



HAL
open science

Dénitrification des eaux en présence d'acides gras volatils

Sylvain Fass

► **To cite this version:**

Sylvain Fass. Dénitrification des eaux en présence d'acides gras volatils. Chimie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 1994. Français. NNT : 1994NAN10443 . tel-01747144

HAL Id: tel-01747144

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01747144>

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

DB 5691

UNIVERSITE DE NANCY I
1994

ÉCOLE DOCTORALE "BIOLOGIE ET SANTÉ"

THESE

Présentée et soutenue publiquement

le 12 juillet 1994

Pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE NANCY I

Mention Chimie et Microbiologie de l'Eau

par

Sylvain FASS

Titulaire du Diplôme d'Etudes Approfondies Chimie et Microbiologie de l'Eau

DENITRIFICATION DES EAUX EN PRESENCE D'ACIDES GRAS VOLATILS



MEMBRES DU JURY

- Président : J.C. BLOCK, Professeur (Université de Nancy I)
- Juges : P. BONIN, Chargée de Recherche CNRS (Université de Marseille)
J. MANEM, Docteur (CIRSEE Lyonnaise des Eaux - Dumez)
- Rapporteurs : A. GRASMICK, Professeur (Université de Montpellier)
W. VERSTRAETE, Professeur (Université de Gand, Belgique)



104 030133 6

Résumé

La dénitrification biologique des eaux représente un procédé extrêmement intéressant puisqu'il permet, *via* un mécanisme de respiration, d'éliminer la pollution azotée (nitrates et nitrites) sous forme de N_2 , *i.e.* sans laisser de résidu. Pour réaliser cette réaction les micro-organismes ont besoin d'un apport de substrat donneur de carbone et d'électrons, qui peut être le méthanol, l'eau usée... D'un point de vue économique, il est plus rentable de pouvoir utiliser les sous-produits de l'hydrolyse anaérobie partielle des boues activées tels les acides gras volatils (AGV) à courte chaîne (acides acétique, propionique, butyrique, valérique).

L'objet principal de ce travail est de déterminer parmi les acides acétique, propionique, butyrique et valérique lequel de ces substrats permet d'éliminer les nitrates à la vitesse la plus élevée, et si possible avec la production de biomasse la plus faible.

Pour répondre à cet objectif, il a été nécessaire de réaliser une culture en continu (initialement inoculée à partir d'une boue activée) alimentée avec les nitrates comme seul accepteur d'électrons et avec les 4 AGV comme seuls donneurs d'électrons. Cette culture a été caractérisée en terme d'espèces bactériennes majoritaires, ainsi qu'en terme de constantes cinétiques. Une dizaine d'espèces cohabitent à l'état pseudo stationnaire, avec entre autre *Alcaligenes*, *Ochrobactrum anthropi* et *Pasteurella*, et présentent des métabolismes respiratoires variés (86 % des espèces réduisent les nitrates en gaz, 10 % s'arrêtent au stade nitrites et 4 % respirent les nitrates extrêmement lentement).

Pour comparer les acides gras entre eux, les vitesses de dénitrification et de consommation du substrat carboné ont été déterminées avec une biomasse mixte. Le propionate se différencie des autres AGV avec une vitesse de consommation du carbone égale à $8 \text{ mg C} \cdot \text{g}^{-1} \text{ MES} \cdot \text{h}^{-1}$ et des oxydes d'azotes de $3 \text{ mg N-NO}_x \cdot \text{g}^{-1} \text{ MES} \cdot \text{h}^{-1}$. Les trois autres AGV (acides acétique, butyrique et valérique), quelles que soient les conditions expérimentales, sont consommés à la même vitesse spécifique d'environ $60 \text{ mg C} \cdot \text{g}^{-1} \text{ MES} \cdot \text{h}^{-1}$, les vitesses de dénitrification étant également du même ordre de grandeur soit $19 \text{ mg N-NO}_x \cdot \text{g}^{-1} \text{ MES} \cdot \text{h}^{-1}$. Ce résultat assez surprenant eu égard aux états d'oxydation moyen du carbone de chaque AGV : 0 pour l'acétate, -0,67 pour le propionate, -1 pour le butyrate et -1,2 pour le valérate, a été expliqué par le fait que la production de biomasse varie en fonction de l'AGV : le valérate induit la production de biomasse maximale, et l'acétate en produit le moins ; le butyrate amenant une production de biomasse moyenne. Un bilan sur le carbone et les électrons, basé sur le modèle de McCarty (1969) a permis de valider notre démarche expérimentale.

Une comparaison des vitesses calculées avec des biomasses mixtes et des souches pures a été effectuée. A titre d'exemple, *Alcaligenes denitrificans subsp denitrificans* réduit les nitrates en gaz en accumulant des nitrites uniquement avec l'acétate, et consomme les 4 AGV à des vitesses spécifiques comprises entre 18 et 28 mg C . g⁻¹ MES . h⁻¹ ; *Pseudomonas mendocina* consomme préférentiellement l'acétate (11 mg C . g⁻¹ MES . h⁻¹), moyennement le propionate et le valérate (7 mg C . g⁻¹ MES . h⁻¹) et faiblement le butyrate (2,6 mg C . g⁻¹ MES . h⁻¹), et réduit les nitrates en gaz (avec une accumulation stœchiométrique des nitrites avec l'acétate) ; enfin *Comamonas testosteroni* réduit les nitrates uniquement en nitrites, ne consomme pas du tout le propionate, et consomme les 3 autres AGV à des vitesses comprises entre 5 et 17 mg C . g⁻¹ MES . h⁻¹. Ainsi la culture bactérienne dénitrifiante est composée d'un mélange d'espèces bactériennes possédant chacune son métabolisme propre vis à vis du substrat et des nitrates.

La réaction de dénitrification comporte comme intermédiaire obligatoire l'ion nitrite, dont l'accumulation transitoire est indésirable particulièrement dans le cas d'une eau à potabiliser. Nous avons montré que quatre paramètres au moins ont une influence directe sur cette accumulation transitoire de nitrites : les variations du pH, de la température, la nature de la souche bactérienne et la source de carbone.

(a) Dans nos conditions expérimentales, une augmentation du pH de 1 unité provoque une augmentation de la concentration en nitrites de 177 mg N-NO₂⁻ . L⁻¹ . j⁻¹, ce qui correspond à 25 % de la charge volumique entrante (culture alimentée avec un mélange d'AGV) ou de 24 mg N-NO₂⁻ . L⁻¹ . j⁻¹, ce qui correspond à 10 % de la charge volumique entrante (culture alimentée avec de l'éthanol).

(b) Une augmentation de la température de 1 °C amène une production de nitrites de 0,15 mg N-NO₂⁻ . L⁻¹. Cette accumulation de nitrites dépend des variations de la température et non de la température elle-même, dans les limites des essais effectués (*i.e.* augmentation de 19 à 27 °C).

(c) Certaines souches présentes dans la culture bactérienne mixte sont incapables de réduire les nitrates au delà du stade nitrites (par exemple *Comamonas testosteroni*). Les nitrites produits par cette espèce minoritaire (abondance : 3 %) sont consommés par d'autres bactéries.

(d) Enfin l'ajout d'acétate provoque systématiquement dans nos expériences une accumulation transitoire de nitrites dans le milieu de culture, contrairement aux autres AGV.

En résumé, si l'objet premier du procédé industriel est d'éliminer rapidement les nitrates et de produire peu de biomasse bactérienne, l'acétate est le substrat carboné le plus indiqué. Par contre, si l'accumulation de nitrites est à éviter, le butyrate ou le valérate devront être préférentiellement utilisés à l'acétate.

Remerciements

À l'issue de ce travail de thèse, je tiens à remercier chaleureusement tous ceux qui ont contribué à sa réalisation...

Alors, Merci Jean Claude... pour m'avoir, il y a très longtemps, accueilli dans ton laboratoire, et sans cesse encouragé quand le moral flanchait ! J'espère un jour pouvoir te rendre tout ce que tu m'as apporté, tant au niveau scientifique que humain,

Merci à A. Grasmick et à W. Verstraete qui me font l'honneur de juger et de critiquer ce travail,

Merci à J. Manem, qui par sa bonne volonté, sa patience a permis à ce travail d'arriver à son terme; les "brain storming" ont toujours été animés et constructifs !

Merci à P. Bonin qui a accepté de participer à ce jury,

Enfin, merci à tous mes amis et collègues du laboratoire qui par leur présence ont toujours su égayer les longues journées du chercheur isolé dans sa tour d'ivoire... Alors, merci à Anne, Barnabé, Carole, Fred, Gérard, Laurence, Marie-Laure, Sandrine, Virginie, Vincent...

Enfin, last but not least, je tiens à dédier ce mémoire de thèse à Marie-Claire, qui avec sa bonne humeur coutumière a toujours su accepter les rares débordements d'horaires inhérents à la culture des petites bêtes !

