

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère De l'Enseignement Supérieur

Et

De la Recherche Scientifique

**Université Abbès Laghrour Khenchela**

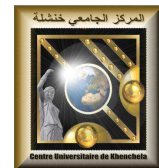
Institut des Sciences de la Nature Et de la Vie

**Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Magistère**

**Option: Microbiologie des écosystèmes aquatiques**

*Présenté par*

**KHEDDOUMA Asma**



## **Elimination des nitrates par procédé biologique des eaux de la région de Khenchela**

*Soutenu le:20. /02 / 2012*

Directeur de Thèse: **M. BENOUNIS M.** (Maître de Conférences)

Univ. Khenchela

**Devant le jury:**

Président : **M. BENALI-CHERIF N.** (Professeur)

Univ. Khenchela

Examineurs : **M. HOUHAMDI M.** (Professeur)

Univ. Guelma

**M. DARBOUCHE A.** (Professeur)

Univ. Khenchela

Membre invité : **M. AYACHI A.** (Maître de Conférences)

Univ. Batna

**2011-2012**

## REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au laboratoire pédagogique de bactériologie, département de vétérinaire, université de BATNA, sous la direction de Monsieur AYACHI Ammar que je remercie pour sa confiance, son aide et sa patience.

Mes remerciements s'adressent également à Monsieur BENALI-CHEKIF Noureddine professeur à l'université de Khenchela qui me fait l'honneur de présider le jury.

Je remercie sincèrement Monsieur HOUHAMDJI Moussa Professeur à l'université de Guelma pour sa précieuse assistance technique et de faire partie de ce Jury.

Je remercie également Monsieur DARBOUCHE Abdelhak, Maître de conférences à l'université de Khenchela, d'avoir accepté de juger ce modeste travail.

Je remercie également mon encadreur, Monsieur le Docteur BENOUNIS Messaoud pour avoir initié ce sujet de recherche.

Je tiens à exprimer ma gratitude à tous nos estimables enseignants de la première année de notre formation Mme KELLIL Katia, Mme BOUANNANI Samia, M. GHERS Azzedine, M. HOUHA Balgacem et Mme DEGHBOUCHE Nadia.

Au terme de ce travail, je tiens à exprimer tout particulièrement ma reconnaissance à Monsieur le Professeur MEHENNAOUI Smail, président du laboratoire de l'Environnement, Santé et Productions Animales, département de vétérinaire, université de Batna, pour ses compétences scientifiques, son ouverture d'esprit, son soutien et sa gentillesse.

Ce travail n'aurait pu avancer sans l'aide précieuse de Monsieur BENDAYKHA Abdelwaheb, qu'il trouve ici le témoignage de ma profonde reconnaissance et ma sincère gratitude.

Je remercie également l'équipe du laboratoire de bactériologie, Madame HIDJAZI Farida, Madame KHADHERI Sana et Monsieur SI MOHAMMED Saleh pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire et pour leur gentillesse.

Un grand merci du fond du cœur s'adresse à M<sup>lle</sup> ABDESSEMAD Zineb, M<sup>lle</sup> NOUAR Yasmina, M. AGGOUNE Radhwane, M<sup>lle</sup> MAMMARI Lamia, Monsieur RAHAB Hamza, Monsieur HAMAMES Mokhtar, Monsieur BACHA Mohammed Nadjib et Monsieur BAALI Mohammed pour l'aide qu'ils m'ont apporté.

Enfin, je tiens à remercier très vivement, Monsieur HAMMADI Larbi, Madame HARKAT Hassina, Monsieur DIBI Ammar, Madame CHORFI Rafika, Madame HLAILI Nozha, Madame MEGALATTI Amel et Monsieur KASSEH-LAOUR Ahmed pour leurs aides.



## *Dédicace*

*Avec l'aide de Dieu, j'ai pu réaliser ce modeste travail dédié à:*

✚ *Mes parents qui ont toujours été là pour moi et qui m'ont donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance.*

✚ *Mes frères Zoubir, A. Elhamid et Ali.*

✚ *Mes sœurs Zeineb et Chaima.*

✚ *Mes amies : Rima, Hala et Maya.*

✚ *Mes collègues : M<sup>eme</sup>. Chorfi Kalthoum, Leyla, Zineb, Hiba, Manel, Karima, Anissa, Soumaya, Mokhtar, Nadjib et Mohsen.*



<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
<b>I. Les eaux usées.....</b>	<b>3</b>
I.1. Nature et origine.....	3
I.1.1. Les eaux usées domestiques.....	3
I.1.2. Les eaux usées urbaines.....	3
I.1.3. Les eaux usées industrielles.....	3
I.2. Composition des eaux usées.....	4
I.2.1. Matières en suspension (MES).....	4
I.2.2. Demande biochimique en oxygène (DBO).....	4
I.2.3. Demande chimique en oxygène (DCO).....	4
I.3. Pollution des eaux usées.....	4
I.4. Effets des eaux usées sur le milieu récepteur.....	5
I.5. Traitement des eaux usées.....	6
<b>II. Les boues activées.....</b>	<b>9</b>
II.1. Généralité sur les boues activées.....	9
II.2. Composition des boues activées.....	9
II.3. Les boues activées à l'échelle microscopique.....	9
II.3.1. Microfaune et microflore.....	9
II.3.2. Les éléments nécessaires au développement des micro-organismes.....	10
II.4. Traitement des boues activées.....	10
II.4.1. Stabilisation des boues activées.....	10
II.4.1.1. Stabilisation anaérobique.....	11
II.4.1.2. Stabilisation aérobie.....	11
II.4.1.3. Réduction de la teneur en eau des boues.....	11
<b>III. Les nitrates.....</b>	<b>12</b>
III.1. Définition et sources.....	12
III.2. Les nitrates dans la nature.....	13
III.2.1. Les nitrates dans le sol.....	13
III.2.2. Les nitrates dans les eaux.....	15
III.2.3. Les nitrates dans les aliments.....	16
III.3. Effets des nitrates.....	16
III.3.1. Effets sur la santé humaine.....	17
III.3.2. Effets sur l'environnement.....	18
III.4. Procédés d'élimination des nitrates.....	20
III.4.1. Procédés physico-chimiques.....	20
III.4.2. Procédés membranaires.....	21
III.4.3. Procédés biologiques.....	22
III.4.3.1. Réduction assimilatrice.....	22
III.4.3.2. Réduction dissimilatrice.....	22
<b>IV. Les bactéries dénitrifiantes.....</b>	<b>22</b>
IV.1. Les bactéries dénitrifiantes autotrophes.....	23
IV.2. Les bactéries dénitrifiantes hétérotrophes.....	25
IV.3. Conditions de la dénitrification.....	25
IV.3.1. Température.....	25
IV.3.2. pH.....	26
IV.3.3. Concentration de l'oxygène dissous.....	26
IV.3.4. Nature de la source du carbone.....	26

<b>V. La nitrate réductase.....</b>	<b>27</b>
<b>CHAPITRE II. MATERIEL ET METHODES</b>	
<b>I. Matériel.....</b>	<b>29</b>
I.1. L'échantillonnage.....	29
I.2. Conservation des échantillons.....	29
I.3. Milieu de culture.....	30
I.4. pH mètre.....	31
I.5. Spectrophotomètre.....	31
<b>II. Méthodes d'analyse.....</b>	<b>31</b>
II.1. Isolement et purification des bactéries.....	31
II.2. Etudes physiologiques et biochimiques.....	32
II.2.1. Tests préliminaires.....	32
II.2.1.1. L'examen à l'état frais.....	32
II.2.1.2. Coloration de Gram.....	32
II.2.1.3. Test de la mobilité.....	32
II.2.1.4. Mode respiratoire.....	32
II.2.2. Tests biochimiques.....	33
II.2.2.1. Recherche de la catalase.....	33
II.2.2.2. Recherche de l'oxydase.....	33
II.2.2.3. Recherche de la $\beta$ galactosidase.....	33
II.2.2.4. Recherche de la nitrate réductase.....	34
II.2.2.5. Fermentation des sucres (test TSI).....	34
II.2.2.6. Utilisation du citrate comme seule source de carbone.....	35
II.2.2.7. Dégradation de l'urée.....	35
II.2.2.8. Production de l'indole.....	35
II.2.2.9. Utilisation des acides aminés.....	36
II.2.2.10. Etude des différentes voies fermentatives intermédiaires.....	36
II.2.3. Identification bactérienne.....	37
II.3. L'enrichissement.....	37
II.4. Cultures en batch et dosages.....	37
II.4.1. Inoculation des cultures en batch.....	37
II.4.2. Mesure de la biomasse.....	38
II.4.3. Mesure du pH.....	38
II.4.4. Dosage des nitrates.....	38
<b>CHAPITRE III. RESULTATS ET DISCUSSION</b>	
<b>Introduction.....</b>	<b>39</b>
<b>I. Suivi de la dénitrification par l'utilisation d'une culture mixte.....</b>	<b>39</b>
I.1. Suivi de la dénitrification par l'utilisation de 500ppm de sources de carbone.....	39
I.1.1. Suivi de la croissance bactérienne.....	40
I.1.2. Suivi de la réduction des nitrates.....	41
I.1.3. Suivi du pH du milieu au cours de la dénitrification.....	42
I.2. Suivi de la dénitrification par l'utilisation de 1000ppm de sources de carbone.....	43
I.2.1. Suivi de la croissance bactérienne.....	44
I.2.2. Suivi de la réduction des nitrates.....	45
I.2.3. Suivi du pH du milieu.....	46
I.3. Suivi de la dénitrification par l'utilisation de 2000 ppm de sources de carbone.....	46

## *Table Des Matières*

---

I.3.1. Suivi de la croissance bactérienne.....	47
I.3.2. Suivi de la réduction des nitrates.....	48
I.3.3. Suivi du pH du milieu.....	49
<b>II. Isolement et identification des souches.....</b>	<b>50</b>
<b>III. Suivi de la dénitrification par l'utilisation des souches pures.....</b>	<b>52</b>
<b>III.1. Culture en batch avec la souche A.....</b>	<b>52</b>
III.1.1. Suivi de la croissance bactérienne.....	52
III.1.2. Suivi de la réduction des nitrates.....	53
III.1.3. Suivi du pH du milieu.....	54
<b>III.2. Culture en batch avec la souche B.....</b>	<b>54</b>
III.2.1. Suivi de la croissance bactérienne.....	54
III.2.2. Suivi de la réduction des nitrates.....	55
III.2.3. Suivi du pH du milieu.....	56
<b>III.3. Culture en batch avec la souche E.....</b>	<b>57</b>
III.3.1. Suivi de la croissance bactérienne.....	57
III.3.2. Suivi de la réduction des nitrates.....	58
III.3.3. Suivi du pH du milieu.....	58
<b>IV. Identification des souches avec les galeries API.....</b>	<b>59</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>61</b>
<b>CONCLUSION GENERALE.....</b>	<b>62</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	
<b>ANNEXES</b>	

## *Liste Des Abréviations*

---

<b>ADH</b>	Arginine dihydrolase.
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique.
<b>API</b>	Appareillage et Procédés d'Identification.
<b>C°</b>	Degré Celsius.
<b>DBO</b>	Demande biochimique en oxygène mesurée après cinq jours.
<b>DCO</b>	Demande chimique en oxygène.
<b>DO</b>	Densité optique.
<b>h</b>	Heure.
<b>IR</b>	Infra rouge.
<b>LDC</b>	Lysine décarboxylase.
<b>MES</b>	Matières en suspension.
<b>mn</b>	Minute.
<b>MO</b>	Matière organique.
<b>nm</b>	Nanomètre.
<b>NR</b>	Nitrate réductase.
<b>ODC</b>	Ornithine-décarboxylase.
<b>ONPG</b>	Ortho Nitro Phényl Galactopyranoside.
<b>pH</b>	Potentiel hydrogène.
<b>ppm</b>	Milligramme par litre.
<b>RM</b>	Rouge de méthyle.
<b>rpm</b>	Rotation par minute.
<b>TSI</b>	Triple Sugar Iron.
<b>UV</b>	Ultraviolet.
<b>VF</b>	Viande foie.
<b>Vis</b>	Visible.

## Liste Des Figures

---

<b>Figure 1.</b> Description globale du fonctionnement d'une station d'épuration (Valat, 2005).....	07
<b>Figure 2.</b> Cycle biogéochimique de l'azote (Portejoie et <i>al.</i> , 2002).....	12
<b>Figure 3.</b> Devenir des nitrates, nitrites et composés nitrosamines dans l'organisme (Guenfoud, 2009).....	18
<b>Figure 4.</b> Individus de grande dimension d' <i>Ulva armoricana</i> , en suspension dans l'eau (Ménesguen, 2003).....	19
<b>Figure 5.</b> Organisation des trois sous unités ( $\alpha$ , $\beta$ et $\gamma$ ) dans NarGHI d' <i>E. coli</i> (Philippot et Hojberg, 1999).....	27
<b>Figure 6.</b> Composition d'une nitrate réductase cytoplasmique et une nitrate réductase périplasmique (Kraft et <i>al.</i> , 2011).....	28
<b>Figure 7.</b> Photographie d'un lit de séchage, station d'épuration de KHENCHELA.....	29
<b>Figure 8</b> Photographie d'un incubateur anaérobie avec agitation.....	38
<b>Figure 9.</b> Cinétique de la croissance bactérienne en présence de 500ppm de source de carbone.....	40
<b>Figure 10.</b> Cinétique de la réduction des nitrates par une culture mixte avec 500ppm de source de carbone.....	41
<b>Figure 11.</b> Evolution du pH au cours de la dénitrification en présence de 500ppm de source de carbone.....	43
<b>Figure 12.</b> Cinétique de la croissance bactérienne en présence de 1000ppm de source de carbone.....	44
<b>Figure 13.</b> Cinétique de la réduction des nitrates par une culture mixte avec 1000ppm de source de carbone.....	45
<b>Figure 14.</b> Evolution du pH au cours de la dénitrification en présence de 1000ppm de source de carbone.....	46
<b>Figure 15.</b> Cinétique de la croissance bactérienne en présence de 2000ppm de source de carbone.....	47
<b>Figure 16.</b> Cinétique de la réduction des nitrates par une culture mixte avec 2000ppm de source de carbone.....	48
<b>Figure 17.</b> Evolution du pH au cours de la dénitrification en présence de 2000 ppm de source de carbone.....	49
<b>Figure 18.</b> Cinétique de la croissance de la souche A.....	52

## *Liste Des Figures*

---

<b>Figure 19.</b> Cinétique de la réduction des nitrates par la souche A.....	<b>53</b>
<b>Figure 20.</b> Evolution du pH au cours de la dénitrification par la souche A.....	<b>54</b>
<b>Figure 21.</b> Cinétique de la croissance de la souche B.....	<b>54</b>
<b>Figure 22.</b> Cinétique de la réduction des nitrates par la souche B.....	<b>55</b>
<b>Figure 23.</b> Evolution du pH au cours de la dénitrification par la souche B.....	<b>56</b>
<b>Figure 24.</b> Cinétique de la croissance de la souche B.....	<b>57</b>
<b>Figure 25.</b> Cinétique de la réduction des nitrates par la souche E.....	<b>58</b>
<b>Figure 26.</b> Evolution du pH au cours de la dénitrification par la souche E.....	<b>58</b>
<b>Figure 27.</b> Les étapes de la coloration de Gram.	
<b>Figure 28.</b> Droite d'étalonnage du dosage des nitrates.	
<b>Figure 29.</b> Photographie des géluries API utilisées pour identification des souches bactériennes isolées.	

## *Liste Des Tableaux*

---

**Tableau I.** Les effets des différents polluants des eaux usées (Association santé environnement, France, 2010).

**Tableau II.** Procédés utilisés pour les traitements des polluants de l'eau (Rodreguez Garcia, 2004).

**Tableau III.** Teneurs en nitrates et activités ou occupation du sol (Odile Ratel, 1992).

**Tableau IV.** Principales origines des  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NH}_4^-$  dans les eaux (Odile Ratel, 1992).

**Tableau V.** Composition du milieu de culture pour un litre d'eau distillée (Mammeri, 2007).

**Tableau VI.** Composition de la solution d'éléments traces pour un litre d'eau distillée (Mammeri, 2007).

**Tableau VII.** Résultats des tests morphologiques et biochimiques sur les différentes souches.

**Tableau VIII.** Résultats des galeries API des différentes souches.

# INTRODUCTION

## GENERALE

**A**vec le développement de l'urbanisation et l'industrialisation ainsi l'évolution des modes de consommation, les rejets des eaux usées ont évolué et la nature continu à recevoir ces déchets.

Ces polluants ; matières organiques, pesticides, détergents, métaux lourds, phosphates et nitrates sont très nocifs pour l'environnement et la santé humaine. Cela pousse les gouvernements et les industries à rechercher des solutions technologiques permettent un traitement efficace et moins couteux des eaux usées.

Les eaux souterraines destinées à l'alimentation humaine sont souvent sujet à d'innombrables sortes de pollution chimique. L'une des principales pollutions des eaux souterraines par les produits diffuse d'origine notamment agricole, est la pollution par les nitrates. Ces derniers proviennent essentiellement de l'utilisation intensive des substances chimiques et organiques (engrais, fumiers et lisiers) en agriculture. Les conséquences de leurs présences ne constituent certes pas un problème nouveau mais plusieurs conditions d'ordre agronomique, économique et sociologique se trouvent réunis aujourd'hui pour que des solutions soient recherchées avec un maximum d'efficacité. **(Boughrara, 2007).**

Les nitrates sont souvent associés à l'eau qui pourtant ne contient que très peu comparées aux végétaux **(Jorddan et Weller, 1996)**. Ainsi le problème des nitrates rentre le cadre de l'optique du traitement des eaux.

L'élimination des nitrates est essentiel pour l'eau contaminée, car une grande quantité de nitrate dans l'eau potable provoque souvent une maladie appelée méthémoglobinémie et autres troubles de santé comme l'hypertension, le goitre, le cancer de l'estomac et des malformations congénitales. Les processus physiques et chimiques tels que l'osmose inverse, échange d'ions, l'électrodialyse et la dénitrification chimique ont été développés pour l'élimination des nitrates de l'eau. **(Nag-Choul et Dong-Ju, 2007).**

Bien que ces techniques soient efficaces pour éliminer les nitrates de l'eau, ils sont très coûteux, autres techniques biologiques ont donc, eu lieu.

C'est dans ce contexte que nous avons entamé l'étude de l'élimination des nitrates des eaux usée de la région de KHENCHELA, par procédé biologique. Ce procédé se base sur l'utilisation des bactéries qui ont la capacité d'utiliser les nitrates comme accepteurs finals des électrons lors d'une respiration anaérobique, ce qui permet de les réduire par le phénomène de la dénitrification.

La dénitrification est la réduction des nitrates par l'intermédiaire des nitrites pour former l'azote gazeux (Betlach et Tiedje, 1981). Elle est couplée à l'oxydation soit de composés minéraux comme le soufre ou l'hydrogène, soit de composés carbonés organiques (Patureau, 1995).

L'objectif de ce travail est donc, l'étude de la cinétique de la dénitrification par une culture mixte et des cultures bactériennes pures, prélevées de la station d'épuration de KHENCHELA et l'optimisation des conditions nécessaires pour une dénitrification maximale.

Pour cela, ce travail est composé de trois parties principales et d'une conclusion générale. Le premier chapitre est l'étude bibliographique consacrée à l'étude des eaux usées (leurs origines, leurs effets sur le milieu récepteur et les mécanismes de traitement des eaux), les sources des nitrates et leur effet sur l'organisme et l'environnement. Dans le cadre du même chapitre, les différents procédés de traitement sont abordés, en insistant sur la dénitrification biologique.

Le deuxième chapitre est une présentation des moyens, des appareillages et les méthodes spécifiques utilisés lors de l'expérimentation

Le dernier chapitre regroupe l'ensemble des résultats obtenus avec différentes séries d'expériences pour l'étude de la dénitrification, en utilisant en premier lieu, une culture bactérienne mixte puis, l'isolement des souches bactériennes dénitrifiantes pures et en fin, l'étude de la cinétique de la dénitrification effectué par l'utilisation de ces cultures pures.

En dernier lieu, on rendra compte de façon synthétique des principaux résultats obtenus, résumant les buts atteints et les perspectives à atteindre par l'approfondissement de cette étude.

CHAPITRE I.

ETUDE

BIBLIOGRAPHIQUE

## **I. Les eaux usées**

Les eaux usées sont les eaux issues de diverses activités urbaines, et ne peuvent pas être rejetées telles quelles dans l'environnement, car elles contiennent divers polluants organiques et des minéraux (Hammadi *et al.*, 2008).

### **I.1. Nature et origine**

Les eaux usées sont des eaux initialement potables ou à usage domestique ou industrielle, souillées par les activités domestiques et/ou industrielles humaine. Elles proviennent de trois sources principales (Boussaboua, 2002).

#### **I.1.1. Les eaux usées domestiques**

Elles comprennent les eaux ménagères (eaux de toilettes, de lessive et de cuisine) et les eaux de vannes (urines et matières fécales) dans le système dit 'tout à l'égout'. Les eaux usées domestiques contiennent des matières minérales et des matières organiques.

#### **I.1.2. Les eaux usées urbaines**

Elles comprennent les eaux usées domestiques et les eaux de ruissellement (eaux pluviales, eaux d'arrosage et de lavage des voies publiques). Les eaux qui ruissellent sur les toitures, les cours, les jardins, les espaces verts, les voies publiques et les marchés entraînent toutes sorte de déchets minéraux et organiques : de la terre, des limons, des boues, des sables, des déchets végétaux (herbes, pailles, feuilles, graines, etc.) et toutes sortes de micropolluants (hydrocarbures, pesticides, détergents,...) (Vaillant, 1974).

#### **I.1.3. Les eaux usées industrielles**

Elles ont une composition très différente de celle des eaux usées domestiques. Leurs caractéristiques varient d'une industrie à une autre. En plus de matières organiques, azotées ou phosphorées, elles peuvent également contenir des produits toxiques, des solvants, des métaux lourds, des micropolluants organiques des hydrocarbures. Certaines d'entre elles nécessitent un prétraitement de la part des industriels avant d'être rejetées dans les réseaux de collecte.

## **I.2. Composition des eaux usées**

La composition des eaux usées est extrêmement variable, en fonction de leur origine industrielle ou domestique. Elles peuvent contenir de nombreuses substances, sous forme solide ou dissoute, ainsi que de nombreux microorganismes.

La composition des eaux usées s'analyse par le biais de diverses mesures physiques, chimiques et biologiques. Les analyses les plus fréquentes comportent des mesures de déchets solides, de la demande biochimique en oxygène mesurée après cinq jours (DBO<sub>5</sub>), de la demande chimique en oxygène (DCO) et du pH.

### **I.2.1. Matières en suspension (MES)**

C'est la masse de matières insolubles ou colloïdales retenues par filtration quantitative ou séparées par centrifugation, elles s'expriment en milligramme par litre (mg/l). Elles donnent également à l'eau une apparence trouble et souvent, un mauvais goût et une mauvaise odeur. Cependant, elles peuvent avoir un intérêt pour l'irrigation des cultures (**Baumont et al., 2000 ; Dafri, 2008**).

### **I.2.2. Demande biochimique en oxygène (DBO)**

La demande biochimique en oxygène est par définition, la quantité d'oxygène nécessaire aux microorganismes vivants présents dans le milieu pour assurer l'oxydation et la stabilisation des matières organiques présentes dans l'eau usée. Par convention, la DBO est la valeur obtenue après cinq jours d'incubation (DBO<sub>5</sub>). L'essai normalisé prévoit un ensemencement microbien à l'aide d'eau usée domestique, d'une eau de rivière ou d'un effluent de station et une incubation à 20°C, à l'abri de la lumière (**Martin, 1982<sub>b</sub>**).

### **I.2.3. Demande chimique en oxygène (DCO)**

Elle regroupe la quantité d'oxygène nécessaire pour l'oxydation de l'ensemble des matières minérales et organiques biodégradables ou non, présentes dans un milieu. Soit donc à la fois les matières oxydables par les processus purement chimique et celles oxydables par les processus biochimiques.

## **I.3. Pollution des eaux usées**

La pollution résulte de l'introduction dans un milieu de substances conduisant à son altération. La pollution de l'eau dépend de son usage ; les eaux de cuisines contiennent essentiellement des restes d'aliments, des graisses et des détergents, les eaux de lavage sont

souillées par les saletés des savons et des détergents et les eaux de toilettes contiennent beaucoup de matières organiques.

La pollution des eaux superficielles est très perceptible attire de suite l'attention sur les dangers et les mesures à prendre pour la combattre. Par contre, la pollution des eaux souterraines est moins apparente, de telle sorte que la tendance générale est de la négliger (Schoeller, 1975).

