure 1.17. : Différentes phases de la croissance bactérienne en milieu liquide décrites par [Buchanan, 1918].....p44

Chapitre 2

Figure 2.1 : Méthode de dilution En série.....p53

Figure 2.2: Méthode d'étalement sur boîte de pétri.....p54

Figure 2.3 : La galerie API 20E.....p55

Chapitre 3

Première Partie : L'étude de la dénitrification par l'utilisation d'une culture mixte

Figure 3.1.1 : Cinétique de la croissance bactérienne avec le méthanol comme source de carbone.....p65

Figure 3.1.2 : Cinétique de la réduction des nitrates avec le méthanol comme source de carbone.....p69

Figure 3.1. 3 : Evolution du pH au cours de la dénitrification avec le méthanol comme source de carbone.....p70

Figure 3.1.4: Cinétique de la croissance bactérienne en présence de 500 ppm et 1000 ppm du succinate de sodium comme source de carbone.....p71

Figure 3.1.5 : Cinétique de la réduction des nitrates en présence de 500 ppm (a) et 1000 ppm (b) du succinate de sodium comme source de carbone.....p72

Figure 3.1.6: Effet du rapport C/N sur la croissance bactérienne.....p73

Figure 3.1.7: Effet du rapport C/N sur la réduction des nitrates.....p74

Deuxième Partie : L'étude de la dénitrification par isolement et caractérisation des souches

- Figure 3.2.1 :** montre la croissance des bactéries sur des boîtes de Pétris après 5 jours. (Photo : Aouati .M.K 2012).....p75
- Figure 3.2.2 :** Résultat d'identification des souches par l'utilisation des systèmes API 20E (Photo : Aouati .M.K 2013).....p77
- Figure 3.2.3:** Arbre phylogénétique proche voisin pour enterobacter hormaechei obtenu à partir d'analyse de la séquence d'ADNr 16S. Le numéro d'accession GenBank est BankIt1760650Seq1KM604662.....p79
- Figure3.2.4 :** Cinétique de la croissance des souches isolées avec source de carbone. (Le méthanol).....p81
- Figure3.2.5 :** Cinétique de la croissance des souches isolées avec source de carbone. (Le succinate de sodium).....p81
- Figure3.2.6 :** Cinétique d'élimination des Nitrate avec sources de carbone le méthanol....p82
- Figure3.2.7:** Cinétique d'élimination des Nitrate avec source de carbone. le succinate de sodium.....p83
- Figure 3.2.8:** Suivi de pH avec source de carbone (Méthanol).....p84
- Figure3.2.9:** Suivi de pH avec source de carbone (Succinate de sodium).....p84
- Figure 3.2.10:** Cinétique de la croissance cellulaire du rapport C/N sur l'efficacité d'élimination des nitrates par Enterobacter hormaechei_N5, après incubation avec une source de carbone succinate à 35°C. Les données sont des moyennes de trois expériences.....p85
- Figure3.2.11:** Cinétique de la croissance cellulaire du rapport C/N sur l'efficacité d'élimination des nitrates par Enterobacter hormaechei_N5, après incubation avec une source de carbone Methanol à 35°C. Les données sont des moyennes de trois expériences.....p86

Figure 3.2.12: Effet du rapport C/N sur l'efficacité d'élimination des nitrates par *Enterobacter hormaechei*_N5, après incubation avec une source de carbone succinate à 35°C. Les données sont des moyennes de trois expériences.....p87

Figure3.2.13: Effet du rapport C/N sur l'efficacité d'élimination des nitrates par *Enterobacter hormaechei*_N5, après incubation avec une source de carbone Methanol à 35°C. Les données sont des moyennes de trois expériences.....p88

Figure 3.2.14: Effet du rapport C / N optimal pour les deux sources de carbone séparément sur Oxygène dissous (DCO). Les données sont des moyennes de trois expériences.....p88

Figure 3.2.15: Effet du rapport C/N optimal pour les deux sources de carbone séparément sur la variation du pH. Les données sont des moyennes de trois expériences.....p89

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre 1

- Tableau 1.1:** Quelques formes inorganiques du cycle de l'azote et leur degré d'oxydation.....p13
- Tableau 1.2:** Normes admises selon (OMS) en composés azotés dans l'eau potable.....p19
- Tableau 1.3:** Valeurs des potentiels des couples mis en jeu dans la réduction électrochimique entre l'étain et les nitrates.....p21
- Le tableau 1.4 :** montre les avantages et les inconvénients de chaque procédé.....p28
- Tableau 1.5 :** Principes, objectifs et applications de quelques techniques de biologie moléculaire et leurs avantages et inconvénients.....p50

Chapitre 2

- Tableau 2.1 :** Composition du mélange réactionnel de la PCR ITS 16S-23S et de la PCR 16S.....p59

Chapitre 3

Première Partie : L'étude de la dénitrification par l'utilisation d'une culture mixte

- Tableau, 3.1.1 :** Les concentrations équivalentes des différentes valeurs du rapport C/N...p73

Deuxième Partie : L'étude de la dénitrification par isolement et caractérisation des souches

| | |
|---|-----|
| Tableau 3.2.1 : Coloration de Gram des souches..... | p76 |
| Tableau3.2.2 : profil morphologique et biochimique d'isolat bactérien en utilisant des galeries API 20E..... | p78 |
| Tableau 3.2.3 : Avantages et inconvénients d'une culture mixte et de la souche Enterobacter hormaechei, (Aouati.M.K 2017)..... | p90 |

LISTE DES ACRONYMES

| | |
|-------------------------------------|--|
| ATP : | Adénosine Triphosphate |
| CF : | Carbohydrates fermentation |
| CFU/ml : | Colony-forming units per millilitre (Unité formatrice de colonies par millilitre). |
| CI : | Citrate |
| DCO : | Demande Chimique en Oxygène |
| DO : | Densité optique |
| EDTA: | Ethylene Diamine Tetra Acetate |
| GR : | Gram tintion; |
| IN : | Indol |
| ITS: | intergenic spacer. |
| MeOH : | Méthanol |
| MT : | Motility |
| RM : | Methyl red; |
| N : | azote |
| Norg : | azote organique |
| N₂ : | Diazote (azote atmosphérique) |
| NH₃: | Ammoniac |
| NH₄⁺: | ammonium |
| N₂O : | Oxyde nitreux |
| NO : | Oxyde nitrique |
| NO₂⁻: | Nitrite |
| NO₃⁻ : | Nitrate |
| NH₂OH : | Hydroxylamine |

| | |
|--------------------------------|--|
| NAR : | Nnitrate réductase |
| NIR : | Nitrite réductase |
| NOR : | Oxyde nitrique réductase |
| N₂OR : | Oxyde nitreux réductase |
| OMS : | Organisation Mondiale de la Santé |
| O₂ : | Oxygène |
| OX : | Oxidase |
| rpm : | round per minute (Tour Par Minute) |
| P : | Phosphore |
| pH : | Potentiel d'hydrogène |
| ppm : | Partie par million |
| PCR : | Polymerase chain reaction (réaction de polymérisation en chaîne) |
| ARDRA : | amplified ribosomal DNA restriction analysis |
| DGGE : | électrophorèse sur gel à gradient dénaturant |
| TGGE : | électrophorèse sur gel gradient de température |
| qPCR : | Amplification quantitative de l'ADN |
| FISH : | Marquage fluorescent de l'ARNr |
| ΔX : | Quantité de la biomasse |
| Q_x : | La quantité de la biomasse produite (productivité) (g.L ⁻¹ .h ⁻¹) |
| Y_{x/s} : | Coefficient de production de la biomasse (masse de cellule formée /masse de substrat consommé) |
| [C]₀ : | Concentration initiale |
| X : | Concentration de la biomasse (masse / unité de volume). |
| μ : | taux de croissance spécifique (temps ⁻¹). |
| F : | flux de la biomasse (volume / unité de temps). |

V : Volume de la biomasse (unité de volume).

α : taux spécifique de lyse (temps^{-1}).

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

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

Table de matière

| | |
|--|----|
| GLOSSAIRE..... | 4 |
| Introduction Générale..... | 7 |
| 1.1. Introduction..... | 12 |
| Synthèse Bibliographique..... | 12 |
| 1.2. Cycle de l'azote :..... | 13 |
| 1.2.1. Fixation :..... | 14 |
| 1.2.2. L'assimilation :..... | 14 |
| 1.2.3. L'ammonification (ou minéralisation):..... | 15 |
| 1.3. Nitrates :..... | 16 |
| 1.4. Sources et risque de la pollution des nitrates :..... | 16 |
| 1.4.1. Dans l'organisme :..... | 16 |
| 1.4.2. Dans l'environnement :..... | 17 |
| 1.4.3. Effets des nitrates:..... | 17 |
| 1.4.3.1. Sur la santé :..... | 18 |
| 1.4.3.2. Sur l'environnement :..... | 19 |
| 1.5. Les procédés d'élimination des nitrates :..... | 20 |
| 1.5.1. Procédés électrochimiques :..... | 20 |
| 1.5.2. Traitements par échange d'ions :..... | 21 |
| 1.5.3. Procédés membranaires de dénitrification :..... | 21 |
| 1.5.3.1. Osmose inverse :..... | 21 |
| 1.5.3.2. Electrodialyse :..... | 23 |
| 1.6. Procédés biologiques de dénitrification :..... | 24 |
| 1.6.1. Dénitrification hétérotrophe :..... | 25 |
| 1.6.2. Dénitrification autotrophe :..... | 25 |
| 1.7. Les avantages et les inconvénients des procédés d'élimination des nitrates :..... | 27 |
| 1.8. Technique biologique de la dépollution azotée :..... | 29 |
| 1.9. Culture des micro-organismes :..... | 37 |
| 1.10. Taxonomie et phylogénie des bactéries dénitrifiantes :..... | 46 |

| | |
|--|----|
| 1.11. La caractérisation moléculaire des micro-organismes : | 47 |
| <i>Matériels & méthodes</i> | 51 |
| 2. Matériels et méthodes :..... | 52 |
| 2.1. Stérilisation des milieux, des solutions et les appareils :..... | 52 |
| 2.2. Prélèvement de l'échantillon:..... | 52 |
| 2.3. Isolement et culture des microorganismes : | 52 |
| 2.4. Méthode par ensemencement en surface sur milieu gélosé :..... | 53 |
| 2.4.1. <i>Mode opératoire</i> :..... | 53 |
| 2.5 Identification et caractérisation des micro-organismes :..... | 55 |
| 2.5.2. <i>Identification des souches par l'utilisation de la galerie API 20E:</i> | 55 |
| 2.5.3. <i>Caractérisation moléculaire</i> :..... | 56 |
| 2.5.3.1. <i>Extraction de l'ADN génomique</i> :..... | 56 |
| 2.5.3.2. <i>Amplification de l'ADN par PCR "Polymerase Chain Reaction"</i> :..... | 56 |
| 2.5.3.3. <i>L'ADN ribosomal nucléaire</i> :..... | 57 |
| 2.5.3.4. <i>Amplification des régions intergéniques par PCR ITS</i> :..... | 57 |
| 2.5.3.5. <i>Amplification par PCR de l'ADN 16S</i> :..... | 57 |
| 2.6. Élimination des nitrates :..... | 60 |
| 2.7. Méthodes analytiques :..... | 60 |
| 3.1.1. Etude de la dénitrification en utilisant le méthanol comme source de carbone : | 62 |
| 3.1.1.1. Etude de la croissance bactérienne: | 64 |
| 3.1.1.2. Cinétique de la réduction des nitrates :..... | 69 |
| 3.1.1.3. Suivi du pH du milieu réactionnel au cours de la dénitrification :..... | 70 |
| 3.1.2. Etude de la dénitrification en utilisant le Succinate de Sodim comme source de carbone : | 70 |
| 3.1.2.1. Cinétique de la croissance bactérienne..... | 71 |
| 3.1.2.2. Cinétique de la réduction des nitrates en présence de 500 ppm et 1000ppm du succinate de sodium comme source de carbone..... | 72 |
| 3.1.3. Effet du rapport C/N :..... | 72 |
| 3.2.1. Résultats d'isolement : | 74 |
| 3.2.2. Identification et caractérisation des microorganismes : | 75 |
| 3.2.2.1. <i>La coloration de Gram:</i> | 75 |
| 3.2.2.2. <i>Par l'utilisation des galeries API de 20 E</i> :..... | 75 |
| 3.2.2.3. <i>Par la technique de biologie moléculaire PCR ARNr 16S</i> :..... | 78 |
| 3.2.3. Croissance cellulaire des souches :..... | 79 |
| 3.2.4. Performances d'élimination des nitrates :..... | 81 |
| 3.2.5. Le suivi du pH de la dénitrification :..... | 82 |
| 3.2.6. Effet du rapport C/N sur l'élimination des nitrates hétérotrophes :..... | 84 |

| | |
|---|-----|
| 3.2.6.1. Cinétique de la croissance cellulaire de la souche <i>Enterobacter hormaechei_N5</i> : | 84 |
| 3.2.6.2. Elimination des nitrates par <i>Enterobacter hormaechei_N5</i> : | 85 |
| 3.2.6.3. Cinétique de la demande d'oxygène dissous (DCO) pour le rapport C/N optimal : | 87 |
| 3.2.6.4. Variation du pH sur rapport C/N optimal des deux sources de carbone : | 87 |
| 3.2.7. Conclusion : | 88 |
| Conclusion Générale..... | 91 |
| Perspectives | 93 |
| Références Bibliographiques | 95 |
| Annexes | 114 |

GLOSSAIRE

Biodiversité : la biodiversité représente la variété et la variabilité des organismes vivants de toute origine y compris, entre autres, les écosystèmes terrestres, marins et autres écosystèmes aquatiques, et des complexes écologiques dont ils font partie. Cela comprend la diversité au sein des espèces et entre espèces ainsi que celles des écosystèmes. Elle est constituée par l'ensemble des êtres vivants, de leur matériel génétique, et des complexes écologiques dont ils font partie (Lévêque, 1997).

Ecosystème : système d'interactions complexe des espèces entre elles et entre celles-ci et le milieu (Frontier & Pichod-Viale, 1998).

Espèce : ensemble d'individus animal ou végétal ayant un aspect semblable, un habitat particulier, féconds entre eux, capables d'engendrer des individus féconds.

Commune (espèce) : lors d'un échantillonnage pour connaître la diversité taxonomique dans un écosystème, une espèce est dite commune si elle présente une proportion élevée d'individus sur l'ensemble du peuplement échantillonné. L'effort d'observation pour rencontrer une espèce commune est faible.

Espèce multihabitat : espèce qui utilise plusieurs habitats au cours de son cycle de vie.

Habitat : correspond au lieu où vit une espèce végétale ou animale donnée. Il peut fournir abri, nourriture et site de reproduction. Plusieurs habitats composant les éléments du paysage, peuvent être utilisés par une espèce (voir espèce multihabitat) pour effectuer son cycle de vie).

Séquence : ordre d'enchaînement de nucléotides.

ADN : acide désoxyribonucléique.

Régions conservées : séquences d'ADN identiques retrouvées chez tous les micro-organismes, par opposition aux régions variables.

Flocs : agglomérats constitués de bactéries et de particules organiques et inorganiques.

Sondes : petits fragments d'ADN de quelques nucléotides, marqués à une extrémité par un fluorophore (molécule fluorescente).

Ribosomes : organites intracellulaires permettant la synthèse des protéines.

ARNr : acide ribonucléique constituant des ribosomes.

Phylogénétique : se rapporte à la classification des êtres vivants avec pour objectif de rendre compte des degrés de parenté entre les espèces et donc de leur histoire évolutive (ou phylogénie).

Electrophorèse : méthode d'analyse qui consiste à séparer des molécules chargées (ADN) en présence d'un champ électrique.

Amorces : petits fragments d'ADN de quelques nucléotides, utilisés par paire et dont les séquences sont complémentaires de celles encadrant le fragment d'ADN à amplifier par PCR.

Agents intercalants : molécules fluorescentes s'insérant entre les bases de l'ADN.

Introduction Générale

Introduction Générale

L'homme utilise son environnement comme une ressource inépuisable. La raréfaction de l'eau et le mauvais usage, menacent le développement durable. La pénurie de ressources en eau est devenue un problème sérieux au niveau mondial. La réutilisation des eaux usées après un traitement approprié est devenue un consensus dans le monde entier (Qin et al., 2013).

La capacité de réduire de manière cohérente et sécuritaire les déchets d'origine terrestre, en particulier en traitant les charges d'effluents NO_3^- , pourrait offrir un certain nombre d'avantages économiques et environnementaux distincts (van Rijn, 2013).

Avec la croissance démographique, l'utilisation intensive d'engrais azotés et des déchets d'élevage dans l'agriculture a conduit à une accumulation fictive de nitrates dans l'eau, ce qui entraîne la dégradation de leur qualité. L'azote, souvent sous la forme NO_3^- , est actuellement visé par de nombreux groupes locaux et nationaux comme contaminant principal de la qualité de l'eau en raison d'un nombre croissant de zones hypoxiques marines induites par l'azote et d'autres environnements de qualité de l'eau (Diaz et al, 2008).

Une forte concentration des nitrates dans les rivières provoque de plus en plus le phénomène d'eutrophisation des écosystèmes (Hamaidi. M.S. et al 2009). En outre, la consommation de cette eau se traduira par l'apparition de méthémoglobinémie chez les humains. Cela a poussé l'Organisation mondiale de la santé (OMS) à classer les nitrates comme polluant dangereux pour la santé publique et fixe à $50 \text{ mg / L N-NO}_3^-$ (OMS. 1984), (Wehbe.N, 2008).

L'élimination des nitrates repose sur divers techniques, procédés physico-chimiques: échange d'ions, osmose inverse et les traitements biologiques: dénitrification hétérotrophe ou autotrophe. La plupart des technologies de dénitrification utilisent la dénitrification hétérotrophe, où une source de carbone organique (C) alimente les bactéries anaérobies

dénaturatives facultatives. Les bactéries dénitrifiantes hétérotrophes ont un taux de croissance plus élevé que les bactéries autotrophes (MetcalfEddy, 2003).

Cependant, la dénitrification biologique a été prouvée être l'une des méthodes les plus avancées à hautes performances et la seule méthode sélective pour l'élimination complète des nitrates (Lazarova.V et al, 1994) et la plus économique (Werner, 1991), (Katz, 2000). Ce procédé nécessite l'utilisation d'un accepteur final d'électrons transférés le long d'une chaîne respiratoire (Tiedje, 1988).

L'élimination biologique des nitrates est largement utilisée dans le traitement des eaux usées industrielles complexes et domestiques (Dong et Tollner, 2003). La majorité de la dénitrification biologique repose sur des bactéries hétérotrophes qui nécessitent une source de carbone organique. Le méthanol est une de sources externes qui a été utilisée pour cette fin (voir Gomez MA, 2001, Wasik E., 2001 et P.Pagàcovà et al, 2010). Il est aussi la source la plus courante de carbone organique ajouté pour soutenir la dénitrification biologique.

La dénitrification était censée être un processus strictement anaérobie (Tiedje, J.M 1982). La dénitrification biologique est un procédé mis en œuvre par de nombreux genres de bactéries. Un grand nombre de bactéries hétérotrophes taxonomiquement et physiologiquement différents, sont en mesure de dénitrification (Knowles, 1996). Les principaux genres associés à la dénitrification sont les suivants: Actinomyces, Aeromonas, Agrobacterium, Alcaligenes, Arthrobacter, Bacillus, Bacteroides, Enterobacter, Escherichia, Pseudomonas, Rhizobium, Salmonella, Staphylococcus ...

De nombreuses études sur la diversité des bactéries dénitrifiantes se tournent maintenant vers l'amplification de gènes fonctionnels de dénitrification. Ces gènes peuvent être des gènes de la nitrate réductase périplasmique ou liée à la membrane (NapA et NarG) (Flanagan et al., 1999; Gregory et al., 2000). Ces études ont révélé une grande diversité de gènes de dénitrification dans l'environnement, qui sont souvent des gènes divergents provenant de bactéries dénitrifiantes en culture (Braker et coll., 2000;. Gregory et al, 2000).

L'objectif principal de cette étude est de trois volets: i) L'isolement et la caractérisation des souches avec les outils de microbiologies. ii) Enlèvement simultané de COD et du nitrate dans un réacteur batch des eaux usées par une culture mixte et des souches dénitrifiantes. iii) Un rapport pondéral C/N est optimal pour obtenir une meilleure dénitrification.

Le consortium a été prélevé à partir de la station d'épuration de Ibn Ziad, Constantine Algérie. Cependant, les souches ont été isolées, on estime que seulement une petite partie de toutes les bactéries sont cultivable, une grande partie des communautés bactériennes reste

non étudié. Avec les techniques moléculaires, plus d'informations peuvent être obtenues au sujet de ces bactéries qui contribuent à l'écosystème et le fonctionnement sont viable, mais non cultivables.

La caractérisation des bactéries isolées utilise souvent les systèmes d'API qui sont basés sur les activités physiologiques et métaboliques des bactéries en utilisant système API 20E, selon le Manuel de Bergey de Bactériologie (Holt et al., 1994).

Les bactéries isolées ont été identifiées et caractérisées, en utilisant leurs propriétés morphologiques et biochimiques. Ainsi qu'en utilisant la technique de la biologie moléculaire pour la caractérisation de la diversité microbienne.

Techniques de biologie moléculaire ont été développées ce qui a permis une caractérisation plus complète de la diversité microbienne, sur la base des spécificités génomiques de chaque espèce (phylogénie).

Cependant, l'extraction de l'ADN génomique à partir d'une culture jeune et pur a été amplifiée par PCR et PCR ITS régions intergéniques. PCR a été développée pour tous les gènes de dénitrification, ce qui permet d'amplifier et d'analyser ces gènes dans les isolats de culture à partir d'échantillons environnementaux (Braker et coll., 2003).

Le ARNr 16S est hautement conservé et universellement présent dans les bactéries. L'importance de ce marqueur que la plupart de cette nouvelle taxa ont été reconnus en utilisant les séquences ARNr 16S (Tindall et al., 2010). Les séquences d'ARN 16S ont été comparées à toutes les séquences accessibles dans des bases de données en utilisant le serveur BLAST du NCBI (Centre National d'Information Biotechnologique).

La soumission des données à GenBank séquences nucléotidiques est sous les numéros d'accèsion BankIt1760650 Seq1 KM604662 BankIt1760650 Seq 2 KM604663.

Cependant, les souches identifiées ont été parfaitement utilisées pour l'élimination des nitrates en utilisant le méthanol (Purtschert et al., 1999) (Gomez 2000) (Aslan, 2002), et le succinate (Rezaee. A. et al, 2010) (Aouati M.K et al, 2017) séparément en tant que source de carbone et d'énergie dans un réacteur batch, acclimater à 35 ° C (Bernet et al., 1996), (Foglar, 2004). Un rapport C/N pour une meilleure dénitrification, accompagnée d'un suivi du pH ainsi que la demande chimique en oxygène (DCO), est une mesure de toute la matière organique des déchets, son principe réside dans la détermination du chrome hexavalent résiduelle.

Cependant, les souches identifient montre l'efficacité et un rendement important d'élimination des nitrates.

Ce mémoire est structuré en une partie de Synthèse bibliographique, puis une deuxième partie mettant relief les matériels et méthodes, une troisième partie présentant les résultats obtenus suivis des interprétations. Enfin, une dernière partie traitant la conclusion qui présentera une discussion globale de l'ensemble des résultats ainsi que les perspectives qui en découlent.

Certains travaux réalisés au cours de cette thèse ont fait l'objet de publications et de communications au cours de manifestations scientifiques internationales

Synthèse Bibliographique

Chapitre 1

Synthèse Bibliographique

1.1. Introduction

L'ensemble des réactions biologiques de croissance et de maintenance requièrent la présence de l'élément azote. Il constitue entre 16 et 23% des protéines cellulaires, environ 12% des acides nucléiques et représente 4 à 16% du poids sec d'un animal (Cole, 1993). La forme azotée la plus abondante et la plus stable (N_2), constitue 78% de l'atmosphère terrestre.

En milieu aquatique, les composés de l'azote existent sous forme inorganique (azote ammoniacal NH_4^+ et NH_3 c'est la forme la plus réduite; nitrites NO_2^- et nitrates NO_3^- la forme la plus stable au milieu aérobie), organique (acides aminés et protéines forme labile et stable) et moléculaire gazeux dissous (95% du total).

Les nitrites NO_2^- et nitrates NO_3^- atteignent 65% du stock totale d'azote organique dissous de l'océan mondial (Lacaze J.C, 1996).

La pollution azotée regroupe l'azote présent sous forme organique et celui sous forme ammoniacal connu sous le nom azote kjeldahl (NTK) et l'ensemble des formes azotées présent dans l'eau (azote organique, azote ammoniacal, nitrite et nitrate. Il correspond donc à l'addition au terme NTK, des formes oxydées de l'azote.

Le cycle de l'azote, c'est les diverses transformations que subit l'azote de la biosphère. Toutes les étapes du cycle de l'azote soit réalisée par quelques microorganismes spécifiques tels que les *Cyanobactéries*, les *Rhizobium*, les *Azotobacter*, les *Azospirillum spp.* Ces bactéries et /ou algues, dites *diazotrophiques*, transforment l'azote gazeux en molécules simples comme

l'azote ammoniacal et l'azote nitrique, alors utilisées par les plantes ou toute autre forme de vie.

1.2. Cycle de l'azote :

L'azote est un élément chimique très répandu dans la nature, se trouve principalement sous forme moléculaire (N_2) et constitue 78% de l'atmosphère. C'est un élément essentiel de la matière vivante. Ainsi l'azote est présent à différents degrés d'oxydation dans la nature (Tableau 1.1). Les principales formes minérales de l'azote sont, à l'état dissous dans les eaux, le N_2 , NH_4^+ , NO_2^- et le NO_3^- , à l'état gazeux dans l'atmosphère, le N_2 , NH_3 , N_2O et le NO_2^- .

Tableau 1.1: Quelques formes inorganiques du cycle de l'azote et leur degré d'oxydation.

| Espèces | État d'oxydation | Noms communs |
|---------------------|------------------|---------------------|
| NH_3 (NH_4^+) | -3 | Ammoniac / ammonium |
| NH_2OH | -1 | Hydroxylamine |
| N_2 | 0 | Diazote |
| N_2O | +1 | Oxyde nitreux |
| NO | +2 | Oxyde nitrique |
| NO_2^- | +3 | Nitrite |
| NO_3^- | +5 | Nitrate |

Le cycle de l'azote est une succession de multiples transformations des composés azotés, via des processus pour la plupart microbiologiques.

Les principales étapes du cycle de l'azote sont la fixation, l'assimilation, l'ammonification, la nitrification et la dénitrification (figure 1.1).

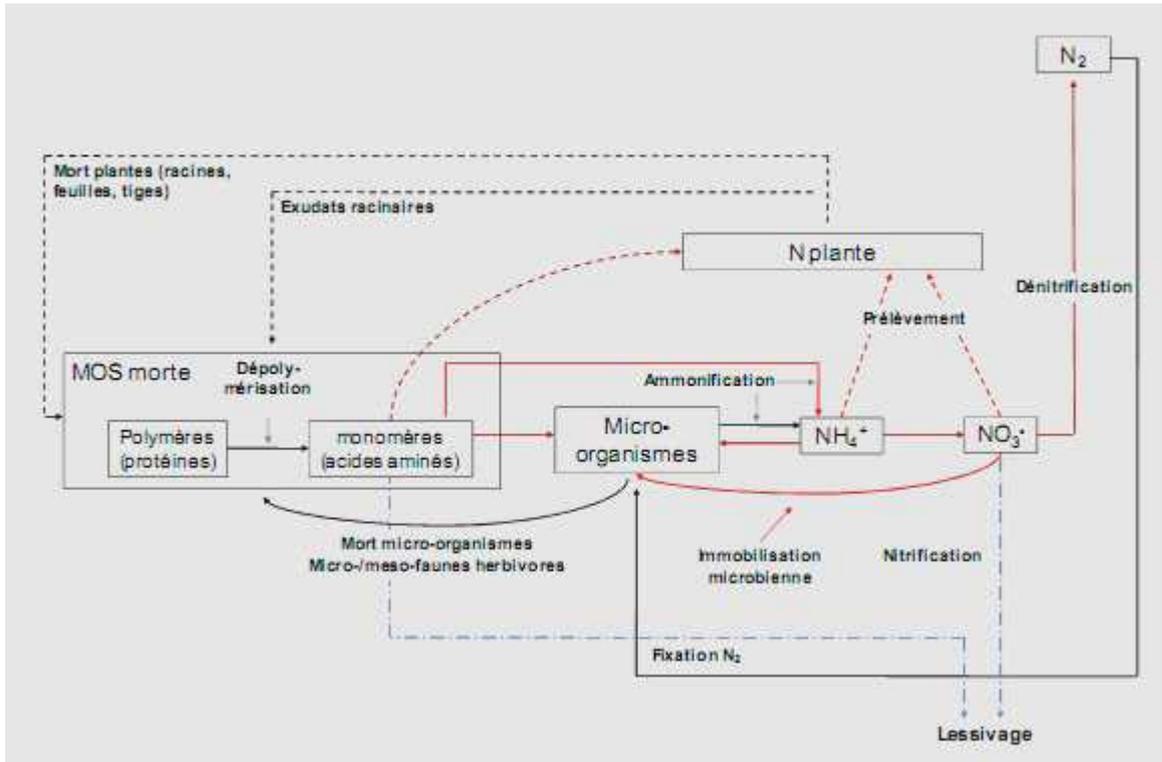
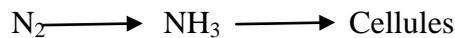


Figure 1.1: Processus majeurs du cycle de l’azote au sein de l’écosystème (d’après Renneberg *et al*, 2009).