SOMMAIRE GÉNÉRAL



CHAPITRE I : ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

1-1 Microbiologie et biochimie de la dénitrification	6
1-1-1 Les enzymes intervenant dans la dénitrification	8
1-1-1-1 Nitrates réductases (NaR).....	8
1-1-1-2 Nitrites réductases (NiR)	11
1-1-1-3 Oxyde nitrique réductase (NOR).....	13
1-1-1-4 Oxyde nitreux réductase (N ₂ OR)	13
1-1-2 Transfert des oxydes d'azote au travers des membranes.....	15
1-1-3 Chaîne de transport d'électrons	16
1-2 Les acides gras volatils en dénitrification.....	19
1-2-1 Intérêt	19
1-2-2 Consommation des AGV en culture mixte	19
1-2-3 Voies métaboliques des AGV	19
1-2-4 Équations théoriques de dénitrification.....	20
1-3 Paramètres influençant l'accumulation de nitrites.....	22
1-3-1 Espèce bactérienne	22
1-3-2 Oxygène	23
1-3-3 Source de carbone et d'électrons	24
1-3-4 pH.....	25
1-3-5 Température	25

CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES

2-1 Milieux de culture	28
2-1-1 Bouillon peptoné et nitraté	28
2-1-2 Milieu gélosé	28
2-2 Mesures physico-chimiques	28
2-2-1 Dosage des nitrates	28
2-2-2 Dosage des nitrites	29
2-2-2-1 Faible concentration	29
2-2-2-2 Forte concentration	29
2-2-3 Dosage des ions ammonium	30
2-2-4 Dosage du carbone organique dissous	30
2-2-5 Détermination de la demande chimique en oxygène	30
2-2-6 Détermination des matières en suspension	31
2-2-7 Analyse élémentaire	31
2-2-8 Mesure d'absorbance	31
2-3 Microbiologie	31
2-3-1 Isolement des espèces bactériennes	31
2-3-2 Dénombrement total des bactéries	32
2-3-3 Identification des espèces bactériennes	32
2-3-3-1 Coloration de Gram	32
2-3-3-2 Test oxydase	33
2-3-3-3 Galerie API 20 NE	33
2-3-3-4 Tests complémentaires	34
2-3-3-4-1 Test glucose fermentation	34
2-3-3-4-2 Test glucose assimilation	34
2-3-3-4-3 Test à 42 °C	34
2-3-3-4-4 Test Mac Conkey	34
2-3-3-4-5 Test NaCl à 4 %	34
2-3-3-4-6 Test mobilité	35
2-3-3-4-7 Test sorbitol	35
2-3-3-4-8 Test O129/R	35

CHAPITRE III : CARACTÉRISATION DES POPULATIONS DÉNITRIFIANTES

3-1 Protocoles	38
3-1-1 Réacteur de dénitrification	38
3-1-1-1 Efficacité du réacteur.....	38
3-1-1-2 Population bactérienne	39
3-1-2 Influence du taux de dilution	39
3-1-2-1 Efficacité des réacteurs.....	39
3-1-2-2 Populations bactériennes	40
3-1-3 Métabolisme respiratoire de quelques espèces bactériennes faiblement dénitrifiantes.....	40
3-2 Résultats.....	41
3-2-1 Fonctionnement du réacteur de dénitrification	41
3-2-1-1 Efficacité du réacteur.....	42
3-2-1-2 Population bactérienne	43
3-2-2 Influence du taux de dilution sur le fonctionnement d'un réacteur de dénitrification	44
3-2-2-1 Efficacité des réacteurs.....	44
3-2-2-2 Calcul des paramètres cinétiques	46
3-2-2-3 Peuplement bactérien	48
3-2-3 Métabolisme respiratoire de quelques espèces bactériennes faiblement dénitrifiantes.....	51
3-3 Discussion.....	53
3-4 Conclusions.....	56

CHAPITRE IV : VITESSES DE DÉNITRIFICATION

4-1 Protocoles	66
4-1-1 Biomasse mixte adaptée aux AGV : C limitant <i>versus</i> N limitant.....	67
4-1-2 Biomasse mixte peu adaptée aux AGV <i>versus</i> adaptée aux AGV	69
4-1-3 Souches pures <i>versus</i> population mixte	70
4-2 Résultats.....	71
4-2-1 Biomasse mixte adaptée aux AGV : C limitant <i>versus</i> N limitant.....	72
4-2-2 Biomasse mixte peu adaptée aux AGV <i>versus</i> adaptée aux AGV	76
4-2-3 Souches pures <i>versus</i> population mixte	77
4-2-3-1 <i>Alcaligenes denitrificans</i>	78
4-2-3-2 <i>Pseudomonas mendocina</i>	80
4-2-3-3 <i>Comamonas testosteroni</i>	81
4-3 Discussion.....	83
4-4 Conclusions.....	85

CHAPITRE V : BILAN ÉLECTRONS

5-1 Protocole.....	104
5-1-1 Conditions expérimentales.....	104
5-1-2 Traitement des résultats pour réaliser le bilan électrons	106
5-1-2-1 Potentiel électrons initial	106
5-1-2-2 Potentiel électrons final	106
5-2 Résultats.....	107
5-2-2-1 Équivalents électrons initiaux	109
5-2-2-2 Équivalents électrons finaux	110
5-2-2-3 Bilan global	110
5-3 Discussion.....	112
5-4 Conclusions.....	113

CHAPITRE VI : ACCUMULATION TRANSITOIRE DE NITRITES

6-1 Protocoles	122
6-1-1 Impact d'une augmentation de pH sur l'accumulation des nitrites.....	122
6-1-1-1 Biomasse alimentée avec un mélange d'AGV	122
6-1-1-2 Biomasse alimentée avec de l'éthanol.....	123
6-1-2 Impact d'une variation de température sur l'accumulation des nitrites	123
6-2 Résultats.....	124
6-2-1 Impact d'une augmentation de pH sur l'accumulation des nitrites.....	124
6-2-1-1 Biomasse alimentée avec un mélange d'AGV	124
6-2-1-2 Biomasse alimentée avec de l'éthanol.....	126
6-2-2 Impact d'une variation de température sur l'accumulation des nitrites	127
6-3 Discussion.....	130
6-4 Conclusions.....	133

CHAPITRE VII : CONCLUSIONS GÉNÉRALES.....142



INTRODUCTION

La dénitrification est une réaction biochimique réalisée par des micro-organismes, qui permet de transformer des oxydes azotés ioniques (nitrates ou nitrites) en gaz (oxyde nitrique, oxyde nitreux ou diazote) (Knowles, 1982 ; Fillery, 1983). Cette réaction couple le transport des électrons *via* la chaîne respiratoire à la phosphorylation oxydative (Zumft, 1992 ; Tiedje, 1988). Dans le cas du traitement des eaux, soit à potabiliser, soit des eaux usées, ce phénomène est très important puisqu'il permet d'éliminer la pollution azotée (nitrates et nitrites) sans laisser de résidu, car le gaz produit (N_2) est éliminé dans l'atmosphère. Les micro-organismes, pour réaliser cette réaction, ont besoin d'un apport carboné qui peut être par exemple du méthanol ou alors apporté par l'eau usée à traiter. D'un point de vue économique, il semble plus rentable de pouvoir utiliser les sous-produits de digestion des boues activées, plutôt qu'un substrat carboné du type méthanol (Grady et Lim, 1980).

Pérot (1989) a démontré que l'hydrolyse anaérobie partielle des boues de station d'épuration conduisait à la production d'acides gras volatils à courte chaîne (AGV), parmi lesquels on peut citer les acides valérique, isovalérique, butyrique, isobutyrique, propionique et acétique. Ces AGV représentent environ 50 % du COT soluble produit (Pérot, 1989), et selon la durée de l'hydrolyse, il est possible de contrôler partiellement les AGV produits. Plusieurs auteurs (Paul *et al.* ; 1989 ; Paul et Beauchamp, 1989 ; Audic et Blanc 1987) ont déjà prouvé que les AGV constituaient des substrats pour les bactéries dénitrifiantes. Paul *et al.* (1989) ont montré que le butyrate permettait d'éliminer davantage de nitrates que la même quantité (en carbone) d'acétate, ce qui s'explique par le nombre d'électrons disponibles supérieur pour le butyrate.

L'objet principal de ce travail est de déterminer quel AGV parmi les acides acétique, propionique, butyrique et valérique permet d'éliminer les nitrates à la vitesse la plus élevée, et si possible avec la production de biomasse la plus faible possible, en vue d'une utilisation en station d'épuration.

Ce document est divisé en 7 chapitres. Le premier tente d'analyser la littérature très vaste sur la dénitrification, et le second est une présentation du matériel et des méthodes utilisés tout au long de cette thèse. Le troisième chapitre présente la caractérisation en terme d'espèces bactériennes et de constantes cinétiques d'un réacteur chemostat,ensemencé à partir de boues activées de station d'épuration, alimenté avec un mélange des 4 AGV, et dont le but est de fournir pour la majeure partie des expériences un inoculum standard, *i.e.* identique d'une manipulation à l'autre. Le quatrième chapitre traite des vitesses de dénitrification et de consommation du carbone en présence des différents AGV testés indépendamment les uns des autres, ainsi qu'en mélange équimolaire sur la base du carbone, avec des conditions environnementales différentes. Ce chapitre permet en principe de décider quel AGV utiliser pour éliminer le plus vite possible les quantités les plus élevées de nitrates. Les expériences réalisées dans le chapitre V permettent de valider les conclusions précédentes en présentant un bilan électrons entre le début et la fin de l'expérience réalisée en culture fermée, avec chacun des 4 AGV testé isolément et avec le mélange des quatre

acides gras volatils. Le chapitre VI a été réalisé pour comprendre pourquoi dans de nombreuses expériences les nitrites s'accumulaient, soit de façon transitoire, soit de façon permanente. Il faut en effet savoir que les nitrites sont fortement indésirables principalement dans le cas du traitement d'eaux à potabiliser, la concentration maximale admissible étant fixée à $0,1 \text{ mg NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$. Nous avons décidé de tester 2 paramètres, à savoir des variations brutales du pH et de la température, et de suivre l'accumulation des nitrites. Enfin le dernier chapitre rassemble les conclusions générales.