Les nutriments des plantes, comme le phosphate et le nitrate, entrent dans l'eau à travers les eaux d'égout, et l'écoulement d'engrais. Ils sont aussi trouvés dans les déchets industriels, bien que ces produits chimiques soient naturels, un grand pourcentage est additionné par les humains. Cette pollution par ces produits provoque le développement des algues et l'eau peut devenir verte avec une mauvaise odeur (l'eutrophisation).

#### **I.4. Effets des eaux usées sur le milieu récepteur**

Ces effets sont observés dans plusieurs domaines, notamment dans les mers et les rivières où s'observe parfois des marées noires ou encore la mort des poissons, suite à des intoxications dues aux rejets industriels (Dafri, 2008).

En effet, quand les eaux résiduaires contiennent des huiles ou des graisses, la formation des films peut s'opposer à l'accès de l'oxygène dans les cours d'eau et provoquer des effets d'intoxication sur les microorganismes et les poissons. Le tableau I résume les différents effets des polluants des eaux usées.

En Algérie, les eaux usées sont généralement déversées à l'état brut, soit directement à la mer, soit vers les oueds, avec dans les deux cas, des problèmes de pollution biologique et chimique. Les cours d'eau fortement pollués traversent ou passent à proximité d'agglomérations urbaines et de zones industrielles majeures (oued EL-HARRACHE à ALGER, oued SOUMMAM à BEJAIA, oued RHUMEL à CONSTANTINE et oued SEYBOUSE à ANNABA), causant ainsi beaucoup de problèmes sanitaires et d'insalubrité aux riverains. Les oueds véhiculent de fortes charges polluantes et leur capacité de dilution et d'autoépuration ne suffit plus à résorber la charge polluante. Ils se sont transformés, pour la plupart, en égouts à ciel ouvert, notamment en été où leur débit baisse naturellement. (Metiche, 2004).

**Tableau I.** Les effets des déferents polluants des eaux usées (**Association santé environnement, France, 2010**).

<b>Polluants</b>	<b>Effets environnementaux</b>	<b>Effets sanitaires</b>
<b>Les matières en suspension</b>	- Eaux plus troubles : perturbe la photosynthèse, la respiration des poissons et colmate les milieux aquatiques.	- Transportent des polluants, ce qui augmente les risques d'absorption de substances toxiques par l'organisme.
<b>Pollution organique</b>	- Asphyxie du milieu par consommation de l'oxygène dissous, mort des poissons. - Stimulation de la production végétale (eutrophisation) et accumulation de boues. - Faiblement biodégradable.	- Favorise le développement d'organismes pathogènes pour l'Homme.
<b>Azote (nitrates, nitrites), Phosphore</b>	- Eutrophisation des milieux aquatiques par excès de matières nutritives pour les végétaux (algues) et conduisant à l'asphyxie des milieux. - Toxicité de l'ammoniaque et des nitrites pour la faune aquatique.	- Nitrates : empoisonnement du sang chez les nourrissons par blocage de l'hémoglobine interdisant le transport de l'oxygène (maladie bleue). - Nitrites : cancers à long terme chez les adultes (même à faible concentration) si associés à certains pesticides.
<b>Métaux</b>	Non biodégradables, bioaccumulables.	- Troubles respiratoires, digestifs, nerveux ou cutanés. - Arsenic, Nickel et Chrome sont également considérés comme cancérigènes.
<b>Pesticides</b>	- Substances très dangereuses pour les milieux aquatiques. - Polluants organiques persistants. - S'adsorbent sur les matières en suspension et s'accumulent dans certains compartiments.	- Les plus toxiques : les insecticides - Effets reprotoxiques (malformations, stérilité, troubles de la reproduction), mutagènes et cancérigènes.

### I.5. Traitement des eaux usées

L'épuration des eaux est un ensemble de techniques qui consistent à purifier l'eau, soit pour recycler les eaux usées dans le milieu naturel, soit pour transformer les eaux naturelles en eau potable (**Dafri, 2008**).

La dépollution des eaux usées nécessite une succession d'étapes faisant appel à des traitements physiques, physico-chimiques et biologiques. En dehors des plus gros déchets présents dans les eaux usées, l'épuration doit permettre, au minimum, d'éliminer la majeure partie de la pollution carbonée.

En entrée de station d'épuration, les eaux subissent des prétraitements (dessablage, dégrillage) avant leur arrivée dans le bassin d'aération. Dans ce bassin, les eaux sont traitées par la microflore dégradant biologiquement la MO (carbone, azote, phosphate). Les boues activées permettent l'épuration des eaux usées par différents processus (nitrification, dénitrification et/ou déphosphatation) conduisant à la production de biomasse (figure 1).

La dégradation de la matière biodégradable est principalement assurée par les bactéries présentes dans les boues activées. En présence d'oxygène, une partie de la MO carbonée est oxydée sous forme de dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ) et d'eau par les bactéries autotrophes. Dans les systèmes visant à diminuer la teneur en azote organique des eaux à traiter, les bactéries nitrifiantes convertissent l'ammonium en nitrates (nitrification). Puis, en absence d'oxygène, des bactéries hétérotrophes anaérobies dégradent les nitrates en diazote ( $\text{N}_2$ ) par un processus appelé dénitrification (Valat, 2005).

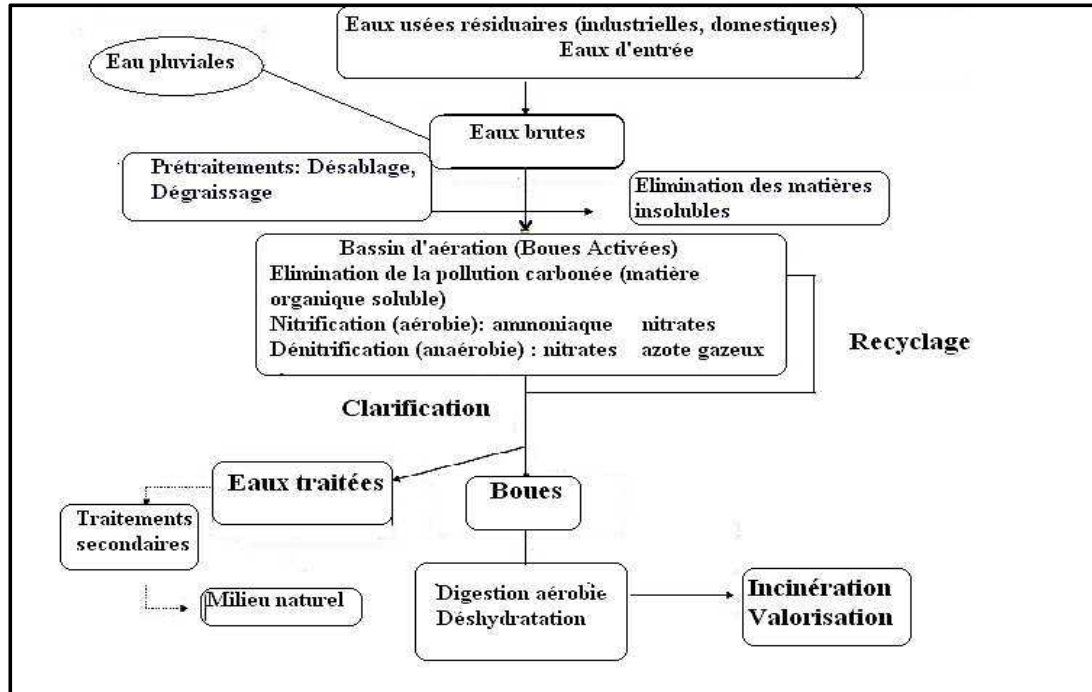


Figure 1. Description globale du fonctionnement d'une station d'épuration (Valat, 2005).

A la fin, l'eau passe dans un bassin de décantation, dit *secondaire*, où les boues se déposent, laissant une eau claire. Celle-ci est filtrée, javellisée, et déchargée dans une rivière ou la mer (Bennouna et Kehal, 2001).

Le tableau ci-dessous, présente un résumé des étapes utilisées dans chaque traitement, et les opérations unitaires utilisées en fonction des impuretés à éliminer.

**Tableau II.** Procédés utilisés pour les traitements des polluants de l'eau (Rodreguez Garcia, 2004).

Etape	Impuretés	Opération unitaire	
Traitement préliminaire et primaire	Matières en suspension	Dégrillage Dessablage Sédimentation Filtration Flottation Addition de polymères chimiques	
Traitement secondaire	Composés organiques biodégradables	Boues activées Réacteur à film fixé : lit bactériens et contacteurs biologiques rotatifs Lagunage Filtration sur sable Systèmes physico-chimiques	
	Composés organiques volatils	Stripping à l'air Adsorption sur charbon actif	
Traitement tertiaire ou « avancé »	Organismes pathogènes	Chloration Ozonation UV	
	Nutriments	Azotés	Nitrification et dénitrification par croissance en suspension ou sur lit fixe Stripping à l'ammoniaque Echange d'ions Chloration
		Phosphorés	Addition métaux/sels Chaulage + coagulation/sédimentation Elimination biologique du phosphore Elimination biologique et chimique du phosphore
		Azotés et phosphorés	Elimination biologique
	Composés organiques réfractaires	Adsorption sur charbon Ozonation tertiaire	

## **II. Les boues activées**

Le système à boues activées a été employé pour traiter une grande variété d'eaux usées et plus de 90% des stations d'épuration l'utilisent comme élément central du processus de traitement. La fonction de base d'un procédé de ce traitement des eaux usées est de convertir des matières organiques en dioxyde de carbone et en eau par des cellules bactériennes (Yu, 2003).

### **II.1. Généralité sur les boues activées**

Les techniques actuelles d'épuration des eaux usées domestiques ou industrielles, ainsi que les seuils de rejet de plus en plus exigeants et les quantités à traiter de plus en plus grandes, entraînent, au cours des différentes phases de traitement, une importante production de boues. Les boues activées contiennent en général 95% à 98% d'eau (Bassompierre, 2007) et elles sont chargées des microorganismes, bactéries, algues et protozoaires.

Elles sont issues du traitement secondaire et essentiellement, composées de biomasse présente en excès dans le système et de la matière réfractaire à l'épuration biologique. Elles sont récupérées après le décanteur secondaire. Leurs pouvoirs fermentescible dépend du temps de séjour dans le système bassin d'aération – décanteur secondaire (aussi appelé âge des boues) (Derbal, 2008).

### **II.2. Composition des boues activées**

La boue activée est essentiellement composée de micro-organismes floculants et mélangés avec de l'oxygène dissous et de l'eau usée. C'est ainsi que les micro-organismes de la boue activée entrent constamment en contact avec les polluants organiques des eaux résiduaires, ainsi qu'avec l'oxygène et sont maintenus en suspension.

### **II.3. Les boues activées à l'échelle microscopique**

#### **II.3.1. Microfaune et microflore**

La faune et la flore bactérienne, appelées encore biomasse, représentent l'ensemble des êtres vivants, animaux et végétaux qui sont présents dans le milieu considéré. Les bactéries sont les actrices principales du traitement mais les autres formes biologiques gravitant autour d'elles (protozoaires, métazoaires,...) sont indispensables au bon équilibre de l'écosystème.

Les espèces varient suivant le type de station de traitement et elles caractérisent le fonctionnement d'une station (**Pujol et al., 1990**). Entre toutes ces espèces se créent alors des relations de compétition, certaines vont se développer plus facilement au détriment d'autres qui resteront minoritaires ou tendront à disparaître.

### **II.3.2. Les éléments nécessaires au développement des micro-organismes**

Le terme « substrat » désigne les substances constituant la nourriture nécessaire au développement des micro-organismes, les composés organiques à dégrader représentent la majorité de ces substances. Si le substrat n'est pas sous une forme directement assimilable par la bactérie, il sera hydrolysé à l'extérieur de la cellule bactérienne par des enzymes.

L'azote ammoniacal et les phosphates sont utilisés en tant que nutriments, car ils entrent dans la composition des composés cellulaires (protéines, membrane cellulaire et l'ADN).

L'oxygène dissous est également indispensable au développement des bactéries aérobies. Suivant la composition de l'effluent à traiter, il sera nécessaire de rajouter l'un ou plusieurs de ces composants afin de favoriser le métabolisme des bactéries (**Bassompierre, 2007**).

### **II.4. Traitement des boues activées**

Les boues, fortement chargées en matières organiques, possèdent un potentiel énergétique avéré, qu'il semble indispensable d'exploiter. Une solution technique peut permettre de répondre à cette problématique énergétique et environnementale, il s'agit de la digestion des boues.

Ce procédé permet de réduire le volume des boues, de les stabiliser et les rendre non odorantes, comme il permet de produire du biogaz principalement composé de méthane (source d'énergie propre et valorisable).

#### **II.4.1. Stabilisation des boues activées**

La stabilisation des boues d'épuration autorise leur rejet dans le milieu naturel, sans risque de contamination et de pollution (**Suh et Roussaux, 2002**). Le suivi de cette stabilisation est primordial à cause de la sensibilité du processus biologique aux paramètres du milieu.

Les conditions expérimentales sont précises et doivent être respectées rigoureusement. Divers paramètres sont mesurés : pH, température, compressibilité des boues, matières organiques et consommation d'oxygène.

#### **II.4.1.1. Stabilisation anaérobique**

La digestion anaérobique est en fait une fermentation bactérienne complète, obtenue de façon contrôlée. Au sein du digesteur, les germes, privés d'oxygène, dégradent la matière organique la plus facilement assimilable. Cette digestion s'effectue en deux phases principales:

La fermentation dite acide qui transforme la matière organique en éléments solubles (acides gras, alcools, ...) et en gaz (CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>S, ...).

La fermentation méthanique, permettant la dégradation complète des produits organiques solubles au stade de biogaz, principalement constitué de méthane.

#### **II.4.1.2. Stabilisation aérobie**

Ce procédé destiné à la réduction de la teneur en matière organique des boues, est aussi appelé digestion aérobie. Il consiste, par une aération prolongée des boues, à poursuivre le développement des micro-organismes aérobies au-delà de la période de synthèse des cellules et d'épuisement de substrats jusqu'à réaliser leur auto-oxydation. C'est le mécanisme de la respiration endogène aérobie.

Les micro-organismes aérobies, placés en phase de respiration endogène, dégradent les matières organiques existant librement ou stockées dans la masse bactérienne (**Bernard et Gray, 2000**).

#### **II.4.1.3. Réduction de la teneur en eau des boues**

Des traitements sont souvent utilisés pour favoriser la séparation liquide/solide : l'épaississement, la déshydratation et le séchage.

L'épaississement : vise à augmenter la siccité (teneur en matières sèches) sans lui enlever sa caractéristique liquide ; il est obtenu par voie gravitaire dans un concentrateur ou par des moyens mécaniques (égouttage, flottation ...) (**Guy, 2003**).

La déshydratation : vise à augmenter significativement la siccité en faisant passer la structure des boues de l'état liquide à un état pâteux ou solide.

Le séchage : élimine en grande partie ou en totalité l'eau par évaporation, soit par voie naturelle (lits de séchage) soit par voie thermique. La technique des lits de séchage se pratique à l'air libre sur des boues liquides et combine évaporation naturelle et drainage de l'eau libre à travers une couche filtrante de sable et de graviers.

### III. Les nitrates

#### III.1. Définition et sources

Le nitrate est un composé inorganique composé d'un atome d'azote (N) et de trois atomes d'oxygène (O), Le symbole chimique du nitrate est  $\text{NO}_3^-$ , c'est une substance chimique qui entre dans le cycle d'azote (figure2). Le nitrate n'est normalement pas dangereux pour la santé à moins qu'il soit réduit en nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ).

Le nitrate est un sel soluble dans l'eau, cet ion est très mobile dans les sols et pénètre dans la nappe phréatique lorsque sa quantité dépasse ce que les plantes peuvent utiliser. Dans des conditions anaérobies, les nitrates peuvent se dégrader en nitrites et se dénitrifier (Guenfoud, 2009).

Toutes les étapes du cycle de l'azote effectuées par des populations microbiennes spécifiques sont réglées par des contraintes environnementales déterminant en retour la distribution des différents composés azotés. Les nombreuses transformations de l'azote permettent à cet élément de circuler entre le compartiment atmosphérique et les milieux terrestres et aquatiques (Cébron, 2004).

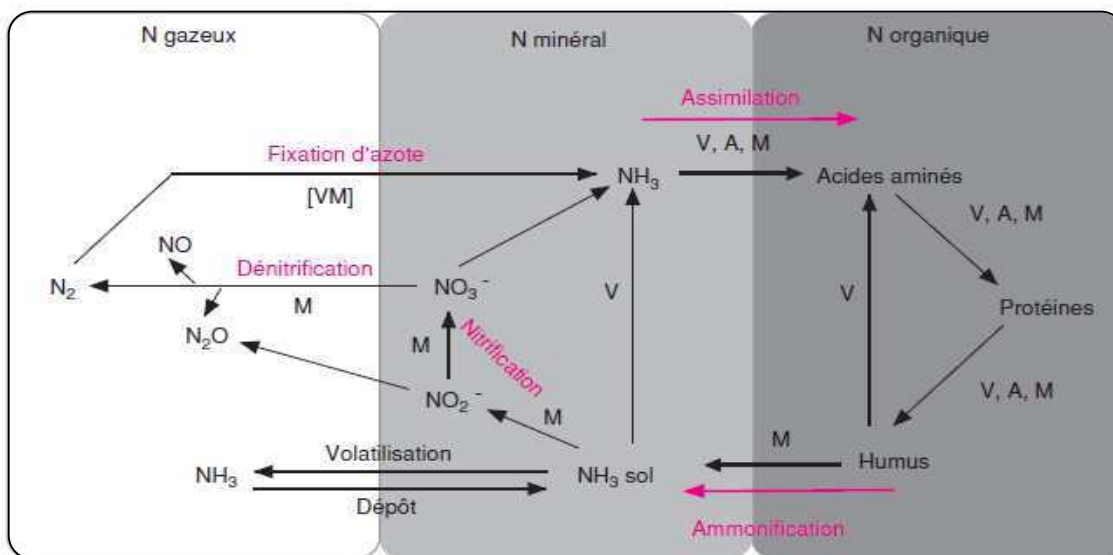


Figure 2. Cycle biogéochimique de l'azote (Portejoie et al., 2002). A : animaux, M :

microorganismes, V : végétaux, [VM] : symbioses végétal/microorganisme.

D'autre part, le nitrate représente la forme la plus stable des deux formes de l'azote, mais sous l'action microbienne, il peut être réduit en nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ), et/ou en azote gazeux ( $\text{N}_2$ ), il est beaucoup utilisé dans les engrais inorganiques, comme agent de conservation des aliments et comme substance chimique brute dans divers procédés industrielles.

Les fertilisants agricoles, le fumier, les rejets domestiques d'eaux usées et la décomposition d'organismes végétaux et animaux figurent parmi les sources les plus importantes de nitrates. Compte tenu de leur très grande solubilité dans l'eau, les sels de nitrates peuvent migrer facilement dans le sol et se retrouvent dans les eaux souterraines servant de sources d'approvisionnement en eau potable.

Le nitrate présent dans la nature ne provient pas uniquement de l'agriculture, même si celle-ci reste la source d'azote la plus importante. Les eaux usées industrielles contiennent également de l'azote, notamment les eaux rejetées par les fabricants d'engrais ou d'explosifs, les industries de traitements des métaux et les industries agro-alimentaires (**Association santé environnement, France, 2010**).

Dans l'industrie pharmaceutique, les nitrates et les nitrites sont essentiels à la synthèse de certains médicaments notamment le nitrate d'argent topique utilisé pour le traitement des brûlures, les antipaludiques, la nitroglycérine et les anti-diarrhéiques. (**Mammeri, 2007**).

### III.2. Les nitrates dans la nature

Le nitrate présent à l'état naturel partout dans l'environnement, c'est un composé commun dans la nature et largement présent dans le sol, les eaux et les aliments (**Du Shao et al., 2007**).

#### III.2.1. Les nitrates dans le sol

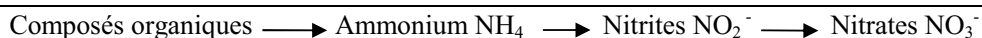
Plusieurs processus peuvent favoriser la présence de nitrates dans le sol :

La fixation de l'azote par des bactéries : C'est bactéries utilisent (fixent) l'azote atmosphérique pour constituer leurs protéines cellulaires. À la mort de l'organisme, l'azote est libéré dans le sol (**Grant, 2000**).

La fixation par des espèces végétales, comme par exemple les légumineuses.

La décomposition des matières organiques : Les nitrates proviennent de la transformation de la matière organique en décomposition par les microorganismes du sol. Ceci s'effectue dans un premier temps selon le processus d'ammonification qui conduit à la production

d'ammonium ( $\text{NH}_4$ ). L'ammonium peut ensuite être transformé en nitrate suivant le processus de nitrification qui comporte deux étapes : la nitrosation ou nitritation (qui conduit à la formation des nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ) sous l'action de bactéries telle *Nitrosomonas*) et la nitratisation (oxydation de  $\text{NO}_2^-$  en  $\text{NO}_3^-$ ) par des bactéries telle *Nitrobacter*.



L'épandage d'engrais commerciaux ou de déjections animales dans les champs, les fuites des champs d'épuration domestiques et des réseaux d'égouts municipaux (Ndala et al., 2006).

Le nitrate constitue la source de l'azote la plus importante pour de nombreux végétaux cultivés, au niveau de la racine, il peut être absorbé selon deux voies, une voie apoplasmique qui correspond à une diffusion de l'ion entre les cellules racinaires et une voie symplasmique qui correspond à la pénétration de l'ion dans les cellules (Bendriss-Amraoui, 2002).

L'augmentation des teneurs des composés azotés traduit une pollution de la ressource liée aux activités humaines et en particulier aux activités de surfaces (tableau III).

**Tableau III.** Teneurs en nitrates et activités ou occupation du sol (Odile Ratel, 1992).

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

### III.2.2. Les nitrates dans les eaux

Les nitrates étant très solubles dans l'eau, une fraction est systématiquement exportée vers les écosystèmes aquatiques localisés en aval et vers les nappes en profondeur (Meybeck, 1982).

La teneur en nitrates des eaux souterraines ou de surface est en augmentation continue ces dernières années avec l'intensification de l'agriculture, de l'industrialisation et de l'urbanisation. Environ 30% à 70% des fertilisants azotés utilisés en agriculture sont perdus dans l'environnement sous forme d'ammoniac ( $\text{NH}_3$ ) et d'oxyde d'azote ( $\text{N}_2\text{O}$ ) (Yapo et al., 2009).

Dans les régions agricoles, on peut trouver de fortes concentrations de nitrates dans l'eau, l'ampleur de la contamination et sa rapidité dépendent à la fois du type de sol et de la profondeur de la source d'eau. (Tableau IV).

**Tableau IV.** Principales origines des  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NH}_4^-$  dans les eaux (Odile Ratel, 1992).

Eaux	Composés azotés	Type de pollution	Source de pollution
Eaux superficielles des rivières, canaux, lacs, étangs.	Ammonium Ammoniaque dissous Azote organique	Ponctuelle	Rejets industriels et domestiques Rejets d'effluents d'élevage.
	Nitrates Nitrites	Ponctuelle et diffuse	Alimentation des eaux superficielle par des nappes polluées.
Eaux souterraines	$\text{NO}_3^-$ presque uniquement	Macro ponctuelle ou macro diffuse.	Fuites des zones industrielles et habitées. Activités agricoles Rejets industriels, domestiques de l'agriculture ou des élevages.

Cette contamination peut être observée lors des épisodes pluvieux en réseaux unitaires, ou lorsque des eaux parasites riches en nitrates s'infiltrent dans le réseau ou encore lorsque des bains de régénération de résines échangeuses d'ions pour l'élimination des nitrates de l'eau potable sont introduits dans le réseau (Deronzier et al., 2001).

De par leur forte solubilité dans l'eau, les nitrates se retrouvent souvent dans l'eau du robinet à des concentrations proches des limites autorisées. En effet, l'utilisation d'engrais azotés qui s'est fortement développée depuis 1950, conduit à une augmentation des teneurs en  $\text{NO}_3^-$  dans les eaux de surfaces et souterraines. Par conséquent, les teneurs élevées en azote des nappes se répercutent sur les eaux brutes utilisées pour la production d'eau potable (Banas et Lata, 2005).

### III.2.3. Les nitrates dans les aliments

Les nitrates sont, depuis longtemps, utilisés à faibles doses dans le domaine alimentaire comme adjuvants dans la préparation des salaisons. Cependant, la croissance de leur taux dans les sols, les rivières et même les nappes phréatiques a conduit les législateurs à en limiter la teneur dans des eaux (Hamon, 2007).

Dans les fromages et les charcuteries, les nitrates sont issus des additifs utilisés comme agents de conservation, comme par exemple le nitrate de sodium (E251) ou le nitrate de potassium (E252) (Banas et Lata, 2005).