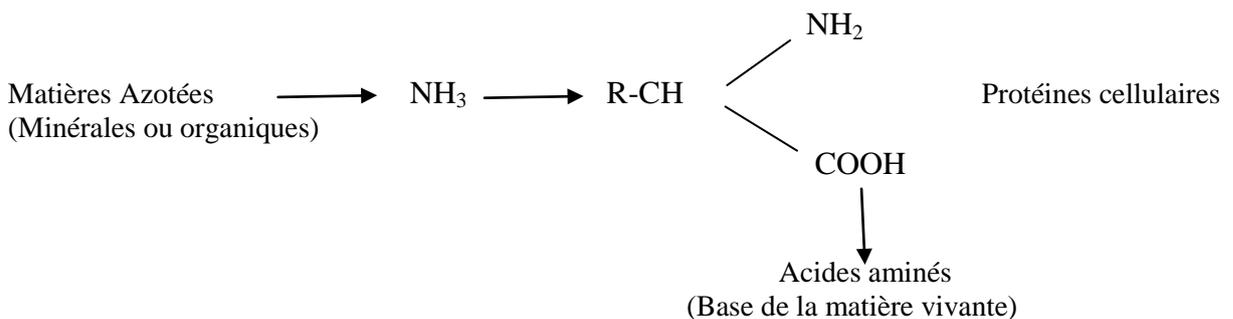
1.2.1. Fixation :

Correspond à l’aptitude que possèdent certains organismes à utiliser l’azote moléculaire pour la synthèse de leurs protéines. Réduction de l’azote à l’état ammoniacal avant d’être assimilé (Martin, 1979).



1.2.2. L’assimilation :

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



1.2.3. L'ammonification (ou minéralisation):

Cette étape est le procédé à partir desquels, les composés azotés organiques sont transformés par des réactions enzymatiques en composés minéraux azotés(NH₃) ou (NH₄).

Ces composés organiques azotés proviennent soit :

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



1.2.4. La nitrification :

La nitrification est l'oxydation de l'azote ammoniacal en nitrate par l'intermédiaire de bactéries nitrifiantes. Il y a deux types de nitrifications :

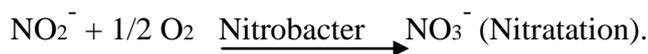
- Nitrifications lithotrophes qui utilise une source de carbone inorganique.
- Nitrifications hétérotrophes qui concernent différents groupes de bactéries.

Elles s'effectuent en deux étapes :

- La nitritation : Oxydation de l'azote ammoniacal en nitrite



- La nitratisation : Oxydation du nitrite en nitrate.

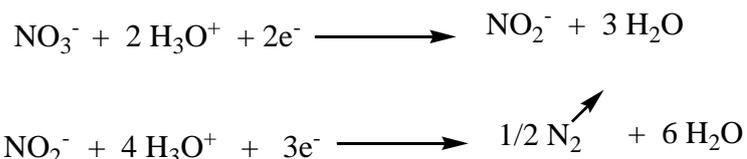


1.2.5. La réduction assimilatrice (Ou dissimilatrice) :

La réduction assimilatrice est la réduction des composés oxydés (azote nitreux NO₂⁻, azote nitrique NO₃⁻) en azote ammoniacal (NH₄⁺).

1.2.6. La dénitrification :

La dénitrification est un processus de réduction des nitrates (NO₃⁻) en azotes moléculaires gazeux (N₂), ce processus est principalement assuré par les bactéries dénitrifiantes.



1.3. Nitrates :

Les nitrates sont des sels de l'acide nitrique. Ce sont des composés azotés naturels de formule chimique NO_3^- (ion nitrate), présents dans tous les écosystèmes.

Ils sont essentiels à la croissance des végétaux qui les puisent dans le sol, mais peuvent devenir néfastes pour les plantes et les animaux s'ils sont trop abondants. Très solubles dans l'eau, ne sont pas retenue par le sol et migrent facilement vers les eaux superficielles et souterraines lorsque il dépasse le taux des besoins de la végétation (Santé canada 1992).

Ils entrent dans la composition des engrais chimiques et naturels (fumiers). Ce sont des composés facilement entraînés par les eaux de pluie, de drainage, de ruissellement ou d'infiltration.

La pollution par les nitrates est un problème complexe. Les nitrates constituent aujourd'hui la cause majeure de pollution des grands réservoirs d'eau souterraine du globe qui par ailleurs présentent en général une qualité chimique et bactériologique satisfaisante pour l'alimentation.

1.4. Sources et risque de la pollution des nitrates :

1.4.1. Dans l'organisme :

Le corps humain est source endogène des nitrates. Les concentrations plasmiqes des nitrates journaliers sont variables, et que la quantité de nitrate dans les urines était plus importante que celle ingérée (Lespine. A, 2001), ainsi que la production endogène des nitrates. De nombreuses études ont détecté la production de monoxyde d'azote (NO) dans l'organisme, sa durée de demi-vie est courte 3 à 5 secondes, transformé en nitrates d'après (Stuehr et Marletta, 1985), il s'agit d'une réaction biochimique intracellulaire de dégradation d'une molécule d'un acide aminé la L-arginine en L-citrulline entraînant la libération de monoxyde d'azote qui réagit avec l'oxygène en forment des molécules N_2O_3 et N_2O_4 donnant par hydrolyse les nitrates.

L'eau et la nourriture sur tout les légumes est la source exogène des nitrates. Certaines études ont estimé que 70 à 80% des nitrates ingérés proviennent des légumes (Boquillet .C et al, 2007).

1.4.2. Dans l'environnement :

Les nitrates sont présents dans le sol à l'état naturel à cause des résidus de la vie animale et humaine. La présence de nitrates dans les eaux continentales provient à 55 % de l'agriculture, suite à l'épandage de doses massives d'engrais azotés et de lisier (effluents d'élevage). Le reste est issu des rejets des collectivités locales (35 %) et de l'industrie (10 %) (Ruiz.L et al, 2003).

Cette pollution est due à la différence entre les apports en nitrates sous forme d'engrais et ce qui est réellement consommé par les plantes. Les nitrates, qui ne sont pas consommés par les plantes, sont alors stockés sous forme de matières organiques. Les bactéries terrestres consomment et décomposent ces matières organiques tout en libérant les nitrates. Les nitrates libérés sont lessivés par les eaux de ruissellement et d'infiltration.

Les nitrates emportés dans les eaux d'infiltration au cours d'une année ne proviennent donc que pour une faible part des engrais apportés cette même année.

Cela veut dire que la pollution actuelle des nappes souterraines provient d'une vingtaine d'années d'épandage d'engrais. Elle dépasse souvent aujourd'hui 50 milligrammes par litre, norme retenue pour les eaux potables par l'Organisation mondiale de la santé. La pollution des eaux par les nitrates présente un double risque. Ils contribuent avec les phosphates à modifier l'équilibre biologique des milieux aquatiques en provoquant des phénomènes d'eutrophisation. Par ailleurs, ingérés en trop grande quantité, les nitrates ont des effets toxiques sur la santé humaine.

1.4.3. Effets des nitrates:

Les nitrates ne sont pas toxiques à dose physiologique tant qu'ils sont sous cette forme, ils ont une toxicité indirecte. Le danger vient des nitrites et autres composés formés à partir des nitrates qui eux ont une toxicité directe. La présence d'ions nitrates dans les eaux engendre deux principaux impacts (Casellas, 2002) :

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

1.4.3.1. Sur la santé :

La méthémoglobinémie, c'est l'effet le plus anciennement connu, également connue sous le nom de syndrome du bébé bleu, est une maladie résultant généralement de l'ingestion de fortes concentrations de nitrate sous sa forme inorganique (Burt et al., 1993)(Doyle M.P et al., 1985).

L'hémoglobine assure le transport de l'oxygène dans l'organisme grâce à la présence de fer dans la molécule (à l'état bivalent : fer ferreux). Dans ce cas l'hémoglobine au contact de l'oxygène donne naissance à l'oxyhémoglobine qui assure la livraison d'oxygène aux divers tissus de l'organisme.

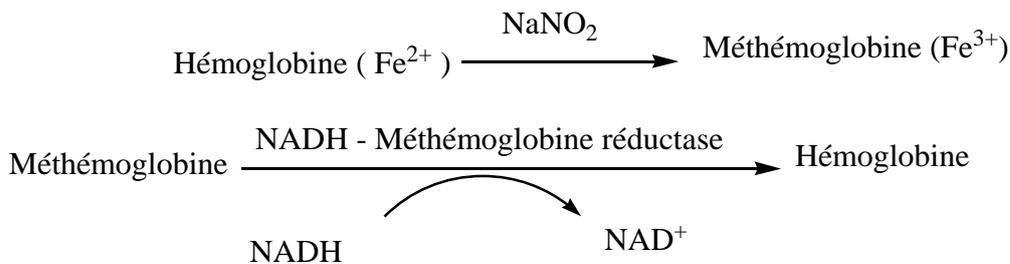
Si le fer est oxydé à l'état trivalent en présence des nitrites, l'oxyhémoglobine libère son oxygène et se transforme en méthémoglobine (MetHB) incapable de fixer l'oxygène. Il s'agit d'une oxydation de l'hémoglobine.



Cet anion est transformé en nitrite, par des bactéries réduisant les nitrates dans l'intestin, qui réagit avec l'hémoglobine dans le sang en la transformant en méthémoglobine, et en conséquence, l'oxygène n'est plus transporté sur les tissus des cellules, provoquant la mort.

En outre, les nitrosoamines sont des composés cancérigènes qui peuvent être formés à partir de nitrite dans l'estomac (Chambon.Pet al, 1983).

Les bébés ne sont pas les seules populations sensibles, cependant, les enfants et les adultes souffrant de maladies ou de traitements qui abaissent les niveaux d'acide gastrique sont également vulnérables à la méthémoglobinémie. Il existe une enzyme qui régénère l'hémoglobine empêchant l'accumulation de méthémoglobine inactive, elle est appelée méthémoglobine- réductase ou NADH – cytochrome b5 réductase. Chez le nourrisson, cette enzyme est inactive ce qui renforce sa sensibilité.



Bien que la méthémoglobinémie soit la seule maladie actuellement directement attribuable à des concentrations élevées de nitrates, il existe d'autres effets présumés sur la santé. Parmi ceux-ci, il y a la possibilité d'avortements spontanés chez les femmes en âge de procréer.

Compte tenu de ces problèmes, l'organisation mondiale de la santé (OMS) a promulgué des réglementations spécifiques fixant les niveaux maximaux des composés azotés dans les Eaux (Tableau 1.2).

Tableau 1.2: Normes admises selon (OMS) en composés azotés dans l'eau potable

| Composés azotés | Normes OMS (mg/l) |
|--|-------------------|
| Ammonium (NH ₄ ⁺) | 1,5 |
| Nitrites (NO ₂ ⁻) | 3 |
| Nitrates (NO ₃ ⁻) | 50 |

1.4.3.2. Sur l'environnement :

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

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

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

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

Dans la zone humide d'El Kennar Nouchfi, le site de Ghedir Béni Hamza (W de Jijle) (Figure. 1.2), où une grande partie de la surface du lac est couverte par les algues et il est

devenu inutilisable pour la récréation, Le marais est aussi caractérisé par une exceptionnelle prolifération de nénuphars blancs.



Figure 1.2 : L'eutrophisation dans le lac Ghdir Beni Hamza (W de JIJEL) Mars 2014.

(Photo :Aouati .M.K)

1.5. Les procédés d'élimination des nitrates :

Il existe divers traitements permettant d'éliminer les nitrates, traitements physico-chimiques : l'échange ionique, la filtration par osmose inverse ou l'électrodialyse sont des procédés efficaces, mais les nitrates sont concentrés dans un résidu qu'il faut ensuite traiter. À l'inverse, les traitements biologiques : dénitrification (hétérotrophe ou autotrophe) (Calvet, 1990), éliminent les nitrates, et ne permettent ni le traitement de teneurs variables en nitrates, ni celui de traces.

1.5.1. Procédés électrochimiques :

Cette méthode a été largement étudiée pendant les dernières années (Casella I.G et al, 2004) (Tada K. et al, 2005). Elle consiste à appliquer une tension sur une électrode de Pt ou Pd activée avec du germanium (Gootzen J. F. E et al, 1997). Les électrons libérés conduisent à la réduction des nitrates et engendrent des espèces intermédiaires NO_2^- , NH_3 ... Comme on voit dans le tableau ci-dessous (Tableau 1.3).

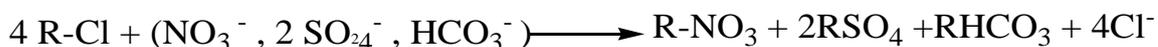
Mais l'inconvénient de cette technique est dûe aux concentrations assez élevées en métal dissous tel que l'étain Sn^{2+} obtenue dans l'eau (Katsounaros I, 2006) qui n'est pas admis pour la consommation humaine.

Tableau1.3: Valeurs des potentiels des couples mis en jeu dans la réduction électrochimique entre l'étain et les nitrates

| Couples | E°(V) |
|---|-------|
| $\text{Sn}^{2+} + 2 e^{-} \rightarrow \text{Sn}$ | -0,14 |
| $\text{NO}_3^{-} + 10\text{H}^{+} + 8 e^{-} \rightarrow \text{NH}_4^{+} + 3\text{H}_2\text{O}$ | 0,88 |
| $\text{NO}_3^{-} + 2\text{H}^{+} + 2 e^{-} \rightarrow \text{NO}_2^{-} + \text{H}_2\text{O}$ | 0,835 |
| $\text{NO}_3^{-} + 4\text{H}^{+} + 3 e^{-} \rightarrow \text{NO}(\text{g}) + \text{H}_2\text{O}$ | 0,96 |
| $2\text{NO}_3^{-} + 10\text{H}^{+} + 8 e^{-} \rightarrow \text{N}_2\text{O}(\text{g}) + 5 \text{H}_2\text{O}$ | 1,12 |
| $2\text{NO}_3^{-} + 10\text{H}^{+} + 8 e^{-} \rightarrow 2\text{NO}(\text{g}) + 5 \text{H}_2\text{O}$ | 1,25 |

1.5.2. Traitements par échange d'ions :

Le principe de cette technique repose sur l'échange des ions nitrates et d'autres anions présents dans l'eau avec les ions chlorures contenus dans une résine en quantité équivalente selon la réaction suivante :



L'ordre d'affinité entre les différents anions varie avec les caractéristiques des résines, car il existe des résines plus ou moins sélectives aux nitrates. En général l'ordre est le suivant : du plus retenu au moins retenu :



Cette technique est très utilisée mais le seul inconvénient est le coût élevé surtout pour la régénération des résines (Simon, 1985). Une eau chargée par les sulfates pourra être gênante dans l'élimination des nitrates, donc les nitrates sont déplacés mais pas éliminés, Ils se retrouveront d'une manière ou d'une autre sous forme de déchets, rejetés en station d'épuration des eaux usées, ou délivré à une industrie de fabrication d'engrais azotés.

1.5.3. Procédés membranaires de dénitrification :

1.5.3.1. Osmose inverse :

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

La pression appliquée et la concentration du soluté sont des facteurs qui influent sur le rendement qui est de l'ordre de 45%.

L'osmose inverse est très utilisée pour le dessalement d'eau de mer ou d'eau saumâtre, et pour la production d'eau ultra-pure (industrie électronique, médicale, nucléaire). Le rendement peut varier de 85 à 95%, dépend de la pression appliquée (pression 30 à 60 bars) de la concentration du soluté, et du flux demandé en eau traitée.

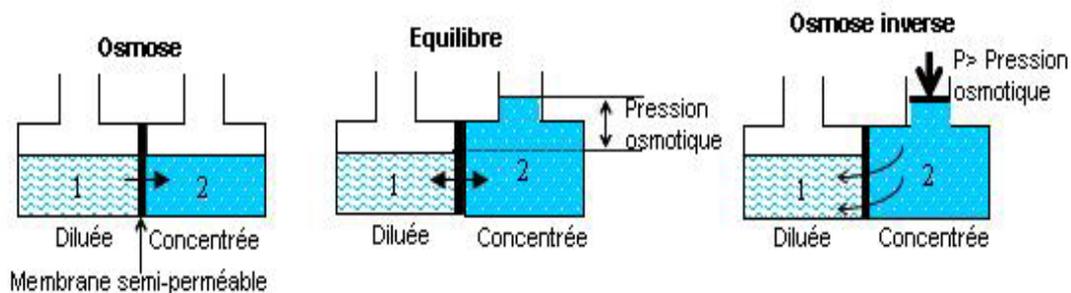


Figure 1.3 : Schémas représentatifs du Principe de l'osmose et de l'osmose inverse

(Tansakul C, 2009).

La pression osmotique d'une solution est proportionnelle à la concentration en solutés qui peut être calculée par la loi de Van't Hoff:

$$\Pi = i.C.R.T$$

Π : Pression osmotique (bar)

i : Nombre d'ions dissociés dans le cas d'un électrolyte

C : Concentration molaire (mol.L^{-1})

R : Constante des gaz parfaits ($0,082 \text{ L.bar.mol}^{-1}\text{K}^{-1}$)

T : Température absolue (K)

1.5.3.2. Electrodialyse :

L'électrodialyse est une technique électro-membranaire qui désigne le transfert d'ions des sels dissous d'une eau à travers une membrane, sous l'effet d'un champ électrique (Eckenfelder, 1982). Le principe de l'électrodialyse est l'application d'un courant continu entre les électrodes d'une cellule, constituée de succession de cellules à compartiment de membrane semi perméables alternativement anioniques et cationiques. Lors de l'action du champ électrique, la membrane anionique autorise le passage des anions et la membrane cationique laisse passer les cations. Les cations sortent du premier compartiment en franchissant la membrane cationique et sont bloqués dans le deuxième compartiment par la membrane anionique. Les anions sortent aussi du premier compartiment en migrant la membrane anionique et sont bloqués par la membrane cationique. Dans le cas des nitrates, on a un compartiment sur deux riches en nitrates.

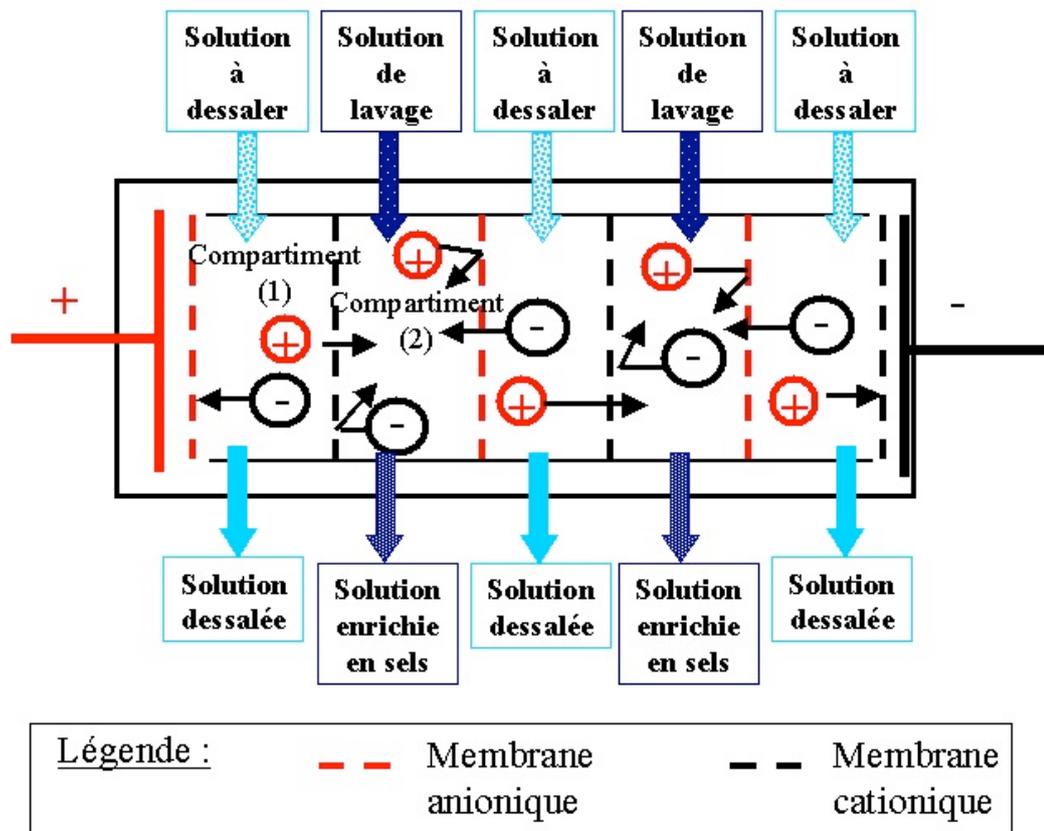


Figure 1.4 : Schémas représentatifs de l'électrodialyse pour la potabilisation de l'eau.

Le premier compartiment est un compartiment de dilution ou la concentration en sel dissout diminue. Tandis que le deuxième compartiment voit augmenter la concentration en sels dissout. C'est alors un compartiment de concentration. Un compartiment sur deux est un compartiment de dilution, un sur deux est un compartiment de concentration. Une électrode à chaque extrémité de l'appareil assure le passage du courant.

1.5.3.3. Nanofiltration :

Nanofiltration est une technique membranaire récente de séparation intermédiaire entre l'ultrafiltration et l'osmose inverse, dans la famille des procédés membranaire sous pression (Gracia F, et al, 2006). Elle est basée sur l'utilisation d'une membrane à pores nanométriques (< 2 nm) porteuse de charges ioniques superficielles. La membrane peut être composée d'un matériau organique ou minéral.

La nanofiltration permet de retenir les molécules de masses moléculaires allant de 200 à 2000 g/mol) par effet physique et les ions par effet électrostatique. Elle est utilisée principalement dans le domaine de la pharmacie, pour la séparation de petites molécules à forte valeur ajoutée (antibiotiques).

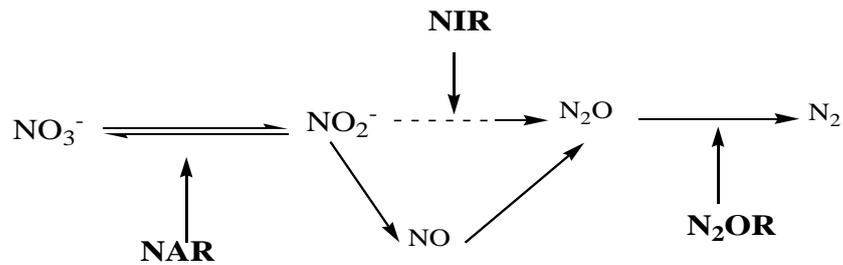
Dans le cas des nitrates, la présence des sels a un effet marqué sur la rétention des nitrates (Gracia F, et al, 2006). L'influence de divers ions dans la solution de nitrates, à la présence des ions sulfates divalents provoque une diminution de la rétention des nitrates. Cet effet est dû à la forte rétention des sulfates à cause de leur taille et des répulsions électrostatiques

1.6. Procédés biologiques de dénitrification :

Les traitements biologiques occupent une place importante parmi les procédés mis en place pour éliminer les nitrates.

La dénitrification biologique repose sur l'utilisation de bactéries, essentiellement de la famille des Pseudomonas, qui utilisent les nitrates à la place de l'oxygène de l'air, et qui les transforment en azote gazeux. Le nitrate ou l'un des intermédiaires est utilisée comme accepteur final d'électrons transférés le long de la chaîne respiratoire (Tiedje, 1988).

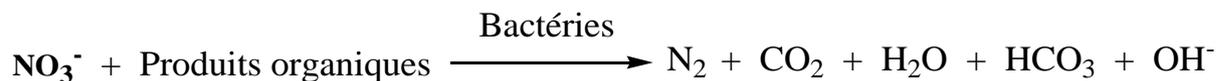
Les oxydes d'azote solubles, nitrates (NO_3^-) ou nitrites (NO_2^-), sont transformés en composés gazeux : oxyde nitrique (NO) protoxyde d'azote (N_2O) et/ou azote (N_2) comme il est indiqué ci-dessous :



Chaque étape est catalysée par une enzyme particulière : nitrate réductase (NAR), nitrite réductase (NIR), oxyde nitrique réductase (NOR), et oxyde nitreux réductase (N₂OR) (Cavigelli et al, 2001). Il y a deux types de dénitrification : (La dénitrification autotrophe et la dénitrification hétérotrophe). Les bactéries hétérotrophes consomment les produits organiques pour en tirer l'énergie tandis que les bactéries autotrophes apportent cette énergie des matières inorganiques et du soufre parfois.

1.6.1. Dénitrification hétérotrophe :

Ces bactéries réalisent la réduction des nitrates en l'absence d'oxygène. Elles ont une croissance rapide, sont peu influencées par la température ; elles nécessitent un pH de 7-8,2 et une teneur en oxygène inférieure à 0,5 mg/l. La dénitrification hétérotrophe est la réaction la plus utilisée dans les procédés biologiques mis en œuvre à l'échelle industrielle. La réaction peut se schématiser ainsi :



Ces bactéries en oxydant des substrats carbonés permettent l'apport d'énergie et de carbone pour le métabolisme cellulaire. La dénitrification hétérotrophe requiert un donneur d'électrons d'un composé organique (méthanol, éthanol, glucose,...) (Bougard, 2004). En absence d'oxygène, ces bactéries dénitrifiantes, souvent anaérobies facultatives, vont utiliser l'oxygène des nitrates comme accepteur final d'électrons.

1.6.2. Dénitrification autotrophe :

De la même manière que précédemment, les nitrates sont réduits en azote gazeux dans des conditions anoxiques. Par contre, l'apport d'énergie se fait au moyen d'un substrat inorganique, hydrogène, soufre ou fer métallique. Les bactéries impliquées ont une cinétique

très lente, rendent ces techniques plus difficilement applicables à l'échelle industrielle (Marie, 2002)

1.6.2.1. La dénitrification à l'hydrogène:

La dénitrification biologique autotrophe peut avoir lieu avec l'hydrogène comme donneur d'électron selon la réaction suivante (Kurt et al, 1987).

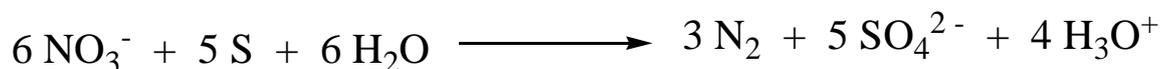


Elle est réalisée par des bactéries de type *Paracoccus* dénitrificans et *Alcaligenes eutrophus* (Tiedje et al, 1982; Teidje ,198). Les bactéries reçoivent une énergie suffisante pour la réduction des nitrates en azote gazeux par l'oxydation de l'hydrogène.

Les avantages de ce procédé sont l'élimination complète des nitrates avec rejet d'azote gazeux, par ailleurs les inconvénients du procédé sont liés à l'utilisation de l'hydrogène (stockage et risque de l'explosion).

1.6.2.2. La dénitrification sur support soufré:

L'une des substances inorganiques utilisées est le soufre, ce qui donne son nom au procédé « procédé soufre/Chaux » ; le soufre jouant le rôle de donneur d'électrons la chaux servant à maintenir le pH. La réaction peut être schématisée ainsi :



Cette réaction est catalysée par des bactéries autotrophes anaérobies du genre *thiobacillus* qui ont la capacité de réduire les nitrates en oxydant de nombreux composés soufrés comme : S^{2-} , S , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$, SO_3^{2-} et même H_2S .

1.6.2.3. La dénitrification par le fer métallique :

La dénitrification par le fer métallique est un procédé basé sur la dénitrification autotrophe, avec un accepteur d'électrons le fer métallique. La dénitrification d'eaux pauvres en matières organiques est également possible en présence de fer ferreux.