CHAPITRE I :

ANALYSE
BIBLIOGRAPHIQUE

1-1 Microbiologie et biochimie de la dénitrification	6
1-1-1 Les enzymes intervenant dans la dénitrification	8
1-1-1-1 Nitrates réductases (NaR).....	8
1-1-1-2 Nitrites réductases (NiR)	11
1-1-1-3 Oxyde nitrique réductase (NOR).....	13
1-1-1-4 Oxyde nitreux réductase (N ₂ OR)	13
1-1-2 Transfert des oxydes d'azote au travers des membranes	15
1-1-3 Chaîne de transport d'électrons	16
1-2 Les acides gras volatils en dénitrification.....	19
1-2-1 Intérêt	19
1-2-2 Consommation des AGV en culture mixte	19
1-2-3 Voies métaboliques des AGV	19
1-2-4 Équations théoriques de dénitrification.....	20
1-3 Paramètres influençant l'accumulation de nitrites.....	22
1-3-1 Espèce bactérienne	22
1-3-2 Oxygène	23
1-3-3 Source de carbone et d'électrons	24
1-3-4 pH.....	25
1-3-5 Température	25

Une littérature très abondante existe sur la dénitrification, tant la dénitrification des eaux (Henze *et al.*, 1993 ; Hall, 1992 ; Hamon et Fustec, 1991...), dans les sols (McCarty et Bremner, 1993 ; Kralova *et al.*, 1992 ; Paul *et al.*, 1989...), les sédiments (Blackburn et Blackburn, 1992 ; Bonin et Raymond, 1990 ; Bradley *et al.*, 1992...). Dans un souci de synthèse, nous allons plus précisément aborder trois axes principaux : (i) la microbiologie et la biochimie de la dénitrification. En effet, il est nécessaire de comprendre parfaitement les mécanismes biologiques et biochimiques de la dénitrification afin de pouvoir étudier plus spécifiquement les différents substrat carbonés en conditions de dénitrification ; (ii) les acides gras volatils utilisés. Cette partie va permettre de faire le point sur les connaissances acquises sur les acides acétique, propionique, butyrique et valérique, en terme de biodégradation en conditions anoxiques et en terme de métabolisation ; (iii) quelques paramètres biologiques et physico-chimiques qui influencent les cinétiques d'accumulation transitoire de nitrites.

1-1 Microbiologie et biochimie de la dénitrification

La dénitrification ne représente que l'un des aspects du cycle de l'azote. La figure 1-1 présente les voies de biotransformation actuellement bien identifiées de quelques molécules azotées ; ces transformations sont réalisées par de nombreux micro-organismes, certains ne possédant pas l'équipement enzymatique pour réaliser toutes ces réactions.

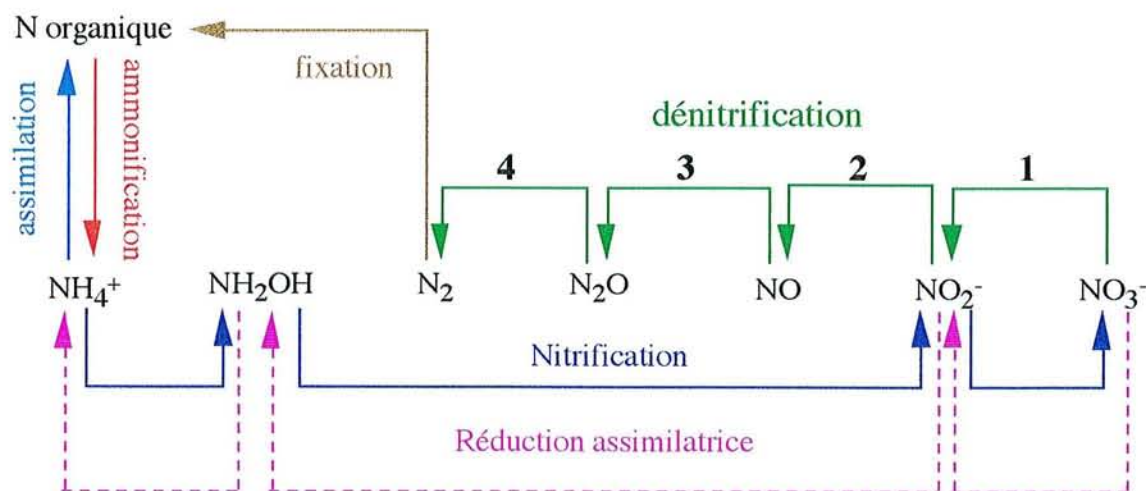


Figure 1-1 : Cycle de l'azote adapté d'après Martin (1979) et Fenchel et Blackburn (1979).

Réaction catalysée par : 1 nitrate réductase, 2 nitrite réductase, 3 oxyde nitrique réductase, 4 oxyde nitreux réductase.

La dénitrification est une réaction se produisant en anoxie (absence d'oxygène moléculaire, présence d'oxyde ionique), ou alors en présence de faibles quantités d'oxygène, et est le fait de bactéries le plus souvent aérobies facultatives. Le tableau 1-1 regroupe différents genres et espèces bactériens participant à une ou plusieurs étapes de la dénitrification. Plus de 90 % des espèces

répertoriées sont Gram -, et ont un métabolisme chimioorganotrophe. Seuls *Thiobacillus*, *Paracoccus denitrificans* et *Rhodobacter sphaeroides* ont la possibilité de croître dans des conditions autotrophes. Toutes ces bactéries proviennent d'écosystèmes très différents (sols, eau douce, eau de mer, tube digestif d'animaux, plantes...), et ont des exigences très diverses, par exemple en terme de pH, de température, de nutriments.

Tableau I-1 : Quelques espèces bactériennes intervenant dans la dénitrification ; adapté d'après Hamon (1990), Payne (1981) et la 9^{ème} édition du Bergey's manual (1984).

① mob + : bactérie mobile dans +90 % des cas ; mob - : bactérie mobile dans -10 % des cas ; Gram ± : Gram +, ou Gram - dans les premiers stades de croissance, ou Gram - ; ② : zone de température où la bactérie accepte de se développer ; ③ : possibilité de croissance sur un milieu contenant des sels minéraux, sans ajouter de source de carbone

Espèces bactériennes	Gram	Mob ①	T° optimale de croissance (°C)	Caractéristiques de croissance
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	-	-	25 - 28	Croissance en anoxie avec NO ₃ ⁻ et NO ₂ ⁻
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	-	-	25 - 28	Croissance en anoxie avec NO ₃ ⁻ et NO ₂ ⁻
<i>Alcaligenes denitrificans</i>	-	+	20 - 37	Croissance en anoxie avec NO ₂ ⁻ mais pas NO ₃ ⁻
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	-	+	20 - 37	
<i>Alcaligenes faecalis</i>	-	+	20 - 37	
<i>Aquaspirillum dispar</i>	-	+	30 - 32	
<i>Aquaspirillum itersonii</i>	-	+	30 - 32	
<i>Aquaspirillum magnetotacticum</i>				S'arrête au stade N ₂ O
<i>Aquaspirillum psychrophilum</i>	-	+	20	Espèce microaérophile
<i>Azospirillum brasilense</i>	±	+	35 - 37	Pas de croissance si T ≥ 20 °C
<i>Azospirillum lipoferum</i>	±	+	35 - 37	
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	-	+	25 - 30 ②	6 < pH optimal de croissance < 7
<i>Chromobacterium violaceum</i>	-	+	30 - 35	S'arrête au stade N ₂ O
<i>Comamonas testosteroni</i>	-	+		Réduit les nitrates en nitrites
<i>Cytophaga johnsonae</i>	-	+	25 - 30	Réduit les NO ₂ ⁻ mais pas les NO ₃ ⁻
<i>Flavobacterium balustinum</i>	-	-	37	Pas de croissance si T < 5 °C ou si T > 42 °C
<i>Flexibacter canadensis</i>				
<i>Halobacterium marismortui</i>	-	- à +	40 - 50	Pas de croissance si T < 10 °C ; bactérie halophile
<i>Halobacterium vallismortis</i>	-	+	40	Pas de croissance si T < 10 °C ; bactérie halophile
<i>Haloferax denitrificans</i>				
<i>Hyphomicrobium vulgare</i>	-	+	15 - 37 ②	Oligocarboophile ③
<i>Janthinobacterium lividum</i>	-	+ à -	25	Pas de croissance si pH < 5
<i>Kingella denitrificans</i>	-	-	30 - 37	
<i>Moraxella lacunata</i>	-	-	33 - 35	
<i>Neisseria cinera</i>	-	-	35 - 37	
<i>Neisseria denitrificans</i>	-	-	35 - 37	
<i>Neisseria elongata</i>	-	-	35 - 37	
<i>Neisseria flavescens</i>	-	-	35 - 37	
<i>Neisseria lactanica</i>	-	-	35 - 37	
<i>Neisseria mucosa</i>	-	-	35 - 37	
<i>Neisseria sicca</i>	-	-	35 - 37	
<i>Neisseria subflava</i>	-	-	35 - 37	
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	-	+		
<i>Paracoccus denitrificans</i>	-	-	30	Autotrophe facultatif
<i>Paracoccus halodenitrificans</i>	-	-	25 - 30	Pas de croissance si [NaCl] < 3 %
<i>Pasteurella</i>				
<i>Propionibacterium acidi-propionici</i>	+	-	30 - 37	Aérobic à aérotolérant
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	+	37	
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	-	+	35	Ne dégrade pas le glucose

.../...