Ils peuvent également être présents dans certaines denrées alimentaires sans être utilisés comme additifs, la plupart des denrées alimentaires ne contiennent ces substances qu'à des concentrations négligeables, à l'exception de certains types de légumes dans une certaine mesure, des pommes de terre, ces concentrations sont notamment liées à l'azote et aux composés azotés présents dans l'environnement (Schudboom, 1993).

Cette présence des nitrates dans les denrées alimentaires peut être nuisible et peut causer plusieurs maladies si elle dépasse certains seuils.

### III.3. Effets des nitrates

Les nitrates en eux même ne sont pas toxiques, c'est leur transformation en nitrites qui peuvent provoquer des troubles caractéristiques.

### **III.3.1. Effets sur la santé humaine**

La toxicité des nitrates provient de leur transformation en nitrites dans l'organisme. Les effets des nitrates sur la santé concernent principalement les très jeunes nourrissons ; il s'agit de la méthémoglobinémie (ou cyanose du nourrisson) (Chan, 2011).

Qu'ils soient d'origine endogène ou exogène, les nitrates sont absorbés au niveau du grêle proximal et passent dans la circulation sanguine (figure 3). Ils connaissent ensuite, un cycle métabolique complexe et encore largement méconnu au cours duquel on observe une excrétion urinaire importante mais partielle et une rétention colique susceptible de favoriser la nutrition de la flore bactérienne. On note également le rôle spécifique des glandes salivaires qui puisent les nitrates dans le sang et les secrètent dans la salive où ils sont partiellement réduits en nitrites. Dans le sang, les nitrites qui sont des oxydants puissants transforment l'hémoglobine en méthémoglobine incapable de fixer l'oxygène.

L'individu adulte possède heureusement un système enzymatique de réduction (de la méthémoglobine en hémoglobine) qui empêche le taux de méthémoglobines de s'élever à un niveau dangereux. Par contre le nourrisson (moins de 6 mois), chez lequel cette réductase n'est pas encore suffisamment développée peut être la victime de son accroissement qui sera d'autant plus important que le taux de nitrates consommés sera lui-même élevé. Lorsque la méthémoglobine atteint dans le sang 5 à 10% de l'hémoglobine totale, des signes de cyanose apparaissent, au-delà de 45% la mort du nourrisson peut survenir (Leclerc, 2008).

D'autres effets des nitrates sur l'homme sont supposés mais pour l'instant, aucun n'est scientifiquement prouvé, comme les nitrosamines qui se sont le produit de réaction entre des dérivés des nitrates et certains acides aminés. Le caractère cancérigène de ces nitrosamines a été établi chez l'animal et est suspecté chez l'homme (Mammeri, 2007).

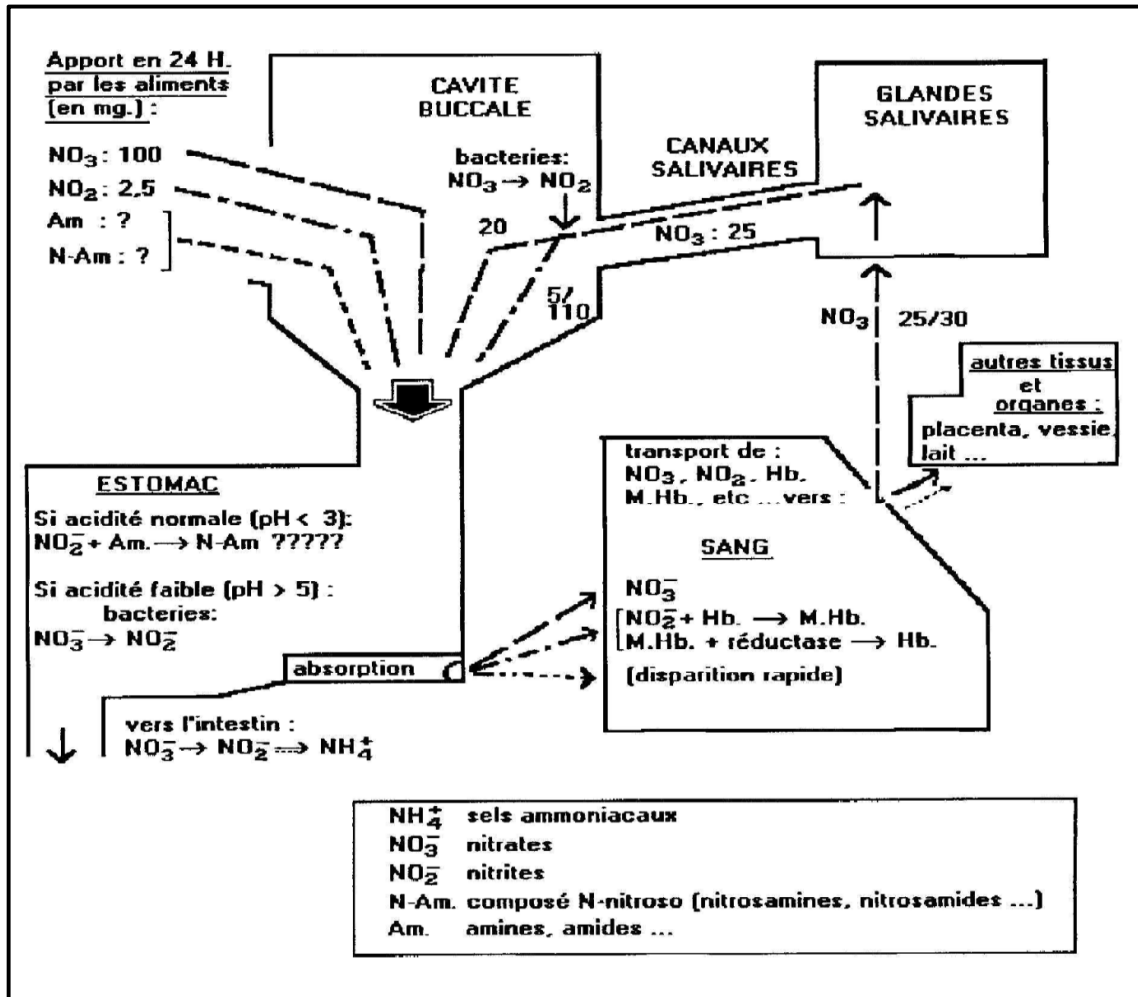


Figure 3. Devenir des nitrates, nitrites et composés nitrosamines dans l'organisme (Guenfoud, 2009).

### III.3.2. Effets sur l'environnement

La dégradation des nitrates nécessite l'absence d'oxygène et les surfaces aérées empêchent cette dégradation ce qui provoque une augmentation de leur concentration dans les eaux de surface. L'effet majeur des nitrates sur les eaux de surface est de les conduire à l'eutrophisation.

L'apport en excès des nitrates dans un milieu aquatique pouvant entraîner la prolifération des végétaux aquatiques (parfois toxiques). Pour les décomposer, les bactéries aérobies augmentent leur consommation en oxygène qui vient à manquer et les bactéries

anaérobies se développent en dégageant des substances toxiques : méthane, ammoniac, hydrogène sulfuré, toxines, etc. Ce phénomène est appelé eutrophisation.

L'apparition du phénomène de l'eutrophisation provoque des modifications inquiétantes de la chaîne alimentaire dont la perte des espèces locales (Idrissi, 2006).

Un type particulier d'eutrophisation ; les marées vertes se provoquent par la prolifération massive d'algues vertes, généralement du genre *Ulva* (figure 4). De nombreuses études ont confirmé le rôle joué par l'azote dans ce phénomène (Merceron et al., 2007).



**Figure 4.** Individus de grande dimension d'*Ulva armoricana*, en suspension dans l'eau (Ménésguen, 2003).

Les apports anthropiques excessifs d'azote, particulièrement sous forme de nitrate d'origine agricole, sont responsables de cette forme d'eutrophisation, les composés azotés enrichissent l'eau en éléments nutritifs et provoquent un développement accéléré des algues et des végétaux d'espèces supérieures, ceci entraîne une perturbation indésirable de l'équilibre des organismes présents dans l'eau et une dégradation de la qualité de l'eau (Paugam et al., 2001).

Lorsque les ulves viennent se plaquer contre les mollusques, elles diminuent le renouvellement de l'eau et l'apport en nourriture. Les poissons plats proches de la plage subissent aussi les conséquences de ces marées vertes.

Afin d'éviter les problèmes écologiques et sanitaires des nitrates, il faut trouver un juste milieu entre une utilisation abusive des sources de nitrates et l'interdiction totale de ceux-ci.

Il est donc important de se référer aux normes qui fixent le seuil à ne pas dépasser (Goudot et Tap, 2003).

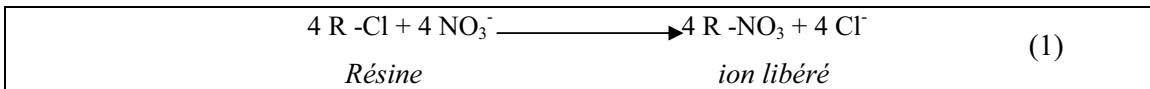
### III.4. Procédés d'élimination des nitrates

Les procédés d'élimination des nitrates peuvent être classés en trois catégories principales :

- Les procédés physico-chimiques (la dénitratisation par résines échangeuses d'ions).
- Les procédés membranaires.
- Les procédés biologiques.

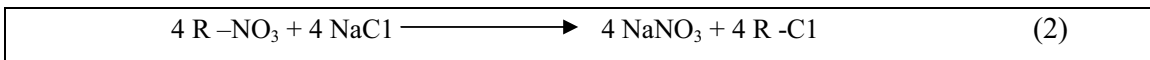
#### III.4.1. Procédés physico-chimiques

Le principe de ce procédé repose sur l'échange des ions nitrates et autres anions présents dans l'eau avec les ions chlorures contenus dans la résine, selon l'équation (1) (Mammeri, 2007).



Cet échange consiste à transférer des ions indésirables de l'eau brute sur un support insoluble, appelé échangeur d'ions, qui les capte et les libère en contrepartie. L'échangeur d'ions possède une capacité limite de stockage sur son support (capacité d'échange) et doit être régulièrement régénéré par une solution fortement concentrée d'ions choisis (Odile Ratel, 1992).

Les résines échangeuses d'ions sont régénérées par passage de saumure de NaCl, cette régénération élimine donc les nitrates préalablement fixés sur les résines et les rejets sont donc constitués de solution de sels avec présence de nitrates (réaction (2), Mammeri, 2007).



Ce procédé d'échange d'ions a épuré l'eau des nitrates qu'elle contenait, mais le problème des éluats de régénération sera à étudier dans chaque cas, de plus ce procédé est très coûteux.

### III.4.2. Procédés membranaires

Les procédés de séparation membranaire ont pris leur essor dans les années 70, en particulier grâce au développement des matériaux et des techniques de fabrication des membranes. Ils regroupent un grand nombre de techniques permettent de réaliser des séparations sous l'action de diverses forces de transfert (**Bouranene, 2008**).

On distingue plusieurs techniques répertoriées sous les noms de nanofiltration, osmose inverse et électrodialyse.

La nanofiltration : Ce procédé membranaire permet d'éliminer plus efficacement une large variété de composés présents dans l'eau (matière organique dissoute et micropolluants) par l'utilisation d'une membrane spécifique semi perméable.

Les membranes de nanofiltration présentent des caractéristiques particulières ; une taille réduite de pore (de l'ordre du nanomètre), ainsi que des charges fixées sur leurs surfaces. Ces propriétés spécifiques compliquent les mécanismes de transfert (**Paugam et al., 2001**).

La nanofiltration montre une efficacité dans l'élimination d'une grande variété de composants indésirables de l'eau (**Amouha et al., 2011**).

L'osmose inverse : C'est le transfert de solvant à travers une membrane sous l'effet d'un gradient de concentration. Si on considère un système à deux compartiments séparés par une membrane semi-sélective et contenant deux solutions de concentrations différentes, l'osmose se traduit par un flux d'eau dirigée de la solution diluée vers la solution concentrée, le perméat (l'eau pure) va sortir et les ions vont être captés.

L'électrodialyse : C'est une filtration sous l'effet d'un potentiel électrique, qui permet la migration et la séparation des espèces ioniques à travers des membranes de polarités différentes (**Mammeri, 2007**).

L'utilisation de ces procédés physico-chimiques et membranaires permet d'extraire les nitrates de l'eau, mais ne permet pas de les éliminer. D'autre part, ces procédés peuvent causer plusieurs risques comme la modification de la qualité des eaux et ils sont très coûteux, pour cela, des procédés biologiques peuvent avoir lieu.

### III.4.3. Procédés biologiques

Ce type des procédés repose essentiellement sur l'utilisation des organismes vivants, eucaryotes (plantes et algues) ou procaryotes (bactéries) pour l'élimination des nitrates, par plusieurs mécanismes.

#### III.4.3.1. Réduction assimilatrice

Les nitrates peuvent être utilisés comme source d'azote, par les bactéries comme par les plantes, ce mécanisme consiste à la réduction des nitrates ou les nitrites en azote ammoniacale ( $\text{NH}_3$ ), qui sera assimilé, pour la production des acides aminées (métabolisme acido-basique) (Rick et Stuart, 2001).

En effet, la réduction et l'assimilation de  $\text{NO}_3^-$  produisent non seulement des acides aminés, mais aussi des acides organiques (Muller, 1992).

#### III.4.3.2. Réduction dissimilatrice

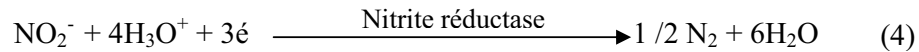
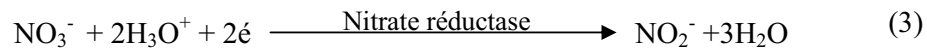
La réduction dissimilatrice (la dénitrification) est la réduction des nitrates par l'intermédiaire de nitrites pour former l'azote gazeux (Betlach et Tiedje, 1981). Elle est couplée à l'oxydation soit de composés minéraux comme le soufre ou l'hydrogène soit de composés carbonés organiques (Patureau, 1995). Le nitrate se comporte en fait en accepteur final des électrons de respiration anaérobique. Et en théorie, les produits de réduction obtenus (nitrites, oxyde nitreux  $\text{N}_2\text{O}$ ) ne sont pas assimilés. Mais dans certains cas, il arrive que la respiration nitrate avec son produit de réduction nitrite puisse être un bon départ pour une réduction assimilatrice en ammonium (par exemple chez *E. coli* cultivée en anaérobiose sur milieu avec nitrates comme source unique d'azote, le nitrite produit par l'activité nitrate réductase respiratoire sera utilisé par la nitrite réductase cytoplasmique assimilatrice).

Ce procédé se base sur l'utilisation des bactéries dénitrifiantes qui ont la capacité d'utiliser les nitrates comme accepteurs finals des électrons lors de la respiration anaérobique (Nozawa et Maruyam, 1988).

### IV. Les bactéries dénitrifiantes

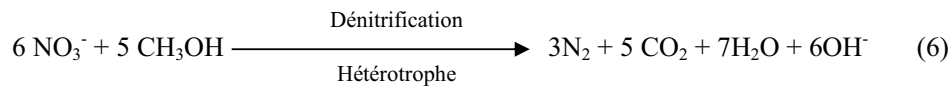
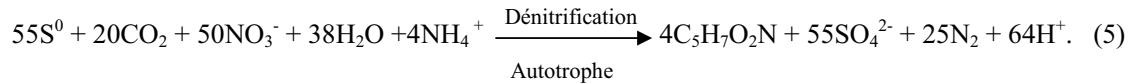
En présence d'une source de carbone et l'absence d'oxygène, les bactéries peuvent utiliser le nitrate comme accepteur final des électrons pour une respiration anaérobique, dite respiration nitrate. Cette réduction du nitrate se fait par des enzymes spécifiques, la nitrate réductase qui réduit le nitrate en nitrite (la majorité des *Enterobacteriaceae*) et la nitrite

réductase qui réduit les nitrites en azote gazeux, selon les réactions (3) et (4), (Guiraud, 1998).



Certaines bactéries possèdent les deux enzymes à la fois, donc peuvent faire une réduction complète du nitrate comme *Alcaligenes faecalis*. La plupart des bactéries dénitrifiantes dans les systèmes aquatiques sont capables de faire une dénitrification complète (Young-Woon et al., 2005).

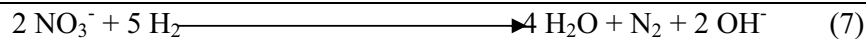
Selon la nature de source du carbone utilisée, on distingue deux types des bactéries dénitrifiantes, les bactéries hétérotrophes utilisent comme source de carbone et d'énergie un substrat carboné organique (réaction (5), Hignette, 1996) et les bactéries autotrophes utilisent une source de carbone minérale et tirent leur énergie de l'oxydation d'un substrat inorganique, hydrogène ou soufre (réaction (6), Bousseboua, 2002).



#### IV.1. Les bactéries dénitrifiantes autotrophes

Ces bactéries font une dénitrification avec oxydation d'un substrat inorganique, hydrogène ou soufre ou fer métallique.

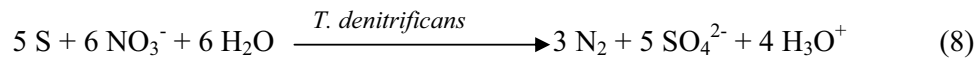
Dénitrification à l'hydrogène: L'oxydation de l'hydrogène fournit aux bactéries l'énergie suffisante à la réduction des nitrates en azote gazeux comme chez *Pseudomonas*. Le pH de l'eau augmente au cours de la réaction à cause de la libération des ions  $\text{OH}^-$  (réaction (7), Derbal, 2008).



Cette dénitrification a des avantages comme, l'élimination complète des nitrates avec rejet d'azote gazeux, d'autre part le substrat utilisé étant l'hydrogène gazeux, il n'y aura pas un substrat en excès à éliminer par des post-traitements.

Et ces inconvénients sont liés à l'utilisation de l'hydrogène (stockage et risque d'explosion) et à la nécessité d'un temps de contact élevé.

Dénitrification au soufre : L'espèce bactérienne impliquée est généralement *Thiobacillus denitrificans*, qui réduit les nitrates en présence du soufre par la réaction (8) (Mammeri, 2007). *T. denitrificans* est une bactérie Gram négatif, sporulée de forme bacille, oxyde diverses formes de soufre  $S^{2-}$ ,  $S^0$ ,  $S_2O_3^{2-}$ ,  $S_4O_6^{2-}$ ,  $SO_3^{2-}$  en sulfate (Sukalyan, 2006).

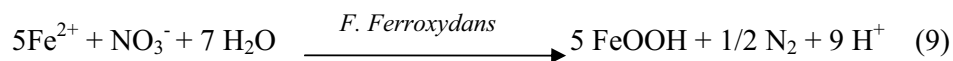


Le principe du dénitrificateur sur soufre consiste à faire passer l'eau à traiter dans une colonne contenant du soufre puis dans un réacteur à calcaire. Le soufre est le siège de la dénitrification et le réacteur à calcaire réajuste le pH (Fusari, 2007).

Dénitrification par fer métallique : Ce procédé est un procédé autotrophe à base de fer métallique qui met en jeu la corrosion du fer et fait intervenir au départ un processus purement physico-chimique. Il est relayé ensuite par un système biologique complexe qui fait intervenir les quatre cycles principaux : de l'azote, du fer, du soufre et du carbone. Aucun ajout de substrat carboné n'est nécessaire ; le carbone minéral de l'eau suffit. Le système est régulé par voie biologique et le paramètre le plus important est le temps de contact eau/fer.

La qualité de l'eau est légèrement modifiée puisqu'on observe un léger adoucissement de l'eau. Cet adoucissement est en fonction du rendement de dénitrification observée et les précipités obtenus peuvent entraîner un colmatage important du réacteur de dénitrification (Coutière, 1999).

L'espèce bactérienne impliquée dans cette dénitrification est *Ferrobacillus ferroxydans*, qui utilise le fer ferreux ( $Fe^{2+}$ ) comme donneur d'électron par la réaction (9) (Coutière, 1999)..

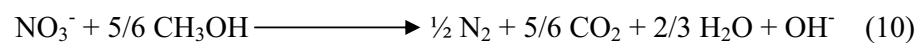


## IV.2. Les bactéries dénitrifiantes hétérotrophes

La dénitrification hétérotrophe est la réaction la plus utilisée dans les procédés biologiques mis en œuvre à l'échelle industrielle. Il existe une vingtaine d'espèces de bactéries strictement dénitrifiantes. Généralement non sporulées, à Gram négatif et anaérobies facultatives, elles appartiennent notamment aux genres *Bacillus*, *Paracoccus* et *Pseudomonas*, (*Paracoccus denitrificans*, *Pseudomonas stutzeri* et *Bacillus licheniformis*).

Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont capables de dénitrifier en présence de plusieurs composés aromatiques comme seule source de carbone (Garcia et al., 1981).

Cette voie métabolique est coûteuse en énergie pour la cellule. Dans le but d'exploiter cette possibilité, il faut fournir aux colonies bactériennes un substrat carboné donneur d'électrons, donc des molécules hydrogène-carbonées (sucres, alcools) (Hignette, 1996). Si l'on considère le méthanol, le bilan réactionnel s'écrit dans la réaction (10) (Bousseboua, 2002).



Ces bactéries peuvent oxyder un grand nombre de substrats carbonés. Le substrat carboné fournit à la fois l'énergie et le carbone nécessaire au métabolisme et aux synthèses cellulaires. En dénitrification des eaux potables, le substrat doit bien sûr ne présenter aucune toxicité.

## IV.3. Conditions de la dénitrification

Plusieurs paramètres jouent sur la vitesse de la dénitrification comme la température, le pH, l'oxygène dessous.

### IV.3.1. Température

En règle générale, la réaction semble être réalisée par des micro-organismes mésophiles. Mais ils n'existent pas de conditions optimales de température pour réaliser la dénitrification.

Bien que la dénitrification semble possible entre 5°C et 75°C (Martin, 1979<sub>a</sub>), du fait de la grande diversité des germes dénitrifiants, la température constitue néanmoins une variable majeur affectant la vitesse de la réaction biologique.

Par ailleurs, l'élévation de la température est favorable à la réaction puisqu'elle entraîne une diminution de la concentration saturante donc du transfert en oxygène dissous, paramètre limitant la vitesse de dénitrification.

#### **IV.3.2. pH**

Les micro-organismes réalisant la dénitrification sont beaucoup moins sensibles aux fluctuations de pH, le pH optimum semble se situer entre 7 et 8,7. La réaction de dénitrification entraîne une élévation du pH qui doit être contrôlé puisqu'il peut y avoir inhibition de la réaction au-delà de pH 9 (Pambrun, 2005).

#### **IV.3.3. Concentration de l'oxygène dissous**

Les micro-organismes dénitrifiants sont des bactéries aérobies facultatives qui tirent leur énergie de celle libérée lors du transfert des électrons des composés organiques vers l'oxygène, le nitrite ou le nitrate. Le choix de l'accepteur final se fait bien entendu en faveur de celui qui donnera la plus grande quantité d'énergie par unité de matière organique oxydée. Il a été montré que l'utilisation de l'oxygène comme accepteur d'électrons, plutôt que le nitrite ou le nitrate, permet de produire davantage d'énergie (Wisjnuprpto, 1981).

De ce fait, la réaction de dénitrification est inhibée en présence d'oxygène, les rendements de dénitrification étant affectés.

Cependant, les recherches concernant la nitrification/dénitrification simultanée en réacteur aérobie ont montré que les environnements locaux des organismes dans les floccs peuvent être très hétérogènes. Les limitations diffusionnelles peuvent donc provoquer la dénitrification dans des zones anoxies au sein des agrégats, même si une concentration significative d'oxygène est mesurée dans le milieu liquide (Pambrun, 2005).

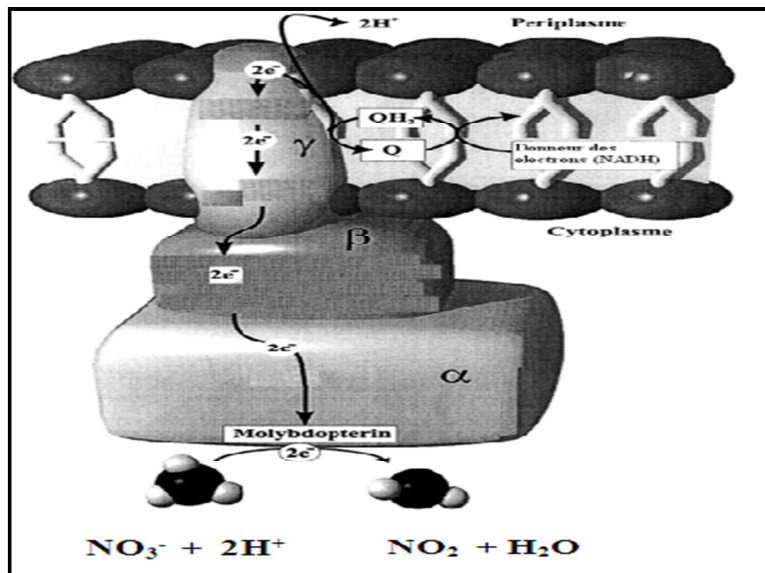
#### **IV.3.4. Nature de la source du carbone**

La disponibilité en carbone organique est essentielle à l'activité des bactéries dénitrifiantes hétérotrophes, car le substrat carboné fournit l'énergie nécessaire à leur métabolisme et constitue l'élément de base de leurs synthèses cellulaires. Les faibles performances de dénitrification biologique, résultant en général d'une limitation des eaux usées en carbone bioassimilable, imposent l'apport d'une source de carbone exogène afin d'améliorer les performances de traitement (Bougard, 2004).