1.7. Les avantages et les inconvénients des procédés d'élimination des nitrates :

Nous présentons au tableau suivant les différents avantages et inconvénients des procédés d'élimination des nitrates.

Le tableau 1.4 : les avantages et les inconvénients de chaque procédé.

| Procédé | Avantages | Inconvénients |
|-----------------------------------|---|---|
| biologique | <ul style="list-style-type: none"> • Rejets exempts de nitrates, • Probabilité faible de formation de sous-produits toxiques, • Spécifique des nitrates, • Faible concentration. | <ul style="list-style-type: none"> • Rendement acceptable dans un domaine de température entre 5°C à 75°C, • Surveillance suivie. |
| Résines échangeuses d'ions | <ul style="list-style-type: none"> • Fiable en toutes circonstances, • Adaptable à un fonctionnement automatique peu sensible aux basses températures. | <ul style="list-style-type: none"> • Dépend de la qualité de l'eau brute : si SO₄ trop élevée, et en Cl si cycle chlorures, • Non spécificité des espèces retenues (SO₂⁻Cl⁻), • Risque de relargage, • Nécessité d'une régénération, • L'eau traitée peut être corrosive, • Rejets très concentrés en nitrate, • Très coûteux. |
| Osmose inverse | <ul style="list-style-type: none"> • Procédé bien maîtrisé <ul style="list-style-type: none"> ○ fiable en toutes circonstances, • Peut fonctionner en automatique, • La composition de l'eau brute a peu d'importance. | <ul style="list-style-type: none"> • Modifie la qualité de l'eau initiale (l'eau traitée peut être corrosive), • Non spécificité des espèces retenues, • Nécessité un prétraitement et quelquefois un post-traitement, • Problème d'évacuation des éluats riches en nitrates, • Durée de service des membranes, • Très coûteux. |
| Electrodialyse sélective | <ul style="list-style-type: none"> • Ne nécessite pas de régénération. | <ul style="list-style-type: none"> • Spécificité moyenne pour des rendements limités, • Nécessité d'un prétraitement, • Présence de rejets concentrés. |

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

1.8. Technique biologique de la dépollution azotée :

Les systèmes biologiques de dépollution azotée consistent, en premier étape, à oxyder l'azote ammoniacal en azote nitrique en milieu aérobie (nitrification) et en seconde étape, à réduire les nitrates formés en azote gazeux en condition anoxique (dénitrification).

Les microorganismes utilisés peuvent être soit en culture libre (système à boues activées), soit en culture fixée (Patureau, 1995).

1.8.1. Les procédés à biomasse libre :

1.8.1.1. Les systèmes à boues activées :

Les premières installations de traitement des eaux usées leur objectif était l'élimination de la pollution carbonée. La nitrification, a été mieux maîtrisée que la dénitrification, dans ces installations. Les procédés de la dénitrification sont apparus plus tardivement et se sont intégrés aux systèmes nitrifiants préexistants. L'association dans un même bassin aérobie de la dépollution carbonée et de la nitrification, suivie d'un bassin anoxique permettant la dénitrification, a été le premier schéma proposé (Figure.1.5).

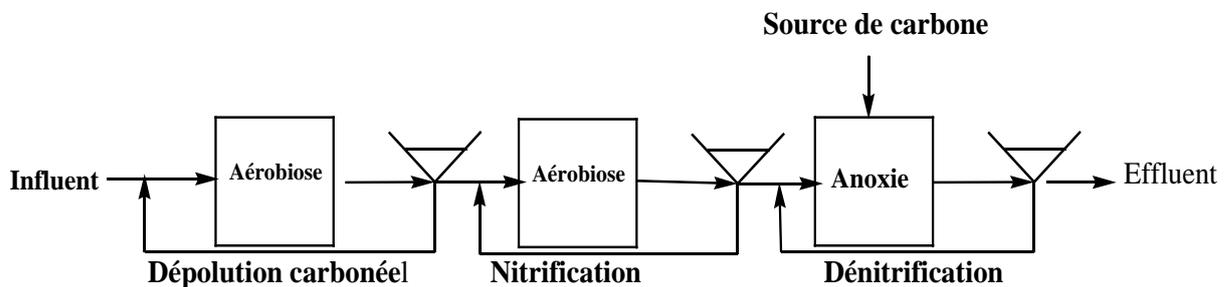


Figure 1.5: Procédé classique à boues activées (d'après Barnard et al, 1998).

Cette approche a nécessité l'ajout d'une source de carbone externe au niveau du bassin de dénitrification (méthanol ou acétate). Afin d'éviter l'ajout de carbone exogène. Ludzack-

Ettinger ont proposé un système (figure 1.6) où la dénitrification a utilisé le carbone présent dans l'effluent. Ce dernier envoyé dans le réacteur de nitrification avec un recyclage des nitrates produits dans la zone aérobie.

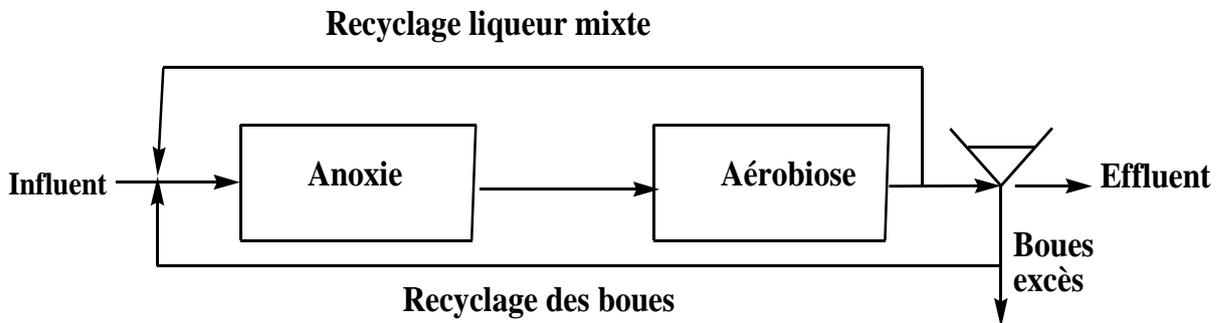


Figure 1.6: modèle de Ludzack-Ettinger modifiée (Cooper et al, 1994).

Ce modèle est l'optimisation de la DCO et limitation de la déstabilisation de la flore nitrifiante par la croissance d'hétérotrophes.

En 1973, le modèle précédent a été complété par Bernard (figure 1.7). Il a ajouté un troisième bassin anoxique après le bassin aérobie nitrifiant, permettant la dénitrification, et un quatrième bassin aéré qui assure le dégazage du dioxyde de carbone, l'augmentation du pH et la précipitation du phosphate (modèle Berdenpho). La dénitrification dans cette seconde zone anoxique est généralement très faible. Tous ces modèles ont été largement utilisés durant les 25 dernières années avec des performances de 85 à 95% en élimination de l'azote et des concentrations finales de moins de 10mg N.l^{-1} (cooper et al, 1994).

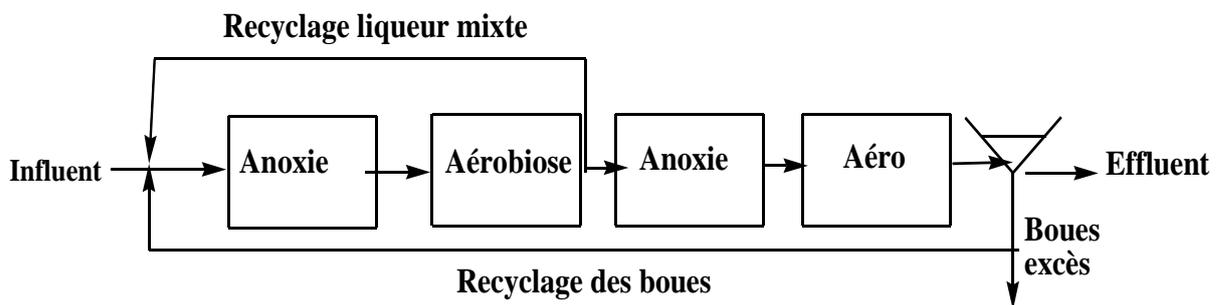


Figure 1.7: Modèle de Barnard de 1973.

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

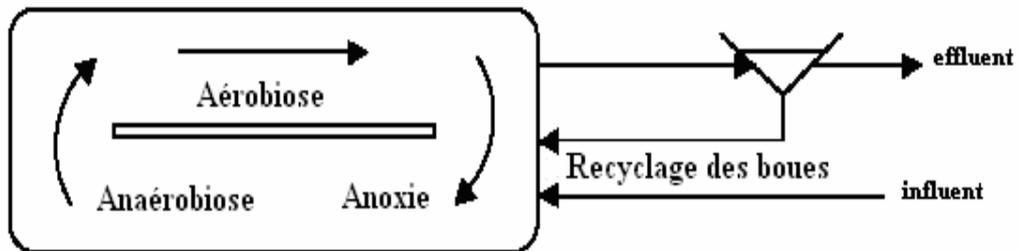


Figure 1.8 : Chenal d'oxydation (Cooper et al, 1994).

1.8.1.2.. Le SBR :

Le SBR (Sequencing Batch Reactor) est un réacteur à biomasse libre, de manière que le mélange de l'alimentation et le soutirage se font de manière séquentielle.

Le principe de ce modèle se fait par répétition de cycles identiques, et chaque cycle est divisé en quatre étapes : l'alimentation, la réaction biologique, la décantation et la vidange (figure 1.9).

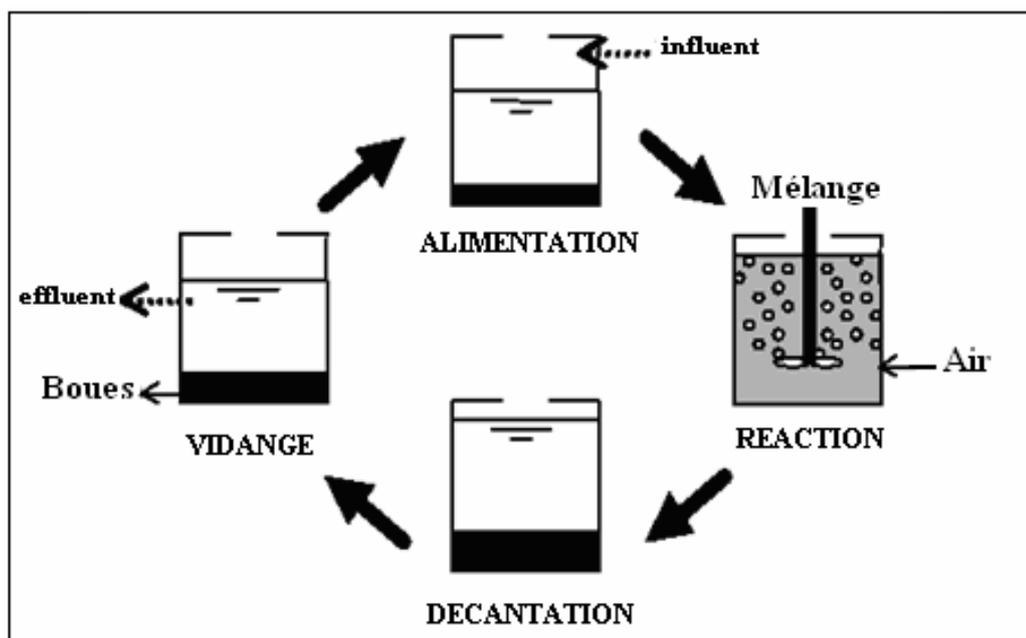


Figure 1.9: Modèle et principe de fonctionnement du réacteur SBR (Torrijos et al, 2000).

Une réaction de (nitrification/dénitrification) se déroule dans le même réacteur et se divise en deux phases : l'une est phase aérobie de transfert d'azote ammoniacal en nitrate et l'autre phase d'anoxie pour la dénitrification, et pour que la DCO soit élevée dans l'effluent, la phase d'aération vient directement après la phase anoxie. Les performances du SBR sont en fonction de temps de séjours de chaque phase et du volume relatif amené à chaque cycle. Le temps de séjour hydraulique ainsi que la charge appliquée, sera fixé par les débits d'alimentations journaliers (DAJ).

Le SBR est utilisé pour les traitements d'effluents industriels comme les effluents d'abattoir, les lisiers de porc, et les lixiviats de décharge (Mace et Mata-Alvarez, 2002). Il est également utilisé pour traitement d'eau de digesteur de boues (ou il peut rester de 800 à 1000mg N-NH₄⁺. L⁻¹) avec des efficacités moyennes de 1Kg. N. m⁻³. J⁻¹ (Mossakowska et al, 1977).

1.8.1.3. Les réacteurs à membranes :

Les systèmes à boues activées sont complétés par une unité de séparation membranaire qui sert à retenir et recycler la biomasse, afin d'éviter la perte de biomasse. Cette méthode utilise un réacteur à cellules immobilisées et les concentrations en biomasse peuvent atteindre 120 Kg .m⁻³ dans ce système (Dos Santos et al, 1999).

Suite à une configuration d'aération discontinue sur un lixiviat de décharge, il peut être utilisé en aérobie ou en anaérobie pour la nitrification /dénitrification, des performances d'élimination de l'azote parvenant à 0.7 Kg N. m⁻³. j⁻¹ (Van Dijk et Roncken, 1997).

La recirculation de l'effluent ammoniacal et la perméabilité à travers la membrane, ainsi que le colmatage des membranes est un frein pour cette technique, et le coût élevé de fonctionnement, c'est la raison pour laquelle ce type de procédé est peu utilisé dans le traitement de l'azote en station d'épuration.

1.8.2. Les procédés à biomasse fixée :

Le principe de ces procédés est basé sur l'utilisation de la capacité de fixation des microorganismes sur un support solide, granulaire, fixe ou mobile, immergé ou non (Figure 1.10).

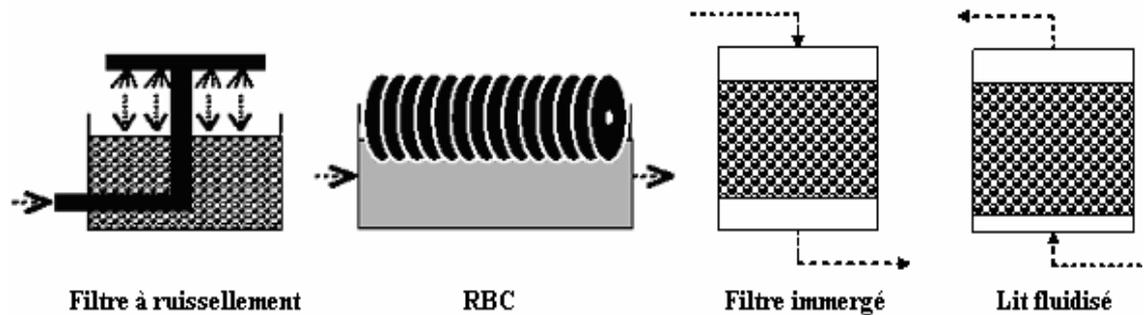


Figure 1.10 : les principaux modèles de traitement de l'azote par immobilisation de la biomasse (Sorensen et Jorgensen, 1993).

Le lit bactérien est un réacteur biologique aérobie, où les microorganismes sont fixés sur un support inerte et forment un biofilm. Il peut être représenté avec le mouvement des divers composés (Figure 1.11) :

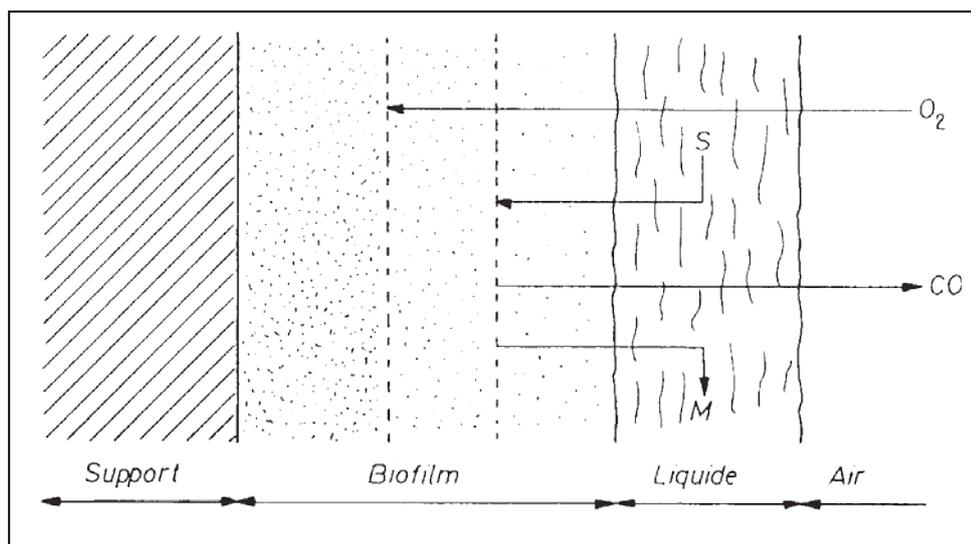


Figure 1.11 : Schema de principe du biofilm.

1.8.2.1. Le lit bactérien à ruissellement :

C'est un système à cellules immobilisés le plus anciennement utilisé. Les réacteurs à filtre de ruissellement, la biomasse est fixée sur un support solide, circulaire surmonté d'un distributeur rotatif. L'effluent à traiter est écoulé par gravitation sur le lit bactérien. Un inconvénient majeur de ce type de réacteur est l'absence de colonisation par la biomasse, qui fait augmentation la charge en azote ammoniacal et peut entraîner une baisse de performance par non élimination du surplus ammoniacal.

1.8.2.2. Les contacteurs biologiques rotatifs (RBC) :

Les procédés à contacteurs biologiques rotatifs (RBC) ou bio disques sont constitués de disques plus ou moins immergés (40-60%) dans un réservoir à flux continu, tournent à une vitesse d'environ 1 rpm et sur les quels s'est développée la biomasse. Ces réacteurs ont une surface d'échange de 150 à 300 m². m⁻³ et la concentration en biomasse peut atteindre 30 kg. m⁻³. Ces contacteurs sont conçues pour des procédés aérobies comme la nitrification et également utilisées pour la dénitrification par immersion totale des disques.

1.8.2. 3. Les réacteurs immergés :

Les réacteurs immergés ou biofiltres se constituent d'un milieu réactionnel rempli d'un solide sur lequel vont se fixer les bactéries. Le garnissage est un support inerte (roche, verre, plastique) et différentes formes (sphères, cubes, grillage, lamelles). Le traitement nitrification/dénitrification est souvent réalisé en utilisant deux biofiltres en série avec ajout d'une source de carbone dans le réacteur de dénitrification. Les taux de nitrification et de dénitrification obtenus entre 10 et 25°C est respectivement de 0,4 à 1,6 kg N. m⁻³. j⁻¹ et de 0,5 à 3 kg N. m⁻³. j⁻¹ respectivement, avec une efficacité globale d'élimination de l'azote de 80-90% (Wang *et al.*, 1992).

La deuxième génération de réacteurs immergés (ou réacteur à lit flottant) fait intervenir un support flottant (polystyrène, polypropylène, ou polyéthylène). L'études de Garrido et al. (2001) ont obtenus un taux de nitrification de 1,1 kg N.m⁻³.j- 1 avec un effluent à 50 mg N-NH⁴⁺. L⁻¹.

1.8.2. 4. Les réacteurs à lit fluidisé :

Les systèmes à lit fluidisé est la tendance pour la mise en place. Les particules support, (généralement du sable), fluidisées par recirculation continue de l'effluent ou par ajout de gaz. Les performances de ces types de procédés peuvent aller jusqu'à 90-95% de dénitrification avec des fréquences de lavage réduites à trois lavages par mois.

"L'étude de la croissance d'une culture bactérienne ne constitue pas un thème spécialisé ou une branche de la recherche ; c'est la méthode de base de la microbiologie".

Jacques Monod

1.9. Culture des micro-organismes :

En écologie microbienne, le terme micro- organisme montre un ensemble d'espèces bactériennes qui sont en interaction dans un même écosystème ou milieu et qui partagent une même fonction. Ces micro-organismes sont caractérisés par une grande diversité taxonomique.

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

- Les micro-organismes cylindriques dites en bâtonnet.
- Les micro-organismes sphériques ou coccoides.
- Les micro-organismes spiraux.

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

Les microbiologistes ont des techniques et des méthodes pour isoler une espèce présente au sein d'un mélange de micro-organismes. Dès lors que l'isolement est réussi, une souche peut alors être maintenue à l'état de culture pure (culture axénique : *a- sans et xenos- étranger*).

Les micro-organismes sont classés dans deux grands groupes basés sur leurs besoins nutritionnels (Oteng et Gyang, 1984). Les micro-organismes autotrophes utilisent le carbone minéral comme unique source de carbone, alors que les micro-organismes hétérotrophes utilisent le carbone organique.

1.9.1. Le milieu de culture :

Un milieu de culture, constitué à partir de substances biologiques ou chimiques, reproduit un environnement favorable à la culture d'un certain type de micro-organismes. Plusieurs centaines de milieux ont été décrits à ce jour et sont utilisés pour cultiver les bactéries. Un milieu synthétique ou un milieu défini peut être utilisé pour la culture de la plupart des micro-organismes.

1.9.2. Les facteurs physico-chimiques :

En plus des exigences nutritives, le développement des micro-organismes est sous la dépendance de différentes conditions physico-chimiques (L'eau, le pH, la température, et l'oxygène).

1.9.2.1. L'eau :

Les fonctions biologiques des micro-organismes et surtout leur reproduction ne peuvent s'effectuer qu'en présence d'une certaine quantité d'eau. Il contribue à la masse d'une bactérie pour 80% ou plus (Scriban, 1994).

Au cours de la croissance, les bactéries ne peuvent donc croître que dans ou sur des matières contenant suffisamment d'eau libre

1.9.2.2. Le pH :

Les micro-organismes ont un comportement variable par rapport au pH. De nombreux chercheurs, en particulier (Baas-Becking et col, 1960), ont étudiées les limites de pH pour la croissance et la reproduction bactérienne. Les systèmes de bio-oxydation utilisés tolèrent une gamme de pH allant de 5 à 9 avec une zone optimale de 6 à 8 La plupart des micro-organismes se développent à un pH neutre, mais certains ont besoin d'un milieu acide (bactéries acidophiles) ou d'un milieu basique (bactéries alkaliphiles) (figure 1.12). Donc Les milieux de culture doivent avoir un pH correspondant avec l'espèce recherchée. C'est pour cela que l'on utilise des tampons de pH pour stabiliser la valeur de ce dernier.

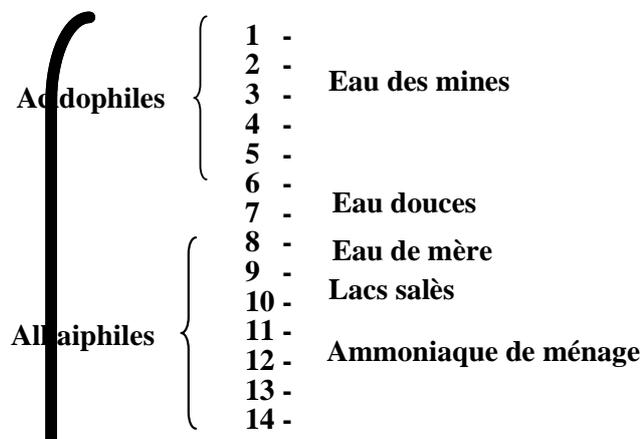


Figure 1.12 : Echelle de pH reliés à quelques environnements (Madigan M. 2000).

1.9.2.3. 1.a température :

La croissance bactérienne en fonction de la température fait différenciée leur type (Figure 1.13):

- Les micro-organismes psychrophiles : poussant de -15 à 10°C, on les trouve dans des Environnements très froids, comme les glaces polaires.

- Les micro-organismes mésophiles ; dont la croissance est possible entre 10 et 45°C, mais la température optimale est comprise entre 30 et 37°C. On les trouve dans les environnements agroalimentaires, médicaux et environnementaux.
- Les micro-organismes psychrotrope : sont Capables de se développer entre 0 et 40°C, mais dont la température optimale de croissance est de 20°C. Ces micro-organismes se trouvent dans les eaux, la terre des climats tempérés et dans certains produits réfrigérés.
- Les micro-organismes thermophiles : sont présents dans les sources hydrothermales, le long du gradient de température. Températures de croissance comprises entre 45°C et 70°C
- Les micro-organismes hyper thermophiles : températures de croissance supérieures à 80°C

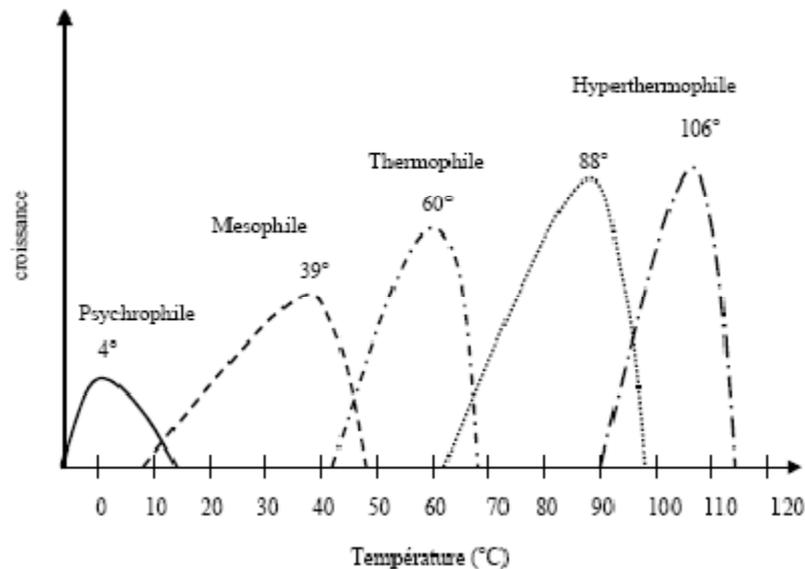


Figure 1.13 : Schéma reliant la croissance des micro-organismes à la température

(Madigan M. 2000).

1.9.2.4. L'oxygène :

Les micro-organismes possèdent des modes respiratoires variés : certains nécessitent de l'oxygène pour leur croissance alors que, pour d'autres, l'oxygène peut être délétère (Marchandin H, 2007). On distingue selon ces modes respiratoires différents groupes de micro-organismes :

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

1.9.3. Isolement en culture pure :

Dans leur environnement naturel, pratiquement tous les micro-organismes coexistent avec une multitude d'autres espèces. Cette coexistence d'espèces à l'état naturel est appelée « communauté microbienne » ou encore « population mixte ».

Les méthodes d'enrichissement aboutissent généralement à l'obtention d'un mélange d'espèces. Il est donc nécessaire d'utiliser des techniques qui permettent d'isoler individuellement une espèce de ce mélange. L'isolement est réalisé en utilisant des procédures aseptiques. Les procédures aseptiques incluent la stérilisation du milieu, l'isolement par stries et l'étalement ou l'inclusion sur / en milieu gélosé.

1.9.3. Stérilisation du milieu :

La stérilisation est un processus permettant de tuer ou d'éliminer tous les micro-organismes vivants présents dans un environnement donné. Le chauffage par la vapeur sous pression (autoclave) est une méthode de stérilisation fréquemment utilisée. Les milieux de culture sont autoclavés dans des tubes ou des flacons fermés (bouchon).

1.9.4. Conditions d'incubation :

Les micro-organismes peuvent être cultivés sur des milieux solides en boîte de Pétri ou sur des géloses en pentes dans des incubateurs. Un incubateur est une enceinte isolée dont la température, contrôlée à l'aide d'un thermostat est maintenue à 25 ou 30°C pour la culture des organismes communs du sol ou à 37°C pour la culture des organismes isolés de l'homme ou d'autres mammifères.

1.9.5. Les techniques classiques de la mesure de croissance :

L'un des outils essentiels de la caractérisation de la croissance microbienne est l'établissement de cinétiques de croissance et leur modélisation par ajustement d'un modèle primaire. Les deux méthodes de mesure de la croissance d'une population des micro-organismes les plus couramment utilisées sont (Mc Meeking T. et al, 1993).

- Le dénombrement des cellules viables sur boîte de Pétri.
- La mesure de la biomasse par turbidimétrie (Delignette-kuller M.L, 1995).

1.9.6. Principe des méthodes de dénombrement sur boîtes de Pétri :

Le dénombrement microbien consiste à déterminer le taux de contamination d'un aliment par un micro-organisme ou un groupe de micro-organismes cible. A chaque cible correspond une méthode de dénombrement dont le mode opératoire peut être définie dans des normes. Le principe général reste le même quels que soient l'aliment et la méthode, avec les étapes décrites ci-après.