.../...

Espèces bactériennes	Gram	Mob ①	T° optimale de croissance (°C)	Caractéristiques de croissance	
<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	-	+	30	Quelques souches s'arrêtent au stade N ₂ O	
<i>Pseudomonas caryophylli</i>	-	+	30 - 33		
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	-	+			
<i>Pseudomonas denitrificans</i>	-	+			
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	+			
<i>Pseudomonas lemoignei</i>	-	+			
<i>Pseudomonas mallei</i>	-	+	37		
<i>Pseudomonas mendocina</i>	-	+	35		
<i>Pseudomonas nautica</i>	-	+			
<i>Pseudomonas perfectomarinus</i>	-	+			
<i>Pseudomonas picketti</i>	-	+	35	Croissance possible à 41 °C mais pas à 4 °C	
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	-	+	35		
<i>Pseudomonas pseudoflava</i>	-	+	35 - 38		
<i>Pseudomonas pseudomallei</i>	-	+	37		
<i>Pseudomonas solonacearum</i>	-	+			
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	-	+	35		
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	-	+	25 - 30 ②		
<i>Rhizobium</i>					
<i>Rhizobium meliloti</i>	-	+	25 - 30		
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	-	+	30 - 34		
<i>Roseobacter denitrificans</i>				Peut pousser à 42,5°C Phototrophe avec des sulfures ; photohétérotrophe en anaérobiose Dénitrie jusqu'à N ₂ O	
<i>Simonsiella muelleri</i>	-	+	27		
<i>Thermotrix thiopara</i>	-	+	70 - 73		
<i>Thiobacillus denitrificans</i>	-	+	28 - 32		
<i>Thiobacillus novellus</i>	-	-	25 - 30		
<i>Thiobacillus versutus</i>	-	+	30 - 35		
<i>Thiosphaera pantotropha</i>					
<i>Wolinella succinogenes</i>	-	+	35 ②		
					6,8 < pH optimal de croissance < 7,4
					pH optimal de croissance = 7
				7,5 < pH optimal de croissance < 7,9	

Chaque étape de la dénitrification est catalysée par un enzyme spécifique (Figure 1-1) : la nitrate réductase (NaR), la nitrite réductase (NiR), l'oxyde nitrique réductase (NOR) et l'oxyde nitreux réductase (N₂OR), qui vont faire passer l'atome d'azote de l'état d'oxydation +V (nitrates) à 0 (diazote). *De facto*, 10 électrons sont nécessaires pour réduire 2 moles de nitrates en une mole d'azote moléculaire. Ces enzymes sont synthétisés soit en présence d'oxydes azotés (Körner et Zumft, 1989), soit en anaérobiose (Matsubara, 1971).

1-1-1 Les enzymes intervenant dans la dénitrification

La synthèse des quatre enzymes est nécessaire pour réduire les nitrates en azote moléculaire. Il existe sur le chromosome bactérien des gènes qui codent pour ces protéines, et des régulateurs de ces gènes qui reconnaissent l'anoxie et / ou la présence d'oxydes azotés ioniques et d'après Stouthamer (1991), au moins 40 gènes sont impliqués dans le processus de la dénitrification.

1-1-1-1 Nitrates réductases (NaR)

Deux types de nitrate réductases (A et B) ont été mis en évidence par Pichinoty (1973). Ces NaR réduisent toutes les deux les nitrates en nitrites, mais diffèrent en terme de localisation, de

propriétés, et par le fait qu'elles sont codées par des gènes différents (Ingraham, cité dans Delwiche, 1981 ; Zumft, 1992). La NaR A réduit les ions chlorate (ClO_3^-), n'est pas inhibée par les ions ammonium, requiert des conditions sans ou avec de faibles concentrations d'oxygène, et intervient entre autre dans le processus de dénitrification. La NaR B ne peut pas réduire les chlorates, est inhibée par l'ammonium, fonctionne avec ou sans oxygène (Payne, 1981), et intervient dans la réduction assimilatrice des NO_3^- (Stouthamer, 1976 ; Payne, 1973 ; Crutzen, cité dans Delwiche, 1981). Cependant, des espèces bactériennes non dénitrifiantes (*E. coli*, *Klebsiella aerogenes*, *Proteus mirabilis*...) synthétisent la NaR A pour réduire les nitrates en NH_4^+ (Stouthamer, 1976) tandis que certaines espèces telles *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas testosteroni* ou *Pseudomonas pseudoalcaligenes* ne possèdent qu'une NaR B (Henry et Bessières, 1984 ; Richard et Kiredjian, 1992). De plus, il apparaît (Payne, 1981) que des bactéries (par exemple *Pseudomonas aeruginosa*) peuvent simultanément utiliser les nitrates en tant qu'accepteur terminal d'électrons (grâce à leur NaR A) et en tant que source d'azote (grâce à leur NaR B).

Dans la suite ce document, le terme nitrate réductase s'appliquera uniquement à la fonction respiratoire.

Le poids moléculaire de la NaR varie, suivant les micro-organismes concernés, entre 100 et 200 kd (Hochstein et Tomlinson, 1988), mais sa composition semble être relativement constante, puisque dans tous les cas étudiés ou rapportés du fer, des groupements sulfures labiles en milieu acide et du molybdène ont été systématiquement mis en évidence (Knowles, 1982 ; Hochstein et Tomlinson, 1988 ; Fillery, 1983). Cet enzyme inséré dans la membrane cytoplasmique est composé de 3 sous-unités, α , β et γ .

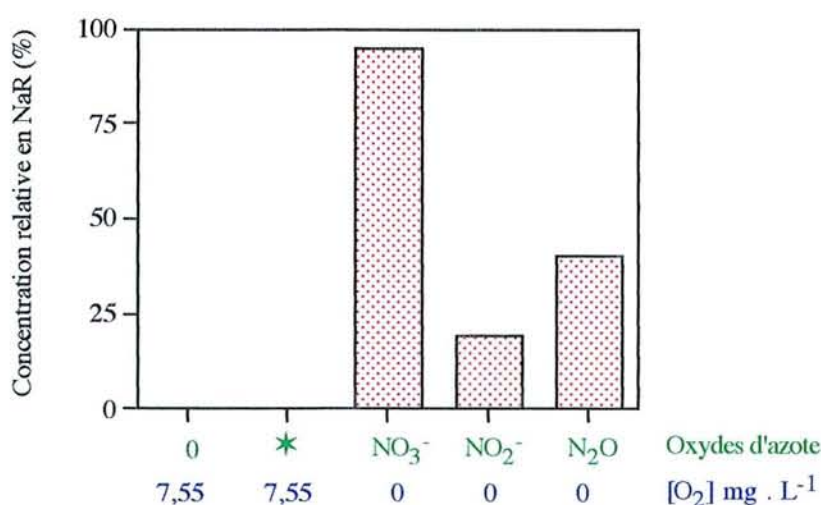


Figure 1-2 : Concentrations relatives en NaR chez *Pseudomonas stutzeri* en présence de différents oxydes azotés, en fonction de la concentration en oxygène présente dans le milieu (modifié d'après Körner et Zumft, 1989). * : soit des nitrates, soit des nitrites, soit N_2O .

Selon les micro-organismes, la nitrate réductase est synthétisée en fonction des conditions environnementales : (i) soit dès l'absence d'oxygène dans le milieu, par exemple chez *Pseudomonas fluorescens* ou *Alcaligenes sp.* (Megusar *et al.*, 1986), (ii) soit dès la présence de nitrates (ou autres oxydes azotés) dans le milieu, (iii) ou encore lorsque ces deux conditions sont réunies (nitrates sans oxygène dans le milieu), par exemple avec *Paracoccus denitrificans* et *Azospirillum brasilense* (Megusar *et al.*, 1986), ou encore *Pseudomonas stutzeri* (Körner et Zumft, 1989). La figure 1-2 montre clairement que la nitrate réductase est synthétisée chez *Pseudomonas stutzeri* en absence d'oxygène avec soit des nitrates (maximum de NaR synthétisée), soit des nitrites (environ 20 % de NaR produite) ou soit avec de l'oxyde nitreux (environ 40 % de NaR synthétisée).