Le méthanol et l'acétate sont les principaux substrats carbonés synthétiques ayant été utilisés dans le domaine de la dénitrification des eaux résiduaires (Foglar et Briski, 2003).

## V. La nitrate réductase

La nitrate réductase ou le complexe NarGHI, est une enzyme qui réduit les nitrates  $\text{NO}_3^-$  en nitrites  $\text{NO}_2^-$  avec une création d'un gradient des protons transmembranaires. Elle se compose de trois sous unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  ainsi que plusieurs cofacteurs. Le NarGHI est déposé dans deux domaines, dont les sous unités  $\alpha$  et  $\beta$  constituent le domaine cytoplasmique et la sous unité  $\gamma$  constitue le domaine membranaire nécessaire pour lier les sous unités  $\alpha$  et  $\beta$  au côté cytoplasmique de la membrane interne (figure 5) (Philippot et Hojberg, 1999).



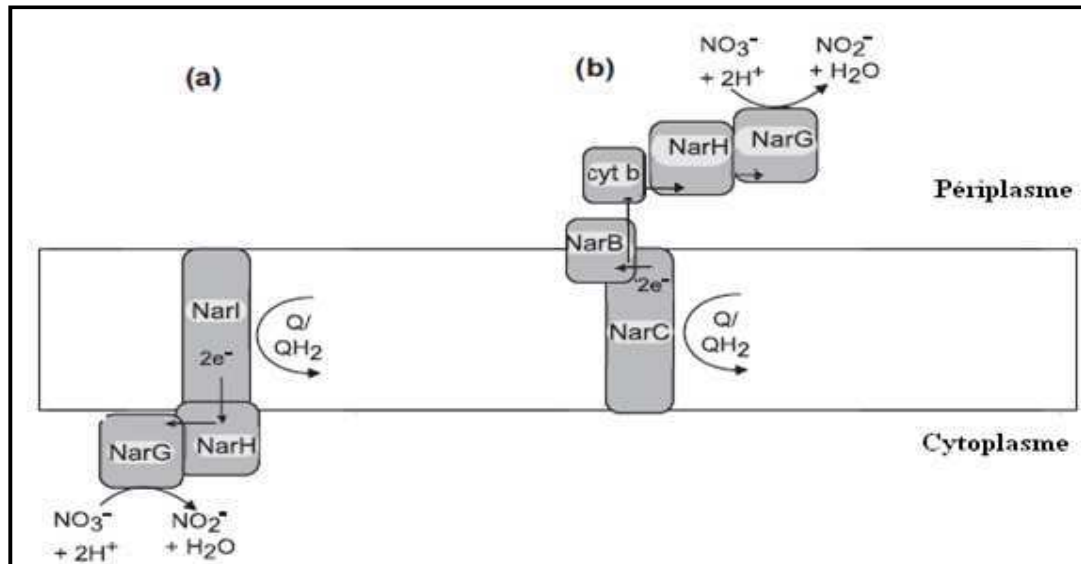
**Figure 5.** Organisation des trois sous unités ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ) dans NarGHI d'*E. coli* (Philippot et Hojberg, 1999).

L'absence de l'oxygène dans le milieu est détectée par des récepteurs spécifiques, d'autre part, autres récepteurs détectent la présence des nitrates dans le périplasma, les nitrates sont ensuite transportés au côté cytoplasmique, par une force motrice protonique à travers des transports membranaires symports (nitrates/ protons) (Kraft et al., 2011). La réduction des nitrates s'effectue donc, dans le cytoplasme.

Dans plusieurs autres bactéries, la réduction du nitrate ne dépend pas de la présence du complexe NarGHI, mais elle est effectuée par une nitrate réductase périplasmique.

Par exemple, *Bradyrhizobium japonicum* ne possède pas le gène qui code pour ce complexe (NarGHI), mais elle est capable de réduire les nitrates à cause de la présence d'une nitrate réductase périplasmique (figure 6). Autre exemple, les bactéries du genre

*Pseudomonas* possèdent aussi une enzyme nitrate réductase périplasmique (Kraft et al., 2011).



**Figure 6.** Composition d'une nitrate réductase cytoplasmique et une nitrate réductase périplasmique (Kraft et al., 2011). (*NarI, NarH, NarG*) sous unités du complexe NarGHI, (*NarC, NarB, NarH, NarG*) sous unités de la nitrate réductase périplasmique, *cyt b* : cytochrome b. (a) : réduction cytoplasmique, (b) réduction périplasmique.

Dans ce cas, les bactéries n'ont pas besoin de transporter les nitrates à l'intérieur (cytoplasme) pour les réduire, ils sont réduits dans le périplasm, ceci peut minimiser le temps de la réaction.

CHAPITRE II.

MATERIELS

ET

METHODES

Ce chapitre est divisé en deux parties, la première représente le matériel qui englobe les appareillages du laboratoire et les milieux de cultures utilisés pour effectuer les différentes expériences. La deuxième partie, résume les principales méthodes d'analyse suivies au cours de notre travail expérimental

## I. Matériel

### I.1. L'échantillonnage

A cause de l'absence du bassin d'anaérobiose dans la station d'épuration de KHENCHELA, nos échantillons des boues activées sont prélevés à partir du lit de séchage (juste après pompage des boues activées) (figure 7), dans des flacons en verre. Les flacons sont bien remplis pour assurer l'anaérobiose au cours du transport.



**Figure 7.** Photographie d'un lit de séchage, station d'épuration de KHENCHELA.

### I.2. Conservation des échantillons

Afin d'éviter les transformations physiques, chimiques et/ou microbiologiques entre le prélèvement et l'analyse, les échantillons sont conservés à 4°C dans une glacière et transportés au laboratoire en 24 h ([Hammadi et al., 2008](#)), nos prélèvements sont transportés de la station d'épuration de KHENCHELA vers le laboratoire de bactériologie, département de vétérinaire, université de Batna.

### I.3. Milieu de culture

Un milieu synthétique a été utilisé pour favoriser la croissance des bactéries dénitrifiantes hétérotrophes, en culture batch. Ce milieu est composé des éléments nécessaires pour la croissance bactérienne (tableau V), son pH est ajusté à  $7 \pm 0.04$  (avec la solution d'hydroxyde de sodium et/ou l'acide chlorhydrique) (Canstantin et Fick, 1996), puis il est autoclavé à  $121^\circ\text{C}$  pendant 15 mn.

**Tableau V.** Composition du milieu de culture pour un litre d'eau distillée (Mammeri, 2007).

Composés	Concentrations
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	$1 \text{ g.l}^{-1}$
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	$1 \text{ g.l}^{-1}$
$\text{KNO}_3$	$1 \text{ g.l}^{-1}$
$\text{NaCl}$	$1 \text{ g.l}^{-1}$
$\text{MgSO}_4$	$0.2 \text{ g.l}^{-1}$
$\text{CaCl}_2$	$0.02 \text{ g.l}^{-1}$
Eléments traces	1 ml

**Tableau VI.** Composition de la solution de traces pour un litre d'eau distillée (Mammeri, 2007).

Composés	Concentrations
HCl 37%	6.76 ml
$\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	$1.5 \text{ g.l}^{-1}$
$\text{H}_3\text{BO}_3$	$0.06 \text{ g.l}^{-1}$
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	$0.1 \text{ g.l}^{-1}$
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$0.12 \text{ g.l}^{-1}$
$\text{ZnCl}_2$	$0.07 \text{ g.l}^{-1}$
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$0.025 \text{ g.l}^{-1}$
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$0.015 \text{ g.l}^{-1}$
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$0.025 \text{ g.l}^{-1}$
EDTA	$5.2 \text{ g.l}^{-1}$

Trois types de source de carbone sont ajoutés séparément au milieu de culture, un sucre simple ; le glucose, un sucre composé ; le lactose et un alcool ; le méthanol.

Chaque source de carbone a été ajoutée avec trois concentrations différentes (500ppm, 1000ppm et 2000ppm).

#### I.4. pH mètre

Les mesures du pH ont été réalisées à l'aide d'un pH-mètre de la marque « PHYWE » muni d'une électrode de verre. Le pH-mètre est préalablement étalonné avec des solutions tampons (pH = 4,7 et 8).

#### I.5. Spectrophotomètre

La mesure de la biomasse et le dosage des nitrates sont effectués dans le laboratoire de l'Environnement, Santé et Productions Animales, département de vétérinaire, université de Batna, par un spectrophotomètre UV/ VIS de la marque « SHIMADZU ».

La spectrophotométrie UV/Visible repose sur l'interaction du rayonnement électromagnétique et de la matière dans le domaine s'étendant du proche UV au très proche IR soit entre 180 et 1100 nm. L'absorbance des composés dans le proche UV et le visible est exploitée en analyse quantitative par application de la loi de Beer-Lambert (Hamon et al., 1990), (annexe 1).

La méthode s'applique non seulement aux composés qui présentent une absorption dans le visible mais également aux composés dont un dérivé obtenu par une réaction chimique présente une telle absorption. Les spectres dans l'UV / visible donnent l'absorbance de l'échantillon analysé en fonction de la longueur d'onde du rayonnement, plus un composé est absorbant, plus l'absorbance est élevée (Galez, 2011).

## II. Méthodes d'analyse

### II.1. Isolement et purification des bactéries

Pour l'isolement des bactéries à partir de la boue activée, une série de dilution standard est effectuée, un échantillon de chaque tube de dilution est ensemencé à la suite sur une gélose nutritive et incubé à 30°C pendant 24h.

Les colonies isolées ont été repiquées sur des nouvelles boîtes de gélose nutritive. Cette procédure a été répétée plusieurs fois pour obtenir des cultures pures (Sharifi-Yazdi et al., 2001). Ces cultures sont identifiées à la suite par des tests physiologiques et biochimiques.

## II.2. Etudes physiologiques et biochimiques

### II.2.1. Tests préliminaires

#### II.2.1.1. L'examen à l'état frais

L'état frais est une étape qui permet de mettre en évidence la forme des bactéries ainsi que le type de leur mobilité et leur regroupement (Boussaboua, 2002). L'observation est réalisée avec une petite goutte d'eau distillée stérile déposée au centre d'une lame stérile.

Une partie d'une colonie bactérienne pure est prélevée à l'anse et dissociée dans la goutte. Une lamelle stérile est ensuite appliquée sur la goutte en évitant la formation de bulles d'air, puis une observation microscopique est effectuée.

#### II.2.1.2. Coloration de Gram

C'est une coloration différentielle permettant la division des bactéries en deux grands groupes, Gram positif et Gram négatif.

Un frottis est réalisé avec une goutte de suspension bactérienne déposée sur une lame stérile et ensuite étalée sur la lame de façon à obtenir un étalement mince, homogène, fixé à la suite par dessiccation en chauffant fortement deux à trois fois une demie seconde le frottis tenu à la pince. La coloration est enfin, opérée selon le protocole technique de Prescott et al., 2003, (annexe 2).

#### II.2.1.3. Test de la mobilité

Ce test est mis en évidence dans le milieu mannitol-mobilité, par une piqure centrale, les bactéries mobiles troublent le milieu et les bactéries immobiles persistent près de la piqure centrale. D'autre part, le virage de la coloration rouge vers une coloration jaune indique la décomposition du mannitol.

#### II.2.1.4. Mode respiratoire

Le type respiratoire est identifié sur une gélose profonde de type VF répartie en tubes en culot. Après régénération du milieu par chauffage, il est laissé refroidir puis,ensemencé à l'aide d'une pipette Pasteur que l'on plonge au fond du tube et que l'on remonte en décrivant une spirale de façon à ensemencer uniformément le milieu sur toute la hauteur (Guiraud, 1998).

Croissance en surface : bactéries aérobies strictes.

Croissance en profondeur : bactéries anaérobies strictes.

Croissance le long du tube : bactéries aéro-anaérobies facultatives.

Croissance dans la partie supérieure proche de la surface : bactéries microaérophiles.

## II.2.2. Tests biochimiques

### II.2.2.1. Recherche de la catalase

Le peroxyde d'hydrogène est toxique, mais certaines bactéries ont la capacité de le dégrader grâce à l'enzyme catalase (réaction (11), [Guiraud, 1998](#)). Pour cela, ce critère est utilisé dans la systématique pour l'identification des bactéries.



Pour tester la présence de cette enzyme chez les bactéries, il faut mettre une colonie à une petite tache sur une lame puis ajouter une goutte de  $\text{H}_2\text{O}_2$  sur place. Un dégagement de gaz indique l'activité de catalase ([Rene et al., 2003](#)).

### II.2.2.2. Recherche de l'oxydase

Les cytochromes sont des protéines qui appartiennent à la chaîne respiratoire, composée d'une succession de transporteurs d'électrons.

La recherche de l'oxydase est un des critères les plus discriminatifs et les plus employés pour l'identification des bactéries, surtout celle des bacilles à Gram négatif.

Cette recherche consiste à mettre en évidence la capacité de la bactérie testée à oxyder la forme réduite incolore de dérivés méthylés du paraphénylène diamine, en leur forme oxydée semi-quinonique rose violacé.

Cette enzyme est recherchée par la méthode des disques. A partir d'un milieu solide, une colonie est déposée sur un disque oxydase placé sur une lame, à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée. Une réaction positive est révélée par l'apparition d'une tache violette.

### II.2.2.3. Recherche de la $\beta$ galactosidase

Ce test permet d'explorer la présence d'une enzyme du métabolisme du lactose, la  $\beta$  galactosidase.

Lorsqu'une bactérie possédant cette enzyme est lysée, elle libère cette dernière qui peut alors hydrolyser un réactif analogue du lactose, l'Ortho Nitro Phényl Galactopyranoside (ONPG). Ce produit donne du galactose et de l'orthonitrophénol qui présente une coloration jaune. Une ose de culture bactérienne est mise en suspension dans quelques gouttes d'eau physiologique, une goutte de toluène est ajoutée (pour la lyse des cellules) ainsi un disque d'ONPG, après incubation une coloration jaune traduit l'hydrolyse et l'absence de coloration indique un résultat négatif (Guiraud, 1998).

#### II.2.2.4. Recherche de la nitrate réductase

Cette recherche se fait par la mise en évidence des nitrites formés, ces derniers en milieu acétique ou sulfurique donnent une coloration rose (Akmouci-Toumi, 2009).

L'enzyme nitrate réductase catalyse la réaction des nitrates en nitrites. Les nitrates peuvent aller également jusqu'au stade azote gazeux  $N_2$ . Dans ce cas, on doit compléter par l'épreuve de Zoo Bell, épreuve qui consiste à ajouter de la poudre de zinc au milieu :

Si le zinc réduit les nitrates encore présents en nitrites, la coloration rose apparaît et la réaction est négative (bactéries sans nitrate réductase).

Si au contraire, le milieu reste inchangé, le stade nitrite a été dépassé donc les bactéries possèdent une nitrate réductase (Marchal et Bourdon, 1982).

Après incubation des souches bactérienne dans le bouillon nitraté pendant 24h à 30°C, quelques gouttes de deux réactifs ont été ajoutés ; le  $NR_1$  (acide sulfanilique) et le  $NR_2$  ( $\alpha$ -naphtylamine), une couleur rouge indique la présence de la nitrate réductase, et si le milieu reste incolore, il faut ajouter un peu de la poudre de zinc.

Dans ce cas la couleur rouge ou rose indique la réduction des nitrates par le zinc, donc l'absence de la nitrate réductase, par contre si le milieu reste toujours incolore, la bactérie possède une nitrate réductase et elle a réduit les nitrates au stade  $N_2$ .

#### II.2.2.5. Fermentation des sucres (test TSI)

Le milieu utilisé pour ce test est la gélose TSI (Triple Sugar Iron), permet une mise en évidence rapide de la fermentation du lactose, du glucose (avec ou sans production de gaz), du saccharose et de la production de sulfure d'hydrogène.

Une colonie est ensemencée en réalisant une piqure centrale dans le culot et des stries serrés sur la pente. Le tube est incubé à 30°C pendant 24h. Le milieu est rouge, le virage de la couleur de rouge vers le jaune indique le résultat positif.

Lactose-saccharose positifs : pente virant au jaune.

Glucose positif : culot jaune.

H<sub>2</sub>S positif : noircissement du milieu dans le culot.

Production du gaz : formation des bulles d'air dans le culot.

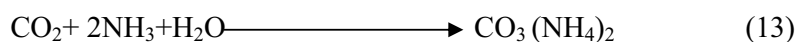
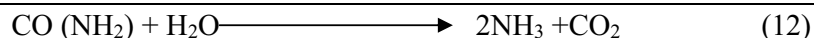
#### II.2.2.6. Utilisation du citrate comme seule source de carbone

Le milieu utilisé est le citrate de Simmons, qui ne contient que le citrate comme source de carbone. Seules les bactéries possédant une enzyme citrate perméase seront donc capables de se développer sur ce milieu (Marchal et Bourdon, 1982).

L'ensemencement se fait sur la pente (milieu incliné), après incubation 24h à 30°C, un virage de la couleur verte vers le bleu indique la dégradation du citrate.

#### II.2.2.7. Dégradation de l'urée

Les bactéries possédant une uréase transforment l'urée en ammoniac et en carbonate d'ammonium (réactions (12,13), Guiraud, 1998).



Cette réaction se traduit par une alcalinisation du milieu, décelable par un indicateur coloré. La recherche de l'uréase peut s'effectuer par culture sur milieu liquide de Ferguson (urée-indole) qui prend une teinte rouge après incubation, due à l'augmentation du pH si l'urée est dégradé (Guiraud, 1998).

#### II.2.2.8. Production de l'indole

Grace à une tryptophanase, les bactéries peuvent dégrader le tryptophane en indole, acide pyruvique et NH<sub>3</sub>. Après incubation de milieu urée indole inoculé par la souche à étudier, l'ajout du réactif Kovacs permet de tester la production de l'indole.

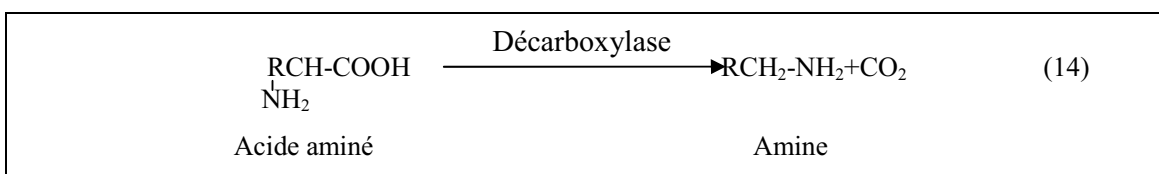
Formation d'un anneau rouge : indole positif.

Absence d'anneau rouge : indole négatif.

### II.2.2.9. Utilisation des acides aminés

Beaucoup d'espèces bactériennes possèdent des enzymes capables de dégrader les acides aminés de manière plus ou moins spécifique. Il s'agit de décarboxylase donnant des amines, de désaminases donnant des acides et de l'ammoniac ou de système particulier tel la tryptophase qui produit de l'indole à partir de tryptophane (Guiraud, 1998).

Les décarboxylases ou carboxylases, scindent les acides aminés entraînant la formation de l'amine correspondant avec la libération de CO<sub>2</sub> suivant la réaction (14), (Akmouci-Toumi, 2009).



Pour mettre en évidence la présence des enzymes ODC (ornithine-décarboxylase), ADH (arginine dihydrolase), LDC (lysine décarboxylase) chez les bactéries, un test est réalisé avec le milieu de Moeller réparti dans 4 tubes à hémolyse, le premier contient un témoin dépourvu d'acides aminés et les 3 autres contiennent successivement, l'arginine, la lysine et l'ornithine.

Après ensemencement, 1ml de vaseline stérile est ajouté dans chaque tube et le tout sera incubé à 30°C pendant 24h. La réaction est positive lorsque le témoin vire au jaune (acidification du milieu due à l'utilisation du glucose). Les tubes contenant l'acide aminé restent violet (phénomène due à l'alcalinisation). Et elle est négative lorsque les tubes contenant l'acide aminé et le témoin virent au jaune (acidification).

### II.2.2.10. Etude des différentes voies fermentatives intermédiaires

Cette étude permet de mettre en évidence la capacité des bactéries d'effectuer une fermentation des acides mixtes (réaction rouge de méthyle, RM). Cette réaction a été testée sur le milieu de Clark et Lubs.

Après ensemencement d'une colonie bactérienne dans le milieu Clark et Lubs et incubation 24h à 30°C, la réaction du RM est testée ; elle consiste à mettre en évidence l'acidification finale d'un milieu glucosé par la fermentation du glucose, cette acidification provoque le virage du rouge de méthyle.

Ce test est effectué par l'ajout de quelques gouttes du rouge de méthyle au milieu de Clark et Lubs. La coloration rouge indique le RM positif et la coloration jaunâtre indique le RM négatif.

### **II.2.3. Identification bactérienne**

Après purification, les espèces bactériennes sont identifiées par l'utilisation d'Appareillage et Procédés d'Identification (galeries API).

### **II.3. L'enrichissement**

Pour adapter les cultures bactériennes pures aux conditions de culture, elles sont enrichies dans 100 ml du milieu de culture pendant 24h, avant de les inoculer dans les cultures en batch.

### **II.4. Cultures en batch et dosages**

#### **II.4.1. Inoculation des cultures en batch**

Les cultures en batch sont réalisées dans des flacons en verre de 500ml, contenant 300ml du milieu nutritif et chargées séparément, avec trois sources de carbone ; glucose, lactose et méthanol, avec trois concentrations différentes (500ppm, 1000ppm et 2000ppm).

Chaque flacon est à la suite inoculé par 2,5% d'inoculum (Rhee et al., 1997) ; en premier lieu, avec les boues prélevées de la station d'épuration de KHENCHELA pour la culture mixte et en deuxième lieu, par les cultures bactériennes pures déjà enrichies. Les flacons (hermétiquement fermés) sont à la suite, incubés dans une jarre d'anaérobiose à bougie dans un bain mari agité (figure 8), à 30°C. Des prélèvements d'échantillons liquides sont effectués à partir des réacteurs, à l'aide des seringues sans les ouvrir, afin de réaliser le suivi de la croissance bactérienne, les concentrations en nitrates et le pH.



**Figure 8.** Photographie d'un incubateur anaérobique avec agitation.

#### II.4.2. Mesure de la biomasse

Le développement bactérien est montré par l'augmentation de la turbidité du milieu, cette turbidité est proportionnelle à la densité optique de la solution.

Un prélèvement de 1,5 ml est effectué à partir de chaque flacon chaque 2h avec une seringue, afin de doser la biomasse avec un spectrophotomètre UV/visible à 600 nm et pour mesurer le pH.

#### II.4.3. Mesure du pH

La variation du pH est suivie au cours de l'expérience (par pH mètre), avec chaque dosage de la biomasse.

#### II.4.4. Dosage des nitrates

Pour ce dosage, des prélèvements de 10,5 ml sont effectués à partir de chaque flacon, avec des seringues et centrifugés à 7000 rpm pendant 10 mn à température ambiante par une centrifugeuse de la marque « MLW T 52.1 », afin d'obtenir un surnageant exempt des cellules microbiennes.

Les nitrates sont à la suite dosés par colorimétrie, avec la méthode de salicylate de sodium (Rodier, 2009). Le protocole expérimental est présenté dans l'annexe 3.

CHAPITRE III.

RESULTATS

ET

DISCUSSION

## Introduction

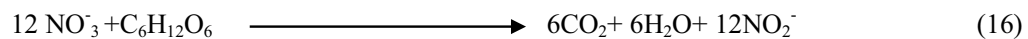
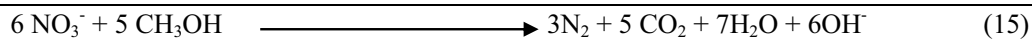
Les expériences de ce chapitre sont réalisées avec trois sources de carbone différentes (le glucose, le lactose et le méthanol), comme mentionné dans le précédent chapitre. Chaque source de carbone est utilisée séparément avec trois concentrations (500ppm, 1000ppm et 2000ppm). En premier lieu, le suivi de la dénitrification est effectué par une culture mixte chargée de bactéries de la boue activée prélevée de la station d'épuration de KHENCHELA.