- Préparation de l'échantillon à analyser : cette étape consiste à prélever la quantité d'aliment désirée (la prise d'essai), à la mélanger à un diluant et à rendre l'ensemble homogène. On obtient ainsi la suspension-mère.
- Dilutions successives : cette étape permet de diluer la suspension-mère jusqu'à obtenir une concentration microbienne exploitable (Figure 1.14).

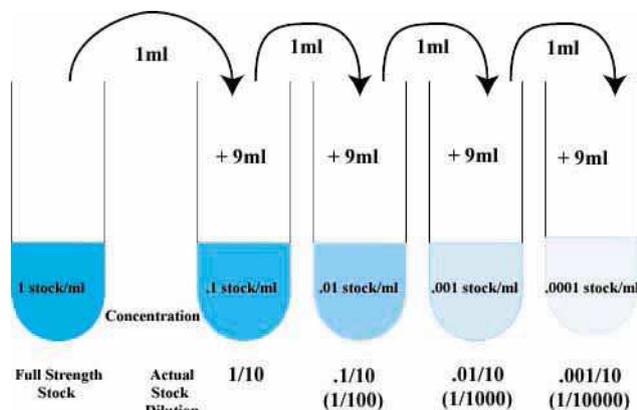


Figure 1.14 : technique de Dilutions successives

- Ensemencement des boîtes de Pétri : un volume défini de la suspension mère et/ou des dilutions ad hoc sont déposées dans ou sur un milieu gélosé nutritif, en boîtes de Pétri (Figure 1.15).
- Incubation : les boîtes sont incubées à une température idéale de développement pendant une durée suffisante.
- *Lecture* : chaque cellule déposée forme un amas (ou colonie) ; le nombre de colonies par boîte est dénombré ; on suppose par la suite qu'il y avait une "unité" de microorganisme ayant formé chaque colonie.
- *Expression des résultats* : le taux de contamination de l'aliment est exprimé en nombre d'unités formant colonie par gramme (ufc/g) ou par millilitre (ufc/ml) d'aliment (Figure 1.15).

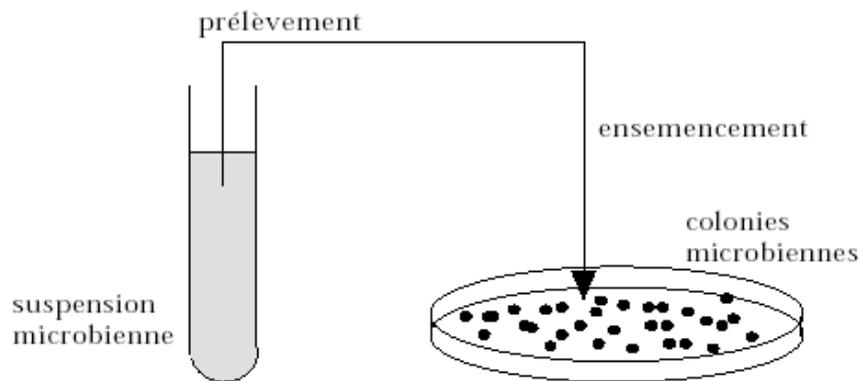


Figure 1.15 : technique de traitement sur boîte de pétri.

1.9.7. Techniques turbidimétriques de mesure de la biomasse :

L'augmentation de la biomasse bactérienne accompagnant la croissance d'une population de microorganismes entraîne l'opacification du milieu de culture. Cette technique ne consiste pas à compter directement les cellules mais à mesurer la biomasse bactérienne. C'est-à-dire la masse cellulaire sèche totale (Meynell G. G. et al, 1970). Les techniques turbidimétriques permettent de suivre l'évolution de la biomasse bactérienne par la mesure de la densité optique (DO). Cette variable définie comme logarithme du rapport entre l'intensité I_0 du faisceau incident et l'intensité I du faisceau transmis, caractérise l'opacité d'un milieu (figure1.16).

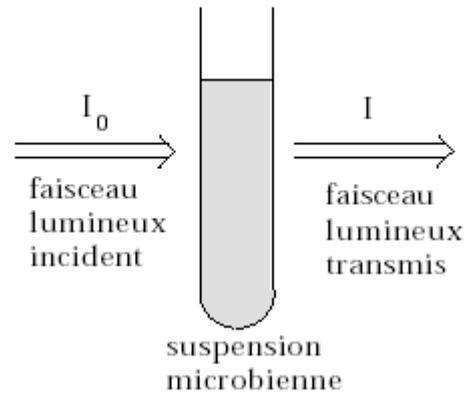


Figure 1.16 : technique turbidimétrique de mesure de la biomasse.

1.9.8. Schéma de la croissance bactérienne :

L'introduction d'une petite population de bactérie (inoculum) dans un volume adapté de milieu de culture conduit à une augmentation prévisible du nombre de cellules. Permet de suivre la courbe le long du cycle. Lorsque des micro-organismes sont cultivés en milieu liquide, ils se développent dans un système fermé, culture en (batch) ou discontinue : ils sont incubés dans un flacon fermé contenant un seul lot de milieu. Comme il n'y a pas d'apport de milieu frais au cours de l'incubation, la quantité d'élément nutritifs diminue et la concentration de déchets augmente.

Le cycle est également représenté sous forme d'une courbe de croissance correspondant au suivi de la population (densité de population N) ou au suivi de la biomasse (densité de la biomasse X), éventuellement après transformation logarithmique, en fonction du temps. Depuis la première description de (Buchanan, 1918), il est classique de distinguer plusieurs phases dans la croissance des cultures des micro-organismes. Ces phases sont caractérisées par certaines valeurs ou variations de la vitesse de multiplication de la culture. On reconnaît classiquement les sept phases successives suivantes (Figure.1.17).

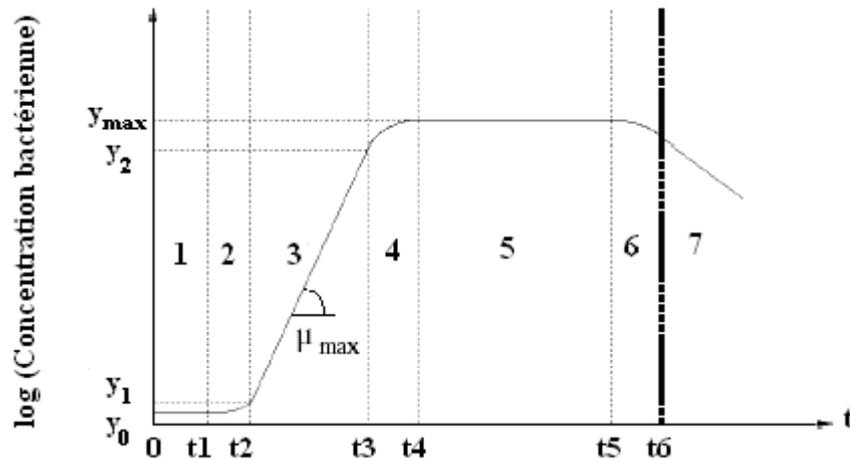


Figure 1.17. : Différentes phases de la croissance bactérienne en milieu liquide décrites par (Buchanan, 1918).

a. La phase de latence :

Le repiquage d'une culture dans un milieu « frais » entraîne une phase d'adaptation. Au cours de cette phase initiale de latence la cellule synthétise en particulier les enzymes qui lui sont nécessaires pour métaboliser le substrat présent (Reatz et Bauer, 2001). La durée de la phase de latence est extrêmement variable. Au cours de cette phase, il n'y a pas de reproduction cellulaire :

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

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

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

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

b. La phase d'accélération de croissance

Durant cette phase, le taux moyens de croissance par organisme augmente avec le temps, cette augmentation par organisme ne continue pas indéfiniment mais seulement jusqu'à certain point déterminé par le temps, proprement dite : la reproduction cellulaire commence.

c. La phase exponentielle de croissance :

Durant cette phase, les micro-organismes ce multiple leur nombre à un intervalle de temps régulier. Au cours de cette phase, la vitesse de croissance dX/dt augmente proportionnellement à X . D'où l'allure logarithmique (ou exponentielle) du phénomène en coordonnées semi-logarithmique, ($\text{Log}X = f(t)$), cette phase a l'allure d'une droite :

$$dX/dt = \mu X$$

On peut modéliser simplement la phase exponentielle de croissance par :

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

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

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

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

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

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

d. La phase de ralentissement :

Durant cette période la vitesse de taux de croissance régresse. Le nombre de micro-organisme continue à augmenter mais moins rapidement que durant la phase de croissance exponentielle. Il y a un épuisement du milieu de culture du fait de la disparition d'un ou plusieurs composés nécessaires à la croissance et à une accumulation des produits inhibiteurs résultants du métabolisme bactérien, il existe un début d'autolyse des micro-organismes.

e. La phase stationnaire :

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

f. Phase de mort accélérée :

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

g. la phase de déclin (décroissance) :

Durant cette phase, un changement nuisible de l'environnement comme la carence en nutriment et l'accumulation de déchets toxiques conduisent à la diminution du nombre de cellules viables et une lyse cellulaire sous l'action des enzymes protéolytiques endogènes, caractéristique de la phase de mortalité.

1.10. Taxonomie et phylogénie des bactéries dénitrifiantes :

Un grand nombre de bactéries hétérotrophes, physiologiquement et taxonomiquement différentes, sont capables de dénitrifier (Knowles, 1996). Presque 130 espèces bactériennes dénitrifiantes ont été trouvées avec plus de 50 genres (Zmuft, 1992). Les genres principaux associés à la dénitrification sont : *Actinomyces*, *Aeromonas*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Bacteroides*, *Campylobacter*, *Cellulomonas*, *Chromobacterium*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Eubacterium*, *Flavobacterium*, *Geodermatophilus*, *Halobacterium*, *Halococcus*, *Hyphomicrobium*, *Klebsiella*, *Leptothrix*, *Micrococcus*, *Moraxella*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Peptococcus*, *Photobacterium*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Spirillum*, *Staphylococcus*, *Streptomyces*, *Thiobacillus*, *Vibrio*. Toutefois, même si de nombreux organismes sont capables de réduire le nitrate en nitrite en absence d'oxygène, seuls quelques-uns sont capables d'une dénitrification complète (transformation du nitrate en azote gazeux). Parmi eux : *Pseudomonas denitrificans*, *Pseudomonas Stutzeri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus denitrificans* et *Thiobacillus denitrificans* (Kiff, 1972). Entérobactérie Hormachea (Aouati.M.K,et al.2017).

De nombreuses études sur la diversité des bactéries dénitrifiantes se tournent actuellement vers l'amplification de gènes fonctionnels de la dénitrification. Ces gènes peuvent être les gènes de la nitrate réductase periplasmique ou liées à la membrane (NapA et NarG) (Flanagan et al., 1999 ; Gregory et al., 2000), les gènes codant pour le cytochrome *b* (NorB), sous-unité de la réductase de l'oxyde nitrique (Zmuft, 1997), les cytochromes *c et d1*, relatif aux nitrites réductases dont une contient du cuivre (NirS et NirK respectivement) (Braker et al., 2000), et un gène codant pour l'oxyde nitreux réductase (NosZ) (Scala & Kerkhof, 1999). Ces études ont révélé une importante diversité des gènes de dénitrification dans l'environnement qui, souvent, sont divergents des gènes provenant des bactéries dénitrifiantes en culture (Braker et al., 2000; Gregory et al., 2000).

1.11. La caractérisation moléculaire des micro-organismes :

La biologie moléculaire est devenue incontournable dans l'étude des processus impliqués dans le traitement des eaux usées. Nous présentons quelques outils couramment utilisés aujourd'hui pour caractériser les populations microbiennes des boues activées, afin d'apporter des informations essentielles à la compréhension et à l'optimisation du fonctionnement des stations d'épuration.

Les micro-organismes sont à l'état de viabilité mais non cultivables elles échappent à la détection lorsque l'on applique des tests microbiologiques conventionnels (Lleo et al., 2001). Les approches moléculaires peuvent potentiellement permettre de détecter une plus grande proportion des communautés bactériennes que la microbiologie classique.

Les approches basées sur l'ADNr 16S comme ARDRA (amplified ribosomal DNA restriction analysis), DGGE (électrophorèse sur gel à gradient dénaturant), ou TGGE (électrophorèse sur gel gradient de température), peuvent être utilisées pour augmenter la vitesse de collecte de données, en permettant l'analyse de l'ensemble des produits de l'amplification du criblage de clones (McCaig et al., 2001). L'ensemble de ces approches débute par une amplification par PCR ciblant des marqueurs génomiques.

1.11.1. Technique Polymerase Chain Reaction (PCR) :

La Technique d'amplification ou Polymerase Chain Reaction (PCR) permet de reconnaître et d'amplifier *in vitro* un fragment d'ADN spécifique, parmi les millions de gènes d'un micro-organisme et les milliards de micro-organismes d'un échantillon, en quelques heures seulement.

La réaction PCR consiste en une succession de réactions chimiques appelées « cycles », chacun contenant trois étapes, dénaturation, d'une hybridation et d'extension de la polymérase (Mullis et al., 1996).

- Dénaturation : la dissociation des brins d'ADN (à 95°C) ;
- L'hybridation spécifique des amorces : aux deux extrémités de la séquence à amplifier (entre 50 et 60°C°).

- l'élongation des brins d'ADN : à partir de chaque amorce grâce à l'action de l'ADN polymérase (à 72°C). Cet enzyme va synthétiser de nouveaux brins d'ADN en assemblant les nucléotides par complémentarité avec les brins d'ADN matrice.

Le nombre de copies de l'ADN cible est doublé à chaque cycle. Au bout de trente cycles, on obtient donc théoriquement 2 copies du fragment d'intérêt, soit plusieurs milliards.

Les méthodes qui utilisent la PCR peuvent conduire à l'identification d'un isolat dans les heures et peuvent être utilisés sur de petites quantités de cellules, y compris ceux qui ne sont pas viables ou non cultivables (Tarr et al., 2007) à l'opposition des méthodes microbiologiques qui nécessitent plusieurs jours.

1.11.2. Technique de gel électrophorèse en conditions dénaturantes (DGGE) :

La (DGGE) est une technique d'empreinte moléculaire visant à séparer des molécules d'ADN de même longueur dans un gel contenant un agent dénaturant, les fragments d'acide nucléique sont soumis à différentes concentrations croissantes en dénaturant. Les brins d'ADN se séparent plus ou moins rapidement en fonction de leur composition en bases AT et GC (2 liaisons hydrogènes pour AT contre 3 pour GC). (Fischer et Lerman. 1979).

La molécule la plus stable migrera moins vite que celle qui se dénaturera dans le gradient.

La DGGE est un outil puissant et pratique pour analyser la diversité des séquences complexes microbiennes naturelles des populations (Kowalchuk et al., 1997) et en plus des bandes intéressantes excisées des gels ou des fragments d'ADN clonés dans un vecteur peuvent ainsi être séquencés (Huybens et al., 2009) afin d'identifier l'espèce bactérienne correspondante.

1.11.3. Le clonage :

Le clonage repose sur l'insertion d'un fragment d'ADN exogène dans un vecteur (plasmide, phagemide, bactériophage...). Le vecteur de clonage est coupé par une enzyme de restriction qui connaît un site unique. Ce site étant unique, le vecteur est donc linéarisé et

possède à chaque extrémité une partie de la séquence d'ADN reconnue par l'enzyme de restriction

Le plasmide obtenu, de nouveau circulaire, est dit recombinant s'il a intégré un insert (Tagu et Moussard, 2003). Ensuite ce plasmide recombinant est introduit dans une cellule hôte qui indépendamment de cet hôte est capable de se multiplier.

1.11.4. Le Séquençage :

Le séquençage de l'ADN constitue une méthode dont le but est de déterminer la succession linéaire des bases A.C.G et T prenant part à la structure de l'ADN. La lecture de cette séquence permet d'étudier l'information biologique par celle-ci (Lamoril et al., 2008), et de retrouver l'identité du micro-organisme correspondant après comparaison avec une base de données. Le séquençage est utilisé pour réaliser l'inventaire des espèces ou des fonctions potentielles d'un écosystème comme les boues activées par exemple.

Le séquençage selon la méthode originale de Sanger a été mis au point dans les années 1970. Ce fut une révolution dans le domaine de l'identification des micro-organismes. Le séquençage des produits de PCR après clonage est fréquemment employé avec le gène 16S (Kassinen *et al.*, 2007 ; Kjeldsen *et al.*, 2007 ;Shinzato *et al.*, 2007). En effet, le séquençage

de ce gène permet généralement l'identification de la souche jusqu'à l'espèce (Van de Peer *et al.*,1996).

Nous présentons au tableau suivant les principes et les objectifs des techniques de la biologie moléculaire, et c'est avantages et inconvénient.

Tableau 1.5 : Principes, objectifs et applications de quelques techniques de biologie moléculaire et leurs avantages et inconvénients.

| Technique | Principe | Objectif | Exemple d'application | Avantage | Inconvénients |
|-------------------|--|---|--|---|---|
| FISH | Marquage Fluorescent De l'ARNr | Identification Moléculaire et répartition spatiale des micro-organismes | Identification des bactéries filamenteuses | Rapide possibilité de multiplexage | Microscope à épifluorescence (cout) |
| PCR | Copie d'un fragment d'ADN cible <i>In vitro</i> | Amplification De l'ADN | DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) | Rapide Grand nombre d'échantillons traités | Réaction pouvant être inhibée par impuretés dans les extraits d'ADN |
| DGGE | Electrophorèse En gradient de dénaturant | Etude de la biodiversité des micro-organismes (possibilité d'identification Ulérieure des espèces dominantes) | Comparaison de différents types de stations d'épuration Impact de conditions particulières sur les micro-organismes | Grand nombre d'échantillons traités | Lourdeur des expérimentations |
| qPCR | Amplification quantitative de l'ADN | Quantification des micro-organismes | | Rapides plusieurs méthodes de détection disponibles | Seuil de quantification souvent limité aux populations présentes à plus de 10 ² cellules/mL de boues |
| Séquençage | Lecture de l'information génétique | Identification moléculaire des micro-organismes | Inventaire moléculaire de tous les micro-organismes présents et/ou de leurs fonctions associées | Approche exhaustive | Lourdeur des expérimentations et de l'analyse des données Cout élevé |

Matériels & méthodes

Chapitre 2

Matériels & méthodes

2. Matériels et méthodes :

2.1. Stérilisation des milieux, des solutions et les appareils :

La verrerie et d'autres appareils ont été stérilisés en étuve à 180°C pendant une heure. Tous les milieux et solutions utilisés ont été stérilisés par autoclavage à une température 121°C, 15 psi pression pendant 20 minutes. Après stérilisation, la verrerie stérilisée stockée séparément dans une étuve à 60°C et refroidie à température ambiante avant leur utilisation ultérieure. Les milieux et des solutions ont été refroidis à la température ambiante puis stockée sous réfrigération pour leur utilisation ultérieure.

2.2. Prélèvement de l'échantillon:

Les échantillons d'eaux usées ont été collectés à partir de boues anaérobies de la station d'épuration Ibn Ziad Constantine, Algérie. Les échantillons sont réfrigérés à 4°C et conservés pour une utilisation ultérieure.

2.3. Isolement et culture des microorganismes :

L'isolement des microorganismes sur des milieux de culture gélosé demeure souvent l'étape de base pour notre travail. Dilution en série est un processus de dilution d'un échantillonner plusieurs fois. Des pipettes stériles de 10 ml, un volume de 9 ml d'eau physiologique est transféré dans chacun des 5 tubes, avec une technique aseptique. On utilisant une pipette stérile de 1 ml l'échantillon de boues active est transféré dans le tube 10⁻¹ mélanger le tube

test correctement puis on continue la dilution pour le test 10^{-2} jusqu'à 10^{-5} avec une technique aseptique (Figure 2.1). Nous suggérons d'utiliser un milieu proposé par Patureau (Patureau et al., 1995), milieu minéral qui contenu (g/L): K_2HPO_4 , 1,00; KH_2PO_4 , 1,00; KNO_3 , 1,00; $NaCl$, 1,00; $MgSO_4$, 0,20; $CaCl_2$, 0,02, dans 1000 ml d'eau déminéralisée; pH =7.2. Les milieux inoculés ont été incubés à 25 ° C.

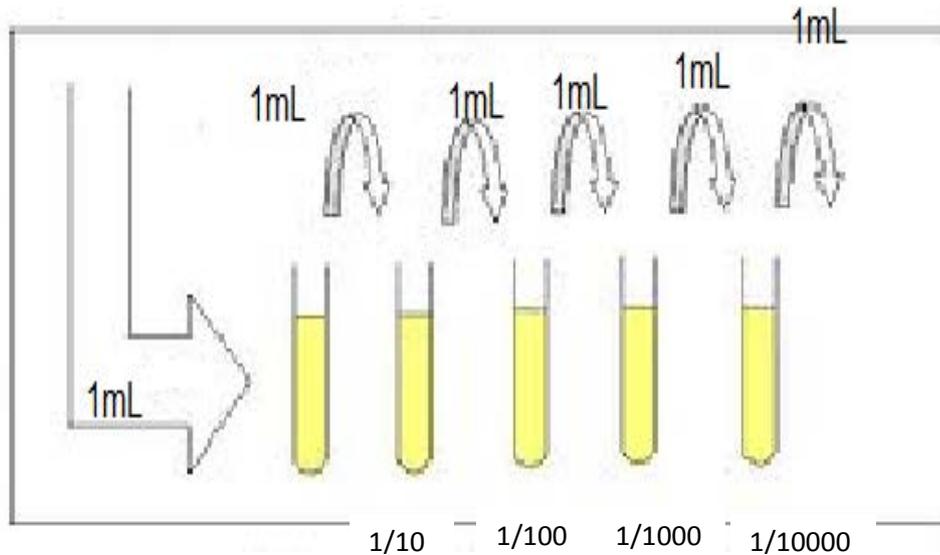


Figure 2.1 : Méthode de dilution En série

2.4. Méthode par ensemencement en surface sur milieu gélosé :

2.4.1. Mode opératoire :

- 1- (Dilution à $1/100$).
 - Préparation des dilutions.
 - Préparation pour l'ensemencement.
- 2- ▪Introduire dans un périe de tubes stériles correspondant au nombre de dilution à utiliser 1 ml d'eau stérile ou [de solution de Ringér diluée à $1/4$].
 - Prélever en suite 5 fois 1 ml d'échantillon soigneusement agité, [et déposer quatre des prélèvements à chaque fois une boîte de pétri stérile]et le cinquième dans le premier des tubes contenant 9 ml.

- 3- ▪Porter au bain-marie bouillant les tubes contenant soit la << gélose à l'extrait de levure>> soit le <<plant count agar>> jusqu'à fusion du milieu.
- Refroidir à $44^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ et maintenir au bain-marie à cette température.
 - Couler aseptiquement dans chaque boîte le contenu de gélose fondue.
 - Maintenue à $44^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ agiter doucement par un mouvement circulaire pour assurer un mélange homogène de l'eau et de la gélose, sans fuir de bulles et sans mouiller les bords de la boîte.
 - Le milieu doit être coulé 10 minutes au plus tard
 - Après répartition de l'eau à analyser, laissé refroidir sur une surface parfaitement horizontale et fraîche.
 - La moitié des boîtesensemencées avec chacune des différentes dilutions d'eau est incubée, aussitôt après solidification, dans une étuve à $37^{\circ} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ durant $24(\pm 1)$ heures

[Ou l'autre est placée dans une enceinte maintenue à une température de 20 à 22°C durant 72 ± 3 heures].

▪Conserver les boîtes à l'obscurité, couvercle en dessous.

- 4- ▪Les boîtes de gélose doivent être préparées (coulées, solidifiées, refroidies, convenablement séchées) Avant le début des manipulations.
- Prélever une prise d'essai de 0.1 ml avec une pipette graduée et la disposer à la surface du milieu à l'aide d'un étaleur stérile (... pasteur).
 - Répartir uniformément la goutte sur toute la surface de la boîte.

Le mélange d'inoculation avec une dilution en série a été étalé sur la boîte de Pétri stérile est étiquette (Figure 2.2), de même milieu contenant 1,5% en volume d'agar et incubée à 25°C jusqu'à ce que les colonies visibles aient été formées. On distingue différents types de colonies sur les plaques afin de comparer les micro-organismes isolés et de sélectionner le meilleur dénitrifiant.

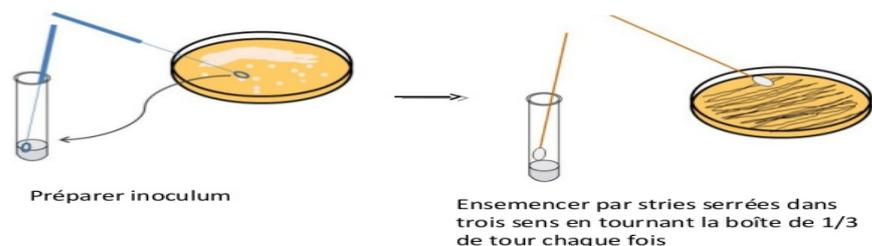


Figure 2.2: Méthode d'étalement sur boîte de pétri.

2.5 Identification et caractérisation des micro-organismes :

2.5.1. La coloration de Gram :

Le frottis est recouvert de cristal violet et reposer pendant 20 secondes. La tache est brièvement lavée à l'aide d'une pissette d'eau distillée. L'excès d'eau est évacué. Le frottis est recouvert de la solution iodine de Gram et reposer pendant 30 secondes. L'iodine de Gram est lavé. La lame est maintenue à un angle de 45 degrés et permet à l'alcool de 95% à couler le long de la surface de la lame jusqu'à ce que l'alcool soit incolore à mesurer qu'il s'écoule à partir du frottis en bas de la surface de la lame. Arrêter la décoloration par le lavage de la lame avec un jet d'eau. Le frottis est recouvert de safranine pendant 1 minute. La lame est lavée doucement pendant quelques secondes. Sécher avec du papier absorbant, séchage à l'air. La lame est examinée par immersion d'huile.

2.5.2. Identification des souches par l'utilisation de la galerie API 20E:

La galerie API 20E compte 20 micro-tubes contenant des substrats sous forme déshydratée (CIT, VP, GEL, ADH, LDC, ODC, URE, H2S.....). Les tests sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les milieux. On Remplit les cupules des tests : CIT, VP, GEL avec la suspension bactérienne, et les autres cupules des tests en anaérobiose : ADH, LDC, ODC, URE, H2S en remplissant leur Cupule d'huile de paraffine. Refermer la boîte d'incubation et la placer à 35-37°C pendant 18 à 24 heures. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanées ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du tableau d'identification ou grâce a un logiciel d'identification.

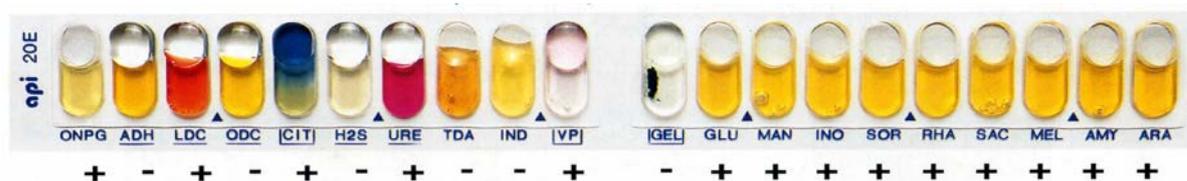


Figure 2.3 : La galerie API 20E.

2.5.3. Caractérisation moléculaire :

2.5.3.1. Extraction de l'ADN génomique :

A partir d'une culture jeune et pure sur milieu solide, on racle quelques colonies de la boîte et on solubilise la biomasse récoltée dans 740µl de TE (10mM Tris HCL, 1mM EDTA-Na₂ ; pH = 8).

Après homogénéisation, la biomasse est traitée avec 20 µl de lysosome (100mg/ml) puis incubée 5min à température ambiante. 40µl de SDS (10%) et 8µl de protéinase K (10mg/ml) sont additionnés avant une incubation à 37°C pendant une heure. On ajoute ensuite 100µl de NaCl (5M) et on homogénéise la solution par une forte agitation.

Après incubation à 65°C pendant 10min en présence de CTAB (10% CTAB dans 0,7M NaCl), on élimine les protéines dénaturées ainsi que les polysaccharides par deux extractions respectives au chloroforme/ alcool isoamylique (24v/1v) et au phénols/chloroforme/ alcool isoamylique (25v/24v/1v).

La séparation des phases aqueuse et organique se fait par centrifugation pendant 10min à 13000rpm et à température ambiante. La phase aqueuse additionnée de 0.6 de son volume par de l'isopropanol (-20°C) est incubée 30min à température ambiante, puis centrifugée 15min à 13000rpm.