Chez *E. coli*, bactérie utilisée comme modèle car très largement décrite dans la littérature, la synthèse des protéines codant pour la NaR est à peu près connue. Plusieurs gènes sont clairement identifiés : narX, narL, narG, narH, narI, narJ, narK, fnr, qui codent respectivement pour les protéines suivantes : NaRX, NaRL, NaRG, NaRH, NaRI, NaRJ, NaRK, FNR (Stouthamer, 1991).

En aérobiose, chez *E. coli*, les cytochromes *o* et *d* sont présents à des taux assez élevés dans la cellule, alors que les enzymes de la respiration anaérobie sont produits à de faibles quantités (Gunsalus, 1992). En effet, la présence d'oxygène inactive la protéine FNR (peut-être par un changement de conformation) (Cole, 1991), et inhibe la synthèse de la NaR au niveau de la transcription (Kapralek *et al.*, 1982). L'absence d'oxygène (avec ou sans nitrates) permet la synthèse des protéines FNR (fumarate réductase, indispensable à la dérégulation de narGHJI) et NaRL (Egan et Stewart, 1990 ; Walker et DeMoss, 1992). La protéine FNR active l'expression des gènes codant pour les enzymes intervenant en absence d'oxygène, tels que les fumarate, nitrate et nitrite réductases (Spiro, 1992). Le mécanisme par lequel FNR détecte l'absence (ou la faible quantité) d'oxygène semble faire intervenir une protéine associée à Fe²⁺ (Spiro, 1992), Stouthamer (1991) rapportant que la protéine FNR est sensible au potentiel redox (redox sensor) : à partir d'un certain redox, la protéine se lie à l'amont des opérons nar et frd, et active leur transcription. Toutes ces études ont été réalisées sur *E. coli*, mais Spiro (1992) a démontré que le gène fnr de *Paracoccus denitrificans* était induit par l'absence d'oxygène, suggérant par là même un mécanisme identique à celui observé chez *E. coli*.

Deux protéines reconnaissent la présence des nitrates dans le milieu : NaRX et NaRQ, qui voient leur conformation modifiée par les nitrates. Ces deux protéines sont très semblables en taille, hydrophobicité et séquence (Chiang *et al.*, 1992). Une fois la conformation de la protéine "senseur" modifiée, la phosphorylation de NaRL se réalise, et NaRL~P active de concert avec FNR l'expression de l'opéron narGHJI (Figure 1-3). Dans le même temps (expression de l'opéron) il y a répression de la synthèse des gènes de l'anaérobiose (par exemple la fumarate réductase) assurant ainsi l'utilisation préférentielle de l'accepteur d'électrons le plus favorable du point de vue énergétique. Le gène narG code pour la sous unité alpha (α) de la nitrate réductase (contient le site catalytique de la réduction des nitrates), narH code pour la sous-unité bêta (β) (qui pourrait participer à l'attachement du complexe à la membrane) et narI code pour la sous-unité gamma (γ)

(noyau héminique correspondant au cytochrome b, transférant les électrons au complexe $\alpha\beta$), à la fois chez *Paracoccus denitrificans* et *E. coli* (Stouthamer, 1991 ; Dubourdiou et DeMoss, 1992 ; Blasco *et al.*, 1989 ; Ingledew et Poole, 1989). Le rôle de narJ n'est pas bien précisé, il semble toutefois que ce gène soit indispensable à la biogénèse de la nitrate réductase, soit au niveau de la maturation du complexe soluble $\alpha\beta$, soit en facilitant l'interaction de ce complexe avec la sous-unité γ liée à la membrane.

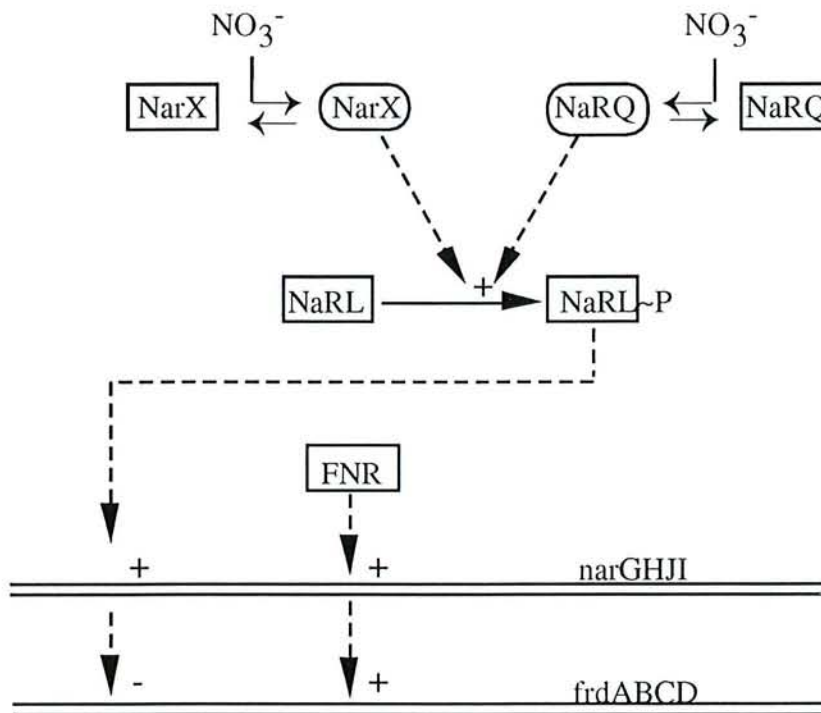


Figure 1-3 : Régulation et formation de la nitrate réductase et de la fumarate réductase chez *E. coli* (modifiée d'après Stouthamer, 1991 et Chiang *et al.*, 1992)

1-1-1-2 Nitrites réductases (NiR)

Il existe deux groupes de nitrites réductases (NiR) : l'une permettant la réduction des NO_2^- en NO, l'autre réduisant les NO_2^- en ammonium. Seul le premier enzyme intervient dans la dénitrification, aussi tout au long de ce rapport le terme "NiR" sera employé dans ce sens. Selon l'espèce bactérienne dénitrifiante considérée, deux grands types de nitrites réductases ont pu être mis en évidence :

(i) une métalloflavoprotéine contenant du cuivre, présente chez *Pseudomonas denitrificans*, *Pseudomonas aureofaciens*, *Alcaligenes faecalis*, *Rhodobacter sphaeroides*... (Fillery, 1983 ; Knowles, 1982 ; Hochstein et Tomlinson, 1988 ; Coyne et Tiedje, 1990 ; Abraham *et al.*, 1993). Le poids moléculaire de cet enzyme est compris entre 70 et 150 kd (Hochstein et Tomlinson, 1988). La NiR catalyse la transformation des nitrites en oxyde nitrique ou en oxyde nitreux.

(ii) une hémoprotéine liée à des cytochromes de types c et d, de 90 à 140 kd, mise en évidence chez de nombreux genres bactériens, dont *Alcaligenes*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Thiobacillus*, *Thiosphaera pantotropha*... (Knowles, 1982 ; Fillery, 1983 ; Hochstein et Tomlinson, 1988 ; Coyne et Tiedje, 1990 ; Moir *et al.*, 1993). Par contre, la localisation de cet enzyme est relativement mal précisée : associée à la membrane cytoplasmique chez *Thiobacillus denitrificans* et *Pseudomonas aeruginosa*, dans l'espace périplasmique ou dans la membrane cytoplasmique chez *Paracoccus denitrificans*, dans la membrane ou dans des fractions cytoplasmiques chez *Pseudomonas perfectomarinus* (Alefounder *et al.*, 1981 ; Betlach, 1982 ; Boogerd *et al.*, 1981 ; Kristjansson *et al.*, 1978 ; Hochstein et Tomlinson, 1988 ; Fillery, 1983). Toutes ces études tendent à prouver que cette NiR est en relation très étroite avec la membrane cytoplasmique, voire même incluse dans la membrane cytoplasmique, ce qui n'a rien d'étonnant dans la mesure où la nitrite réductase est un enzyme intégré à la chaîne respiratoire, chaîne respiratoire elle-même incluse dans la membrane cytoplasmique. Selon Coyne et Tiedje (1990) le type de nitrite réductase n'est pas spécifique à une espèce bactérienne, mais est spécifique d'une souche bactérienne. De plus, aucun micro-organisme (dans l'état actuel de nos connaissances) ne possède à la fois les 2 types de réductase. Chez les bactéries dénitrifiantes, la nitrite réductase à cytochrome cd1 a été mise en évidence plus souvent que la NiR à cuivre (Coyne *et al.*, 1989).