Ensuite, des cultures pures sont isolées de la même boue activée pour le suivi de la dénitrification. Les résultats obtenus sont présentés en trois points principaux :

- Suivi de la dénitrification par l'utilisation d'une culture mixte.
- Isolement et identification des souches bactériennes.
- Suivi de la dénitrification par des souches pures déjà isolées.

### I. Suivi de la dénitrification par l'utilisation d'une culture mixte

Dans cette expérience le glucose, le lactose et le méthanol sont utilisés comme sources de carbone à différentes concentrations. Au cours de l'incubation, on observe une augmentation de l'opacité du milieu. Ce qui s'explique par la multiplication des microorganismes. Une apparition des bulles de gaz a été observée, causée par le dégagement du CO<sub>2</sub> et N<sub>2</sub> (réactions (15 et 16), [Bousseboua, 2002](#)).



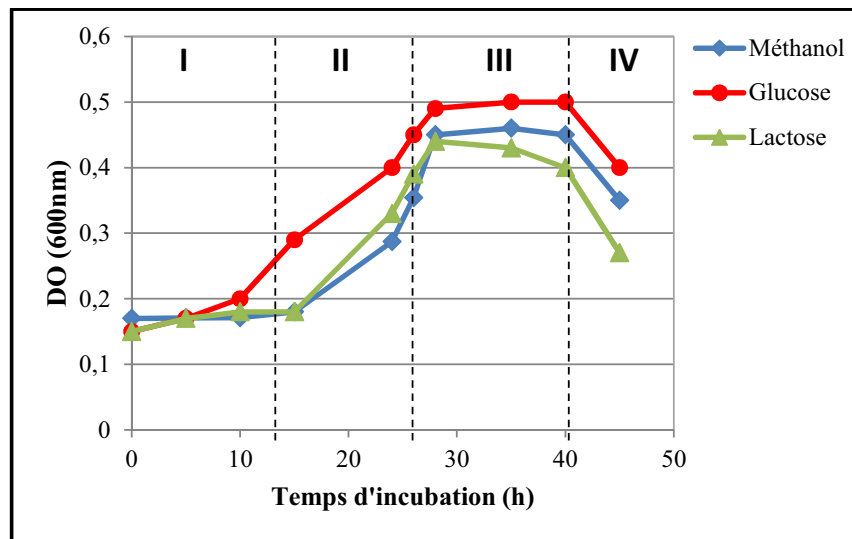
Afin de prolonger la durée de vie des bactéries et éviter l'épuisement du milieu, la quantité de source de carbone utilisé a été optimisée. Le suivi de la dénitrification a été effectué à trois concentrations différentes de sources de carbone : 500, 1000 et 2000 ppm.

#### I.1. Suivi de la dénitrification par l'utilisation de 500 ppm de sources de carbone

Les premiers réacteurs contiennent une concentration de sources de carbone (glucose, lactose et méthanol) de 500 ppm. Un dosage de biomasse à 600 nm, une mesure du pH et un dosage des nitrates sont effectués pendant le temps de l'incubation.

### I.1.1. Suivi de la croissance bactérienne

Les résultats du dosage de la biomasse bactérienne sont représentés dans la figure 9.



**Figure 9.** Cinétique de la croissance bactérienne d'une culture mixte, en présence de 500ppm de sources de carbone.

Elle montre que la croissance bactérienne se fait en 4 phases principales.

La Phase de latence (phase I) : durant laquelle les bactéries ne se divisent pas, la croissance est nulle et l'accoutumance des bactéries à l'environnement.

La Phase exponentielle (phase II) : Ce type de croissance est appelé croissance exponentielle car le nombre de cellules croît d'un facteur constant et à intervalle régulier (Guiraud, 1998). Durant cette phase la croissance est maximale, les bactéries subissent une division binaire et le phénomène apparaît continu. Après chaque division cellulaire, les cellules filles entament un nouveau cycle. La durée totale d'un cycle est appelée temps de génération.

La phase stationnaire ou la phase de freinage (phase III) : au cours de cette phase, aucune augmentation du nombre de bactéries n'est observée et le nombre des cellules vivantes égale au nombre des cellules mortes.

La phase de déclin (phase IV) : dans cette phase, le nombre de bactéries viables décroît ce qui augmente le taux de mortalité des bactéries. Parallèlement, la biomasse diminue à la suite de l'autolyse des bactéries mortes (Bousseboua, 2002).

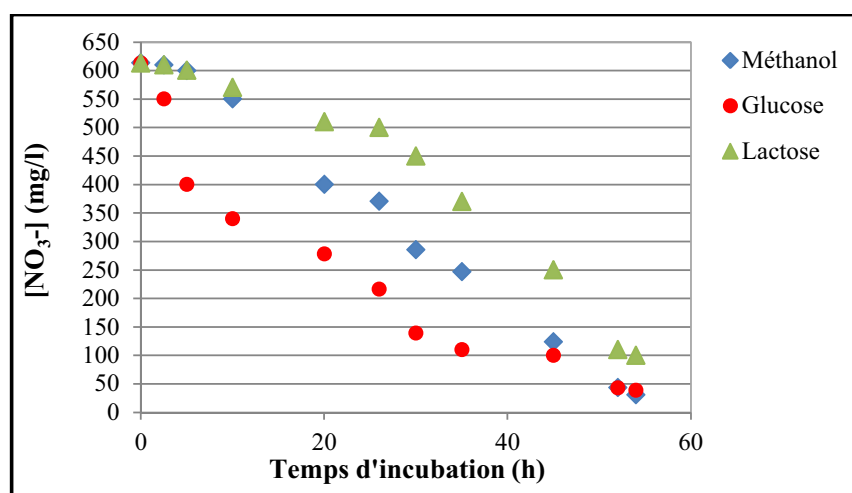
En présence du glucose comme source de carbone et d'énergie, une courte phase de latence d'environ 5 heures a été observée. Pour les deux autres sources de carbone étudiées, des durées de 12 et 15 heures ont été observées pour le méthanol et le lactose respectivement. D'autre part, le glucose donne une bonne croissance qui se traduit par une phase exponentielle élevée ( $DO = 0,5$ ). Ceci peut s'expliquer par le fait que le glucose est toujours prioritairement métabolisé par les bactéries et les enzymes de sa dégradation sont constitutives (toujours présentes).

Le méthanol donne une bonne croissance expliquée par son utilisation comme source de carbone, spécialement, par les bactéries Gram négatifs qui possèdent une méthanol déshydrogénase (Pelmont, 2005).

Le premier plateau observé, dans la courbe de croissance avec le lactose, correspond à la phase de latence pendant laquelle sont synthétisées les enzymes nécessaires au métabolisme du lactose (la perméase et la  $\beta$  galactosidase). Ces enzymes sont inductibles et ne sont pas synthétisées qu'en présence de leur substrat spécifique. La croissance observée avec ce substrat montre la variété des communautés bactériennes présentes dans les boues activées. Ces communautés contiennent des bactéries capables de dégrader le lactose et l'utiliser comme source de carbone et d'énergie.

### I.1.2. Suivi de la réduction des nitrates

La figure 10 représente la cinétique de la dénitrification en fonction du temps d'incubation.



**Figure 10.** Cinétique de la réduction des nitrates par une culture mixte avec 500ppm de sources de carbone.

Elle montre qu'une réduction des nitrates est observée en utilisant 500 ppm de sources de carbone, au cours de la croissance.

L'incubation se fait en anaérobiose. Malgré l'absence de l'oxygène, les bactéries se développent en diminuant la concentration des nitrates dans le milieu. Ceci montre que la dénitrification n'est qu'une alternative à la respiration classique de l'oxygène.

Donc, les nitrates sont utilisés comme accepteurs finals des électrons au cours d'une respiration anaérobie, dite respiration nitrate (Tiedje, 1988). L'adaptation bactérienne durant la phase de latence est accompagnée par une réduction faible des nitrates. Cette réduction augmente avec la croissance bactérienne (phase exponentielle).

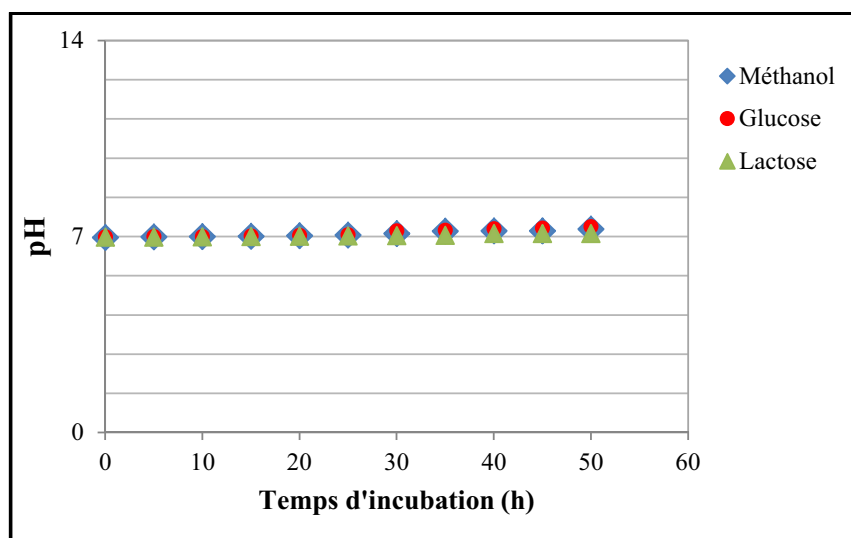
Après 52 heures de traitement, les cellules bactériennes entrent dans la phase de déclin ou la mort cellulaire avec des vitesses de réduction différentes, selon la nature de source de carbone. Le glucose donne une dénitrification avec une vitesse élevée, les nitrates sont réduits de 600 mg/l à 100 mg/l au bout de 35 heures. En revanche, ils sont réduits de 600 mg/l à 100 mg/l au bout de 45 heures avec le méthanol et au bout de 52 heures dans le cas du lactose. Ceci revient à la bonne croissance bactérienne avec le glucose et le méthanol. L'utilisation du lactose donne une faible vitesse de réduction des nitrates à cause de la croissance lente avec ce substrat.

Selon les travaux de Akunna et al., 1993, la vitesse de la dénitrification dépend de la nature du substrat utilisé comme source de carbone. Ils montrent que l'utilisation du glucose augmente la vitesse de la réduction des nitrates

Dans les trois cas, les bactéries entrent dans la phase de déclin avant la réduction totale des nitrates. Ceci peut s'expliquer par l'épuisement du milieu et que la concentration de 500 ppm de source de carbone n'était pas suffisante pour une réduction totale des nitrates.

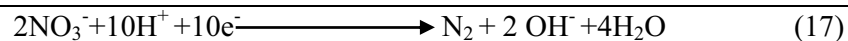
### I.1.3. Suivi du pH du milieu au cours de la dénitrification

La dénitrification est une réaction consommatrice des protons qui provoque une augmentation du pH (Guibing Zhu et al., 2009). Comme le montre la figure 11 qui représente la variation du pH du milieu contenant 500 ppm de sources de carbone en fonction du temps.



**Figure 11.** Evolution du pH au cours de la dénitrification en présence de 500ppm de sources de carbone.

Cette augmentation du pH est utilisée comme indicateur de la présence de réduction des nitrates par la réaction (17), (Mammeri, 2007).

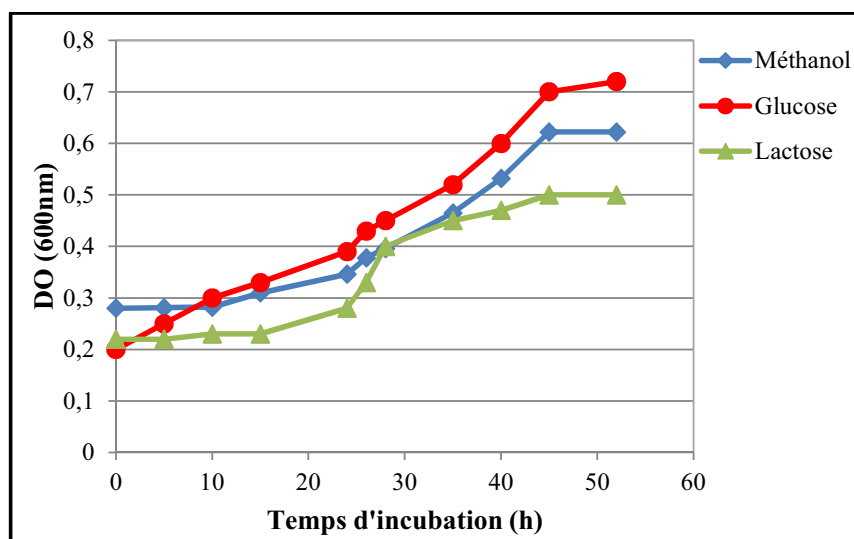


Avec le glucose et le méthanol, le pH augmente de 7 à 7,2 à cause de la bonne dénitrification observée avec ces substrats. Dans le cas du lactose, le pH varie de 7 à 7,09. Ce qui montre que la croissance des cellules bactérienne influence le pH.

### I.2. Suivi de la dénitrification par l'utilisation de 1000 ppm de sources de carbone

On a montré que la concentration de 500 ppm de sources de carbone n'était pas suffisante pour une bonne réduction des nitrates. Pour prolonger la durée de vie des bactéries et éviter l'épuisement du milieu, la concentration des sources de carbone (glucose, méthanol et lactose) a été augmentée à 1000ppm.

## I.2.1. Suivi de la croissance bactérienne



**Figure 12.** Cinétique de la croissance bactérienne d'une culture mixte, en présence de 1000ppm de sources de carbone.

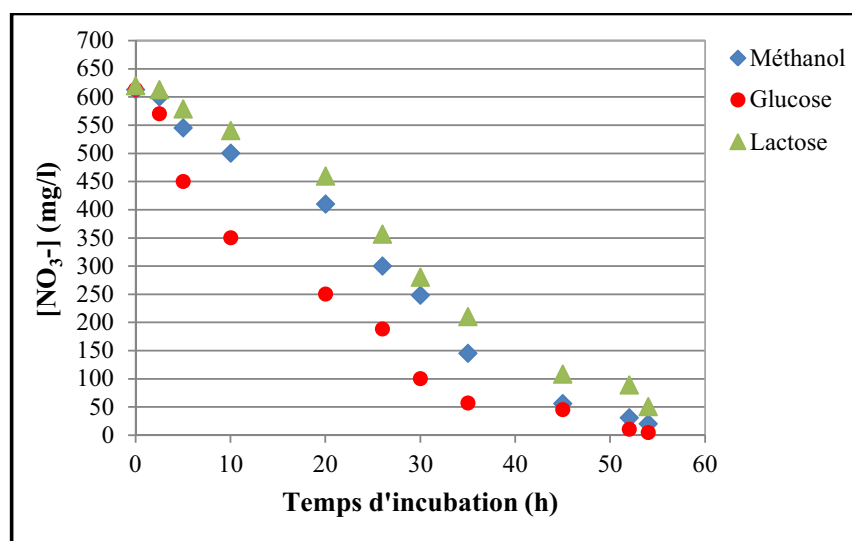
Une réduction de la durée de la phase de latence est observée avec l'augmentation de la concentration de sources de carbones (Meyer *et al.*, 1999), spécialement avec l'utilisation du glucose, la durée de la phase de latence est réduite à 2 heures seulement. D'autre part, la figure 12 montre une bonne croissance qui se traduit par une densité optique élevée et qui peut atteindre 0,7 avec 1000 ppm de glucose.

Avec l'utilisation de 1000 ppm de méthanol, la phase de latence se réduit à 10 heures, ce qui montre que la concentration élevée du substrat augmente le taux de la survie bactérienne. Les bactéries peuvent utiliser le méthanol comme seule source de carbone pour se développer. On observe aussi que la phase exponentielle atteint une valeur élevée de DO égale à 0,6. Une croissance lente est toujours observée avec le lactose et l'augmentation de sa concentration initiale à 1000 ppm ont augmenté la durée de vie des bactéries.

On remarque aussi, qu'après 52 heures d'incubation les bactéries entrent dans la phase de déclin avec 500 ppm de source de carbone. Par contre avec 1000 ppm de source de carbone, les bactéries ne dépassent pas la phase stationnaire. Ceci peut s'expliquer par la richesse du milieu de culture, l'absence de l'épuisement du milieu avec cette concentration.

### I.2.2. Suivi de la réduction des nitrates

La prolongation de la durée de vie des bactéries avec l'augmentation des concentrations initiales des sources de carbone est accompagnée par une bonne réduction des nitrates. Ces dernières sont utilisées comme accepteurs finals des électrons durant la respiration anaérobie. Cette réduction est représentée en fonction du temps d'incubation, dans la figure 13.



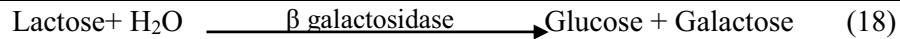
**Figure 13.** Cinétique de la réduction des nitrates par une culture mixte avec 1000ppm de sources de carbone.

Une augmentation de la vitesse de réduction des nitrates est bien remarquée avec cette concentration de sources de carbone.

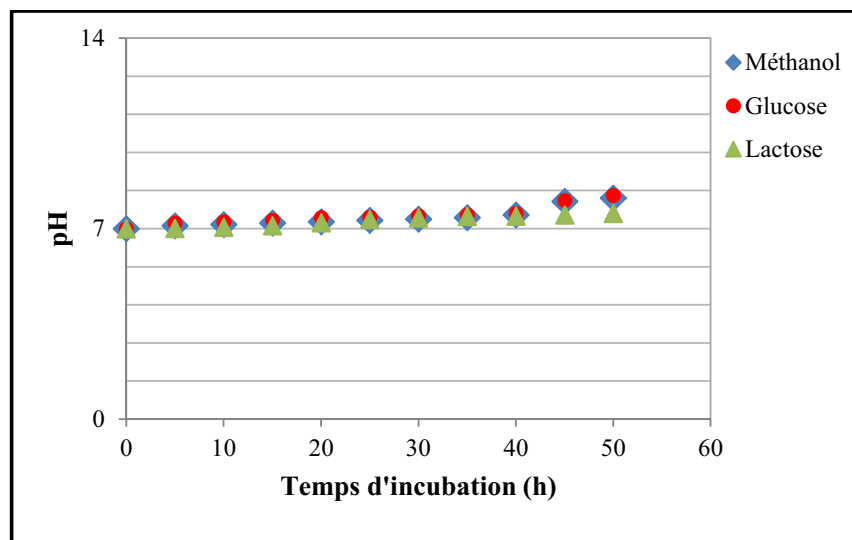
Avec un sucre simple (le glucose), une réduction des nitrates jusqu'à 100 mg/l se fait en 30 heures et elle atteint des concentrations minimales d'environ 8 mg/l après 52 heures d'incubation. Cette réduction importante des nitrates est due essentiellement aux taux élevés de la croissance. Ce taux élevé revient essentiellement à la concentration et à la nature du substrat utilisé comme source de carbone et d'énergie.

Avec le méthanol, la concentration des nitrates arrive à 100 mg/l après 35 heures d'incubation et atteint sa valeur minimale de 19 mg/l après 52 heures. Ceci s'explique par le fait que le méthanol possède une chaîne carbonique courte facilement dégradée par les bactéries et la concentration initiale, 1000 ppm, de ce substrat prolonge la durée de vie des cellules bactériennes.

Pour la dernière source du carbone le lactose, la même figure montre que la réduction augmente avec l'augmentation de la concentration du substrat. Par contre, sa vitesse reste toujours faible par rapport à celles observées avec les deux autres sources de carbone (le glucose et le méthanol). La réduction atteint 100 mg/l pour 50 heures d'incubation. Ceci est dû à la composition du lactose, qui est un sucre composé et sa dégradation demande la présence des enzymes spécifiques. La perméase pour sa pénétration à l'intérieur de la cellule et la  $\beta$  galactosidase pour sa dégradation en glucose et galactose (18).



### I.2.3. Suivi du pH du milieu



**Figure 14.** Evolution du pH au cours de la dénitrification en présence de 1000 ppm de sources de carbone.

Avec 1000 ppm de substrats, une légère augmentation du pH de milieu a été observée, comme le montre la figure 14. Le pH atteint avec les trois sources de carbone le glucose, le méthanol et le lactose des valeurs de 7,7, 7,4 et 7,2, respectivement après 52 heures d'incubation.

### I.3. Suivi de la dénitrification par l'utilisation de 2000 ppm de sources de carbone

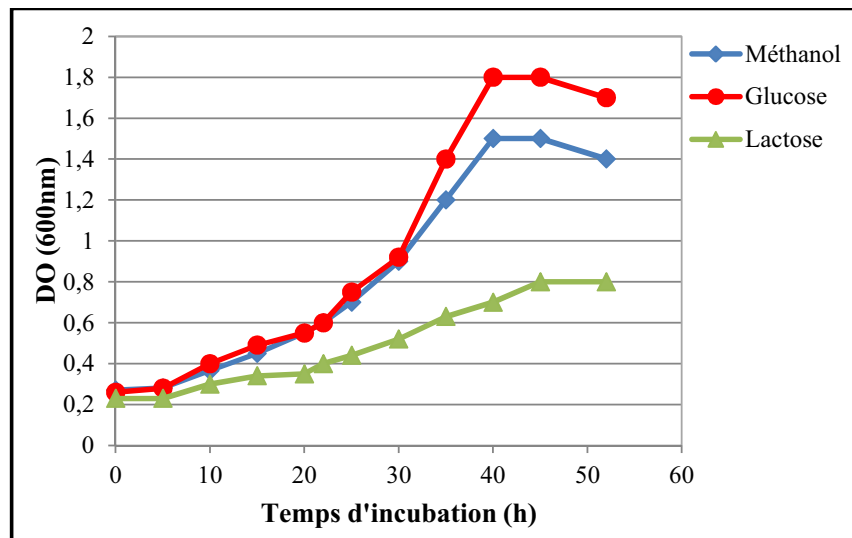
Pour améliorer le rendement de la dénitrification, une autre augmentation de la concentration de source de carbone a été effectuée. Une concentration de 2000 ppm a été utilisée, les mêmes expériences ont été réalisées pour doser la biomasse bactérienne, les nitrates et mesurer l'évolution du pH.

### I.3.1. Suivi de la croissance bactérienne

L'augmentation de la concentration de sources de carbone de 500 ppm à 1000ppm a évolué le taux de la croissance. Cette augmentation a donné une bonne réduction des nitrates qui a pu atteindre 8 mg/l après 52 heures d'incubation.

Après cette évolution, d'autres expériences ont été effectuées avec une concentration de 2000 ppm pour les trois sources de carbone : le glucose, le méthanol et le lactose.

La biomasse est dosée en fonction de la turbidité avec un spectrophotomètre UV /VIS à 600 nm. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 15.



**Figure 15.** Cinétique de la croissance bactérienne d'une culture mixte, en présence de 2000ppm de sources de carbone.

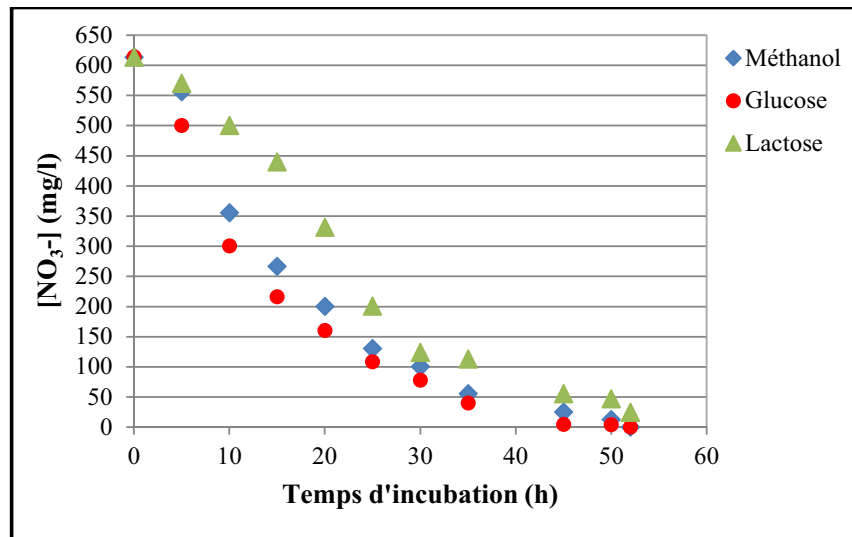
La réduction de la phase de latence est observée avec les trois sources de carbone, ça revient à l'augmentation de la concentration initiale des substrats utilisés comme sources de carbone et d'énergie comme le montre [Meyer et al., 1999](#).

Le nombre des cellules bactériennes augmentent avec l'augmentation de la concentration initiale de la source de carbone. Ceci est bien observé par l'évolution de la DO. Les valeurs de la DO atteignent les valeurs de 1.8, 1.5 et 0.8 pour le glucose, le méthanol et le lactose, respectivement.