Le précipité d'ADN est lavé avec une solution d'éthanol 70%, recentrifugé pour 5min puis séché et repris dans 20µl de la solution de TE (Tris EDTA) et conservé à -20°C.

2.5.3.2. Amplification de l'ADN par PCR "Polymerase Chain Reaction" :

La PCR est la Réaction de Polymérisation en Chaîne. C'est une technique d'amplification enzymatique (Taq polymérase) in vitro qui permet à partir d'un fragment

d'ADN, d'obtenir un grand nombre (plusieurs millions) de copies identiques de ce même fragment. La PCR comprend 3 phases :

- une phase de dénaturation.
- une phase d'hybridation.
- une phase d'élongation..

2.5.3.3. L'ADN ribosomal nucléaire :

L'ADN ribosomal nucléaire est constitué d'une unité répétée un grand nombre de fois (50 à 100 selon Cassidy et al., 1984).

Un mécanisme d'évolution concertée s'oppose à leur divergence et maintient leur homogénéité de séquence (Srivasta et Schlessinger, 1991). Cette unité contient des gènes extrêmement conservés codant pour des ARN ribosomiques (ARNr) et des régions intergéniques plus variables.

2.5.3.4. Amplification des régions intergéniques par PCR ITS :

L'espace intergénique transcrit « Internal Transcribed Spacer » ITS est considéré comme conservé au niveau intra-spécifique et variable entre espèces. Il représente donc un bon marqueur pour la révélation de la diversité génotypique des isolats.

L'amplification des séquences ITS a requis l'utilisation de deux amorces universelles (Wheeler et al., 1996) : S-D-Bact-1494-S ITS **16S-23S** (5'-GTCGTAACAAGGTAGTCACCCCC-3') et S-D-Bact-0035-A ITS **16S-23S** (5'-CAAGGCATCCACCGT-3').

La réaction PCR a été déroulée dans un volume final de 25µl. Le mélange réactionnel, la concentration des réactifs ainsi que les cycles d'amplification sont indiqués dans le tableau 1.

2.5.3.5. Amplification par PCR de l'ADN 16S :

L'ADNr 16S est le gène codant pour l'ARNr 16S (ARN ribosomique 16S), c'est un gène de ménage, essentiel pour le maintien des fonctions vitales de la cellule et présent dans

les génomes de toute cellule. Il représente une horloge moléculaire potentielle pour tracer les relations phylogénétiques entre les micro-organismes :

- Comporte des séquences internes très conservées qui permettent de sélectionner des amorces universelles pour l'amplification de l'ARNr 16S de la majorité des bactéries existantes.
- Comporte des séquences internes variables qui une fois analysées permettent de distinguer les espèces de bactéries entre elles et de les classer en fonction de leur phylogénie.
- est d'une taille suffisamment courte (~1500 pb) pour être analysé rapidement.

L'amplification de la séquence du gène qui code pour l'ARNr 16S a requis l'utilisation de deux amorces universelles (Wheeler et al., 1996) : S-D-Bact-0008-S (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') et S-D-Bact-1495-A (5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3').

La réaction PCR a été déroulée dans un volume final de 25µl. Le mélange réactionnel, la concentration des réactifs ainsi que les cycles d'amplification sont indiqués dans le tableau 1.

Tableau 2.1 : Composition du mélange réactionnel de la PCR ITS 16S-23S et de la PCR 16S.

| Constituants du mélange réactionnel | Amplification ITS et 16S |
|--|---------------------------------|
| Tampon de l'enzyme | 10X |
| MgCl ₂ | 25mM |
| dNTP | 25mM |
| Amorce F | 25µM |
| Amorce R | 25µM |
| Taq polymérase | 1U |

2.5.3.6. Identification des isolats dénitrifiantes :

L'identification des micro-organismes ont d'abord été réalisée avec des tests biochimiques, comme suggéré par le Manuel de Bergey du déterminant Bactériologique (Holt et al., 1994) qui se composait de pigment, de la catalyse, de la mobilité, de l'amidon des oxydes d'analyse et des tests maltose. L'identification moléculaire est une technique spécifique, l'extraction, l'amplification et le séquençage 16S ARNr. Cependant révélée essentielle pour identifier les organismes, l'étude de leur diversité et d'établir leurs relations phylogénétiques, a été réalisée en utilisant des protocoles.

Extraction de l'ADN génomique à partir d'une culture jeune et pure, quelques colonies ont été grattées et la biomasse récoltée est dissous dans 740 uL de TE (10 mM de Tris-HCl, 1 mM d'EDTA ; Na₂. pH = 8) après l'homogénéisation. Révélations de l'électrophorèse des produits d'amplification PCR ont été réalisées sur des gels avec 1,5% de gel d'agarose, préparée dans du tampon TBE. Bandes recherchées ont été visualisées par spectrométrie. L'amplification par PCR de l'ARNr 16S, est une technique d'amplification enzymatique (Taq polymérase) in vitro, elle a trois phases : de dénaturation, d'annelage et d'élongation. Les gènes de micro-organismes ARNr 16S ont été amplifiés par PCR en utilisant la paire d'amorces universelles (Wheeler et al, 1996) S-D-Bact-0008 S(5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3)etS-D-Bact-1495-S (5'CTACGGCTACCTTGTACGA-3').

La PCR a été lancée avec une dénaturation initiale de l'ADN à 94 ° C pendant 3 min. Les fragments d'ADN ont été analysés par électrophorèse sur 1,5% (p / v) sur gel d'agarose. Les gènes de micro-organismes ARNr 16S ont été comparés aux souches de référence disponibles dans la base de données accessible sur web, en utilisant le serveur BLASTn au NCBI: Centre national d'information sur la biotechnologie (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Cependant, les tests en lots ont été de 500 mL de volume en condition anaérobie. La concentration initiale de NO₃-N était de 300 mg.L⁻¹ et la source de carbone 1 mg.L⁻¹ pour le méthanol et le succinate de sodium séparément. La dénitrification dans les batch a été vérifiée par différents micro-organisme isolé.

2.6. Élimination des nitrates :

Les expériences ont été effectuées dans le réacteur batch de 500 ml pour tester la réduction du nitrate in vitro. Chaque batch propre et stérile a été rempli avec 250 ml de mélange de milieu et 10 ml de suspension de biomasse. Le réacteur a été mis en œuvre dans des conditions anaérobies avec le dénitrifiant. Le rapport C/N a été maintenu constant à 1,5 et à 35°C tout au long du travail accompagné d'un suivi de pH. Nous contrôlons l'élimination des nitrates et les effets de source de carbone séparément. Tandis que pour l'étude du rapport C/N on a inoculé des réacteurs batch chaque volume de travail est de 500 ml avec la souche N5 opérée en parallèle à des rapports C/N de 0.6, 1.0 et 3.0 avec le méthanol et succinate de sodium comme source de carbone et d'énergie séparément et a été accompagnée d'un suivi de pH.

2.7. Méthodes analytiques :

Les échantillons ont été centrifugés pendant 20 min à 7000 rpm (Sigma 1-15.). Ainsi, le surnageant obtenu a été utilisé pour l'analyse des nitrates et la demande chimique en oxygène (DCO), en utilisant les méthodes standard (APHA, 2014).

La concentration en nitrate a été surveillée par spectrophotométrie sur (Safas Monaco), par colorimétrie, avec la méthode de salicylate de sodium (Rodier., 1978) à $\lambda = 415$ nm, la croissance des micro-organismes a été contrôlée par spectrophotométrie à une longueur d'onde $\lambda = 600$ nm (Jianlong W. et al, 1999).

Tandis que la demande chimique en oxygène (DCO), on introduit dans un tube de 3 ml de l'acide solution (H_2SO_4 concentré = 1,83, contenant 6,6 g / l de AgSO_4), 0,1 g de poudre de HgSO_4 purifiée, 2 ml d'échantillon, 1 ml de la solution de dichromate de potassium, Après fermeture hermétique et homogénéisation, le tube est placé dans le réacteur de DCO, la dose finale est effectuée par absorptiométrie à $\lambda = 340$ nm (Rodier 9th ed). Le pH a été régulièrement contrôlé tout au long des essais par pH-mètre (instruments HANNA).

Résultats & discussion

Chapitre 3

Résultats & discussion

Première Partie : L'étude de la dénitrification par l'utilisation d'une culture mixte

Nous avons commencé nos expériences d'élimination des nitrates par l'utilisation de micro-organismes (culture mixte), prélevés à partir de la station d'épuration Ibn Ziad, Constantine. Il est préféré de s'assurer que nos micro-organismes sont capables d'éliminer les nitrates avant de commencer notre étude.

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

L'étude de la biodégradation du méthanol a été faite dans des conditions et des milieux variés, y compris les eaux de surfaces, les eaux usées, les eaux souterraines, les sédiments du sol. Le méthanol se dégrade complètement et sa dégradation ne produit pas d'intermédiaires persistants [Howard P.H., 1990]. Il est dégradé par une large variété de bactéries aérobies et anaérobies. Afin que nous puissions comparer les résultats déjà obtenue dans la littérature, nous avons commencé par l'utilisation de la même source de carbone.

Les expériences ont montré que la nature de la source de carbone a une grande influence sur la voie de réduction du nitrate. [Purtschert I. et al 1996, Foglar L. et al 2003, Maneesha P. et al, 2009].

Notre travail a été commencé par l'utilisation du méthanol comme source unique de carbone et d'énergie dans le processus de dénitrification pour voir les capacités de nos microorganismes à dégrader le méthanol et les nitrates en même temps.

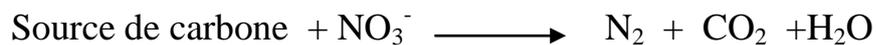
3.1.1.1. Etude de la croissance bactérienne :

Le méthanol a été utilisé comme source unique de carbone et d'énergie à une concentration (500 mg.L⁻¹) avec le nitrate comme accepteur final d'électrons (N-NO₃⁻ =137,80 mg.L⁻¹)

La croissance bactérienne et la concentration des nitrates a été suivi en fonction du temps afin d'étudier l'adaptation physiologique d'une culture mixte incubée dans un milieu synthétique, dans un bioréacteur à une température de 35°C.

Au cours d'incubation nous avons observé :

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



Les résultats sont représentés sur la figure suivante :

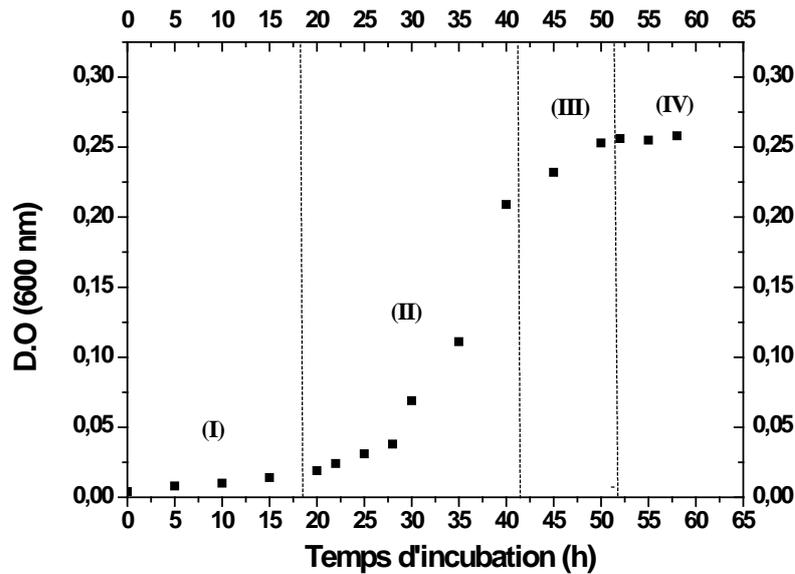


Figure 3.1.1 : Cinétique de la croissance bactérienne avec le méthanol comme source de carbone.

La cinétique de la croissance bactérienne a montré quatre phases principales (Figure 3.1.1):

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

Durant cette phase, il n'y a pas de division cellulaire : $X = X_0 = Cte$

La vitesse de croissance dx/dt est également nulle.

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

a) Taux de croissance bactérien

La définition du taux de croissance bactérien μ (h^{-1}) au cours de la croissance dans un réacteur batch durant chaque instant (t) :

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

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

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

μ : taux de croissance spécifique (temps⁻¹).

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

V : volume de la biomasse (unité de volume).

α : taux spécifique de lyse (temps⁻¹).

Aucun transport de la biomasse (influent et effluent) n'a lieu, car on a utilisé un réacteur batch et si on suppose que la croissance est en phase logarithmique, la respiration endogène (la lyse) fortement négligeable et donc $\alpha \ll \mu$.

En écrit l'équation (1) :

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

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

b) Taux d'utilisation du substrat

La consommation des substrats c'est pour fournir le nécessaire en nutriments, en énergie, en composés structuraux de la croissance bactérien.

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

$$\frac{dS}{dt} = \frac{F}{V} \cdot S - \frac{\mu X}{Y_{X/S}} - \frac{q_p X}{Y_{p/S}} - mX - \frac{F'}{V} \cdot S' \dots \dots \dots (3)$$

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

$\frac{ds}{dt}$: vitesse de consommation du substrat (ou demande instantanée).

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

V : volume de la culture (unité de volume).

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

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

μ et q_p : taux spécifique de croissance et de formation de produit respectivement (temps⁻¹).

Le réacteur batch n'a ni alimentation en substrat ni transport du substrat donc l'équation (3) peut être réécrite sous la forme suivante :

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

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

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

Donc :

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

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

c) Rendement de croissance et productivité

A tout instant de culture, on peut calculer un rendement instantané

$$Y_{X/S} = \frac{dX}{dS} \dots \dots \dots (7)$$

qui représente la quantité de biomasse produite par gramme de substrat consommé pendant un intervalle de temps très court [Guiraud. J.P., 1998]. Ce rendement est en générale constant tant que le substrat **S** est le seul facteur limitant de la croissance. La quantité de biomasse s'exprime habituellement en grammes de matière sèche (parfois en grammes de protéines).

Le rendement global s'applique à l'ensemble de la culture :

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{(X - X_0)}{(S - S_0)} \dots \dots \dots (8)$$

En grammes de biomasse (masse sèche) produits par grammes de substrat consommé.

La productivité est la quantité de biomasse produite par unité de volume et de temps.

$$Q_X = \frac{\Delta X}{\Delta t} = \frac{X - X_0}{t - t_0} \dots \dots \dots (9) \quad (\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1})$$

d) Calcul du taux de croissance spécifique et productivité :

Le taux de croissance spécifique μ [Guiraud. J.P., 1998] est calculé à partir de la relation suivante :

$$\mu = (\ln X_{\max} - \ln X_0) / (t_{\max} - t_0) \dots \dots \dots (10)$$

La quantité de la biomasse produite (productivité) Q_X est calculée à partir de l'équation (9)

Les calculs montrent que :

$$\mu = 0,07 \text{ h}^{-1}$$

$$Q_X = 5.215 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$$

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

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

3.1.1.2. Cinétique de la réduction des nitrates :

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

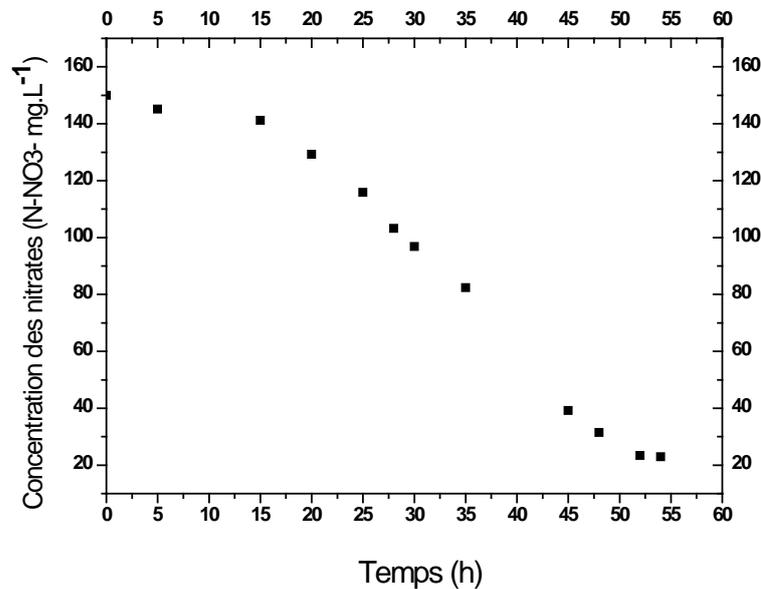


Figure 3.1.2 : Cinétique de la réduction des nitrates avec le méthanol comme source de carbone.

Au moment que les nitrates seront presque totalement consommés la croissance bactérienne s'arrête. Ceci montre que la dénitrification n'est qu'une alternative à la respiration

classique de l'oxygène. Ainsi les nitrates sont utilisés comme accepteurs finaux d'électrons qui sont transférés le long de la chaîne respiratoire [Tiedje J. M., 1988].

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

$$V_{\text{moy}} = 3,51 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}.$$

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

La dénitrification s'arrête après 58 heures de traitement (Figure 3.1.2). La concentration des nitrates est alors de 23 mg.L⁻¹, ce qui donne un taux de dénitrification de 84,66 %.

3.1.1.3. Suivi du pH du milieu réactionnel au cours de la dénitrification :

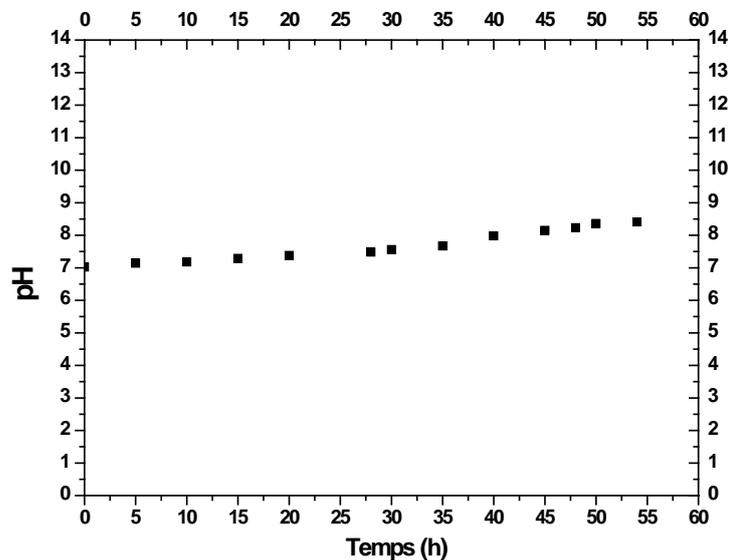


Figure 3.1. 3 : Evolution du pH au cours de la dénitrification avec le méthanol comme source de carbone.

Au cours de la réduction des nitrates, on constate que les variations du pH sont faibles (notre cas le pH varie de 7,02 à 8,41) (figure 3.1.3) Montrant ainsi que le pH optimal pour la dénitrification est compris entre 7 et 8 [Mouchet, 1982].

3.1.2. Etude de la dénitrification en utilisant le Succinate de Sodim comme source de carbone :

Le suivi de la dénitrification a été en présence de 500 et 1000 ppm du succinate de sodium comme source de carbone et d'énergie.

3.1.2.1. Cinétique de la croissance bactérienne :

Nous essayons d'optimiser les conditions nécessaires de dénitrification. Après avoir montré l'efficacité de la dénitrification de nos micro-organismes prélevés de la station d'épuration Ibn Ziad, Constantine.

Pour cela nous avons suivi l'évolution de la croissance bactérienne et la concentration des nitrates en fonction du temps en utilisant 500 mg.L⁻¹ et 1000 mg.L⁻¹ du succinate de sodium comme source unique de carbone et d'énergie avec le nitrate comme accepteur final d'électrons (N-NO₃⁻ = 150 mg.L⁻¹) (Figure 3.1.4).

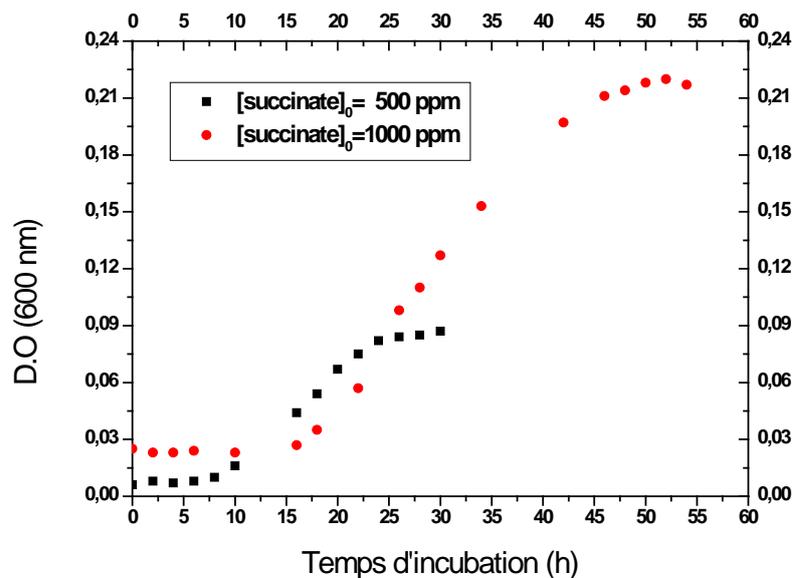


Figure 3.1.4: Cinétique de la croissance bactérienne en présence de 500 ppm et 1000 ppm du succinate de sodium comme source de carbone.

D'après la figure 3.1.4 et pour les deux concentrations du succinate de sodium utilisé on a observé une augmentation de la biomasse plus importante pour 1000 mg.L^{-1} par rapport à 500 mg.L^{-1} .

3.1.2.2. Cinétique de la réduction des nitrates en présence de 500 ppm et 1000ppm du succinate de sodium comme source de carbone :

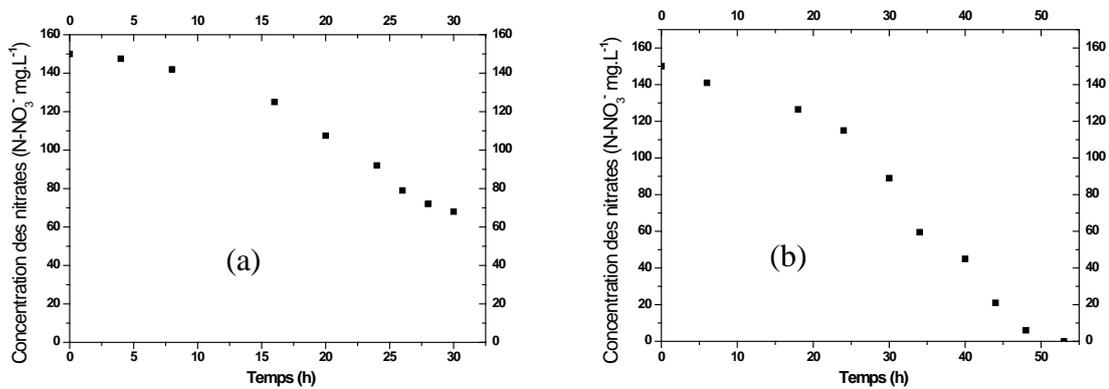


Figure 3.1.5 : Cinétique de la réduction des nitrates en présence de 500 ppm (a) et 1000 ppm (b) du succinate de sodium comme source de carbone.

En utilisant 500 ppm du succinate de sodium comme source de carbone, une inhibition de dénitrification a été remarquée pour une concentration de 68 mg.L^{-1} de $\text{NO}_3^- > 50 \text{ mg.L}^{-1}$ concentration admissible par l'Organisation Mondiale de la Santé (O.M.S) et un taux de réduction des nitrates de 54,67 % (Figure (a) 3.1.5). Cependant nous avons augmenté la concentration du succinate de sodium comme source de carbone et d'énergie à 1000 mg.L^{-1} , pour un rendement de la réaction de dénitrification important (figure (b) 3.1.5) avec une vitesse moyenne de dénitrification égale à $4,23 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

3.1.3. Effet du rapport C/N :

Nous avons fait varier le rapport ($\text{Substrat}_{\text{entré}} / \text{Nitrate}_{\text{entré}}$) pour évaluer l'effet du rapport C/N, sachant que la quantité du nitrate est ajustée en fonction de celle de carbone = 207,4 ppm comme le montre le Tableau, 3.1.1

Tableau, 3.1.1 : Les concentrations équivalentes des différentes valeurs du rapport C/N.

| KNO ₃ (ppm) | C/N |
|------------------------|-----|
| 0 | 0 |
| 1000 | 1,5 |
| 3000 | 0,5 |
| 5000 | 0,3 |

Les résultats sont représentés ci-dessous

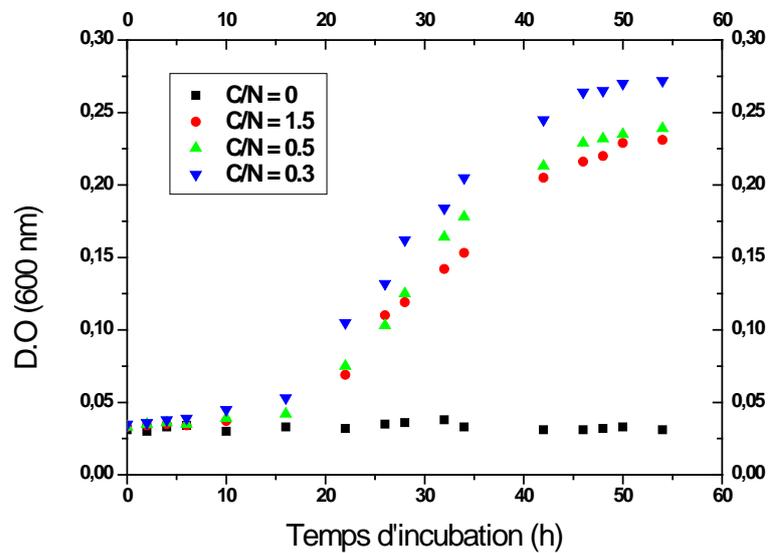


Figure 3.1.6: Effet du rapport C/N sur la croissance bactérienne.

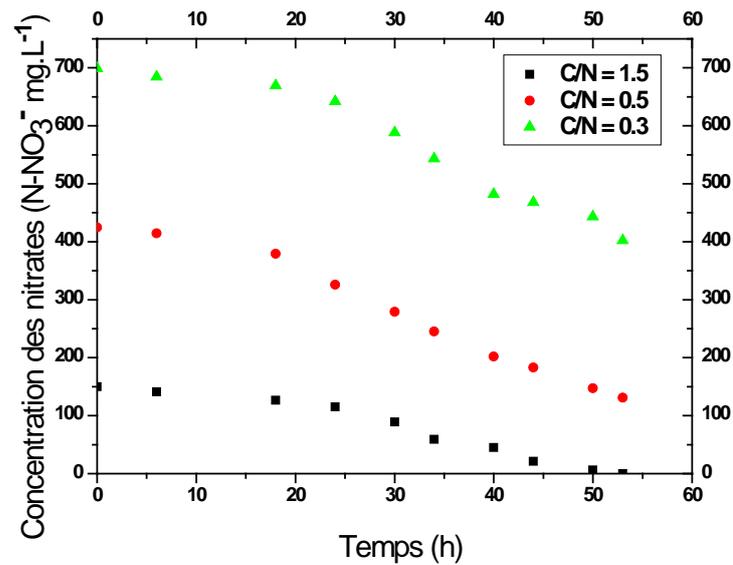


Figure 3.1.7: Effet du rapport C/N sur la réduction des nitrates.

Selon la figure (3.1.6) on observe que le rapport C/N = 0 inhibe la croissance bactérienne, toute fois l'effet de l'augmentation du rapport C/N est légèrement plus favorable aux cinétique de la croissance.

La figure (3.1.7) montre qu'avec un rapport C/N =1,5 et à l'instant t = 54 heures une élimination total des nitrates. Toute fois, une inhibition de dénitrification a été observé avec les autres rapports (C/N = 0,5 et C/N = 0,3). Les taux de réduction des nitrates étaient 69,14 %, 42,49 % respectivement.

Nous concluons que pour un meilleur rendement de dénitrification soit le rapport C/N pondéral égale à 1,5.

Deuxième Partie : L'étude de la dénitrification par isolement et caractérisation des souches

3.2.1. Résultats d'isolement :

Le procédé d'isolement est un procédé d'isolement du mélange de colonies à une seule colonie. Ce processus a été effectué en utilisant la méthode des stries à obtenir des cultures pures.

L'échantillon prélevé de la station d'épuration est transférés dans une boîte de gélose nutritive. Il est important que le nombre de colonies développer sur des boites de Pétris ne soient pas trop grandes. Sur des boites de Pétris bondés certaines cellules peuvent pas former des colonies, et quelques colonies risquent de fondre, ce qui conduit à des mesures erronées. Donc, pour obtenir le nombre de colonies échant, l'échantillon doit être dilué. Cette solution d'échantillon a été diluée jusqu'à 10^{-5} .