L'activité de la NiR a été mesurée par Megusar *et al.* (1986) chez cinq micro-organismes. En présence de nitrates et en l'absence d'oxygène, *Paracoccus denitrificans*, *Pseudomonas stutzeri* et *Alcaligenes sp.* avaient une activité NiR 5 à 10 fois plus élevée que chez *Azospirillum brasilense* et *Pseudomonas fluorescens*. Par contre, en présence d'oxygène et en absence de nitrates aucune activité NiR n'a pu être mesurée. Kawakami *et al.* (1985) confirment ce résultat chez *Paracoccus denitrificans*. Cet arrêt de l'activité NiR est réversible, car en imposant des conditions d'anoxie après 30 heures d'aérobiose, l'activité NiR est supérieure à celle mesurée en début d'expérience. La reprise de l'activité de la nitrite réductase est due à la NiR préalablement synthétisée, et non pas à une synthèse récente.

Körner et Zumft (1989) confirment les résultats de Megusar *et al.* (1986) chez *Pseudomonas stutzeri*. En effet, dès qu'il y a de l'oxygène (7,5 mg . L⁻¹ soit 100 % de saturation) avec ou sans oxyde azoté, aucune activité NiR n'est mesurable (Figure 1-4). En anoxie, avec des nitrates ou des nitrites comme accepteur d'électrons, l'activité NiR est nette, mais nulle en présence d'oxyde nitreux. Ces résultats sont cohérents entre eux : en fournissant des nitrites il y a synthèse maximale de NiR, en fournissant des nitrates, il y a synthèse de NiR, et après apport de N₂O il n'y a pas quantité mesurable de NiR. Le fait que les nitrates induisent la production de nitrite réductase se comprend aisément dans la mesure où le gène nirB, qui code pour la nitrite réductase, est aussi activé par la protéine NaRL (l'activité nirB est de 1 à 3 fois supérieure en présence de NaRL qu'en son absence) (Cole, 1991). Chez *Pseudomonas aeruginosa* la synthèse de la NiR est sous contrôle d'un activateur codé par le gène fnr (Arai *et al.*, 1991).

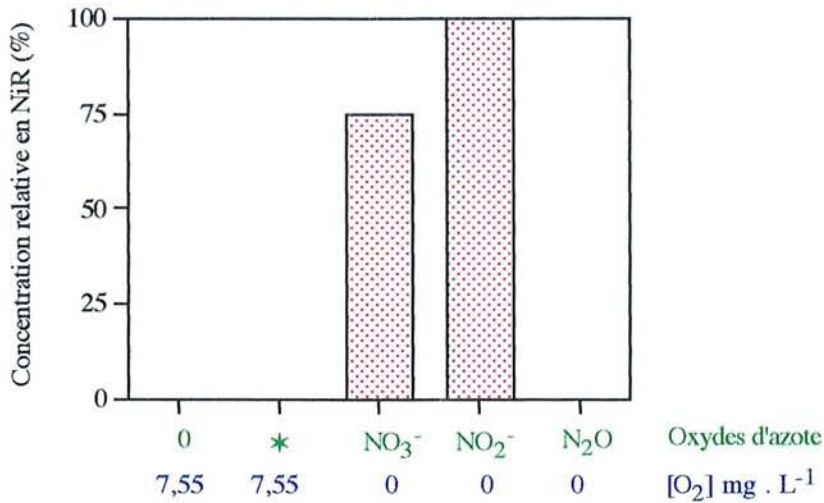


Figure 1-4 : Concentrations relatives en NiR chez *Pseudomonas stutzeri* en présence de différents oxydes azotés, en fonction de la concentration en oxygène présente dans le milieu (modifié d'après Körner et Zumft, 1989). * : soit des nitrates, soit des nitrites, soit N₂O.

1-1-1-3 Oxyde nitrique réductase (NOR)

L'oxyde nitrique réductase est l'enzyme qui catalyse la réduction de l'oxyde nitrique (NO) en oxyde nitreux (N₂O). L'existence de l'oxyde nitrique réductase a longtemps été un sujet de controverse, dû probablement à la difficulté de mesurer de très faibles concentrations de NO libre (Pelmont, 1993). La présence de NO durant la dénitrification est effectivement rarement détectée, au contraire de l'oxyde nitreux et de l'azote moléculaire. Néanmoins, Betlach et Tiedje (1981) ont mesuré une accumulation d'oxyde nitrique dans des cultures de *Flavobacterium*, *Pseudomonas fluorescens*, *Alcaligenes*, et Firestone *et al.* (1979) ont observé le même phénomène chez *Pseudomonas stutzeri*.

Braun et Zumft (1991) ont prouvé l'existence de la NOR chez *Pseudomonas stutzeri*. De même, *Pseudomonas perfectomarina*, *Paracoccus denitrificans* et *Paracoccus halodenitrificans* possèdent une NOR (Remde et Conrad, 1991 ; Mancinelli *et al.*, 1986 ; Dermastia *et al.*, 1991), alors que *Pseudomonas aeruginosa* ne semble pas en posséder. Zumft (1992) rapporte que la NOR est liée à la membrane cytoplasmique, tandis que Carr et Fergusson (1990) et Heiss *et al.* (1989) ont montré que la NOR contenait un complexe cytochrome b (38 kDa) et c (17,5 kDa). Les constituants de l'oxyde nitrique réductase sont codés par les gènes *norB* et *norC*, faisant partie d'un même cluster (Braun et Zumft, 1992).

1-1-1-4 Oxyde nitreux réductase (N₂OR)

Cet enzyme intervient en dernier dans la dénitrification, dans la mesure où il va catalyser la réduction de l'oxyde nitreux (N₂O) en azote moléculaire (N₂). Il existe cependant de nombreuses espèces bactériennes dénitrifiantes dépourvues de cet enzyme, et pour lesquelles le produit terminal de la réduction des nitrates sera l'oxyde nitreux (Tableau 1-1).

D'un poids moléculaire compris entre 85 kd et 144 kd chez *Paracoccus denitrificans* (Kristjansson et Hollocher, 1981, Snyder et Hollocher, 1987), l'oxyde nitreux réductase est un enzyme soluble (sauf chez *Flexibacter canadensis* d'après Zhang et Hollocher, 1993), contenant de 4 à 8 atomes de cuivre par mole d'enzyme (Zhang *et al.*, 1991, Coyle *et al.*, 1985, Soohoo et Hollocher, 1991, Soohoo *et al.*, 1991), mais ni fer ni molybdène (Hochstein et Tomlinson, 1988). Zumft et Matsubara (1982) confirment ces résultats chez *Pseudomonas perfectomarinus* et *P. stutzeri*. Cet enzyme est localisé dans la membrane cytoplasmique chez *Paracoccus denitrificans* ; il perd rapidement toute activité si, partiellement purifié, il est exposé à l'oxygène (Kristjansson et Hollocher, 1981). Il n'est toutefois pas possible de préciser s'il s'agit d'une modification des composants de la chaîne respiratoire conduisant les électrons vers l'oxygène, ou alors s'il s'agit simplement d'un phénomène de toxicité. Cette inactivation par l'oxygène est réversible par passage en anoxie.

Une étude conduite par Körner et Zumft (1989) sur *Pseudomonas stutzeri* a curieusement mis en évidence le fait que la concentration de N_2OR est maximale en présence de nitrates, puis décroît en présence de N_2O (environ 60 % de la quantité maximale) et en présence de nitrites (environ 30 % de la quantité maximale). Enfin, en présence d'oxygène la concentration de N_2OR représente entre 3 et 6 % de la quantité maximale de N_2OR synthétisée, respectivement sans oxyde azoté et en présence d'oxyde nitreux (Figure 1-5).

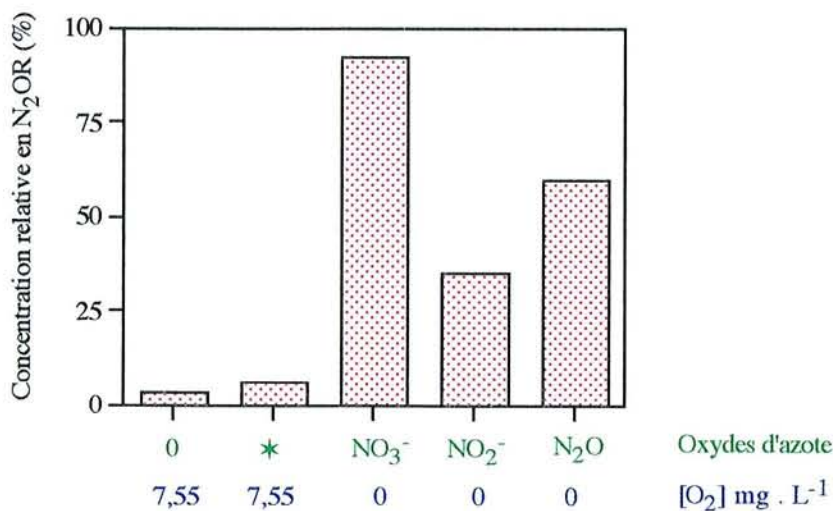


Figure 1-5 : Concentrations relatives en N_2OR chez *Pseudomonas stutzeri* en présence de différents oxydes azotés, en fonction de la concentration en oxygène présente dans le milieu (modifié d'après Körner et Zumft, 1989). * : soit des nitrates, soit des nitrites, soit N_2O .