En revanche, cette augmentation de la concentration de sources de carbone, jusqu'à 2000 ppm, est accompagnée par une diminution de la durée de vie bactérienne. Les bactéries qui ont pu résister jusqu'à 52 heures avec 1000 ppm du glucose, entrent dans la phase de

déclin après 48h avec 2000 ppm du même substrat. Et celles qui ont pu vivre 52 heures avec 1000 ppm de méthanol, meurent après 50 heures d'incubation avec 2000 ppm. On observe aussi qu'avec le lactose, les bactéries entrent dans la phase stationnaire après 52 heures d'incubation. Ce qui montre que la concentration de source du carbone n'est pas le seul facteur qui influence la durée de vie bactérienne.

### I.3.2. Suivi de la réduction des nitrates



**Figure 16.** Cinétique de la réduction des nitrates par une culture mixte avec 2000 ppm de sources de carbone.

La figure 16 montre que la vitesse de la dénitrification augmente toujours avec l'augmentation de la concentration initiale des sources du carbone. Après 25 heures d'incubation, les nitrates sont réduits à une concentration de 100 mg/l avec le glucose et totalement réduites après 48 heures d'incubation. Dans le cas du méthanol comme source de carbone, La concentration de réduction des nitrates atteint 100 mg/l après 30 heures et totalement réduites après 50 heures d'incubation. Avec le lactose, la dénitrification est toujours lente et aucune réduction totale n'est observée.

On observe qu'en augmentant la concentration initiale de la source de carbone jusqu'à 2000 ppm, sans augmenter la concentration initiales des nitrates, les cellules bactériennes se développent et leurs nombres augmentent. Ce qui peut s'expliquer par le fait que ces bactéries utilisent les nitrates présents dans le milieu pour acquérir de l'oxygène et respirer.

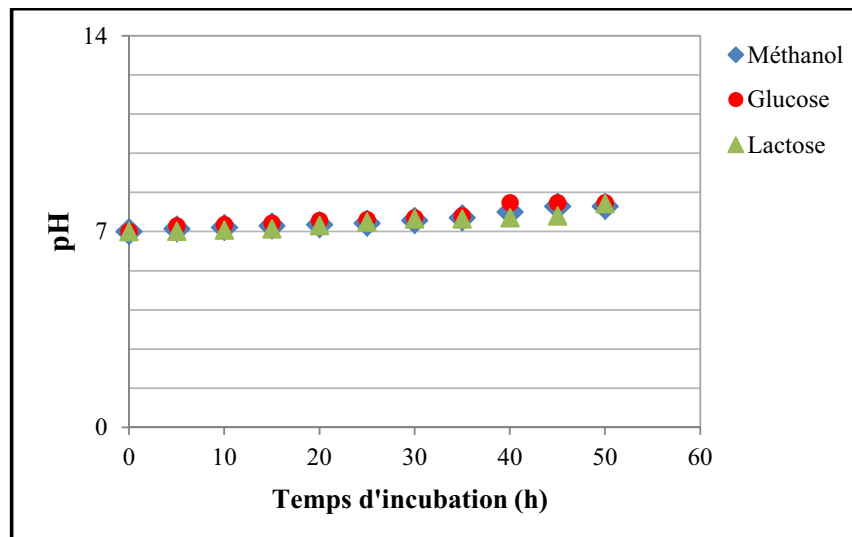
La concentration initiale des nitrates était totalement réduite par les bactéries après 48 heures avec le glucose et après 50 heures avec le méthanol. Ces durées d'incubation

importantes provoquent la mort des cellules. L'accepteur final des électrons (les nitrates) est aussi un facteur qui influence directement la durée de vie bactérienne.

Nos résultats obtenus avec le lactose montrent aussi que ce substrat est difficilement métabolisé par les bactéries et donne une dénitrification avec une vitesse faible,

### I.3.3. Suivi du pH du milieu

Comme la réduction de toutes les molécules de nitrates alcalinise le milieu, le pH du milieu a été suivi (figure 17).



**Figure 17.** Evolution du pH au cours de la dénitrification en présence de 2000ppm de sources de carbone.

La figure 17 montre qu'avec l'évolution de la vitesse de dénitrification, dans le cas du glucose, le pH du milieu augmente de 7 à 8,03. Cette dernière valeur de pH reste inchangée après 48 heures à cause de la mort des cellules. Avec le méthanol le pH augmente de 7 à 7,8 durant 35 heures d'incubation. Après 35 heures, toutes les bactéries sont mortes et aucun changement du pH n'est observé. Dans la même figure, on montre que le pH du milieu qui contient le lactose comme source de carbone augmente avec l'augmentation du taux de dénitrification, l'évolution du pH observée est plus ou moins lente.

A partir des expériences réalisées avec une culture bactérienne mixte, on peut conclure que la réduction des nitrates dépend de la nature, de la concentration et de la biodégradabilité de source de carbone.

Avec la culture mixte, on a pu réduire les nitrates à des concentrations très faibles. Un taux d'environ 99% a été atteint, tout en utilisant des concentrations élevées de substrat (source de carbone).

Le glucose et le méthanol, facilement dégradables par les bactéries, ont donné une bonne croissance avec des taux de dénitrification élevés. Tandis que, le lactose demande beaucoup de temps pour être dégradé par les bactéries.

Selon les travaux de **Hallin et Pell, 1998**, les populations bactériennes dénitrifiantes peuvent s'adapter à la présence du méthanol comme seule source de carbone et d'énergie et d'une manière lente par rapport à l'adaptation au glucose.

En fin, l'absence des nitrates dans le milieu provoque la mort cellulaire même en présence des concentrations élevées de source du carbone.

## **II. Isolement et identification des souches**

Pour vérifier le taux de la réduction pour chaque bactérie isolée, d'autres expériences ont été réalisées avec des cultures bactériennes pures à des concentrations élevées de sources de carbone,

Pour cela, des isolements bactériens et des tests d'identification sont effectués à partir des boues activées de la station d'épuration de KHENCHELA.

Après une série de repiquage sur gélose nutritive, des colonies bactériennes sont isolées. Six souches d'aspects différents de A à F ont été étudiées avec différents tests biochimiques et morphologiques, pour identifier leurs genres.

Les résultats de différents tests de ces souches sont représentés dans le tableau VII.

**Tableau VII.** Résultats des tests morphologiques et biochimiques sur les différentes souches.

Souches		A	B	C	D	E	F
		Tests					
Forme		Bacille	Bacille	Bacille	Coccobacille	Bacille	Bacille
Gram		-	-	-	-	-	-
Mobilité		+	+	-	-	+	+
Type respiratoire		AAF	AAF	AS	AS	AAF	AAF
Catalase		+	+	+	+	+	+
Oxydase		-	+	+	+	+	-
ONPG		+	-	+	-	+	+
Nitrate réductase		+	+	-	-	+	-
Nitrite réductase		-	-	-	-	-	-
T S I	Glucose	+	+	+	-	+	+
	Saccharose	-	-	+	-	-	+
	Lactose	-	-	+	-	-	+
	H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-
	Formation de gaz	+	+	-	-	+	+
Citrate		-	+	-	-	+	+
Uréase		+	+	-	-	+	-
Indole		-	-	-	-	+	-
ADH		+	-	abs	abs	+	abs
ODC		+	+	abs	abs	-	abs
LDC		-	-	abs	abs	+	abs
RM		-	-	+	-	-	-

(+) Résultat positif. (-) Résultat négatif. (AAF) : aéro-anaérobie facultatif. (AS) : aérobie stricte. (Abs) : absence du test.

Après ces tests, trois souches bactériennes aéro-anaérobie facultatives (A, B et E) montrent une capacité à réduire les nitrates (nitrate réductase positif). Elles peuvent croître aussi bien en présence qu'en absence d'oxygène (Leyral et Vierling, 2007).

En présence d'oxygène (respiration aérobie), les bactéries l'utilisent comme accepteur final des électrons. En absence d'oxygène (respiration anaérobie), d'autres molécules comme les nitrates, sont utilisées comme accepteurs finals des électrons.

Selon les critères représentés dans le tableau (VII), les souches B et E ressemblent au *Pseudomonadaceae* et la souche A ressemble beaucoup plus aux *Enterobacteriaceae* (Sharifi-Yazdi et al., 2001).

La capacité de réduire les nitrates ainsi que la croissance des trois souches sont mesurés par les mêmes méthodes utilisées avec la culture mixte. Une concentration initiale de 2000 ppm de source de carbone a été utilisée. Cette concentration a donné une bonne croissance avec un bon rendement de dénitrification, comme on l'a montré précédemment. La variation du pH du milieu a été suivie pour chaque souche.

### III. Suivi de la dénitrification par l'utilisation des souches pures.

#### III.1. Culture en batch avec la souche A.

##### III.1.1. Suivi de la croissance bactérienne.

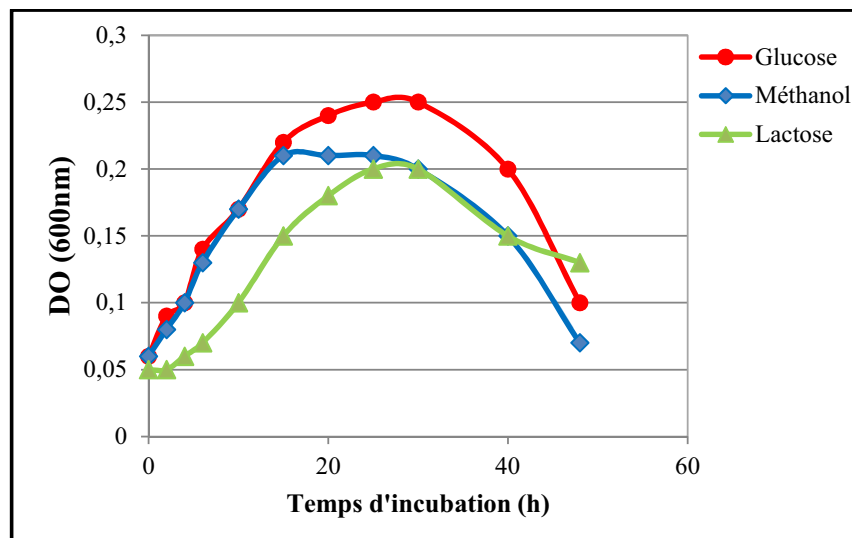
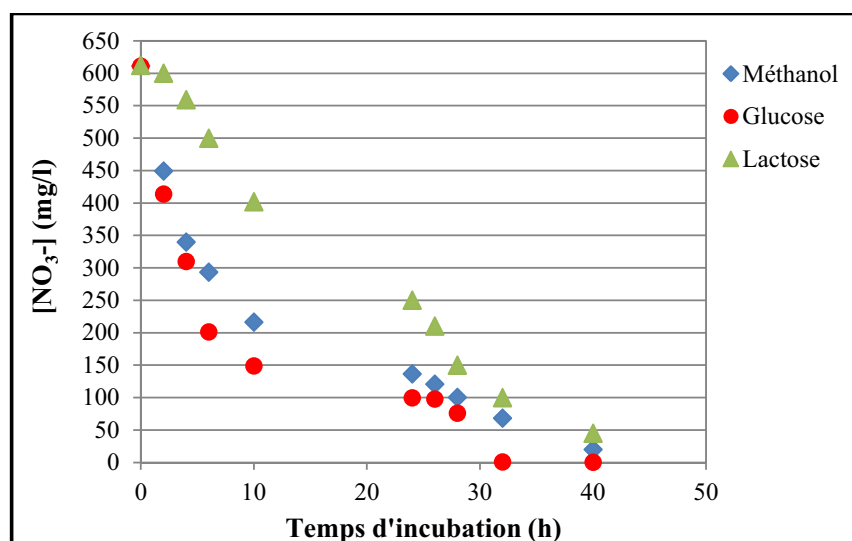


Figure 18. Cinétique de la croissance de la souche A.

La figure 18 montre que les cellules bactériennes ont bien adapté aux conditions du milieu après l'enrichissement. Ce qui se traduit par l'absence de la phase de latence. Une bonne croissance a été observée pendant les premières 25 heures. Puis, les bactéries entrent dans la phase stationnaire et en fin une mort cellulaire après 30 heures d'incubation.

Le glucose donne toujours une bonne croissance par rapport aux autres sources de carbone ; une phase exponentielle élevée. Ces résultats montrent que cette souche représente une capacité d'utiliser les trois types des substrats, en plus des enzymes du métabolisme de glucose, elle possède une méthanol déshydrogénase et une  $\beta$  galactosidase

### III.1.2. Suivi de la réduction des nitrates

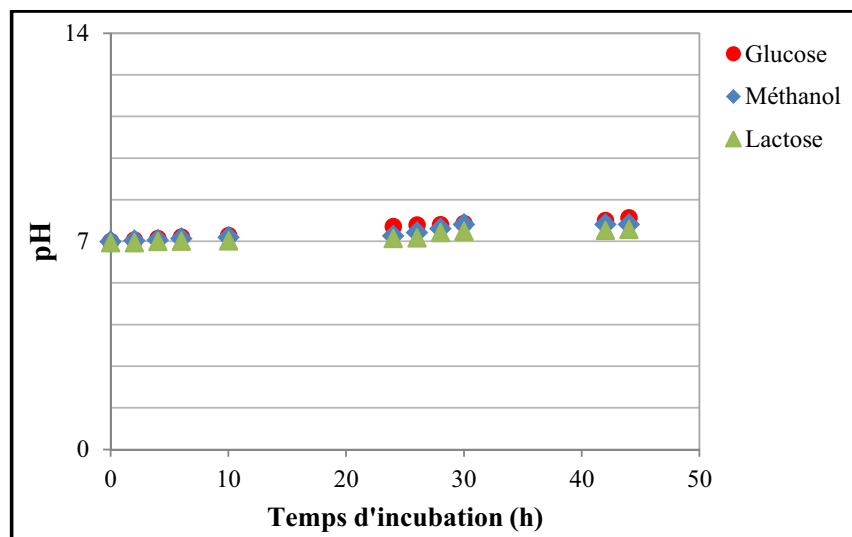


**Figure 19.** Cinétique de la réduction des nitrates par la souche A.

La figure 19 montre que les nitrates sont réduits au fur et à mesure avec la croissance bactérienne, à un taux de réduction maximal. Les bactéries entrent dans la phase de déclin après 30 heures d'incubation à cause de la réduction totale des nitrates et l'arrêt total de la respiration.

Comme dans le cas des cultures mixtes, la vitesse de la dénitrification avec le glucose est plus élevée comparée aux deux autres sources de carbone. Le glucose donne une réduction totale des nitrates après 32 heures, le méthanol après 40 heures. La culture avec le lactose réduit les nitrates à une concentration d'environ 20 mg/l après 40 heures d'incubation. Cette réduction est accompagnée d'une augmentation du pH.

### III.1.3. Suivi du pH du milieu

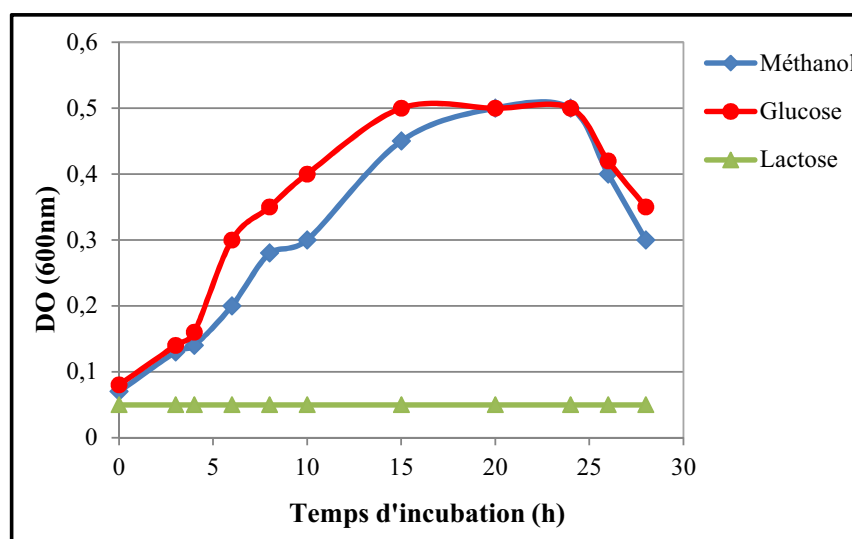


**Figure 20.** Evolution du pH au cours de la dénitrification par la souche A.

La réduction des nitrates est toujours accompagnée d'une augmentation de pH du milieu. La figure 20 montre que le pH peut atteindre 7,5 avec le glucose, 7,2 avec le méthanol et 7,07 avec le lactose. Ce qui prouve que la souche A possède une capacité à réduire les nitrates.

## III.2. Culture en batch avec la souche B

### III.2.1. Suivi de la croissance bactérienne



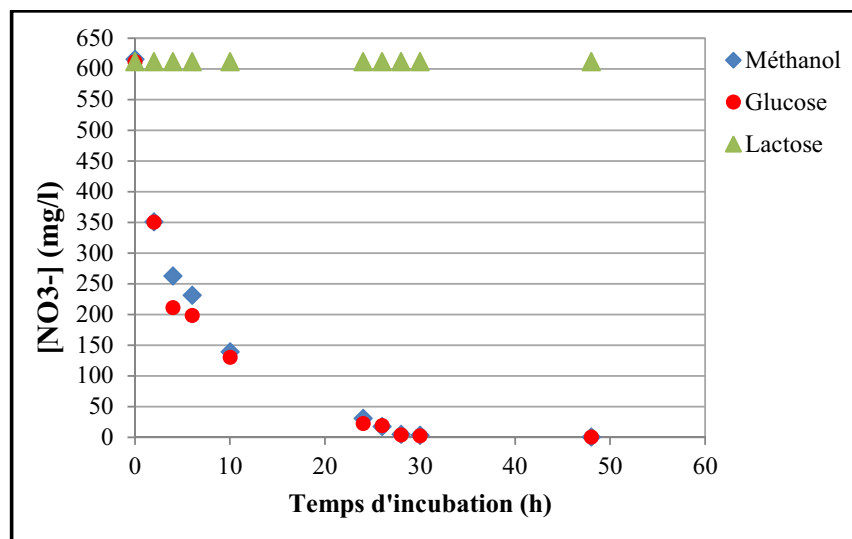
**Figure 21.** Cinétique de la croissance de la souche B.

La cinétique de croissance observée dans la figure 21, montre une phase exponentielle élevée avec le glucose et le méthanol. La valeur élevée de la DO représente un nombre élevé de cellules bactériennes capables de dégrader le glucose et le méthanol. La durée de cette évolution est de 15 heures. Donc, la souche B donne une bonne croissance dans une courte période. Après cette évolution, les bactéries entrent dans la phase stationnaire, c'est l'arrêt de la division cellulaire. Puis, elles entrent dans le déclin après 27 heures d'incubation.

En présence du méthanol comme source de carbone, la croissance bactérienne est proche de celle avec le glucose. Ceci peut s'expliquer par le fait que cette bactérie possède une capacité d'utiliser le méthanol comme source de carbone et possède de ce fait une méthanol déshydrogénase. Par contre, aucune croissance n'est observée avec l'utilisation du lactose comme source de carbone. Donc, cette souche bactérienne ne possède pas des enzymes spécifiques pour la dégradation du lactose (perméase et/ou  $\beta$  galactosidase). Ceci a été prouvé par les résultats négatifs du test d'ONPG (tableau VII).

Cette croissance est accompagnée d'une réduction des nitrates utilisés pour la respiration, (figure 22).

### III.2.2. Suivi de la réduction des nitrates



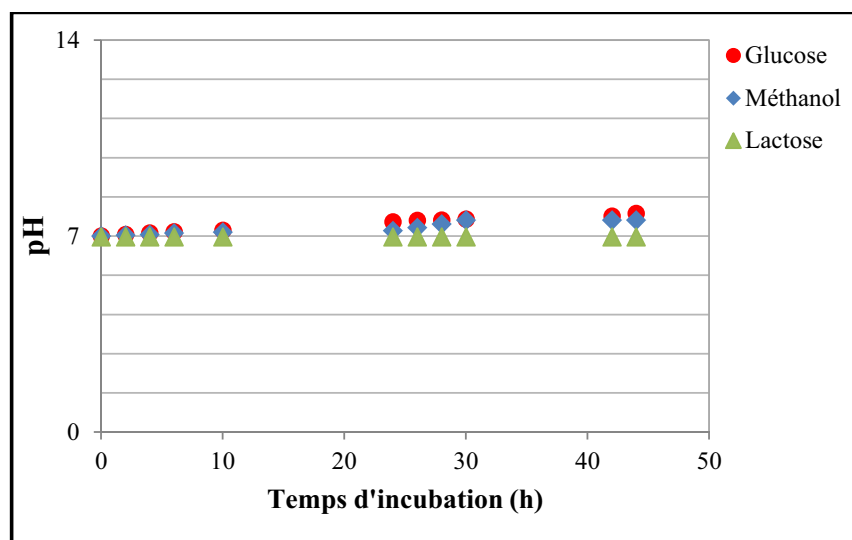
**Figure 22.** Cinétique de la réduction des nitrates par la souche B.

La figure 22 montre que l'utilisation du méthanol a donné une dénitrification avec une vitesse très proche à celle donnée par l'utilisation du glucose. Cette souche a une grande capacité à dégrader le méthanol. De ce fait, elle peut appartenir aux *Pseudomonadaceae*

(tableau VII) et selon les travaux de [Husárová et al., 2011](#), le méthanol est facilement dégradable par cette famille.

Que ce soit avec l'utilisation du glucose ou du méthanol, on montre que la réduction des nitrates par cette souche se fait avec une vitesse élevée (réduction complète des nitrates après 30 heures d'incubation), comparée à la première souche (A). Par contre, aucune réduction avec le lactose n'est observée à cause de l'absence de la croissance bactériennes ; l'absence des enzymes du métabolisme de lactose.

### III.2.3. Suivi du pH du milieu



**Figure 23.** Evolution du pH au cours de la dénitrification par la souche B.

Comme le montre la figure 23, une évolution du pH très remarquable au cours de la dénitrification par la souche B en utilisant le glucose comme source de carbone. Le pH augmente de 7 à 7,8 après 24 heures d'incubation, et de 7 à 7,5 avec le méthanol comme source de carbone. Cette évolution s'arrête avec la mort cellulaire et la réduction totale des nitrates. Tandis que l'utilisation du lactose n'a aucune influence sur le pH du milieu, à cause de l'absence de la croissance bactérienne et la réduction des nitrates.

Les premières souches bactériennes ont donné des résultats très élevés de la réduction, avec des vitesses différentes, la deuxième souche (B) a pu réduire les nitrates avec le glucose comme substrat, dans un intervalle de temps très court (30 heures). Tandis que, la période de réduction des nitrates par la souche (A), avec le même substrat, est assez importante (50 heures).

Les deux souches peuvent métaboliser le méthanol comme source de carbone et d'énergie. La souche B montre une grande capacité de dégradation comparée à la souche A. On montre aussi que le lactose est difficilement métabolisé par la souche A, réduisant ainsi les nitrates mais avec une vitesse très lente. En revanche, la souche B qui ne possède pas d'enzymes spécifiques pour sa dégradation n'arrive pas à métaboliser ce substrat.

### III.3. Culture en batch avec la souche E

#### III.3.1. Suivi de la croissance bactérienne

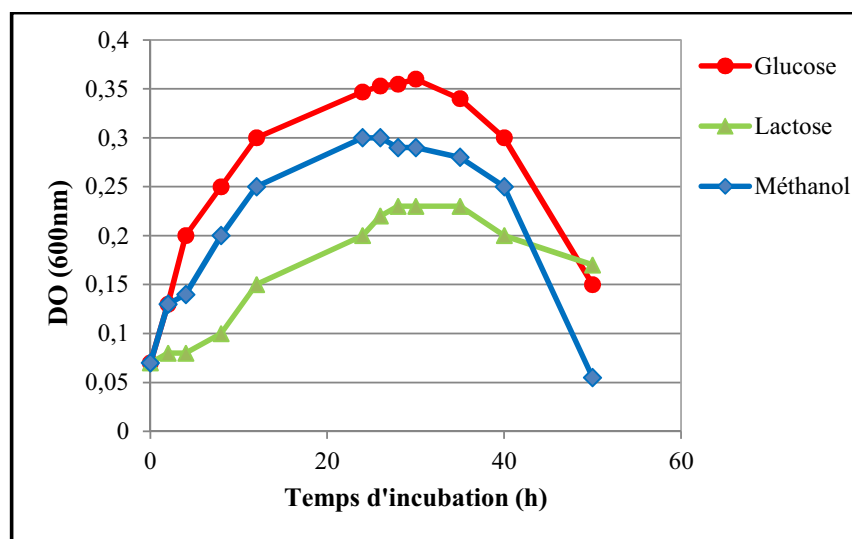
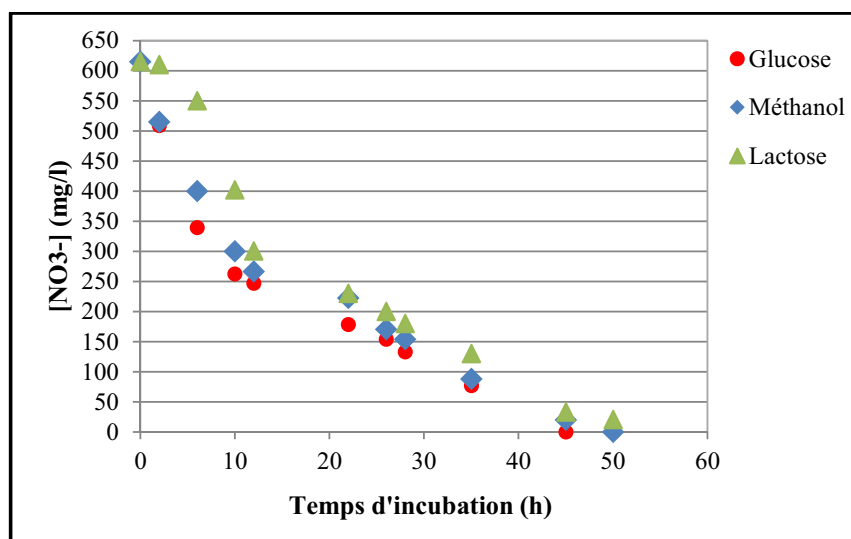


Figure 24. Cinétique de la croissance de la souche E.