En utilisant la méthode de la boîte de pétrie de diffus, l'échantillon dilué a été transféré dans une boîte de gélose nutritive et les bactéries ont été cultivées sur elle (Figure 3.1). L'observation, ces échantillons prennent environ trois à quatre jours à la croissance sur des boites de Pétris.

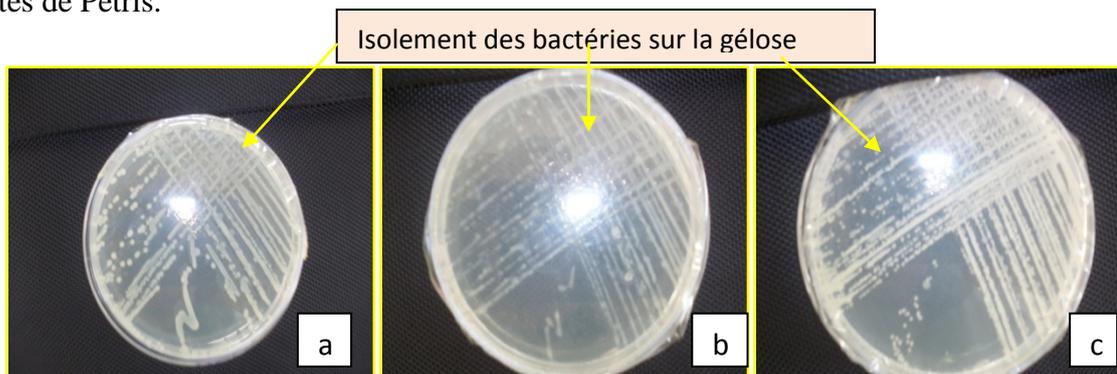


Figure 3.2.1 : montre la croissance des bactéries sur des boites de Pétris après 5 jours. (Photo : Aouati .M.K 2012).

3.2.2. Identification et caractérisation des microorganismes :

3.2.2.1. La coloration de Gram:

- La coloration de Gram est d'une technique pour observer la flore bactérienne présente en fonction de leur réaction coloration de Gram.
- Les bactéries de Gram-positifs ont une tache violet foncé ou bleu.
- les bactéries de Gram –négatifs ont une couleur rose à rouge

A partir d'une colonie isolée, en inocule le milieu de culture afin de réaliser subséquemment des tests d'identification.

Tableau 3.2. 1 : Coloration de Gram des souches.

| <i>SOUCHE</i> | <i>Genre</i> | <i>Coloration de Gram</i> |
|---------------|-----------------|---------------------------|
| N1 | <i>COQUEUS</i> | <i>Gram-positif</i> |
| N5 | <i>COQUEUS</i> | <i>Gram-négatif</i> |
| N6 | <i>Bacilles</i> | <i>Gram-négatif</i> |
| N2 | <i>COQUEUS</i> | <i>Gram-positif</i> |
| N4 | <i>COQUEUS</i> | <i>Gram-négatif</i> |

3.2.2.2. l'utilisation des galeries API de 20 E :

Parmi les cinq microorganismes isolés des eaux usées Ibn Ziad, Constantine, Algérie, par les méthodes de culture, la coloration de Gram des souches est présenté au tableau 3.2.1. Cependant, le profil morphologique et biochimique des isolats bactériens de la souche N5etN6 en utilisant système API de 20 E, selon le Manuel de Bergey de Bactériologie (Holt et al., 1994) (Figure 3.2.2), sont présenté dans le tableau 3.2.2.

La souche *E. hormaechei* est des bâtonnets gram-négatifs qui sont mobiles, de la catalase positive et du glucose fermenté et de l'Indol négatif et de l'uréase. Le profil morphologique et biochimique des isolats bactériens en tant que cultures pures a été identifié est présenté dans le tableau 3.2.2. L'acide est produit à partir des composés suivants: glucose, saccharose,

mannitol, sorbitol, arabinose. Les composés suivants ne sont pas utilisés comme seules sources de carbone.



Figure 3.2.2 : Résultat d'identification des souches par l'utilisation des systèmes API 20E (Photo : Aouati .M.K 2013).

Tableau 3.2.2: profil morphologique et biochimique d'isolat bactérien en utilisant des galeries API 20E (Aouati M.K et al, 2017).

| Sr.No. | SOUCHE (Test) | isolat N5 | isolat N6 |
|--------|--|-----------|-----------|
| 1. | Formes cellulaires (Morphologie) | Rod | Cocci |
| 2. | Gram | - | +/- |
| 3. | Citrate (CIT) | + | + |
| 4. | Indole (IND) | - | - |
| 5. | Methyl Red (MEL) | + | + |
| 6. | Voges-Proskauer (VP) | - | - |
| 7. | H ₂ S Production | - | - |
| 8. | Catalase | + | + |
| 9. | ADH | + | + |
| 10. | Urease (URE) | - | - |
| 11. | Amylase (AMY) (Hydrolyse de l'amidon) | + | - |
| 12. | Gelatinase (GEL) | + | - |
| 13. | LDC | + | + |
| 14. | ONPG | + | + |
| 15. | TDA | - | - |
| 16. | ODC | + | + |
| 17. | INO | + | +/- |
| 18. | RHA | + | + |
| 19. | Sugar Utilization Test | | |
| a) | Glucose | + | + |
| b) | Mannitol | + | + |
| c) | Sucrose SAC | + | + |
| d) | Maltose MEL | + | + |
| e) | Arabinose (ARA) | + | - |
| f) | Lactose SOR | + | + |

Citrate (CIT),Indole (IND), Methyl Red (MEL), Voges-Proskauer (VP), Amylase (AMY) (Hydrolyse de l'amidon), Gelatinase (GEL)

3.2.2.3. Par la technique de biologie moléculaire PCR ARNr 16S :

La technique biologique moléculaire par PCR ARNr 16S pour seulement deux bactéries ont été sous les numéros d'accèsion: BankIt1760650 Seq1KM604662 BankIt1760650 Seq2 KM604663, elles ont montrées leurs capacités être le meilleur micro-organisme dénitrifiant. Ces microorganismes, avec une concentration de nitrate de 300 mgL⁻¹ ont montré l'élimination totale des nitrates, en au moins 48 heures.

Les séquences de gènes d'ADNr 16S de N5 and N6 ont été alignées avec les séquences déposées dans La base de données GenBank à l'aide d'un programme BLAST. L'arbre phylogénétique a été généré par le programme Tree Dyn (v198.3).

Proposé par Méthodes et algorithmes pour la bioinformatique LIRMM. ([Http://phylogeny.lirmm.fr/phylo_cgi/simple_phylogeny.cgi](http://phylogeny.lirmm.fr/phylo_cgi/simple_phylogeny.cgi)).

La recherche a révélé être 99% identique à *Enterobacter hormaechei*. N5 et N6 (99%) sont la même souche. Les résultats de l'analyse phylogénétique ont également montré que la souche appartenait au genre *Enterobacter* (figure 3.2.3).

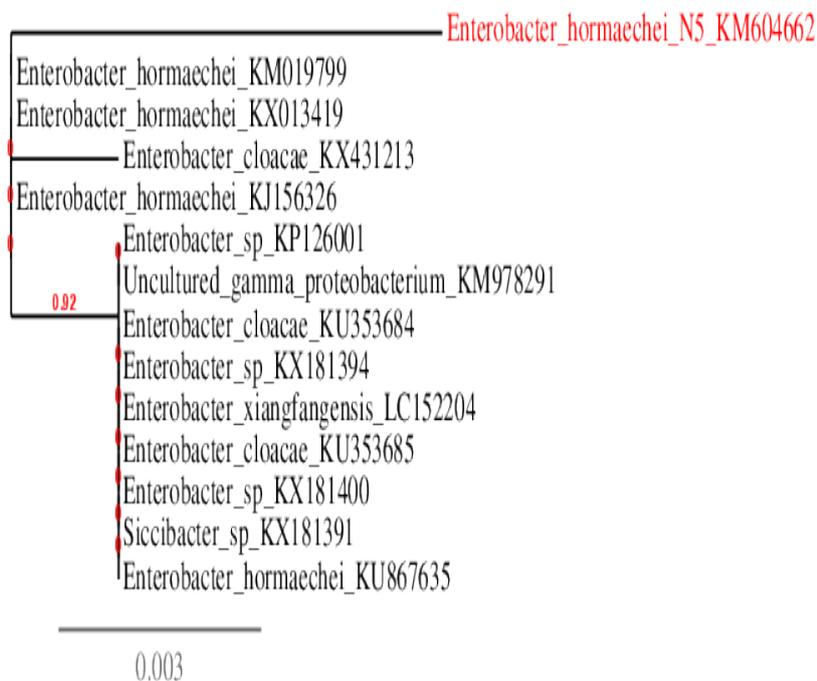


Figure 3. 2.3: Arbre phylogénétique proche voisin pour *enterobacter hormaechei* obtenu à partir d'analyse de la séquence d'ADNr 16S. Le numéro d'accèsion GenBank est BankIt1760650Seq1KM604662 (Aouati M.K et al, 2017).

3.2.3. Croissance cellulaire des souches :

Au cours des tests de croissance cellulaire des souches, on a effectué le suivi par mesure de densité optique à 600 nm, avec du méthanol et du succinate de sodium séparément, comme source de carbone et d'énergie.

La première phase est la phase d'adaptation des souches bactériennes isolées à leurs environnements et synthèse des enzymes nécessaires au métabolisme des substrats disponibles.

La seconde est la phase exponentielle la croissance bactérienne augmente au maximum mais tout dépend de la source de carbone, le succinate a été mieux adapté à la croissance des souches bactériennes isolées N5 et N6 que le méthanol.

Dans notre cas avec du succinate (figure 3.2.5) la durée a été de 24 heures pour la souche N5 et 22 heures pour la souche N6, avec un taux de croissance spécifique (μ) (Guiraud. J.P., 1998) de 0.09 h^{-1} et 0.08 h^{-1} et la productivité (Q_x) est de $6.325 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, $6.125 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ respectivement.

Tandis qu'avec le méthanol (figure 3.2.4) la durée a été de 20 heures pour la souche N5 et 21 heures pour la souche N6, avec un taux de croissance spécifique (μ) de 0.07 h^{-1} et 0.06 h^{-1} et la productivité (Q_x) est de $5.325 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, $5.125 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ respectivement.

Cela pourrait être la raison de la plus grande croissance bactérienne dénitrifiante trouvée quand le succinate est utilisé comme source de carbone, parce que c'est l'étape dans le cycle de Krebs.

Pendant la phase de décélération une très faible croissance bactérienne due à une carence nutritionnelle, d'un ou plusieurs composés nécessaires à la croissance et une accumulation des produits inhibiteurs du métabolisme bactérien.

La quatrième est la phase stationnaire, il n'y a aucune augmentation du nombre de microorganismes, le taux de la croissance bactérienne est nul. Les souches identifiées *E.Hormachea* (N5, N6) ont montré une bonne performance (figure 3.2.4) et (figure 3.2.5)

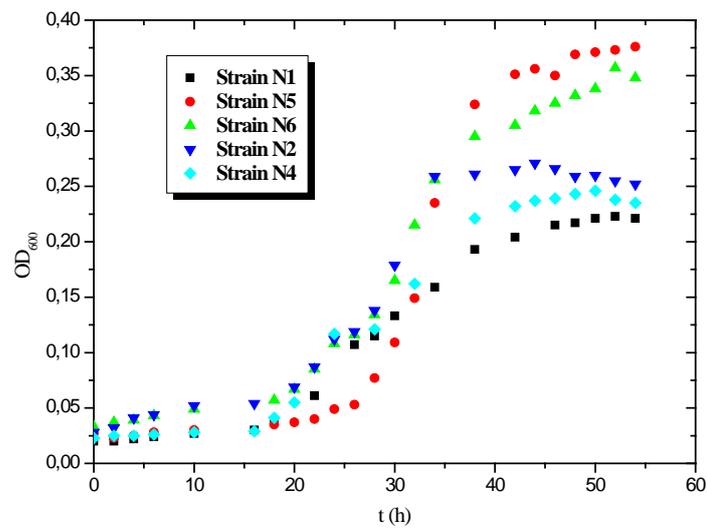


Figure 3.2.4 : Cinétique de la croissance des souches isolées avec source de carbone (Le méthanol).

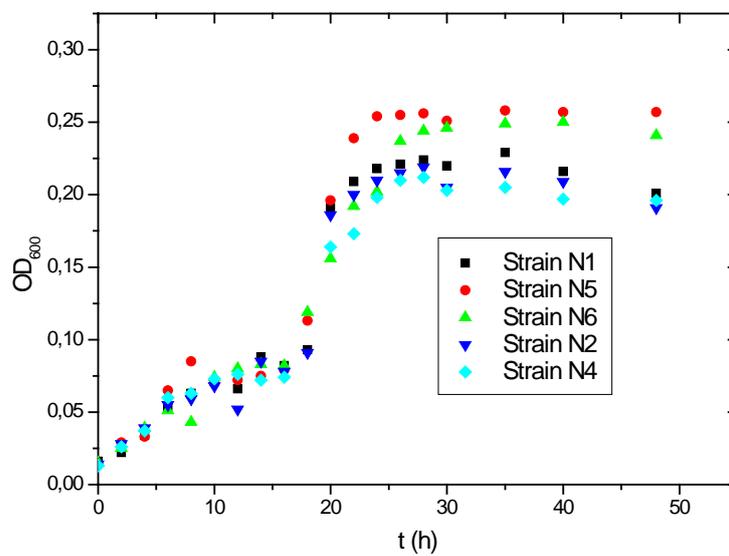


Figure 3.2.5 : Cinétique de la croissance des souches isolées avec source de carbone (Le succinate de sodium).

3.2.4. Performances d'élimination des nitrates :

Le taux de dégradation des nitrates a été étudiée dans un réacteur de 500 ml en discontinu pendant 72 heures (figure 3.2.6) et (figure 3.2.7) par un spectrophotomètre de marque (Safas Monaco) à 415 nm.

Les résultats obtenus on utilisant le méthanol et le succinate de sodium séparément ont montré l'élimination totale des nitrates à 56 heures et 48 heures respectivement (figure 3.2.6) et (figure 3.2.7) avec la souche *Enterobacter hormaechei*_N5.

Tandis qu'avec la souche *Enterobacter hormaechei*_N6 s'arrête à 72 heures de traitement, d'une concentration en nitrates de 25.6 mg.L⁻¹, soit un taux de biodégradation de 91.67% (figure 3.2.6). Par contre, la concentration des nitrates est arrêtée à 22 mg.L⁻¹ avec un taux de 92.67% (figure 3.2.7).

Cependant, le rendement du procédé est meilleur lorsque le succinate est utilisé. Par conséquent, la croissance des deux souches semble être mieux que les autres souches et en conformité avec le processus de dégradation. Ainsi, on pourrait suggérer que, parmi les deux sources de carbone testées, le succinate de sodium semble être le plus approprié pour le traitement des eaux usées contaminées par le nitrate.

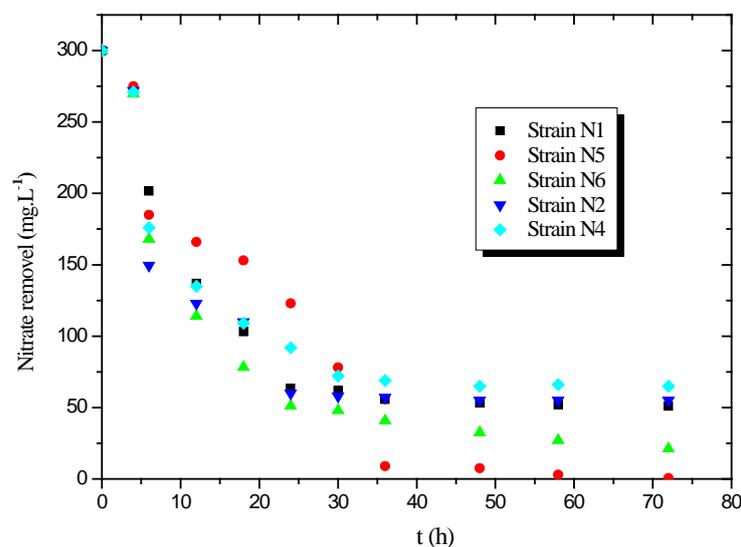


Figure 3.2.6 : Cinétique d'élimination des Nitrates avec sources de carbone le méthanol.

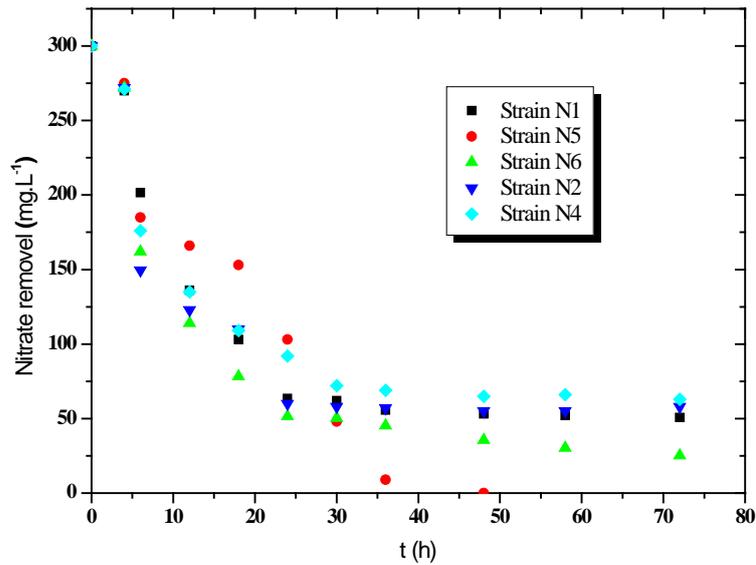


Figure 3.2.7: Cinétique d'élimination des Nitrate avec source de carbone. le succinate de sodium.

3.2.5. Le suivi du pH de la dénitrification :

Le pH est l'un des paramètres qui influent sur le bon déroulement de la dénitrification. Le suivi du pH a varié entre 6.5 et 8.5 (figure 3.2.8) et (figure 3.2.9) pendant toute la période de dénitrification. L'ajustement du pH a été fait par l'addition de l'acide chlorhydrique et hydroxyde de sodium.

En observant la croissance bactérienne des souches isolées et l'élimination des nitrates a augmenté dans un pH qui a varié entre 6.7 et 8.2 en utilisant les deux sources de carbone séparément. Cependant, l'influence du pH sur la dénitrification a montré son effet sur la concentration des nitrates qui peut être inhibiteur.

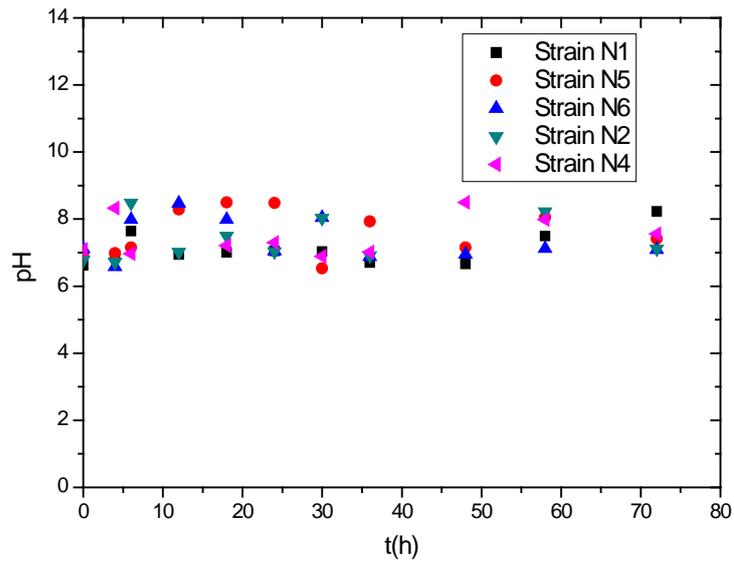


Figure 3.2.8: Suivi de pH avec source de carbone.
(Méthanol).

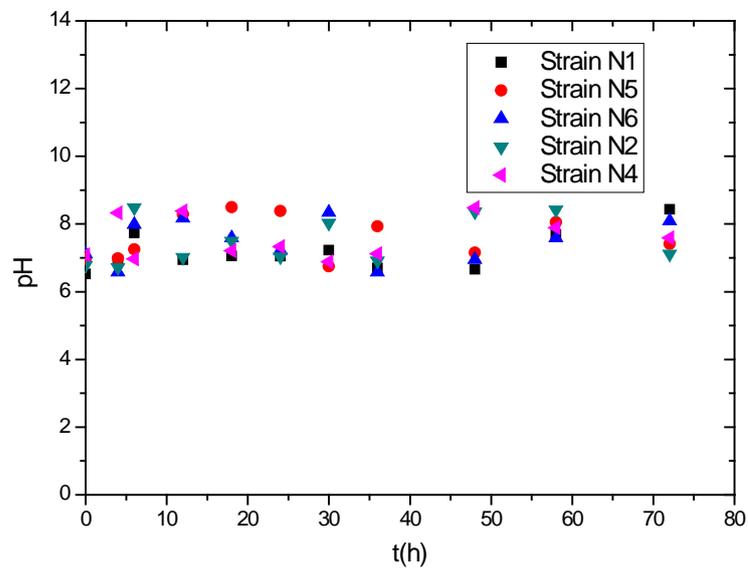


Figure 3.2.9: Suivi de pH avec source de carbone
(Succinate de sodium).

3.2.6. Effet du rapport C/N sur l'élimination des nitrates:

L'efficacité d'élimination des nitrates était étroitement liée à la source de carbone organique. Quelle que soit la nature de la source de carbone, la détermination du carbone utilisé par rapport au nitrate éliminé est une étape préliminaire obligatoire à toute optimisation du traitement biologique par dénitrification (Akizuki S. et al., 2013).

3.2.6.1. Cinétique de la croissance cellulaire de la souche *Enterobacter hormaechei*_N5 :

La croissance cellulaire de la souche *Enterobacter hormaechei*_N5_KM604662, à montrer une bonne performance avec les deux sources de carbones, le succinate de sodium au rapport C/N=3.0 (Figure 3.2.10), tandis que avec le méthanol les rapports 0.6 et 1.0 (Figure 3.2.11). Nous l'avons expliqué par la capacité des microorganismes à métaboliser les substrats utilisés et l'effet du rapport C/N.

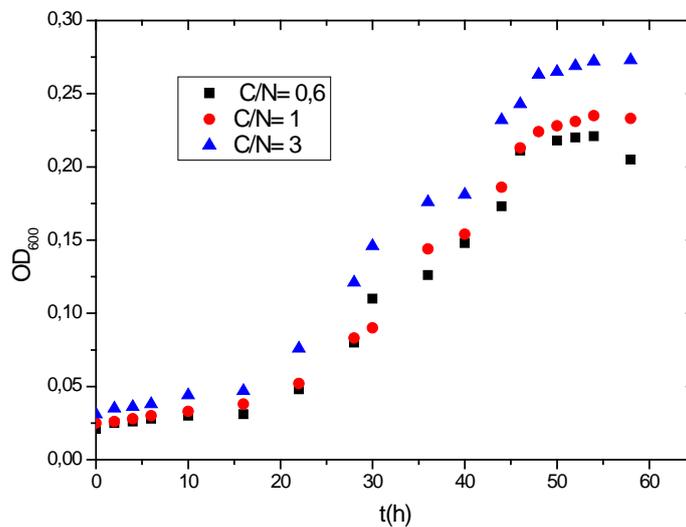


Figure 3.2.10: Cinétique de la croissance cellulaire du rapport C/N sur l'efficacité d'élimination des nitrates par *Enterobacter hormaechei*_N5, après incubation avec une source de carbone succinate à 35°C. Les données sont des moyennes de trois expériences.

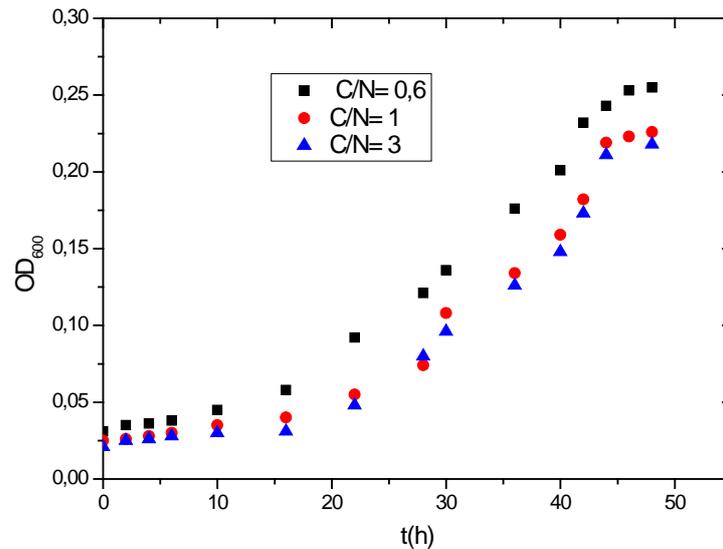


Figure 3.2.10: Cinétique de la croissance cellulaire du rapport C/N sur l'efficacité d'élimination des nitrates par *Enterobacter hormaechei_N5*, après incubation avec une source de carbone Methanol à 35°C. Les données sont des moyennes de trois expériences.

3.2.6.2. Elimination des nitrates par *Enterobacter hormaechei_N5* :

Les effets du rapport C/N a été évalué, en variant le rapport (Substrat / Nitrate) : La quantité de carbone est ajustée selon la concentration de nitrate 300 mg.L⁻¹, mais pour le méthanol et le succinate de sodium est de 1 mg.L⁻¹. Les équations stoechiométriques théoriques pour la dénitrification avec du méthanol comme source de carbone ont été définies par Cheng et Lin(1993). Cette équation estime qu'un rapport C/N de 0,71 est nécessaire pour la réduction complète du nitrate en azote moléculaire. Nos études ont suggéré les rapports C/N pour la dénitrification avec du methanol et le succinate de sodium de 1,0 et 3,0, respectivement.

Cependant, la réduction complète des nitrates après 72 heures de traitement avec du succinate de sodium a été réalisé avec succès, pour un rendement de 98,54% (Figure 3.2.12).

Alors qu'avec le méthanol après 63 heures de traitement, avec un rendement de 97,23% (Figure 3.2.13).

Toutefois, le meilleur rapport C/N d'élimination des nitrates a été égale à 3,0 lors de l'utilisation du succinate de sodium (Figure 3.2.12). Néanmoins, le methanol était égal à 1,0 (Figure 3.2.13), ce dernier est en accords avec les valeurs théoriques. Cependant, le rapport

C/N du processus était meilleur lorsque le Succinate de sodium été utilisé (Aouati M.K et al, 2017).

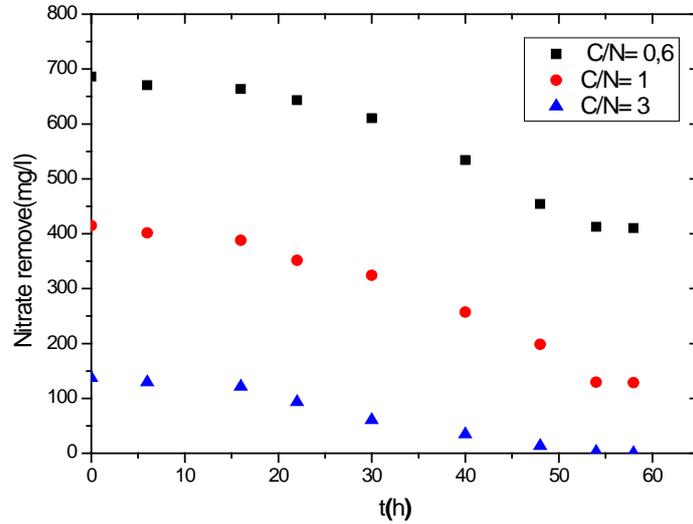


Figure 3.2.12: Effet du rapport C/N sur l'efficacité d'élimination des nitrates par *Enterobacter hormaechei_N5*, après incubation avec une source de carbone succinate à 35°C.

Les données sont des moyennes de trois expériences.