Le tableau 1-2 regroupe et synthétise les caractéristiques essentielles des 4 enzymes intervenant dans la dénitrification. La nitrate réductase est orientée du côté cytoplasmique, tandis que la nitrite réductase, l'oxyde nitreux réductase et probablement l'oxyde nitrique réductase sont orientées du côté extérieur (espace périplasmique). Il faut donc (i) que les nitrates présents dans le milieu extérieur passent la membrane cytoplasmique, pour y être réduits en nitrites ; puis (ii) que

ces nitrites formés dans le cytoplasme soient transférés au travers de la membrane, pour y être réduits successivement en NO, N₂O et N₂.

Tableau 1-2 : Caractéristiques des divers enzymes intervenant dans la dénitrification (mb cyto : membrane cytoplasmique ; cyt : cytochrome ; e⁻ : électrons).

Enzyme	Nitrate réductase (NaR)	Nitrite réductase (NiR)	Oxyde nitrique réductase (NOR)	Oxyde nitreux réductase (N ₂ OR)
Réaction catalysée	NO ₃ ⁻ → NO ₂ ⁻	NO ₂ ⁻ → NO	NO → 1/2 N ₂ O	1/2 N ₂ O → 1/2 N ₂
Nombre d'e ⁻ transférés	2	1	1	1
Localisation	Face interne de la mb cyto	Face externe de la mb cyto	Lié à la mb cyto (face externe ?)	Face externe de la mb cyto
Composition	Mo, Fe, S	① protéine + cuivre ② hémoprotéine + cyt c et d	Cytochromes b et c	Enzyme soluble + cuivre
M (kd)	100 à 200	① 70 à 150 ② 90 à 140	au moins 55	80 à 145

1-1-2 Transfert des oxydes d'azote au travers des membranes

Comme il l'a été dit dans les paragraphes précédents, les sites actifs (par site actif nous entendons la partie de l'enzyme qui transfère effectivement les électrons aux oxydes azotés) des nitrite, oxyde nitrique et oxyde nitreux réductases sont du côté périplasmique, alors que celui de la nitrate réductase est du côté cytoplasmique. De ce fait, pour que les nitrates puissent servir d'accepteurs d'électrons, il faut qu'il y ait entrée des NO₃⁻ dans le cytoplasme de la bactérie et que les NO₂⁻ ainsi formés soient évacués dans l'espace périplasmique.

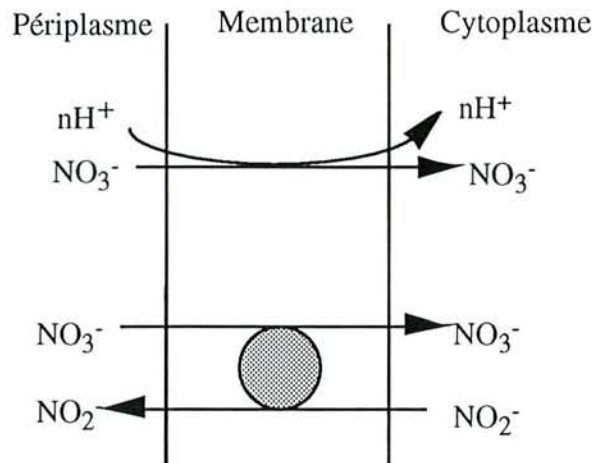


Figure 1-6 : Systèmes de transport des nitrates chez *Paracoccus denitrificans* d'après Boogerd *et al.* (1981), Boogerd *et al.* (1983) et Stouthamer *et al.* (1982).

Boogerd *et al.* (1981), Boogerd *et al.* (1983) et Stouthamer *et al.* (1982) ont proposé deux systèmes de transport des nitrates et des nitrites (Figure 1-6). Le premier permet aux nitrates de traverser la membrane cytoplasmique en symport avec des protons, en absence de nitrites ; ce

système permet d'initier la réduction des NO_3^- en NO_2^- . Le second système est activé lorsque des nitrates ont déjà été réduits en nitrites : un système antiport va transférer mole à mole les NO_3^- dans le cytoplasme, et les NO_2^- dans l'espace périplasmique.

Il est probable que le système antiport soit codé par le gène narK. En effet, la présence de la protéine NarK augmente les cinétiques d'entrée sortie de ces deux composés, apparaissant ainsi comme un "catalyseur" du processus (Stouthamer, 1991). Noji *et al.* (1989) ont montré que narK code pour une protéine transmembranaire fortement hydrophobe. Kolesnikow *et al.* (1992) ont étudié la régulation du gène narK chez *E. coli* en réponse à l'anaérobiose, à la présence de nitrates, de fer et de molybdène. Il ressort clairement de leur travail que l'expression de ce gène est multipliée par 110 fois en passant de conditions aérobies à anaérobies, et par un facteur 930 en passant de l'aérobiose à l'anoxie (présence de nitrates). La présence de molybdène et de fer est nécessaire à l'expression optimale de narK.

1-1-3 Chaîne de transport d'électrons

Les enzymes intervenant dans la dénitrification agissent au sein d'un système extrêmement complexe : la chaîne de transport d'électrons, qui permet de véhiculer les électrons générés par l'oxydation d'un substrat jusqu'à un accepteur terminal (ici les nitrates). Ce système fonctionne par transferts successifs sous contrôle enzymatique des entités "électrons" sur un accepteur de potentiel de plus en plus élevé.

Tableau 1-3 : Potentiels standards d'oxydoréduction de certains composés de la chaîne respiratoire ($\text{pH} = 7$; $T = 30^\circ\text{C}$) ; (modifié d'après Gottschalk, 1986 ; Lehninger, 1985).

① la valeur de E'_0 est comprise entre ces deux valeurs.

Composant de la chaîne respiratoire	E'_0 (V)
$2 \text{H}^+ + 2\text{e}^- \leftrightarrow \text{H}_2$	-0,41
$\text{NAD}^+ + 2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^- \leftrightarrow \text{NADH} + \text{H}^+$	-0,32
Flavoprotéine _{ox} + $2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^- \leftrightarrow$ Flavoprotéine _{red}	-0,45 - 0,0 ①
FeS protéine _{ox} + $2 \text{e}^- \leftrightarrow$ FeS protéine _{red}	-0,40 + 0,20 ①
Ubiquinone _{ox} + $2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^- \leftrightarrow$ Ubiquinone _{red}	+0,04
$2 \text{cyt b}_{\text{ox}} + 2 \text{e}^- \leftrightarrow 2 \text{cyt b}_{\text{red}}$	+0,07
$2 \text{cyt c}_{\text{ox}} + 2 \text{e}^- \leftrightarrow 2 \text{cyt c}_{\text{red}}$	+0,25
$2 \text{cyt a}_{\text{ox}} + 2 \text{e}^- \leftrightarrow 2 \text{cyt a}_{\text{red}}$	+0,38
$1/2 \text{O}_2 + 2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^- \leftrightarrow \text{H}_2\text{O}$	+0,82
$2 \text{NO}_3^- + 12 \text{H}^+ + 2 \text{e}^- \leftrightarrow \text{N}_2 + 6 \text{H}_2\text{O}$	+0,52

Le tableau 1-3 présente les potentiels standards d'oxydoréduction de divers constituants de la chaîne respiratoire (modifié d'après Gottschalk, 1986 et Lehninger, 1985). Plus E'_0 est négatif, plus faible est l'affinité du système pour les électrons, et inversement, plus E'_0 d'un système est positif,

plus grande est son affinité pour les électrons. Ainsi, les électrons peuvent être transférés par des réactions redox en cascade du NAD^+ jusqu'à l'accepteur terminal, les nitrates ou l'oxygène.