Avec le glucose, une croissance élevée de la souche E est remarquée dans les premières 24 heures (figure 24). Après 32 heures d'incubation, ces bactéries entrent dans la phase stationnaire et elles peuvent vivre des heures plus par rapport à la souche B.

Une bonne croissance est observée aussi avec le méthanol, utilisée par cette souche bactérienne comme seule source de carbone et d'énergie. On remarque aussi que la souche E a aussi une capacité d'utiliser le lactose comme source de carbone. Cette capacité se traduit par l'augmentation de l'opacité du milieu à cause de développement cellulaire en présence de ce substrat.

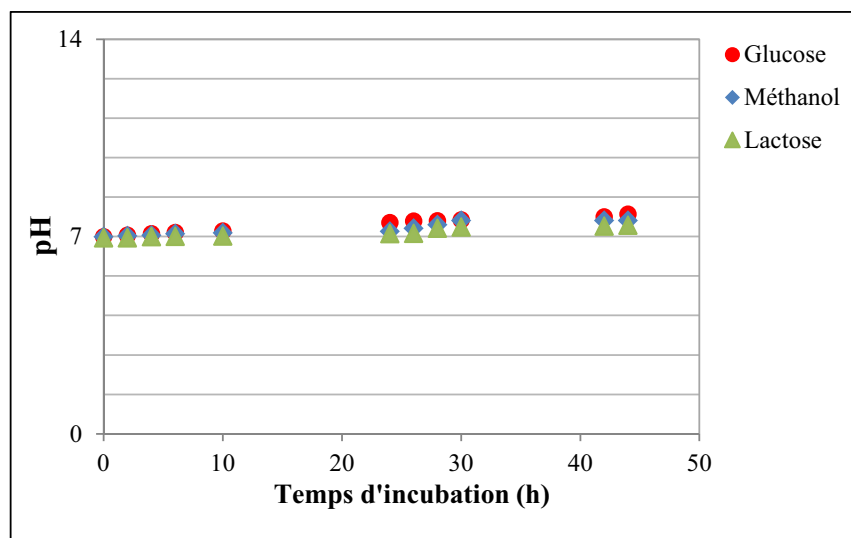
## III.3.2. Suivi de la réduction des nitrates



**Figure 25.** Cinétique de la réduction des nitrates par la souche E.

La vitesse de la réduction des nitrates dépend toujours de la nature du substrat utilisé comme source de carbone par les bactéries. On observe que le glucose donne une dénitrification avec une vitesse élevée, comme le montre la figure 25. La réduction est totale après 45 heures. Avec le méthanol, la réduction totale est atteinte après 50 heures d'incubation. L'utilisation du lactose donne aussi une réduction des nitrates avec une vitesse faible:  $[\text{NO}_3^-] = 20 \text{ mg/l}$  après 50 heures d'incubation.

## III.3.3. Suivi du pH du milieu



**Figure 26.** Evolution du pH au cours de la dénitrification par la souche E.

Nos expériences avec les cultures bactériennes pures sont réalisées avec 1000 mg/l du KNO<sub>3</sub>, utilisé comme source d'azote ([NO<sub>3</sub><sup>-</sup>]= 613,55 mg/l) et 2000 mg/l de sources de carbone. Ces concentrations, identiques dans les trois expériences, ont donné des taux de croissances et de dénitrification différents. En présence du glucose, la réduction des nitrates se fait avec des vitesses différentes pour les souches étudiées. La souche (B) réduit tous les nitrates qui se trouvent dans le milieu de culture dans 30 heures. Tandis que la souche (E) les réduit dans 50 heures et la souche (A) dans 52 heures.

En présence du méthanol comme source de carbone, les nitrates sont complètement réduits par les souches B, A et E au bout 33, 54 et 52 heures, respectivement. Ce qui montre l'utilisation de ce substrat comme donneur des électrons par les trois souches bactériennes isolées. Les résultats avec le lactose sont variables. La souche B n'a pas pu le métaboliser à cause de l'absence des enzymes nécessaires pour sa dégradation. Tandis qu'avec les souches A et E, le lactose donne une dénitrification avec une faible vitesse. Comme le montre [Augustin, 2005](#), le taux de la croissance (vitesse de multiplication par unité de densité) a une influence directe sur la réduction des nitrates. Lorsque la bactérie croit plus vite (taux de croissance élevé), elle réduit les nitrates plus vite.

#### IV. Identification des souches avec les galeries API

Après nos résultats précédents, les souches isolées sont identifiées en utilisant le système API (annexe 4), le tableau ci-dessous récapitule les noms des espèces isolées.

**Tableau VIII.** Résultats des galeries API des différentes souches.

Souches	Galerie API utilisée	Code d'identification	Nom d'espèce
<b>A</b>	API 20 E	<b>3 3 0 5 5 7 3</b>	<i>Enterobacter cloacae</i>
<b>B</b>	API 20 NE	<b>1 5 4 7 7 4 7</b>	<i>Chryseomonas luteola</i>
<b>C</b>	API 20 NE	<b>0 5 7 7 7 7 7</b>	<i>Burkholderia cepacia</i>
<b>D</b>	API 20 NE	<b>0 0 0 0 0 2 4</b>	<i>Moraxella spp.</i>
<b>E</b>	API 20 NE	<b>5 5 7 6 7 5 5</b>	<i>Aeromonas hydrophila</i> / <i>Aeromonas caviae</i>
<b>F</b>	API 20 NE	<b>1 4 6 1 7 4 3</b>	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>

La souche A été identifiée comme *Enterobacter cloaca*, la souche B comme *Chryseomonas luteola* (cette espèce aurait également comme synonyme le nom d'espèce *Pseudomonas luteola* (Anzai et al., 1997) et la dernière espèce ressemble à deux espèces ; *Aeromonas hydrophila* et *Aeromonas caviae*.

A partir des tests supplémentaires recommandés par le manuel d'identification API NE (biomerieux®), la fermentation du glucose peut différencier entre ces deux espèces. La souche E donne des résultats positifs de fermentation du glucose dans le TSI (tableau VII), c'est une *Aeromonas hydrophila*.

La souche B ; *Pseudomonas luteola*, appartient au *Pseudomonadaceae* qui possèdent, selon Kraft et al., 2011, une enzyme nitrate réductase périplasmique. Ce qui influe, peut-être, sur la vitesse de la dénitrification élevée.

## Conclusion

Nos expériences ont donné différents résultats. Ils varient selon le type de la culture (mixte ou pure) et la nature, la concentration et la biodégradabilité des sources de carbone.

La variation de la nature de source de carbone a montré que les sucres simples, tel que le glucose, sont plus assimilables par les bactéries et facilement dégradables, ce qui augmente la croissance bactérienne et donne une bonne réduction des nitrates. Ces derniers sont utilisés par les bactéries aéro-anaérobies facultatives comme accepteurs finals des électrons en abri d'oxygène.

On a montré aussi que la richesse de la culture mixte, par plusieurs souches bactériennes, donne une bonne dénitrification par rapport aux cultures pures. Ceci est dû aux différents métabolismes suivis par la communauté bactérienne présente dans les cultures mixtes. Il a été montré, dans la figure 13 par exemple, que le lactose est bien métabolisé par la culture mixte et donne une bonne réduction des nitrates. Tandis que la souche *Pseudomonas luteola* n'a donné aucune croissance et aucune réduction des nitrates, comme le montre la figure 22. Ce qui montre que l'augmentation de nombre et de genres bactériens, par l'utilisation des cultures mixtes, augmente la réduction des nitrates.

D'autre part, le changement de la concentration des sources de carbone montre que l'adaptation des bactéries aux conditions du milieu augmente avec l'augmentation de la concentration initiale de la source de carbone et la réduction ainsi, de la phase de latence. Donc, la richesse du milieu de culture favorise la croissance d'un grand nombre de bactéries et le taux de la croissance (vitesse de multiplication par unité de densité) a une influence directe sur la réduction des nitrates et lorsque la bactérie croît avec une vitesse élevée les nitrates sont réduits plus vite.

CONCLUSION

GENERALE

**L**a pollution des eaux par les nitrates est très répandue dans les régions agricoles, comme la région de KHENCHELA, ceci revient à l'utilisation des nitrates dans les engrais agricoles. Les nitrates étant des sels très solubles dans l'eau ; ils migrent donc aisément dans la nappe phréatique lorsque les niveaux excèdent ce que les plantes peuvent utiliser, ceci augmente le risque de la contamination des eaux potables; les fortes teneurs de nitrates dans l'eau potable peuvent causer des problèmes de santé, en particulier chez les enfants.

L'objectif de ce travail était l'étude de l'élimination des nitrates des eaux usées de KHENCHELA, par des procédés biologiques. Cette élimination se base sur l'utilisation des microorganismes et plus spécifiquement des bactéries qui ont une capacité de réduire les nitrates ; les bactéries dénitrifiantes.

Pour cela, différentes expériences ont été réalisées, afin de déterminer les conditions favorables pour une bonne réduction et pour isoler des espèces bactériennes capables de réduire les nitrates.

Des cultures en batch sont réalisées dans des conditions anaérobiques, et inoculées en premier lieu, par les boues activées chargées par les bactéries (culture mixte) et en second lieu, par des espèces bactériennes pures isolées de la même boue activée.

Nos expériences ont prouvé que ; la croissance bactériennes dépend directement de la nature, la concentration initiale et la biodégradabilité de la source du carbone. Trois types de sources de carbone ont été utilisés ; un sucre simple (le glucose), un sucre composé (le lactose) et un alcool (le méthanol). L'utilisation du glucose comme source de carbone a donné des bons résultats à cause de sa dégradation facile par les bactéries ; les enzymes responsables de la dégradation des glucoses sont constitutives.

Le méthanol peut être utilisé par quelques espèces bactériennes qui possèdent une méthanol déshydrogénase.

Le lactose difficilement dégradables, demande la présence des enzymes spécifiques ; la perméase et la  $\beta$  galactosidase, qui sont des enzymes inductibles synthétisée par des espèces bactériennes juste dans la présence du substrat.

L'augmentation de la concentration initiale des sources de carbone a permet de favoriser les conditions du milieu pour une bonne croissance des cellules bactériennes et elle a une influence sur la phase de latence ; qui se diminue par l'augmentation de la concentration

de source du carbone. D'autre part, la concentration élevée de source du carbone a donné une réduction des nitrates avec un taux élevé.

Le taux de la réduction des nitrates par l'utilisation des cultures mixte a prouvé que les communautés bactériennes peuvent réduire les nitrates à des concentrations très fines en présence des concentrations élevées des sources de carbone. Le changement de la nature des sources de carbone a donné des différentes vitesses de la réduction, l'utilisation du glucose augmente la croissance bactérienne et augmente donc la vitesse de l'élimination des nitrates, le méthanol aussi donne une vitesse importante de l'élimination des nitrates, tandis que le lactose dégradé par quelques espèces et difficilement dégradé a donné des taux de réduction faibles.

Après cette première étape, des cultures pures sont isolées à partir de la boue activée, six espèces sont purifiées et identifiées par le système API comme : *Pseudomonas luteola*, *Aeromonas hydrophila*, *Enterobacter cloacae*, *Moraxella spp*, *Sphingomonas paucimobilis* et *Burkholderia cepacia*.

Trois espèces parmi elles ont l'enzyme spécifique de la réduction des nitrates : la nitrate réductase. Ces espèces sont *Pseudomonas luteola*, *Aeromonas hydrophila* et *Enterobacter cloacae*. Les taux de la dénitrification et de la croissance se diffèrent selon l'espèce.

*Pseudomonas luteola* a donné une bonne réduction des nitrates dans un intervalle de temps très court avec le glucose et elle n'a pas pu utiliser le lactose comme source de carbone (ONPG -), elle possède une enzyme nitrate réductase périplasmique ; elle n'a pas besoin de transporter les nitrates au cytoplasme pour les réduire ce qui permet de réduire le temps de la réaction. Cette hypothèse nécessite d'autres études pour être confirmée, et pour montrer que la nitrate réductase périplasmique a une influence directe sur le temps de la dénitrification.

Comme la réduction des nitrates est une réaction consommatrice des protons, on a utilisé l'évolution du pH de milieu comme un indicateur de la présence de cette réaction, l'apparitions de gaz aussi montre des résultats positifs.

En comparant les résultats obtenus avec les cultures mixtes et les cultures pures, on a trouvé que la culture mixte peut résister et survivre plus que les cultures pures, d'autre part, la culture mixte chargée par plusieurs espèces a la capacité d'utiliser une grande variété des

substrats tandis que, les cultures pures utilisent des substrats selon leurs capacités enzymatiques.

La combinaison des souches bactériennes (culture mixte) provoque une résistance et augmentation de durée de vie et donc augmentation du rendement de dénitrification.

En perspective, on peut prévoir l'étude de plusieurs aspects complémentaires à nos résultats :

- Il est indispensable de varier d'autres paramètres de la culture en batch avec les cultures mixtes, afin d'optimiser les conditions nécessaires pour un bon rendement.
- Il serait intéressant d'utiliser des méthodes moléculaires ; pour identifier les espèces bactériennes dénitrifiantes.
- Il serait également intéressant d'augmenter l'échelle de notre bioréacteur, pour effectuer des études à l'échelle industrielle.
- D'autres études génétiques sont nécessaires pour bien comprendre le mécanisme du travail des enzymes ; nitrate réductase et nitrate réductase périplasmique.

*REFERENCES*

*BIBLIOGRAPHIQUE*

- **Akmouci-Toumi S., 2009.** Contribution à l'étude des boues de forage : Isolement et évaluation de la capacité de quelques souches microbiennes à dégrader le gasoil. *Mémoire de Magister, Département de Biologie, Université de Boumerdes, Algérie.*
- **Amouha M., Gholam R., Nabi B. et Behnam H., 2011.** Nanofiltration Efficiency in Nitrate Removal from Groundwater: A Semi-Industrial Case Study. *IACSIT Press, Singapore*, vol.17, pp. 232-236.
- **Anzai Y., yuko K. et Hiroshi O., 1997.** The Phylogeny of the Genera *Chryseomonas*, *Flavimonas*, and *Pseudomonas* Supports Synonymy of These Three Genera. *International journal of systematic bacteriology*, Vol. 47, N° 2, pp. 249-251.
- **Association Santé Environnement France, 2010.** Pollution de l'eau : Origines et impacts.
- **Augustin J., 2005.** Modélisation de la croissance microbienne et gestion de la sécurité sanitaire des aliments. *Mémoire pour l'obtention de l'habilitation à diriger des recherches, l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Université de Paris XII Val de Marne.*
- **Banas D. et Lata J., 2005.** Les nitrates. *Document technique.*
- **Bassompierre C., 2007.** Procédé à boues activées pour le traitement d'effluents papetiers : de la conception d'un pilote à la validation de modèles. *Thèse de Doctorat, Institut national polytechnique de Grenoble.*
- **Baumont S., Camard J.P., Lefranc A., Francon A., 2000.** Réutilisation des eaux usées épurées : risques sanitaire et faisabilité en Ile-de France, *Paris: 12-13, 27-29.*
- **Bendriss-Amraoui M., 2002.** Contribution à l'étude du métabolisme du nitrate chez quelques variétés marocaines de blé tendre. *Thèse de Doctorat, Faculté des sciences Dhar El mahraz Fès, Maroc.*
- **Bennouna M. et Kehal S., 2001.** Production de Méthane à Partir des Boues des Stations d'Épuration des Eaux Usées : Potentiel Existant en Algérie. *Revue des Energies Renouvelables. : Production et Valorisation – Biomasse*, pp. 29-36.
- **Bernard S. et Gray N.F., 2000.** Aerobic digestion of pharmaceutical and domestic wastewater sludge at ambient temperature. *Water Research*, Vol. 34, N°3, pp. 725-734.
- **Betlach, R.M. et Tiedje, M.J., 1981.** Kinetic explanation for accumulation of nitrite, nitric Oxide and nitrous oxid during bacterial denitrification. *J. Appl. Environ. Microbiol*, Vol. 42, pp. 1074-1084.

- **BOUGARD D., 2004.** Traitement biologique d'effluents azotes avec arrêt de la nitrification au stade nitrite. *Thèse de Doctorat, L'école nationale supérieure agronomique de Montpellier, France.*
- **Bougherara H., 2007.** La biodégradation par culture mixte en réacteur batch. *Mémoire de Magister, Département de chimie, Université de Constantine, Algérie.*
- **Bouranene S., 2008.** Etude de la rétention de solutés neutres et ioniques par des membranes de nanofiltration. *Thèse de Doctorat, Ecole doctorale de Louis Pasteur, UTINAM, Besançon, France.*
- **Bousseboua H., 2002.** Techniques d'étude des bactéries. Dans *Microbiologie générale. Ed. de l'université Mentouri, Constantine (Algérie), pp.145-157.*
- **Cébron A., 2004.** Nitrification, bactérie nitrifiantes et émission de N<sub>2</sub>O. *Thèse de Doctorat, écologie microbienne-sciences de l'eau, Université Paris VI-Pierre et Marie Curie, France.*
- **Chan Thomas Y.K., 2011.** Vegetable-borne nitrate and nitrite and the risk of methaemoglobinaemia. *Toxicology Letters, Vol. 200, pp. 107-108.*
- **Constantin H. et Fick M. , 1997.** Influence of c-sources on the denitrification rate of a high-nitrate concentrated industrial wastewater. *Water Research, Vol. 31, N° 3, pp. 583-589.*
- **Coutière B., 1999.** Nouveau procédé de dénitrification des eaux par le fer métallique. *Thèse de Doctorat, Université de Limoges, Limoges, France.*
- **Dafri A., 2008.** Biodégradation des crésols par le microbiote des eaux usées de la ville de Constantine. *Mémoire de Magister, Institut de microbiologie. Université de Constantine, Algérie.*
- **Derbal K., 2008.** Digestion anaérobie des déchets Solides mélanges avec les boues De station d'épuration. *Thèse de Doctorat, département de chimie industrielle, Université de Constantine, Algérie.*
- **Deronzier G. et al., 2001.** Traitement de l'azote dans les stations d'épuration biologique des petites collectivités. Document technique, *Cemagref, FNDAE. N° 25.*
- **Du S., Zhang Y. et Lin X., 2007.** Accumulation of Nitrate in Vegetables and Its Possible Implications to Human Health. *Agricultural Sciences in China, Vol. 6 N° 10, pp. 1246-1255.*

- **Foglar L. et Briski F., 2003.** Wastewater denitrification process, the influence of methanol and kinetic analysis. *Process Biochemistry, Vol.39, pp. 95-103.*
- **Fusari C., 2007.** Réalisation et optimisation d'un dénitrificateur autotrophe à l'Aquarium de La Rochelle. *Rapport du stage, LP ACA.*
- **Galez P., 2011.** Spectrométrie UV / VISIBLE. *Mesures Physiques Annecy – MPh2 SE3 ME3.*
- **Garcia J.L., 1981.** La biosynthèse des enzymes de la dénitrification chez cinq bactéries dénitrifiantes. *Cah. ORSTOM, sér. Biol., Vol. 43, pp. 3-6.*
- **Garcia J.L., Roussos S. et Ensoussan M.B., 1981.** Etude taxonomique de bactéries dénitrifiantes isolées sur benzoate dans des sols de rizières du Sénégal. *Cah. ORSTOM, sér. Biol., Vol. 43, pp.13-25.*
- **Goudot S. et Tap J., 2003.** Les nitrates. *IUP biotechnologique et bio-industrie spécialité.*
- **Grant I.F., 2000.** Les transformations dans le sol. *Natural Resources Institute, University of Greenwich at Medway, Central Avenue, Chatham Maritime, Kent ME4 4TB, Royaume-Uni.*
- **Guenfoud N., 2009.** Qualité des eaux de consommation dans la région de Constantine Teneur en nitrates et nitrites. *Mémoire de Magister, Institut de la nutrition, de l'alimentation et des technologies agro-alimentaires (INATAA). Université de Constantine, Algérie.*
- **Guibing Z., Yongzhen P., Liming Z., Yu W. et Shuying W., 2009.** Performance and optimization of biological nitrogen removal process enhanced by anoxic/oxic step feeding. *Biochemical Engineering Journal, Vol. 43, pp. 280–287.*
- **Guiraud J.P., 1998.** Microbiologie alimentaire. *Dunod, Paris, 615p.*
- **Guy A., 2003.** Les boues d'épuration Et leurs perspectives de gestion en Île-de-France. *Au nom de la commission Agriculture, environnement, Ruralité Adopté par le CESR, pp.14-120.*
- **Hallin S. et Pell M., 1998.** Metabolic properties of denitrifying bacteria adapting to methanol and ethanol in activated sludge. *Water Research, Vol.32, N° 1, pp. 13-18.*
- **Hammadi L., Ponton A. et Belhadri M., 2008.** Effet de traitement thermique sur le comportement physico-chimique et rhéologique des boues activées de station d'épuration. *Revue des Energies Renouvelables, Vol. 11 N° 3, pp. 465 – 472.*

- **Hamon M., 2007.** Les nitrates peuvent-ils induire une toxicité indirecte ? Can nitrates lead to indirect toxicity. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, pp. 347-355.
- **Hignette M., Lamort B., Langouet M., Ieroy S. et Martin G., 1996.** Elimination des nitrates par filtration biologique autotrophe sur soufre en aquariologie marine. *Mém. Inst. Océano. P. Ricard*, pp. 7-13.
- **Idrissi L., 2006.** Nitrates et nitrites Polluants qui menacent la santé et l'environnement. *Les technologies de laboratoire, Vol.1*, pp. 10-14.
- **Jorddan T. E. et Weller D. E., 1996.** Human contribution to terrestrial nitrogen flux: assessing the sources and fates of anthropogenic fixed nitrogen. *BioScience, Vol. 46*.
- **Kraft B., Marc S. et Halina T., 2011.** Microbial nitrate respiration – Genes, enzymes and environmental distribution. *Journal of Biotechnology, Vol.155*, pp.104- 117.
- **Leclerc H., 2008.** Nitrates de l'eau d'alimentation et risques pour la santé. *Copyright-Académie d'Agriculture de France*.
- **Leyral G. et Vierling E., 2007.** Microbiologie et toxicologie des aliments (hygiène et sécurité alimentaires). 4<sup>ème</sup> édition, *DOIN, Paris*, p. 54.
- **Mammeri L., 2007.** Etude de la réaction de dénitrification par l'utilisation du succinate de sodium comme source de carbone. *Mémoire de Magister, Département de chimie, université de Constantine, Algérie*.
- **Marchal N., et Bourdon J.L., 1982.** Les milieux de cultures pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. *Ed. Doin, Paris*.
- **Martin G., 1982<sub>b</sub>.** Point sur l'épuration et le traitement d'effluents (eau, air). *Techniques et Documentation ed. Lavoisier, Paris, Vol. 1*.
- **Martin, G., 1979<sub>a</sub>.** Le problème de l'azote dans les eaux. *Techniques et Documentation ed. Lavoisier, Paris, Vol.1*.
- **Ménesguen A., 2003.** Les "marées vertes" en Bretagne, la responsabilité du nitrate. *Centre de Brest, Direction de l'Environnement et de l'Aménagement du Littoral, IFREMER*.
- **Merceron M., Virginie A., Isabelle A., Philippe M., 2007.** In situ growth potential of the subtidal part of green tide forming *Ulva* spp. Stocks. *Science of the Total Environment, Vol. 384*, pp. 293-305.
- **Metiche M., 2004.** Environnement : Phénomènes de pollution Et techniques de protection. *Centre Universitaire de Béchar, Algérie*.