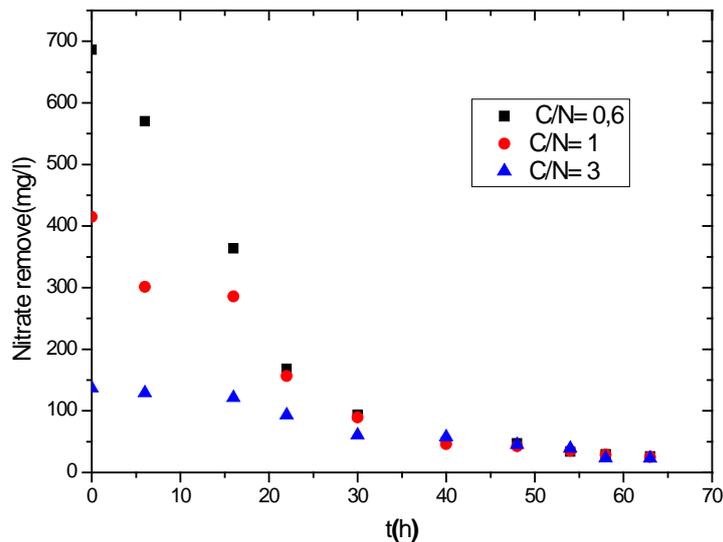


Figure 3.2.13: Effet du rapport C/N sur l'efficacité d'élimination des nitrates par *Enterobacter hormaechei_N5*, après incubation avec une source de carbone Methanol à 35°C.

Les données sont des moyennes de trois expériences.

3.2.6.3. Cinétique de la demande d'oxygène dissous (DCO) pour le rapport C/N optimal :

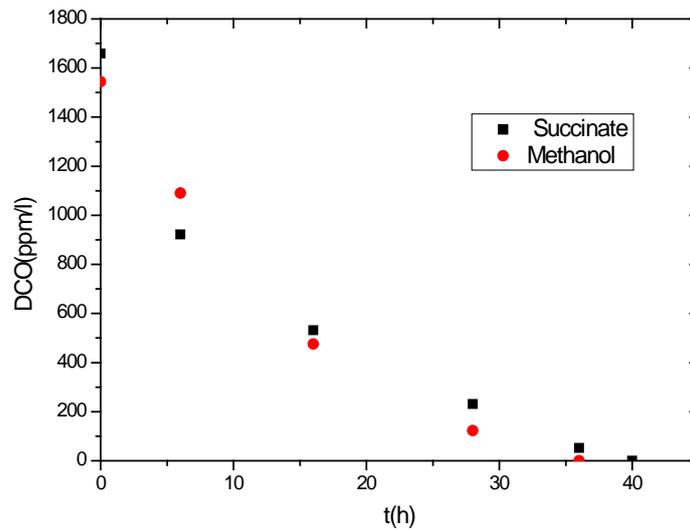


Figure 3.2.14: Effet du rapport C / N optimal pour les deux sources de carbone séparément sur Oxygène dissous (DCO). Les données sont des moyennes de trois expériences.

3.2.6.4. Variation du pH sur rapport C/N optimal des deux sources de carbone :

Le pH varie entre 6.8 et 8.5 (Figure 3.14). Confirment en outre que le mécanisme d'élimination des nitrates d'entérobacter hormaechei_N5_KM604662 pendant le processus de dénitrification anaérobie a été conduit au résultat obtenu (Figure 3.12) et (Figure 3.13).

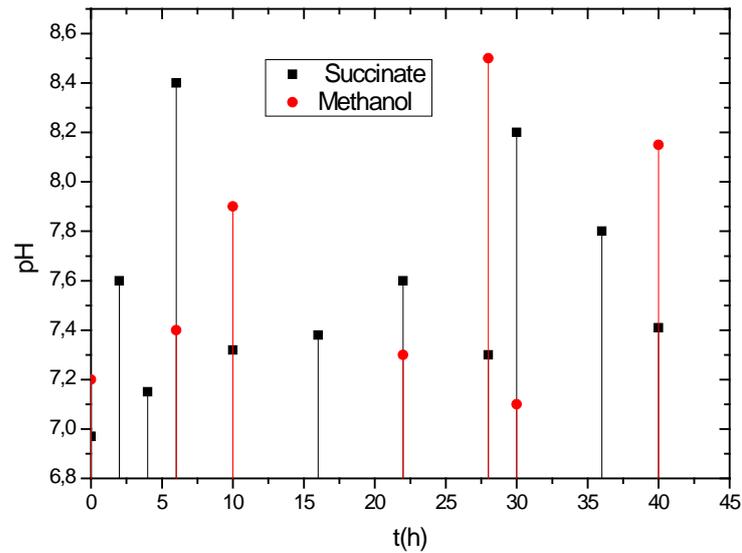


Figure 3.2.15: Effet du rapport C/N optimal pour les deux sources de carbone séparément sur la variation du pH. Les données sont des moyennes de trois expériences.

3.2.7. Conclusion :

L'étude qui a été portée dans cette thèse, a montré plusieurs avantages et inconvénients entre une culture mixte et la souche *Enterobacter hormaechei*, qui est illustré dans le tableau 3.2.3 ci-dessous.

Tableau 3.2.3 : Avantages et inconvénients d'une culture mixte et de la souche *Enterobacter hormaechei*, (Aouati.M.K et al, 2017).

| Micro-organismes | Avantages | Inconvénients |
|---------------------------------------|--|--|
| Culture mixte | <ul style="list-style-type: none">❖ Facile à mettre en œuvre❖ Rendement d'élimination des nitrates élevé.❖ Economique. | <ul style="list-style-type: none">❖ Rendement acceptable dans un domaine de température entre 5°C à 45°C.❖ La croissance à un temps de la phase de latence longs. |
| Souche <i>Enterobacter hormaechei</i> | <ul style="list-style-type: none">❖ Elimination des nitrates rapides et complets.❖ Croissance de la phase exponentielle importante.❖ Rendement d'élimination des nitrates élevé (proche de (100%)) | <ul style="list-style-type: none">❖ Coût et temps élevé de caractérisation.❖ Rendement acceptable dans un domaine de température entre 20°C à 44,5°C |

Conclusion Générale
&
Perspectives

Conclusion Générale & Perspectives

Conclusion Générale

L'étude qui a été fixée dans cette thèse est la dénitrification hétérotrophe par l'utilisation des microorganismes prélevés à partir de la station d'épuration Ibn Ziad, Constantine, Algérie.

En réacteur batch, nous avons étudié l'influence de plusieurs paramètres physico-chimiques qui peuvent avoir un effet inhibiteur ou accélérateur sur la croissance bactérienne et la dénitrification. Dans la première étape par l'utilisation d'une culture mixte et en seconde étape par l'utilisation des souches bactériennes isolément et caractérisation, après incubation avec source de carbone le méthanol et le succinate de sodium séparément, dans un milieu nutritif approprié. La consommation de nitrates et la croissance bactérienne pouvaient être facilement surveillées en temps réel.

L'utilisation de la culture bactérienne mixte a montré une croissance rapide mais la phase de latence est longue pour les deux sources de carbone et l'élimination des nitrates est complète, un taux de rendement très important de 97,6% du succinate par rapport au méthanol qui de 84,66 %.

Les souches identifiées *Enterobacter hormaechei_N5_KM604662* et *Enterobacter hormaechei_N6_KM604663* ont montrées une forte capacité à dégrader les nitrates. Le suivi cinétique de la croissance bactérienne des souches isolées a débuté par la phase de latence, accompagnée par la phase exponentielle et terminée par une phase de stagnation, après épuisement du milieu nutritif de croissance ainsi que la source de carbone et les nitrates. De

même pour la culture mixte. Mais on constatant que la croissance bactérienne de cette dernière, la phase de latence est plus longue contrairement a celle des souches N5 et N6.

La cinétique de réduction des nitrates pour le succinate de sodium et méthanol étaient inférieurs à $50 \text{ mg.L}^{-1} \text{ NO}_3\text{-N}$, qui est en accord avec les directive de l'organisation mondial de la santé (WHO), en utilisant des souches isolées est principalement les souches identifiées, dans moins de 72 heures de traitement.

Tandis que l'étude expérimental du rapport C/N des deux sources du carbone le méthanol et le succinate séparément en utilisant la souche *E. hormaechei_N5*, la cinétique de la croissance bactérienne ne diffère pas, mais la réduction des nitrates avec le succinate a montré un taux de rendement très important de 98.7% par rapport au méthanol qui de 88.4%. Le rapport C/N=3.0 a été jugé optimal pour la dénitrification des eaux usées à haute teneur en nitrate.

Nous avons suivi le pH lors de l'utilisation du methanol et de succinate de sodium au rapport optimal, qui a varié de 6.8 à 8.5. Les résultats ont été prometteurs en utilisant les deux souches, *Enterobacter hormaechei_N5_KM604662*. et *Enterobacter hormaechei_N6_KM604663*, pour l'élimination des nitrates.

Cependant, elles ont été considérées comme un candidat du consortium pour la bio-dénitrification des eaux usées.

Perspectives

Les perspectives envisage est d'effectuer simultanément la réduction des nitrates et créer une Banque de souches bactériennes dénitrifiantes. Bien que de nombreuses bactéries ou un consortium soient connus et utilisés pour le processus de dénitrification, nos résultats pourraient fournir une ressource microbienne alternative pour l'élimination biologique des composés azotés des eaux usées. En particulier, les conditions extrêmes dans lesquelles la colonie bactérienne a été isolée favorisent l'utilisation de la souche dans les environnements qui inhibent généralement les traitements biologiques, tels que les eaux usées des tanneries.

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

A

Adam, J.W.H. (1980). Health aspects of nitrate in drinking-water and possible means of denitrification. *Water SA*, 6 : 79.

Adam, J.W.H. (1980). Health aspects of nitrate in drinking-water and possible means of denitrification. *Water SA*, 6 : 79.

Adrian, Tan-Guan-Sheng; Yin, Wai-Fong; Chan, Kok-Gan (13 June 2014). Freshwater-Borne Bacteria Isolated from a Malaysian Rainforest Waterfall Exhibiting Quorum Sensing Properties. *Sensors* 14 (6): 10527–10537.

Akizuki S., Izumi K., Nagao N., Shiotani T., Niwa C., Toda T (2013)., Effect of COD/NO⁻³ ratio and seed sludge on simultaneous methanogenesis and denitrification in intermittent organic solid waste treatment, *International Biodeterioration & Biodegradation*. 84 . pp 8-13.

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

American Public Health Association,(2014). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22 th ed, APHA/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington DC, USA.

Alexander M., Marshal, K. C. et Hirsch P (1960). Autotrophy and heterotrophy in nitrification. *Int. Congr. Soil.*, 7th, pp 586-591.

Aouati M.K, Bougherara H, S. Zaroual.S, B. Kebabi B, (2017) Effet de la nature de la source de carbone sur la dénitrification. *Sciences & Technologie A.* 45 (2017) 9-15.

Aouati M. K , Bougherara H, Ouled-Haddar.H, Sifour M, Aissaoui S, B. Kebabi B (2018). Heterotrophic denitrification by *Enterobacter hormaechei* collected from wastewater treatment plant in presence of methanol and sodium-succinate. *J. Mater. Environ. Sci.*, Accepted (Oct 2017), Volume 9, Issue X, Page xxx-xxx.

Aslan. S (2002). Groundwater pollution problems in turkey, groundwater and human developement. In: proceedings of the IHA-ALHSUD Congress in Mardel plata, Argentina, 21-25 october; 2002

B

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

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

Barnard JL, Morgenroth E, Pitman T, Cooper P, Chapman A, Ching DWK. (1998). The development of nutrient-removal processes (abridged) - Discussion. *Journal of the Chartered Institution of Water and Environmental Management.* ; 12(5):330.

Barroin G, (1991). « La réhabilitation des plans d'eau ».La recherche. 238 (22), 1421.

Baumann B., Snozzi M., Zehnder A.J.B. and van der Meer J.R., (1996). Dynamics of denitrification activity of *Paracoccus denitrificans* in continuous culture during aerobic-anaerobic changes. *J. Bacteriol.* 178: 4367-4374.

Beatson, C.G. (1978). Methaemoglobinaemia-Nitrate in drinking water. *Environ. Health*, 86 :31.

Belcon G., Gillet M. (1997). Procédé de dénitrification biologique autotrophe par *Thiobacillus dénitrificans* sur soufre-maeri. *REV. Fr. Sci. Eau*, 2,3,267-279.

Buchanan, R.E. (1918). Life phases in a bacterial culture. *J. Infect. Dis.* 98, 1271-1273.

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

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

Bougard, D. (2004) Traitement biologique d'effluents azotes avec arrêt de la nitrification au stade nitrite. Thèse de doctorat, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier.

Bouwer E.J., Crowe P.B (1988) Biological processes in drinking water treatment. *JAWWA*, 9,82-93.

Braker, G., Tiedje, J.M., (2003). Nitric oxide reductase (norB) genes from pure cultures and environmental samples, *Appl. Environ. Microbiol.* 69:3476–3483.

Braker G., Zhou J.Z, Wu L.Y, Devol A.H., Tiedje J.M.,(2000). Nitrite reductase genes (nirK and nirS) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in Pacific Northwest marine sediment communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2096-2104.

C

Cabral, J.P.S (2010). Water Microbiology. Bacterial Pathogens and Water. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 7 (10): 3657–3703.

Calvet, R. (1990) Nitrate-Agriculture-Eau (I.N.R.A).

Casellas, M., Dagot, C. et Baudi, M. (2002). Stratégie d'élimination de l'azote d'un effluent urbain dans un réacteur discontinu séquentiel (SBR). *Revue des sciences de l'eau*, 749-765.

Cavigelli M.A. et Robertson G.P. (2001). Role of denitrifier diversity in rates of nitrous oxide consumption in a terrestrial ecosystem. *Soil Biology and Biochemistry*, 33. pp 297-300.

Chabour N. (2004). La surexploitation des eaux souterraines dans les plaines littorales : nappe de Telezza dans la région de Collo (Nord-Est Algérien). Sciences & technologie BN° 22. Décembre 2004. pp 127-132.

Chambon. P, Coin.L, Vial. J (1983). Risque pour la santé humaine de certains composés azotés présent normalement ou éventuellement dans l'eau de boisson, les nitrates et composés N-nitroso. La technique de l'eau l'assainissement N° 438/439 et 440/441 p25-32 :33-38.

Chantal G. (2001). Nitrate pollution of ground water: the response time of ground water. Journal of bioscience and bioengineering. Vol. 108, No. 7, pp 423–435.

Chen K., Lee S. et Houg J. (1998). Simultaneous carbon-nitrogen removal in waste water using phosphorilated PVA-immobilised microorganismes. Enzyme and Microbial Technology 23: 311-320.

Cheng K.C., Lin Y.F (1993), *Water Resource* 27. pp 1749.

Cloirec, P. Germinet, R. (1998). Les composés organiques volatils (COV). Lavoisier, Tec&Doc.

Cole, J. (1993). Controlling environmental nitrogen through microbial metabolism. Trends in biotechnology , 11(8),368-372.

Cooper. P., Day. Met Thomas. V. (1994). Process options for phosphorus and nitrogen removal from wastewater. Journal of the institution of water and environmental management , 8(1), 84-92.

D

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

Dardel. F (de), (1987). Résines échangeuses d'ions et eau potable. Eau Ind. Nuis., 112,45-47.

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

Delignette-Muller M.L, (1995). Méthodes de prédiction des aptitudes de croissance des populations de micro-organismes. Thèse de doctorat N°118-95 présentée devant l'Université Claude Bernard-Lyon I.

Deguin. A. (1998). Incidence des résines échangeuses d'anions sur la qualité de l'eau traitée selon le procédé Nitracycle. TSM Eau, 83, 4, 231-234.

Diaz R.J, Rosenburg R. (2008) Spreading dead zones and consequences for marine ecosystems. Science, 321 (2008), pp. 926-929

Dong-UK Lee, Il-SU Lee, YE-DUK Choi and JAE-HO BAE. (2001). Effect of external carbon source and empty bed contact time on simultaneous heterotrophic and sulfur-utilising autotrophic denitrification. Process biochemistry 36. 1215-1224.

Dong X., Tollner E.W(2003). Evaluation of Anammox and denitrification during anaerobic digestion of poultry manure, *Bioresource Technology*. 86 (2003) 139-145.

Doyle, M.P. Heran, J.G. Dykstro, R.L. (1985) J. Free Rad. Biol. Med. 1 (1985) 145.

Dos Santos VAPM, Tramper J, Wijffels RH. (1998). Integrated nitrogen removal in compact systems by immobilized microorganisms: new-generation bioreactors. In: Elgewely MR, ed. Biotechnology Annual Review, Vol 4. Sara Burgerhartstraat 25/PO Box 211/1000 AE Amsterdam/Netherlands: Elsevier Science Publ B V; 1998:321-394.

Dries, D. Liessens J., Verstraete W., (1988). Nitrate removal from drinking water by means of hydrogenotrophic denitrifiers in a polyurethane carrier reactor. Wat. Supply, 6, 181-192.

Duboz, A. (1992). Pollution par les nitrates des eaux destinées à l'alimentation humaine. Causes et conséquences . Traitement possibles. Cons. Gén. GREF, Paris. p 23.

Dupin, S. (1992) Dénitrification biologique hétérotrophe appliquée au traitement des eaux d'alimentation : conditions et fonctionnement et mise au point d'un procédé. Thèse de doctorat de Microbiologie de l'Université de Claude Bernard. Lyon I, p281.

E - F - G

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

Fischer S. G., & L. S. Lerman.(1979). Length-independent separation of DNA restriction fragments in two dimensional gel electrophoresis. *Cell*, 16:191-200.

Flanagan D.A., Gregory L. G., Carter J.P., Karakas-Sen A., Richardson D.J., Spiro S., (1999). Detection of genes for periplasmic nitrate reductase in nitrate respiring bacteria and in community DNA. *FEMS. Microbiol. Lett.* 177: 263-270.

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

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

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

Fraser, P. (1985) Nitrates : Epidemiological Evidence. *IARC Sci. Publ.*, 65 :183.

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

Gamble, T., Betlach, M. et Tiedje, J. (1977). Numerically dominant denitrifying bacteria from world soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 33 : 926-939.

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

Garcia, J. T. (1981). La biosynthèse des enzymes de la dénitrification chez cinq bactéries dénitrifiantes. *Cah. ORSTOM. Sér. Biol.*, 43 : 3-6.

Germon, J., Couton, Y et Senez L. (1999). Epuration des effluents porcins par épandage ; efficacité et prise en compte de l'évolution des effluents au cours du stockage .

Gomez. MA et al (2000). Influence of carbon source on nitrate removal of contaminated groundwater in a denitrifying submerged filter; B80: 69-80.

Gómez M.A., Hontoria E., González-López J (2002). Effect of dissolved oxygen concentration on nitrate removal from groundwater using a denitrifying submerged filter, *Journal of Hazardous Materials*. B 90 (2002) 267–278.

Gootzen J. F. E., Peeters P. G. J. M., Dukers J. M. B., Lefferts L., Visscher W. and van Veen J.A. R. (1997). The electrocatalytic reduction of NO₃⁻ on Pt, Pd and Pt + Pd electrodes activated with Ge. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 1997. 434(1-2). pp. 171-183.

Goregues, C.M., Michotey, V.D., Bonin, P.C., (2005). Molecular, biochemical, and physiological approaches for understanding the ecology of denitrification, *Microb. Ecol.* 49:198–208.

Gregory L.G., Karakas-Sen A., Richardson D.J., Spiro S., (2000). Detection of genes for membrane-bound nitrate reductase in nitrate-respiring bacteria and in community DNA. *FEMS. Microbiol. Lett.* 183: 275-279.

Grimont, F. Grimont, P.A.D (2006). The Genus *Enterobacter*. *The Prokaryotes*, Volume 6: Proteobacteria: Gamma Subclass. pp 197-214. Springer New York.

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

Gupta SK, Raja SM, Gupta AB. (1994). Simultaneous nitrification-denitrification in a rotating biological contactor. *Environmental Technology*. 1994; 15(2):145-153.

H

Hamaidi M.S. Hmaid F., Zoubiri A., Bouaklil F. et Dhan Y. (2009). Etude de la Dynamique des Populations Phytoplanktoniques et Résultats Préliminaires sur les Blooms Toxiques à Cyanobactéries dans le Barrage de Ghrib (Ain Defla-Algérie). *European Journal of Scientific Research* ISSN 1450-216X Vol.32 N°3 (2009). pp 369-380.

Hanus F, Bernard C (1988). Dénitrification des eaux potables dans un réacteur biologique à élimination continue de la biomasse en excès : un procédé inédit. *TSM Eau*, 83, 4, 243-246.

Haslay C, Leclerc H. (1993). Microbiologie des eaux.

Hauk,R.D. (1981). Nitrogen fertilizer effect on nitrogen cycle processes. *Ecology Bulletin*, 33 : 551.

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

Holm, H. W. and Vennes, J.W., (1970). Occurrence of Purple Sulfur Bacteria in a Sewage Treatment Lagoon. *Applied Microbiology*. 19(6): 988-996.

Holt JG, et al., (1994). editors. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th ed. Williams & Wilkins; Baltimore, MD, USA: pp. 175–190.

Hormaechei.R. , E., Edwards, P. (1960). A proposed genus *Enterobacter* International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy 10 71–74.

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

Hwang,y, Yoneyama, Y et Noguchi, Hiroshi. (2000). Denitrification characteristics of reject water in upflow biofiltration.

I - J - K

IFEN, (1994). L'environnement en France, édition 1994-1995. Dunod et Ifen. 1994. 1-339.

Jacques Capblancq et al. (2002). Eutrophisation des eaux continentales.

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

Kassinen A., Krogiuskurrikka L., Makivuokko H., Rinttila T., Paulin L., Corander J., Malinen E., Apajalahti J., Palva A(2007).The fecal microbiota of irritable bowel syndrome patients differs significantly from that of healthy subjects. *Gastroenterology*, (133), 24-33.

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

Katz .I et al. (2000). Simultaneous removal of nitrate and atrazine from groundwater. *Water Sci Technol*; 41(4/5) : 49-56.

Kermarrec, C. (1999). Bilan et transformation de l'azote en élevage intensif de pocs sur litière. Thèse de Doctorat. Univ. Renne I.

Kiff, (1972). The of ecology nitrification/denitrification systemes in activated suldge. *Watre . Poll.Cont.* 71. Pp 475-484.

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

Kim H., Bram V., Lieven W., Willy V., Nico B., and Paul De Vos (2006), Cultivation of Denitrifying Bacteria: Optimization of Isolation Conditions and Diversity Study, *Appl Environ Microbiol.* 72(4) 2637–2643.

Kjeldsen K.U., Kjellerup B.V., Egli K., Frølund B., Nielsen P.H., Ingvorsen K (2007). Phylogenetic and functional diversity of bacteria in biofilms from metal surfaces of an alkaline district heating system. *FEMS Microbiol. Ecol.*, , (61), 384-397.

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

Knowles R., (1996). Denitrification: microbiology and ecology. *Life Support Biosph Sci.* 3: 31-34.

Kowalchuk GA., Stephen JR., De Boer W., Prosser J.I., Embley T.M., Woldendorp J.W., (1997). Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the β -subdivision of the class proteobacteria in coastal sand dune by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1489-1497.

Krebs H.A (1970). The history of the tricarboxylic acid cycle. *Perspect. Biol. Med.*. 154-170.

Krogulska B. and Mycielski R., (1984). Bacterial microflora participating in the removal of nitrogen from industrial wastewaters by nitrification and denitrification. *Acta Microbiol. Pol.* 33: 67-76.

L

Lacaze J.C, (1996). L'eutrophisation des eaux marines et continentales causes, manifestations, conséquences et moyens de lutte. (DISTNB). Eds, mar, S.A 1996. *Mus. Natn. Hist. Nat.* Paris. p 169.

Lazarova V., Capdeville B., Nikolov L. (1994). *Water Resource.* 28 (1994) 1189.

Lleò M.M., Bonato B., Tafi M.C., Signoretto C., Boaretti M. and Canepari P. (2001). Resuscitation rate in different enterococcal species in the viable but non-culturable state. *J.Appl. Microbiol.* 91 :1095-1102.

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

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

Lin J.T. and Stewart V., (1998). Nitrate assimilation by bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* 39: 1-30.

LIRMM, Methods and algorithms for bioinformatics,
([Http://phylogeny.lirmm.fr/phylo.cgi/simple_phylogeny.cgi](http://phylogeny.lirmm.fr/phylo.cgi/simple_phylogeny.cgi))

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

Lloyd D. (1993). Aerobic denitrification in soils and sediments - From falacies to facts *Trends in Ecology and Evolution* 8: pp 352-356.

Lobry J.R. (1991). Réévaluation du modèle de croissance de Monod. Effet des antibiotiques sur l'énergie de maintenance. Thèse de Doctorat n°134-91 présentée devant l'Université Claude Bernard, Lyon I.

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

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

M

Mace S, Mata-Alvarez J. (2002). Utilization of SBR technology for wastewater treatment: An overview. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2002; 41(23):5539-5553.

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

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

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

Marie Odileratel. (2002). Elimination des nitrates des eaux potables.

Margarida, M., Eloisa, P. G., José, R. C., Roberto, C. P. and Elizabeth de Mattos, M., (2003). Estimation of denitrifying microbiota in tertiary sewage treatment and kinetics of the denitrification process using different sources of carbon. *Brazilian Journal of Microbiology*, 34:104-110.

Martin G. (1979). Le problème de l'azote dans les eaux. (Techniques et Documentation ed.).

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

Mc Caig A.E, L. Anne Glover L.A, Prosser J.I (2001). Numerical Analysis of Grassland Bacterial Community Structure under Different Land Management Regimens by Using 16S Ribosomal DNA Sequence Data and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Banding Patterns. *Appl. Environ. Microbiol. vol. 67.* (10) 4554-4559.

McCaig A E., Grayston S.J., Prosser J I., Glover L A. (2001). Impact of cultivation on characterisation of species composition of soil bacterial communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* 35: 37-48.

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

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

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

Metcalf Eddy. (2003), Wastewater Engineering Treatment and Reuse . (4th ed.)McGraw-Hill, NewYork, NY. (2003).

Meybeck M. , Chapman D., Helmer R., (1989).GlobalFreshwater Quality : a first assessment. Global environmet monitoring system. W. H. O. , UNEP. Cambridge Massachussetts. Blackwell, 1-306. P121.

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

Mossakowska A, Reinius LG, Hultman B. (1997). Nitrification reactions in treatment of supernatant from dewatering of digested sludge. *Water Environment Research*. 69(6):1128-1133.

Mouchet P. (1982). Réflexions complémentaires sur l'importance des phénomènes biologiques dans le traitement et la distribution des eaux de consommations, *Techn. Eau Assain.*, 424, 4, pp. 7-25.

Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G. & Erlich H.(1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 51(1):263-273.

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

N - O - P

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

NCBI : National Centre of Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

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

OCDE (Organisation for Economic Cooperation and Development), (1982). Eutrophication of Waters, Monitoring, Assessment and Control, Final Report. OECD Cooperative Programme on Monitoring, of Inland Waters (Eutrophication, Control, Environment Directorate, OECD, Paris, 1-154

Oteng K. et Gyang. (1984). Introduction à la microbiologie alimentaire dans les pays chauds.

Pagáčová P, Galbová K, Drtil M, Jonatová I, (2010) Denitrification in USB reactor with granulated biomass. *Bioresource Technology*, Volume 101, Issue 1, January 2010, Pages 150-156.

Parsons L. L., Murray R. E., Smith M. S. (1991). Soil denitrification dynamics—spatial and temporal variations of enzymæactivity, populations, and nitrogen gas loss. *Soil Science Society of America Journal* 55: pp 90-950

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

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

Protejoie S., Martinez J., Landmann G. (2002). L'ammoniac d'origine agricole : impacts sur la santé humaine et animale et sur le milieu naturel. *INRA Prod. Anim.*, 2002, 15 (3), pp 151-160.

Pungrasmi W., Playchoom C., Powtongsook S (2013). Optimization and evaluation of a bottom substrate denitrification tank for nitrate removal from a recirculating aquaculture system, *J Environ Sci (China)*. 25(8) (2013) 1557-1564.

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

Q - R - S

Qin Yuje, Wu Jiandong, Ouyang Hai (2013). The Application of Organica Ecological Technology in Residential Sewage Treatment. *Journal of Environmental Protection*, 4: 31-34.

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

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

Rene E.R., Kim S.J., Park H.S (2008)., Effect of COD/N ratio and salinity on the performance of sequencing batch reactors, *Bioresource Technology*, 99 (4) 839–846.

Rezaee,A. and H. Godini, S. Dehestani, S. Kaviani, (2010). Isolation and characterization of a novel denitrifying bacterium with high nitrate removal : *Pseudomonas stutzeri*. Department of Environmental Health, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. *Iran. J. Environ. Health. Sci. Eng.*, 2010, Vol. 7, No. 4, pp. 313-318.

Robertson LA., Dalsgaard T., Revsbech NP., Kuenen JG., (1995). Confirmation of aerobic denitrification in batch cultures, using gas chromatography and ¹⁵N mass spectrometry. *FEMS Microbiol. Ecol.* 18: 113-120.