- **Meybeck M., 1982.** Carbon, Nitrogen, and Phosphorus transport by World Rivers. *American journal of sciences, Vol. 282, pp. 401-450.*
- **Meyer A., Diana J. et Lecler H., 1999.** Cours de microbiologie générale. *Ed. Dion, paris, pp 128-140*
- **Muller B., 1992.** Régulation de l'absorption racinaire de nitrate par les produits de son assimilation foliaire. *Thèse de Doctorat, Ecole nationale supérieure agronomique de Montpellier, Montpellier, France.*
- **Nag-Choul C. et Dong-Ju K., 2007.** Two-Stage Removal of Nitrate from Groundwater Using Biological and Chemical Treatments. *Journal of bioscience and bioengine ering, Vol. 104, N° 2, pp. 129–134.*
- **Ndala S.M., Scholes M.C. et Fey M.V., 2006.** Soil properties and processes driving the leaching of nitrate in the forested catchments of the eastern escarpment of South Africa. *Forest Ecology and Management, Vol. 236, pp. 142–152.*
- **Nozawa T. et Maruyama Y., 1988.** Denitrification by a soil bacterium with phthalate and other aromatic compounds as substrates. *J Bacterial, Vol. 170, N°6, pp.2501–2505.*
- **Odile-Ratel M., 1992.** Elimination des nitrates des eaux potables. *Document technique, FNDAE, Paris.*
- **Pambrun V., 2005.** Analyse et modélisation de la nitrification partielle et de la précipitation concomitante du phosphore dans un réacteur à alimentation séquencée. *Thèse de Doctorat, Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse.*
- **Patureau, D., 1995.** Etude cinétique et physiologique d'une bactérie dénitrifiant en conditions aérobie, suivi d'un réacteur aéré, parfaitement mélangé, en culture pure et en culture mixte associé à une flore nitrifiante. *Thèse de Doctorat, Université de Toulouse.*
- **Paugam L., Taha S., Cabon J. , Gondrexon N. et Dorange G., 2001.** Nanofiltration de solutions de nitrate d'ammonium. Etude des paramètres influents. *Revue des sciences de l'eau / Journal of Water Science, Vol. 14, N° 4, pp. 511-523.*
- **Pelmont J., 2005.** Biodégradations et métabolismes, Les bactéries pour les technologies de l'environnement. *EDP Sciences, pp. 147-148.*
- **Philippot L. et HÖjberg O., 1999.** Dissimilatory nitrate reductases in bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta, Vol. 1446, pp. 1-23.*

- **Portejoie 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., Vol. 15, N° 3, pp. 151-160.*
- **Prescott, Harley et Klein, 2003.** Microbiologie. 2<sup>ème</sup> édition, de boeck, Bruxelles, p.28.
- **Pujol R., Vachon A., Martin G., 1990.** Guide technique sur le foisonnement des boues activées. *Document technique FNDAE, N°8.*
- **Rene S.H., Jaap A., Marcel V., 2003.** Identification of thermotolerant *Campylobacter*. *A global Salmonella surveillance and laboratory support project of the World Health Organization, Global Salm-Surv, 5<sup>ème</sup> édition.*
- **Rhee S., Jay J. et Lee S., 1997.** Nitrite accumulation in a sequencing batch reactor during the aerobic phase of biological nitrogen removal. *Biotechnology Letters, Vol. 19, N° 2, pp. 195-198.*
- **Rick W. et Stuart T., 2001.** Microbial nitrogen cycles: physiology, genomics and applications. *Current Opinion in Microbiology, Vol. 4, pp. 307-312.*
- **Rodier J., 2009.** L'analyse de l'eau. Neuvième édition, Dunod, Paris, pp. 327-329.
- **Rodriguez-Garcia A., 2004.** Etude de la congélation comme technique de traitement des eaux : applications spécifiques. *Thèse de Doctorat, institut national des sciences appliquées de Toulouse.*
- **Schoeller H.J., 1975.** La pollution des eaux souterraines. *IAHS-AISH Publ. N° 103.*
- **Schuddboom L., 1993.** Nitrates et Nitrites dans les denrées alimentaires. *Editions du Conseil de l'Europe.*
- **Sharifi-Yazdi M., Azimi C., Khalili M., 2001.** Isolation and Identification of Bacteria Present in the Activated Sludge Unit, in the Treatment of Industrial Waste Water. *Iranian J. Publ. Health, Vol. 30, pp. 91-94.*
- **Slavomíra et al., 2011.** Biotransformation of methanol and formaldehyde by bacteria isolated from clouds, Comparison with radical chemistry. *Atmospheric Environment Vol. 45, pp. 6093-6102.*
- **Suh, Y. J. et Roussaux, P, 2002.** An LCA of alternative wastewater sludge treatment scenarios. *Resources, Conservation and Recycling, Vol. 35, pp. 191-200.*
- **Sukalyan S., 2006.** Autotrophic Biological Denitrification with Elemental Sulfur or Hydrogen for Complete Removal of Nitrate-Nitrogen from a Septic System

Wastewater. *The NOAA/UNH Cooperative Institute for Coastal and Estuarine Environmental Technology (CICEET)*.

- **Tiedje, J.M., 1988.** Ecology of Denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium, In A.J.B. Zehnder. *Biology of anaerobic Microorganisms*, New-York, JohnWeiley and sons. pp. 179- 244.
- **Vaillant J.R., 1974.** Perfectionnement et nouveautés pour l'épuration des eaux résiduaires. *Eyrolles, Paris: 21-24, pp. 236-237.*
- **Valat C., 2005.** Développement d'outils biologiques pour le diagnostic Environnemental. *Thèse de Doctorat, l'Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne Et l'Université Jean Monnet de Saint-Etienne, France.*
- **Wisjnuprpto, 1981.** Mise au point d'un procédé biologique compact de dépollution (étude de l'élimination du carbone, de l'azote et du phosphate). *Thèse de Doctorat, institut de chimie industrielle. INSA de Toulouse.*
- **Yapo O. et al., 2009.** Searching for Parameters Optimising the Biological Denitrification of Nitrate-and Ammonium-Rich Well Waters by Private Slow Sand Filtration Reactors. *European Journal of Scientific Research, Vol.26 N° 4, pp.565-576.*
- **Young-Woon L. et al., 2005.** Diversity of Denitrifying Bacteria Isolated from Daejeon Sewage Treatment Plant. *The Journal of Microbiology, Vol. 43, N° 5, pp.383-390.*
- **Yu L., 2003.** Chemically reduced excess sludge production in the activated sludge process. *Chemosphere, Vol. 50, pp. 1-7.*

# *ANNEXES*

### *Annexe 1. La loi de Beer Lambert*

Cette loi exprime que la diminution de l'intensité lumineuse (donc des nombres des photons) d'une radiation monochromatique est proportionnelle au nombre de particules (atomes ou molécules) qui absorbent.

Soit  $dI/dn = -kI$ , où  $dI$  est l'intensité lumineuse absorbée à partir d'une valeur  $I$  de l'intensité, par l'augmentation  $dn$  du nombre de particules absorbantes,  $k$  est une constante.

Par l'intégration entre les limites :  $I_0$  intensité initiale et  $I$  intensité finale.

$$\int_{I_0}^I dI/I = -k \int_0^k dn$$

On obtient:

$$\ln I/I_0 = -kN \quad N \text{ est le nombre de molécules ayant absorbées.}$$

$\ln I/I_0$  est l'absorbance (ABS).

$$\text{Donc : } ABS = \ln I/I_0 = -kN$$

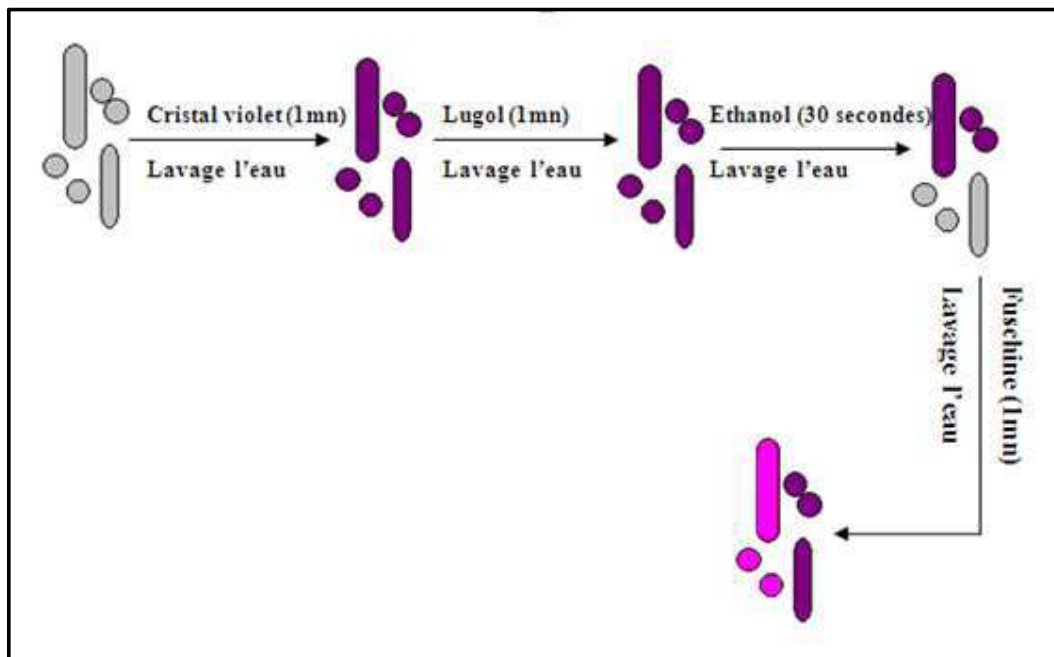
## Annexe 2. Protocole de la coloration de Gram

La coloration de Gram développée en 1884 par le médecin danois Christian Gram, est la méthode de coloration la plus utilisée en bactériologie. Ce procédé de coloration différentielle devise les bactéries en deux classes : Gram positif et Gram négatif.

Dans les premières étapes du procédé de coloration de Gram, le frottis est coloré avec le cristal violet, un colorant basique. Ensuite, la préparation est traitée avec le lugol qui augmente l'interaction entre les cellules et le colorant pour que les cellules soient plus fortement contrastées.

Le frottis est ensuite décoloré par lavage avec de l'éthanol ou de l'acétone. Cette étape engendre l'aspect différentiel de la coloration de Gram : les bactéries Gram positif gardent le cristal violet, tandis que les bactéries Gram négatif le perdent et se décolorent.

Enfin, le frottis est contre coloré à l'aide d'un colorant basique de couleur différente, la safranine ou la fuschine sont les plus utilisés. Ce colorant colore les bactéries Gram négatif en rose et laisse les bactéries Gram positif colorées en violet foncé (figure 27).



**Figure 27.** Les étapes de la coloration de Gram.

### Annexe 3. Protocole de dosage des nitrates par colorimétrie

#### Méthode au salicylate de sodium

##### Principe

En présence de salicylate de sodium, les nitrates donnent du paranitrosalicylate 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.

\* 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 de 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<sup>-1</sup> :

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<sup>-1</sup>.

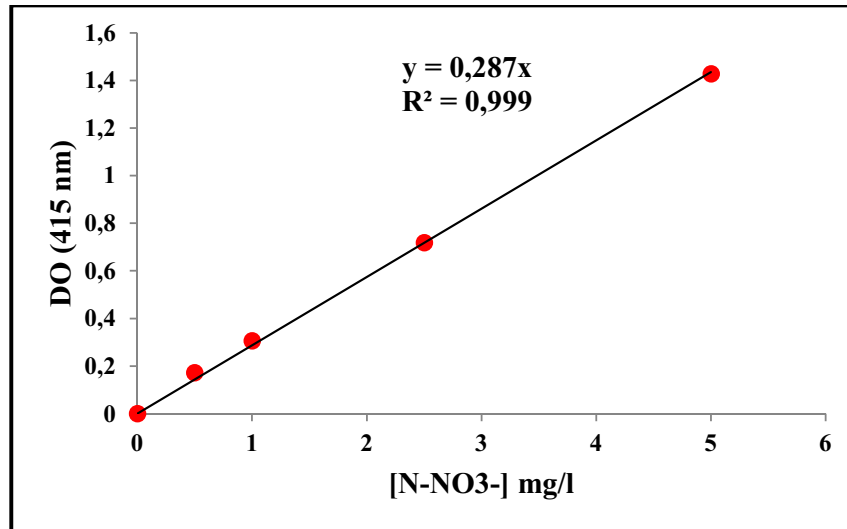
Amener 50 ml de la solution mère à 1000 ml avec de l'eau distillée

##### Etablissement de la courbe d'étalonnage

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

Numéro des capsules	T	I	II	III	IV
Solution d'étalon d'azote nitrique à 0,005g.l <sup>-1</sup> (ml)	0	1	2	5	10
Eau distillée (ml)	10	9	8	5	0
Solution de salicylate de sodium (ml)	1	1	1	1	1
Correspondance en mg.L-1 d'azote nitrique	0	0,5	1	2,5	5

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.



**Figure 28.** Droite d'étalonnage du dosage des nitrates.

### Mode opératoire

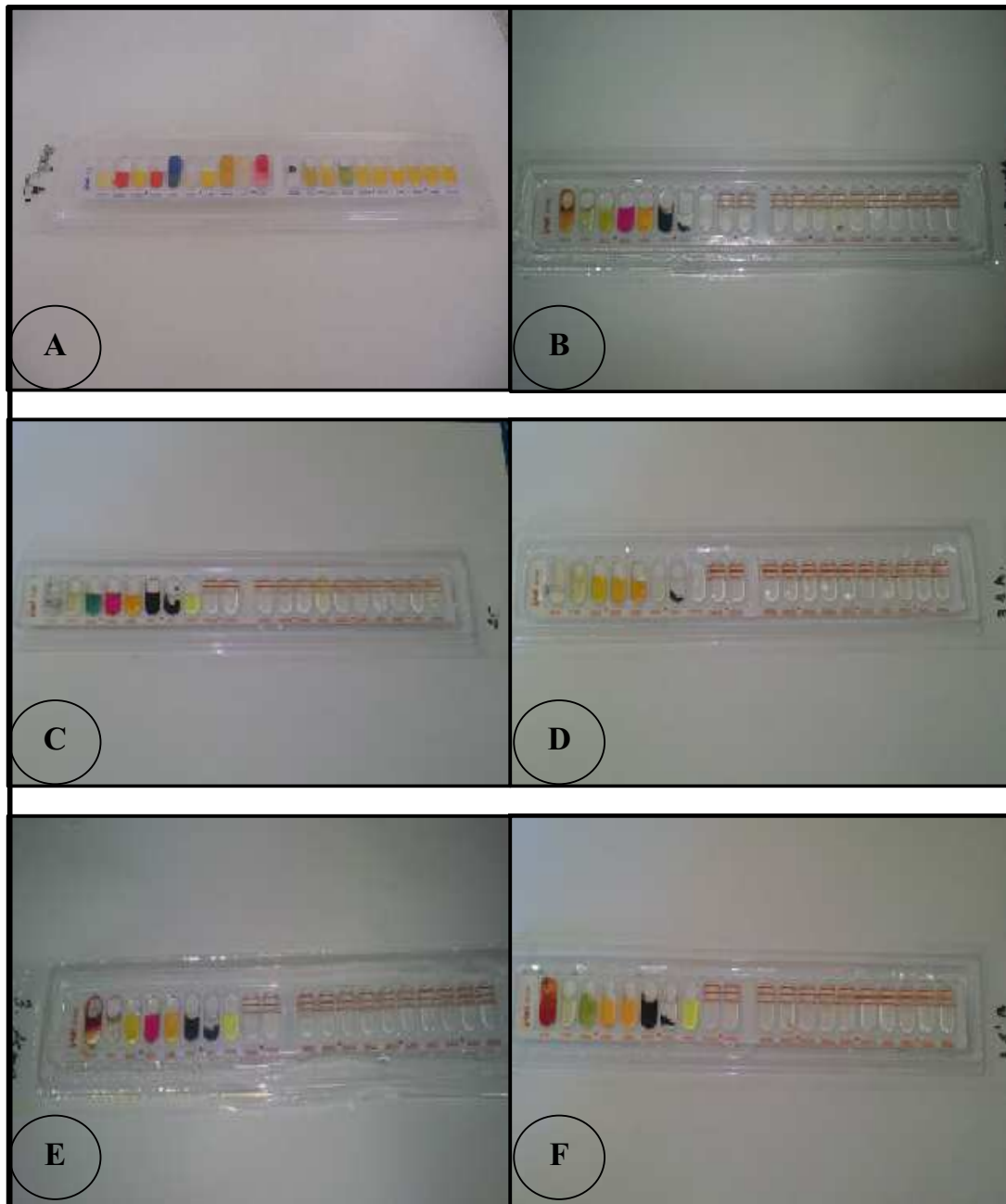
Introduire 10 ml d'eau dans une capsule de 60 ml (pour des teneurs en azote nitrique supérieures à 10 mg.L<sup>-1</sup>, opérer une dilution). Alcaliniser faiblement avec la solution d'hydroxyde de sodium. Ajouter 1 ml de solution de salicylate de sodium puis poursuivre le dosage comme pour la courbe 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.

### Expression des résultats

Pour une prise d'essai de 10 ml, la courbe donne directement la teneur en azote nitrique exprimée en milligrammes par litre d'eau. Pour obtenir la teneur en nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), multiplier ce résultat par 4,43.

## Annexe 4. Les résultats des galeries API



**Figure 29.** Photographie des galeries API utilisées pour identification des souches bactériennes isolées.

- A : API 20 E représente *Enterobacter cloacae*
- B : API 20 NE représente *Pseudomonas luteola*
- C : API 20 E représente *Burkholderia cepacia*
- D : API 20 NE représente *Moraxella spp.*
- E : API 20 NE représente *Aeromonas hydrophila*
- F : API 20 NE représente *Sphingomonas paucimobilis*

## *Résumé*

Ce travail a comme but d'étudier le phénomène de la dénitrification biologique des eaux usées, tout en utilisant dans un premier lieu, une culture bactérienne mixte constituée de différentes bactéries présentes dans la boue activée prélevée de la station d'épuration de KHENCHELA et par la suite, on a utilisé des cultures bactériennes pures isolées à partir de la même boue activée.

Nos expériences sont réalisées dans une série des réacteurs en batch, incubés en anaérobiose dans une jarre à bougie à 30°C avec plusieurs natures de sources de carbone.

Les premières expériences avec les cultures mixtes ont montré des cinétiques de croissance et de dénitrification différentes. Ces cinétiques dépendent directement de la nature, la biodégradabilité et la concentration de la source de carbone. L'utilisation du glucose permet aux bactéries une bonne croissance avec un rendement de dénitrification élevé

En plus, les expériences réalisées avec les cultures pures ont permis d'isoler six espèces identifiées comme : *Pseudomonas luteola*, *Aeromonas hydrophila*, *Enterobacter cloacae*, *Moraxella spp*, *Sphingomonas paucimobilis* et *Burkholderia cepacia*. Elles démontrent qu'ils existent des espèces bactériennes capables de réduire les nitrates avec un taux de réduction assez important et avec des concentrations différentes de sources de carbones.

### ***Mots clés :***

*Dénitrification biologique, culture mixte, culture pure, batch.*

## *Abstract*

**T**he purpose of this work is to study the phenomenon of biological denitrification by using mixed culture taken from activated sludge of sewage treatment plant of KHENCHELA and pure culture isolated from the same activated sludge.

Our experiences were made in serial batch reactors incubated anaerobically in a candle jar at 30 ° C with several types of carbon sources.

The first experiments with mixed cultures show different growth kinetics and denitrification. These kinetic depend directly to the nature, biodegradability and concentration of carbon source. The use of glucose allows bacteria to grow well with high denitrification yield.

However, our experiments with pure cultures allows us to isolate six species identified as *Pseudomonas luteola*, *Aeromonas hydrophila*, *Enterobacter cloacae*, *Moraxella spp*, *Sphingomonas paucimobilis* and *Burkholderia cepacia*,. They show the existence of bacterial species able to reduce nitrates with reduction rate rather important at different carbon sources.

### ***Keywords:***

*Denitrification, mixed culture, pure culture, methanol, batch.*

# \$% &\$" !

.4)\$ ! - & / 01 2 ) 3 & ) \* +\$, - ' ( ) \$

7 & : ; / 01 (! < +\$ ' ( ) \$8 09 5# 67 5#

7\* F # 30 ( , -3D6E = \$?@ B 6 C>\* #9= -

J( 6 < +G J( 19 & ) \* +G , - H = - 5 %

H ( # < +\$ OP < M D \*N67I \$+. E ( D K A0\$L . ) \*

7ND . J \$ R 0 D KQ ; ) K

\* +\$ T A O (SC (! \* +\$ 9' ( ) \$ > \* #9 = - 9

*Pseudomonas luteola, Aeromonas hydrophilae, Enterobacter cloacae, Moraxella spp* C

*Burkholderia cepacia* و *Sphingomonas paucimobilis*

( # +4\$W C D KQ ; ) KO, (S 5 \* +\$(# KV = - ( > @

7 K; X3\$

( .+

7 Z Y (! < +\$ Y& ) \* +\$, - Y # \$% 2 Y

Nom : **KHEDDOUMA**  
Prénom : **Asma**

Date de soutenance / / 2012

**Diplôme : Magister**

**Thème : Elimination Des Nitrates Des Eaux Usées De La Région De Khenchela, Par  
Procédé Biologique**

**Résumé**

Ce travail a comme but d'étudier le phénomène de la dénitrification biologique des eaux usées, tout en utilisant dans un premier lieu, une culture bactérienne mixte constituée de différentes bactéries présentes dans la boue activée prélevée de la station d'épuration de KHENCHELA et par la suite, on a utilisé des cultures bactériennes pures isolées à partir de la même boue activée. Nos expériences sont réalisées dans une série de réacteurs en batch, incubés en anaérobiose dans une jarre à bougie à 30°C avec plusieurs natures de sources de carbone.

Les premières expériences avec les cultures mixtes ont montré des cinétiques de croissance et de dénitrification différentes. Ces cinétiques dépendent directement de la nature, la biodégradabilité et la concentration de la source de carbone. L'utilisation du glucose permet aux bactéries une bonne croissance avec un rendement de dénitrification élevé.

En plus, les expériences réalisées avec les cultures pures ont permis d'isoler six espèces identifiées comme : *Pseudomonas luteola*, *Aeromonas hydrophila*, *Enterobacter cloacae*, *Moraxella spp*, *Sphingomonas paucimobilis* et *Burkholderia cepacia*. Elles démontrent qu'il existe des espèces bactériennes capables de réduire les nitrates avec un taux de réduction assez important et avec des concentrations différentes de sources de carbones.

**Mots clés :**

*Dénitrification biologique, culture mixte, culture pure, batch.*

**Directeur de recherche : M.BENOUNIS M**

**Devant le jury :**

<b>Président :</b>	<b>M. BENALI-CHERIF N.</b> (Prof)	Univ. Abbès Laghrour - Khenchela.
<b>Examineurs :</b>	<b>M. HOUHAMDI M.</b> (Prof)	Univ. 08 Mai 1945 – Guelma.
	<b>M. DARBOUCHE A.</b> (MCA)	Univ. Abbès Laghrour Khenchela.
<b>Membre invité :</b>	<b>M. AYACHI A.</b> (MCA)	Univ. Hadj Lakhdar- Batna.

الغرض من هذا العمل هو دراسة ظاهرة نزع النترات من مياه الصرف الصحي، بطرق بيولوجية باستخدام مجموعة بكتيرية مختلطة مستخلصة من طين مأخوذ من محطة معالجة مياه الصرف الصحي بنشلة من جهة . ومن جهة أخرى باستخدام نوع بكتيري محدد مأخوذ من نفس الطين. التجارب أجريت في وسط ملائم وبغياب الأوكسجين عند 30 درجة مئوية. وأظهرت التجارب مع المجموعة البكتيرية المختلطة أن معدل النمو البكتيري و معدل نزع النترات يختلف باختلاف تركيز المصدر الأساسي للكربون . وزيادة هذا التركيز يؤدي إلى نمو بكتيري جيد مع تخفيض تركيز النترات خاصة باستعمال الغلوكوز . أما التجارب التي أجريت باستخدام أنواع بكتيريا محددة فقد ادت الى استخلاص انواع بكتيرية معرفة *Pseudomonas luteola, Aeromonas hydrophila, Enterobacter cloacae, Moraxella spp Burkholderia cepacia و Sphingomonas paucimobilis* أثبتت هذه التجارب انه توجد بكتيريات لها القدرة على تخفيض تركيز النترات في الماء بشكل جيد وبنسب متفاوتة .

#### الكلمات الدالة

نزع النترات- طرق بيولوجية - مجموعة بكتيرية مختلطة- نوع بكتيري محدد-الميثانول.