Rodier J., Legube B., Merlet N. (2009), L'analyse de l'eau (eaux naturelles, eaux résiduaires, eau de mer), 9th ed., *DUNOD Edition, Paris, France. ISBN 978-2-10-054179-9,* (2009) 327-329.

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

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

Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T., (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

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

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

Scala. D.J & Kerkhof L.J, (1999). Diversity of Nitrous Oxide Reductase (*nosZ*) Genes in Continental Shelf Sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* vol. 65 (4) 1681-1687.

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

Hall PTR.

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

Shao L., Xu Z.X., Yin H.L., and Chu H.Q., (2008), Rice husk as carbon source and bio-film carrier for water denitrification, *Journal of Biotechnology*. 136. 647-677.

Shinzato N., Muramatsu M., Matsui T., Watanabe Y (2007). Phylogenetic analysis of the gut bacterial microflora of the fungusgrowing termite *Odontotermes formosanus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, (71), 906-915.

Sibony Jaques. (1983). Technique et procédés d'élimination des produits azotés des les eaux potables. La technique de l'eau et l'assainissement N° 437. P47-52.

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

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

Sorensen B. H. et Jorgensen S. E. (1993). The removal of nitrogen compounds from wastewater. Amestredam, London, New-york, Tokyo.

Stanier R. Y. (1976). Microbiologie générale, Mosson et CIE éditeurs, pp 225-370.

T - V - W

Tada K. and Shimazu K. (2005). Kinetic studies of reduction of nitrate ions at Sn-modified

Pt electrodes using a quartz crystal microbalance. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2005. 577(2). pp 303-309.

Takaya N., Catalan-Sakairi M.A.B., Sakaguchi Y., Kato I., Zhou Z.M., Shoun H (2003)., Aerobic denitrifying bacteria that produce low levels of nitrous oxide, *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (2003) 3152–3157.

Tansakul C. (2009). Procédés hybrides à membranes pour le prétraitement d'eau de mer avant dessalement par osmose inverse. Thèse de doctorat Toulouse INSA.

Tarr CL., Patel J S., Pühr N D., Sowers E G., Bopp CA. & Strockbine N A. (2007). Identification of *Vibrio* Isolates by a Multiplex PCR Assay and *rpoB* Sequence Determination. *J. Clin. Microbiol.* 45 (1): 134–140.

Tiedje J.M., (1982) in: A.L. Pege (Ed.), Agronomy Monograph No.9 2nd Edition, American Society of Agronomy, Madison, WI. 1018.

Tiedje J. M. (1988). Tiedje J. M., Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium, In A.J.B Zehnder (Eds.), *Biology of anaerobic microorganisms, New-York, John Weiley and sons.* (1988) 179- 244.

Torrijos M, Vuitton V, Moletta R. (2000). Le procédé SBR : une solution efficace et économique pour dépolluer les eaux usées des petites fromageries du massif jurassien. In: nuisances Adpdtdeed, Poitiers ESdId, eds. 14èmes Journées Information Eaux (JIE 2000). Poitiers, 13- 15 septembre; 2000: 45-1 à 11 (communication orale, texte intégral).

Van De Peer Y., Chapelle S., De Wachter R (1996). A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. *Nucleic Acids Res*, , (24), 3381-3391.

Van Dijk L, Roncken G. (1997). Membrane bioreactors for wastewater treatment : the state of the art and new developments. *Water Science and Technology.* 1997; 35(10):35-41.

Van Rijn J., Tal Y., Schreier H.J., (2006) Denitrification in recirculating systems: theory and applications *Aquac. Eng.* 34 (2006). 364-376.

Van Rijn J. (2013). Waste treatment in recirculating aquaculture systems. *Aquac. Eng.*, 53 (2013), pp. 49–56

Voet D., Voet J.G., Pratt C.W (2013). Principales of Biochemistry: Life at Molecular Level. 4th edition. (2013).

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

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

Weisi Li (2013). Study on Characteristics in the Removal Process of Ammonia Nitrogen and Nitrate Nitrogen by an Isolated Heterotrophic Nitrification-Aerobic Denitrification Strain *Rhodococcus sp.* *Journal of Environmental Protection*, (2013), 4, 74-79

WHO., (2003) Nitrate and nitrite in drinking-water., Background document for preparation of WHO Guidelines for drinking-water quality, Geneva, *World Health Organization* (WHO/SDE/WSH/03.04/56). (2003) 417-420.

Wheeler et al., (1996). Homology of DNA sequence DATA. *Departement of Invertebrate Zoology, American Meseum of Natural History, New york, NY.* 10024, (1996).

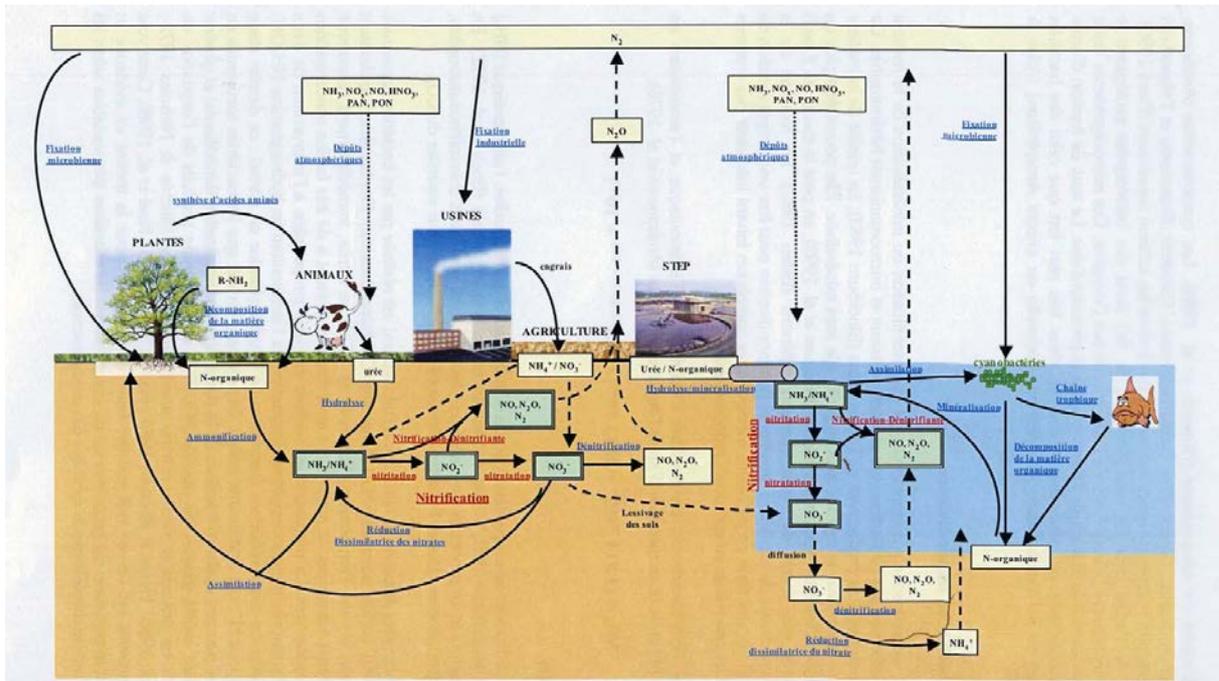
Y-Z

Yoshinari T., Knowles K (1976). Biochem, Biophys, Res, Commun. 69 (1976) 705.

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

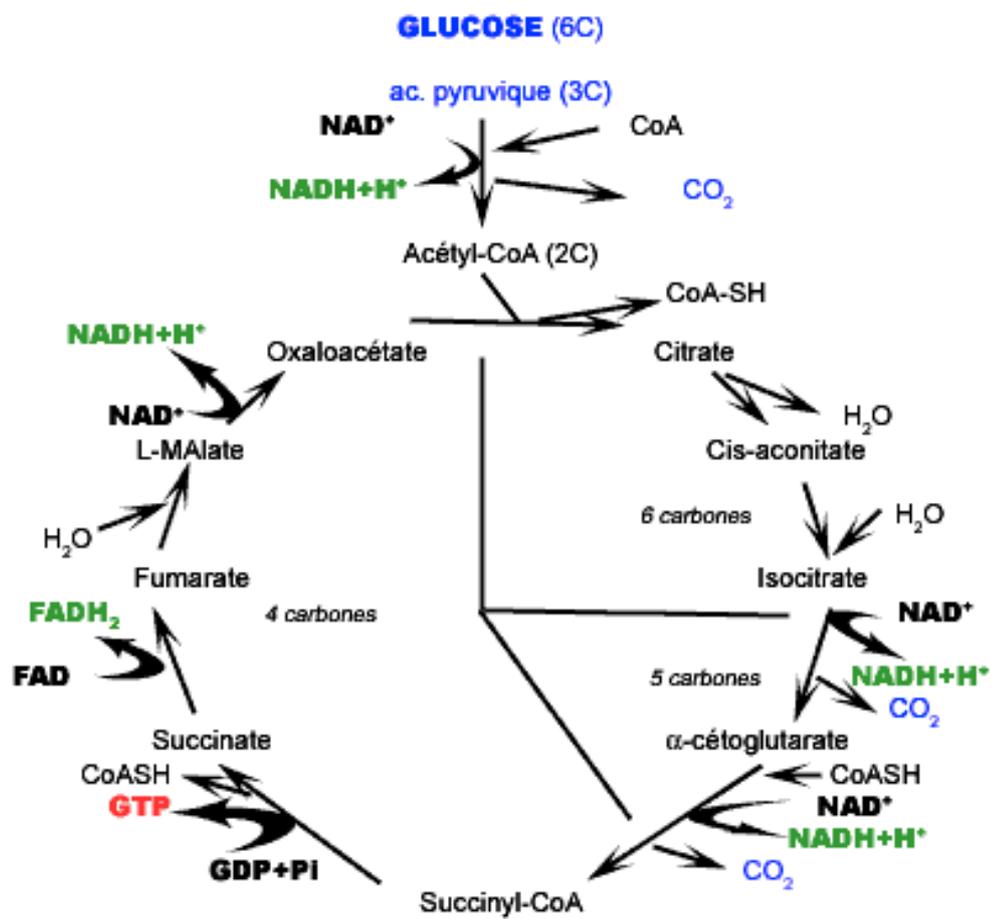
Annexes

Annexes 1



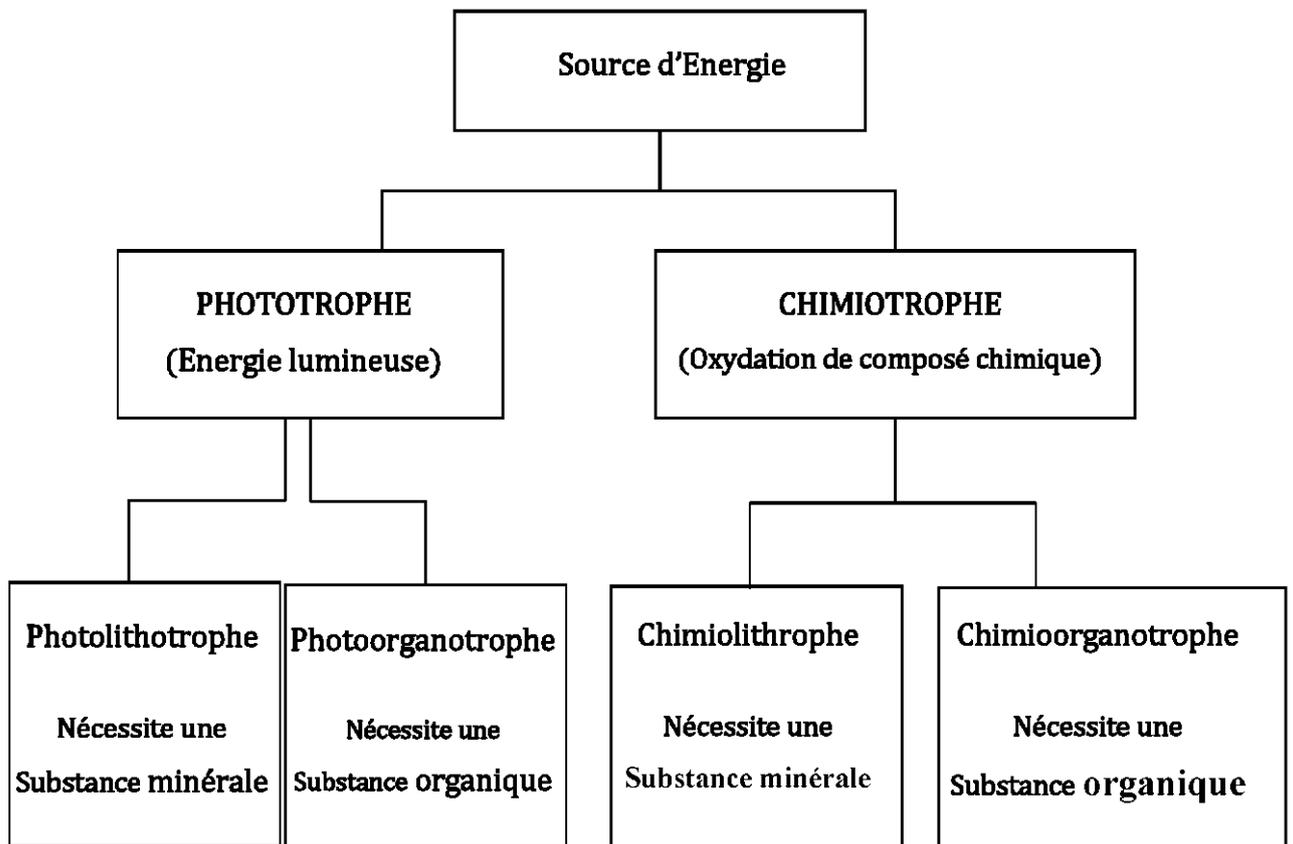
Cycle de l'azote montrant les connexions existant entre les milieux terrestres et aquatiques.
 PAN = peroxyacyl, PON = particule organic nitrogen. (Cébron, 2004)

Annexe 2



Cycle de Krebs

Annexe 3 : Classement des microorganismes selon leurs types d'énergie



Annexe 4: Fonctions physiologiques des principaux éléments constitutifs des Cellules microbiennes.

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

Annexe 5: Les caractéristiques physico-chimiques du succinate de sodium

| | |
|-----------------------|--|
| Source de carbone | Succinate de sodium |
| Formule moléculaire | $C_4H_4Na_2O_4$ |
| Formule structurale | $NaOOCCH_2CH_2COONa$ |
| Etat physique | Poudre blanche |
| Point de fusion | $> 400^\circ C$ |
| Densité | 1.886 g/cm^3 à $25^\circ C$ |
| Tension de vapeur | $< 0.00015 \text{ hPa}$ à $100^\circ C$ $1.16E-7 \text{ hPa}$ |
| Solubilité dans l'eau | $> 100 \text{ g/l}$ à $25^\circ C$ |

Annexe 6: Les caractéristiques physico-chimiques du méthanol

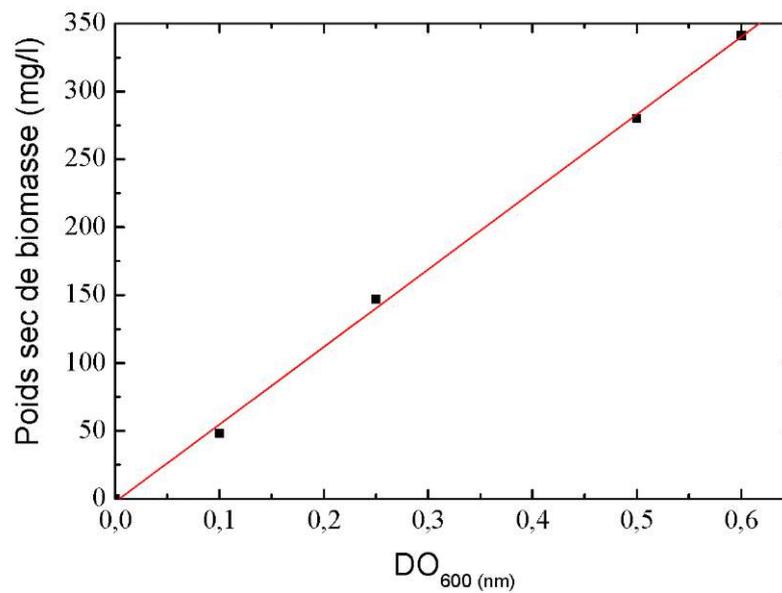
| | |
|-----------------------------|--|
| Source de carbone | MeOH |
| Formule moléculaire | CH ₄ O |
| Synonyme | Alcool méthylique |
| Etat physique | Liquide fluide |
| Poids moléculaire | 32 g /mol |
| Densité | 0,791 g/cm ³ à 20°C |
| Point d'ébullition | 64,5°C |
| Point de fusion | - 97,8°C |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

Annexe 7 : Relation entre la densité optique et l'extrait sec

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

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

Coefficient de corrélation $R = 0,0996$



Droite d'étalonnage de la biomasse

Annexe 8 : Protocole de dosage des nitrates par la colorimétrie

Méthode au salicylate de sodium

Principe

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

Réactifs

-solution de salicylate de sodium à 0,5 %, à renouveler toutes les 24 heures.

-Acide sulfurique concentré. (d=1,84)

-Solution d'hydroxyde de sodium et de tartrate double de sodium et de potassium :

| | |
|---|---------|
| Hydroxyde de sodium | 400 g |
| Tartrate double de sodium et de potassium | 60 g |
| Eau distillée | 1000 ml |

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

A conserver dans un flacon en polyéthylène.

-Solution mère étalon d'azote nitrique à 0,1 g/l :

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

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

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

Etablissement de la courbe d'étalonnage

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

| Numéro de capsules | T | I | II | III | IV |
|---|----|-----|----|-----|----|
| Solution étalon d'azote nitrique à 0.005 g/l (ml) | 0 | 1 | 2 | 5 | 10 |
| Eau distillée (ml) | 10 | 9 | 8 | 5 | 0 |
| Correspondance en mg/l d'azote nitrique | 0 | 0.5 | 1 | 2.5 | 5 |
| Solution de salicylate de sodium (ml) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

Evaporer à sec au bain marie ou dans une étuve portée à 75-80°C (ne pas surchauffer, ni chauffer trop longtemps). Laisser refroidir. Reprendre le résidu par 2 ml d'acide sulfurique concentré en ayant soin de l'humecter complètement.

Attendre 10 minutes, ajouter 15 ml d'eau bidistillée puis 15 ml de la solution d'hydroxyde de sodium et de tartrate double de sodium et de potassium qui développe la couleur jaune.

Effectuer les lectures au spectromètre à la longueur d'onde de 420 nm. Soustraire des densités optiques lues pour les étalons, la valeur relevée pour le témoin. Construire la courbe d'étalonnage.

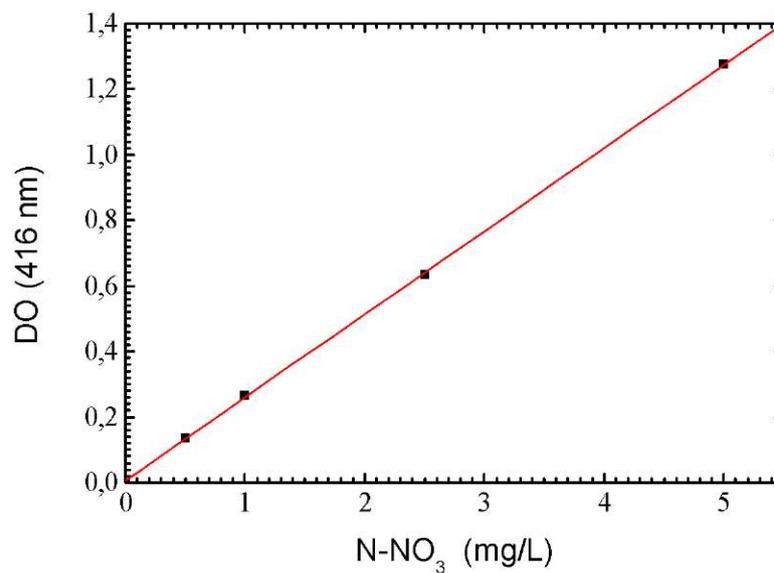
Mode opératoire

Introduire 10 ml d'eau dans une capsule de 60 ml (pour des teneurs en azote nitrique supérieures à 10 mg, opérer une dilution). Alcaliniser faiblement avec la solution d'hydroxyde de sodium. Ajouter 1 ml de solution de solution de salicylate de sodium puis poursuivre le dosage comme la courbe d'étalonnage. Préparer de la même façon un témoin avec 10 ml d'eau bidistillée.

Effectuer les lectures au spectromètre à la longueur d'onde de 415 nm et tenir compte de la valeur lue pour le témoin. Se reporter à la courbe d'étalonnage (figure).

Expression des résultats

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



Droite d'étalonnage du dosage des nitrates

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

Coefficient de corrélation $R = 0,9998$

Annexe 9 : La mesure de la demande chimique en oxygène

Introduction

Mode opératoire

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

Principe

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

Appareillage

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

Spectromètre double faisceau et cuve.

Réactifs

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

Protocole

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

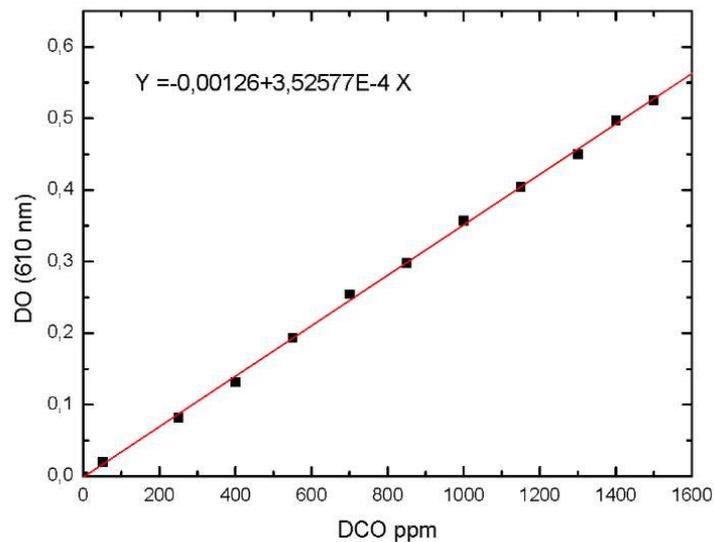
Après fermeture hermétique et homogénéisation, le tube est placé dans le réacteur pendant

2 mn suivant la concentration en oxydant choisie.

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

Etalonnage

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



Résumé:

Le travail que nous présentons dans cette thèse consiste en une étude de la réaction de dégradation des nitrates des eaux usées par l'utilisation d'un processus biologique. La dénitrification hétérotrophique est l'une des méthodes les plus sélectives et les plus avancées pour l'élimination des nitrates; elle est généralement inhibée par des sources de carbone insuffisantes. Ce processus nécessite l'utilisation d'un accepteur final d'électrons, souvent c'est un hydrocarbure tels que le méthanol, le glucose, le fructose.... Dans notre cas nous avons testé à 35°C dans un milieu nutritif approprié, le succinate de sodium et le méthanol, dans une première étape par l'utilisation d'une culture mixte prélevée à partir de la station d'épuration Ibn Ziad, Constantine, Algérie. Dans une seconde étape par cinq souches bactériennes qui ont été isolées mais seules les souches N5 et N6 qui ont été identifiées. Les souches ont été préalablement identifiées en utilisant des tests biochimiques, coloration de Gram et par galerie API 20 E, puis une méthode basée sur la similitude de l'ARNr de PCR-16S. L'analyse de la séquence du gène de l'ARNr 16S a indiqué que les deux souches étaient plus étroitement liées à *Enterobacter hormaechei* avec des similarités de séquence de 99%. Les deux souches ont montré une excellente capacité à éliminer les nitrates et à transformer les substances carbonées, à savoir, le méthanol et le succinate de sodium en dioxyde de carbone. Ce processus s'est accompagné d'une légère augmentation du pH avec production simultanée d'azote gazeux comme produit final à 35 ° C. Le nitrate a été éliminé après 48 h d'incubation. Ainsi, la capacité de dénitrification anaérobie des souches N5 et N6 a été prouvée. Le succinate de sodium est la source de carbone la plus favorable pour la dénitrification par les deux souches (N5 et N6). De plus, les souches N5 et N6 pourraient éliminer efficacement le nitrate à de faibles rapports C / N et dans des conditions où la température est élevée, ce qui favoriserait l'élimination des nitrates des eaux usées.

Mots clés: *Enterobacter hormaechei*, dénitrification hétérotrophique, nitrate, rapport C/N.

Abstract

The work that we present in this thesis consists of a study of the nitrate degradation reaction of wastewater by the use of a biological process. Heterotrophic denitrification is one of the most selective and advanced method for nitrate removal, it is usually inhibited by insufficient carbon sources. This process requires the use of a final electron acceptor, often it is a hydrocarbon such as methanol, glucose, fructose In our case we tested at 35 ° C in a suitable nutrient medium, sodium succinate and methanol, in a first step by the use of a mixed culture taken from the wastewater treatment plant (WWTP) Ibn Ziad, Constantine , Algeria. In a second step by five bacterial strains that have been isolated but only the N5 and N6 strains that have been identified. five bacterial strains were isolated but only the strains N5 and N6 were identified. The strains were preliminarily identified using biochemical, Gram staining and by API 20 E system, tests and then a method based on the similarity of the PCR-16S rRNA. 16S rRNA gene sequence analysis indicated that both strains were most closely related to *Enterobacter hormaechei* with sequence similarities of 99%. Both strains showed an excellent capability to remove nitrate and to transform carbon substances namely methanol and sodium-succinate to carbon dioxide. This process was accompanied by a slight rise in pH with a simultaneous production of nitrogen gas as the end product at 35°C. Nitrate was removed after 48 h of incubation. Thus, the anaerobic denitrification ability of strains N5 and N6 has been proved. Sodium-succinate is the most favorable carbon source for denitrification by both strains (N5 and N6). Furthermore, strains N5 and N6 could effectively remove nitrate at low C/N ratios and under conditions where the temperature is elevated, which would benefit nitrate removal from the wastewater.

Keywords: *Enterobacter hormaechei*, Heterotrophic denitrification, Nitrate, C/N ratio.

ملخص

العمل الذي نقدمه في هذه الرسالة يتكون من دراسة رد فعل نترات تدهور مياه الصرف الصحي من خلال استخدام عملية بيولوجية. إزالة النتروجين التغايرية هي واحدة من أكثر الطرق انتقائية ومتقدمة لإزالة النترات. فإنه عادة ما تعوقها مصادر الكربون غير كافية. تتطلب هذه العملية استخدام متقبل نهائي للإلكترون، وغالبا ما يكون هيدروكربون مثل الميثانول والجلوكوز والفركتوز في حالتنا اختبرنا عند 35 درجة مئوية في وسط غذائي مناسب، سكسينات الصوديوم والميثانول، في خطوة أولى من خلال استخدام ثقافة مختلطة مأخوذة من محطة تنقية ابن زياد، قسنطينة، الجزائر. في خطوة ثانية من خمس سلالات بكتيرية تم عزلها ولكن فقط سلالات N5 و N6 التي تم تحديدها. تم تحديد سلالات مبدئيا باستخدام الاختبارات البيوكيميائية غرام تلوخيخ ومعرض API 20 E، ومن ثم طريقة تستند إلى تشابه PCR-16S ARNr تحليل تسلسل الجينات 'ARNr 16S' أن كلا سلالة كانت ترتبط ارتباطا وثيقا مع المعوية هورميتشي مع تشابه تسلسل 99%. وأظهرت كلا السلالتين قدرة ممتازة لإزالة النترات وتحويل المواد الكربونية وهي الميثانول والسكسينات الصوديوم إلى ثاني أكسيد الكربون. وقد صاحب هذه العملية ارتفاع طفيف في الرقم الهيدروجيني مع الإنتاج المتزامن للغاز النيتروجين كمنتج نهائي عند 35 درجة مئوية. تمت إزالة النترات بعد 48 ساعة من الحضارة. وهكذا، تم إثبات قدرة إزالة النتروجين اللاهوائي من سلالة N5 و N6. السكسينات الصوديوم هو مصدر الكربون الأكثر ملاءمة لنزع النتروجين من قبل كل من سلالات (N5) و (N6) وعلاوة على ذلك، يمكن للسلالات N5 و N6 إزالة النترات بشكل فعال عند نسب C / N منخفضة وفي ظل ظروف ارتفاع درجة الحرارة، الأمر الذي من شأنه أن يفيد إزالة النترات من مياه الصرف الصحي.

الكلمات المفتاحية: إنتيروباكتري هورمايشي، نزع النتروجين المغاير، نترات، نسبة C / N