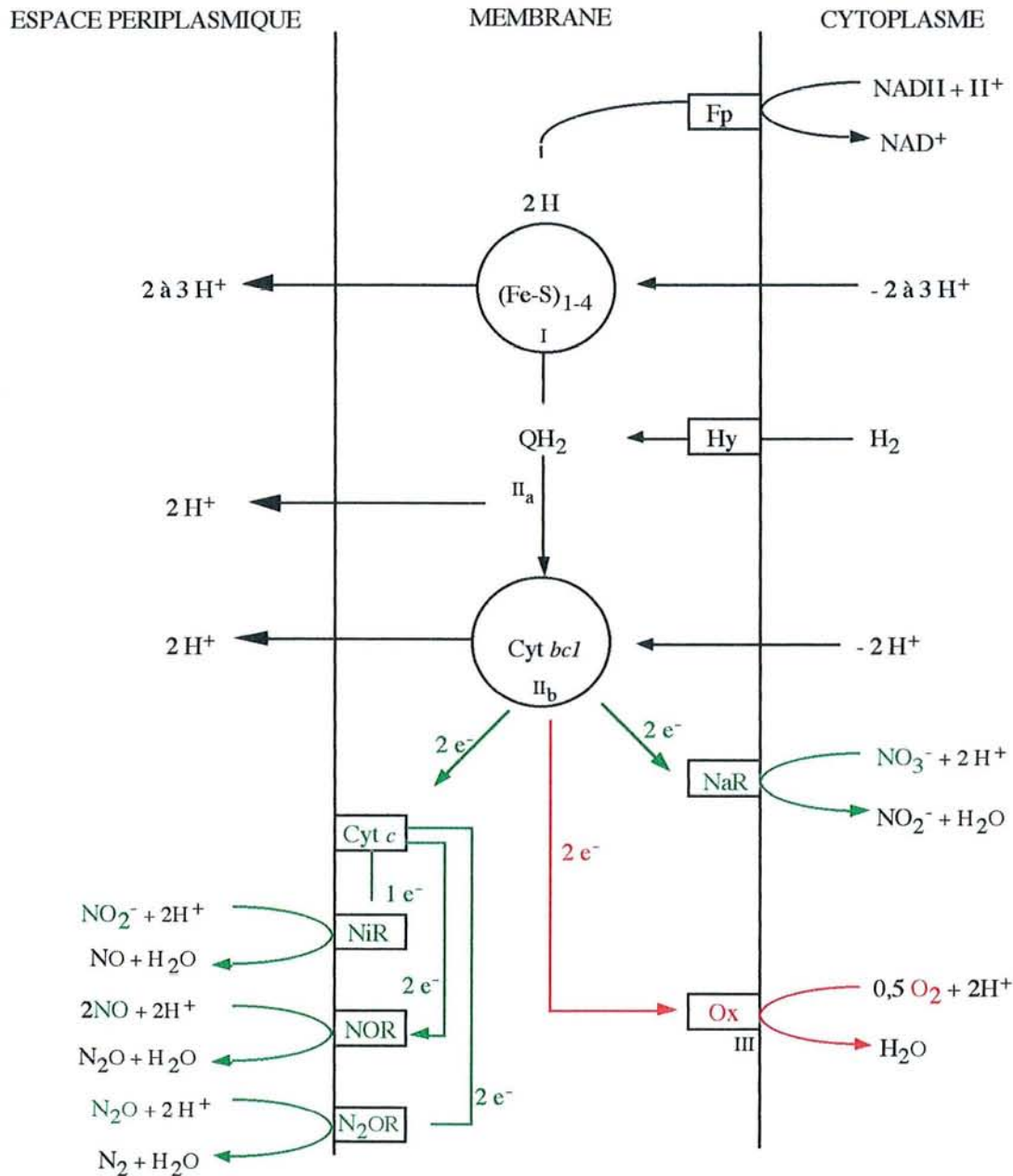


Figure 1-7 : Chaîne respiratoire de *Paracoccus denitrificans*, adaptée d'après Stouthamer *et al.* (1982). I, $\text{II}_a + \text{II}_b$, III : sites de phosphorylation ; Fe-S : centre fer-soufre ; Ox : cytochrome aa3 (cytochrome oxydase) ; Hy : hydrogénase ; Fp : flavoprotéine ; QH_2 : ubiquinone.

La chaîne respiratoire est étroitement associée à la membrane cytoplasmique. Sa composition et son organisation varient à la fois selon l'espèce bactérienne et les conditions environnementales. Chez *Paracoccus denitrificans*, d'après les études de Porte et Vignais (1980), Stouthamer *et al.* (1982), Van Verseveld et Stouthamer (1978), Alefounder *et al.* (1981), la chaîne respiratoire peut être représentée comme indiqué sur la figure 1-7. Pour expliquer cette figure, il est possible de

s'appuyer sur les connaissances établies pour la chaîne respiratoire de *E. coli* (Ingledeew et Poole, 1984, Gottschalk, 1986 ; Lehninger, 1985).

Comme nous l'avons déjà indiqué, la composition de la chaîne respiratoire dépend des conditions expérimentales. Ainsi, la figure 1-7 qui présente à la fois les composants synthétisés en aérobiose (couleur rouge sur la figure) et en conditions de dénitrification (couleur verte) est donc inexacte, mais permet de mieux illustrer son fonctionnement. Jusqu'au cytochrome bc1, le cheminement des électrons est identique en conditions aérobies ou anoxiques : ils sont transportés du NAD jusqu'au cytochrome bc1 le long d'une chaîne de molécules passant successivement d'un état oxydé à un état réduit. Le cytochrome bc1 représente un carrefour au sein de la chaîne respiratoire : en aérobiose, les électrons sont acceptés par le cytochrome aa3, alors qu'en anoxie ils le sont par le cytochrome c.

En parallèle au transfert des électrons, on peut noter qu'à 3 endroits (notés I, II et III, Figure 1-7) il se produit une excrétion de protons, pompés du cytoplasme pour être rejetés dans l'espace périplasmique. Ce phénomène contribue à maintenir un gradient de protons, positif du côté externe à la membrane cytoplasmique, et négatif coté cytoplasme. La force protonmotrice ainsi générée est directement à l'origine de la synthèse d'ATP, *via* l'ATPase. Par molécule d'ATP synthétisée, la translocation de 2 à 4 protons de l'espace périplasmique dans le cytoplasme est nécessaire. Au niveau de la protéine fer-soufre (2 à 3 protons rejetés dans l'espace périplasmique) et au niveau du cytochrome b (4 protons excrétés) il y a synthèse à chaque fois d'une molécule d'ATP (c'est ce qui est représenté sur la figure 1-7 par "sites traditionnels de conservation de l'énergie"). Le transfert des électrons du NAD⁺ à l'azote génère donc 2 molécules d'ATP, alors que le transfert de ces électrons jusqu'à l'oxygène en génère trois, si la voie du cytochrome aa3 est empruntée.

L'efficacité de la phosphorylation oxydative lors du transport des électrons jusqu'aux oxydes d'azote représente 67 à 70 % de celle correspondant à la respiration aérobie (Stouthamer *et al.*, 1982). En effet, lors de la réduction de l'oxygène en eau *via* le cytochrome aa3, 6 ou 7 protons (pour deux électrons transportés) sont transférés du côté périplasmique alors que seulement 4 ou 5 le sont réellement lors de la dénitrification.

Tableau 1-4 : Taux de croissance de *Pseudomonas denitrificans* en condition de respiration aérobie et de respiration en anoxie (Koike et Hattori, 1975).

Conditions de croissance	Rendement de croissance cellulaire	
	g de poids sec/mol d'accepteur (O ₂ ou NO ₃ ⁻)	g de poids sec/électron équivalent accepté
aérobiose	34,5	8,63
dénitrification	18,0	3,60

Le nombre de cellules formées à partir d'un substrat donné étant proportionnel au taux d'ATP généré, une culture en aérobiose permet de synthétiser plus de biomasse qu'une culture en anoxie (Stouthamer *et al.*, 1982 ; Grady et Lim, 1980). Le tableau 1-4 présente la masse de cellules formées (exprimée en poids sec) par mole d'accepteur d'électrons obtenue en respiration aérobie ou

en anoxie lorsque la source de carbone et d'électrons est le glutamate. Une molécule d'oxygène accepte 4 électrons *via* la chaîne respiratoire et une molécule de nitrate accepte 5 électrons quand il est réduit en N₂. Koike et Hattori (1975) montrent ainsi qu'en culture batch, la biomasse synthétisée par électron transporté dans la chaîne respiratoire est réduit d'environ 60 % quand l'accepteur d'électrons est le nitrate.

1-2 Les acides gras volatils en dénitrification

1-2-1 Intérêt

Cependant, l'utilisation d'autres sources de molécules peu coûteuses, tel que les acides gras volatils (AGV) semble être intéressante. En effet, l'hydrolyse partielle anaérobie des boues en station d'épuration permet d'obtenir des AGV en quantité importante (Pérot, 1989). La composition de ces hydrolysats de boues est relativement bien connue, tout au moins du point de vue des molécules carbonées. Après une quinzaine d'heures d'hydrolyse, des acides gras volatils sont produits, dont l'acide valérique (CH₃(CH₂)₃COOH), isovalérique, butyrique (CH₃(CH₂)₂COOH), isobutyrique, propionique (CH₃CH₂COOH) et acétique (CH₃COOH). Ils représentent environ 50 % du COT soluble produit (Pérot, 1989).

1-2-2 Consommation des AGV en culture mixte

Les travaux de Paul *et al.* (1989) et de Paul et Beauchamp (1989a et b) ont prouvé que les acides acétique, propionique et butyrique constituaient des substrats utilisables en tant que source de carbone et d'électrons par des bactéries dénitrifiantes. Ils ont montré que la capacité de dénitrification (*i.e.* la réduction des nitrates en oxyde nitreux) était la plus importante avec le butyrate et diminuait du propionate à l'acétate. Ceci s'explique par l'examen des états d'oxydation moyens du carbone du butyrate, du propionate et de l'acétate respectivement égal à -1, -0,67 et 0. Le butyrate peut donc céder davantage d'électrons que le propionate et l'acétate.

1-2-3 Voies métaboliques des AGV

Les acides gras volatils représentent la source de carbone pour la cellule. A ce titre, avant d'être métabolisés il faut qu'ils pénètrent dans la cellule, en passant au travers de la paroi et de la membrane cytoplasmique. Pour l'acétate, il s'agit d'un transport actif (Gottschalk, 1986). Une fois dans la cellule, ils vont être intégrés au cycle des acides tricarboxyliques (cycle de Krebs) en tant qu'acétyl Co-enzyme A (acétyl CoA) (Gottschalk, 1986 ; Lehninger, 1982 ; Stryer, 1992) :

- l'acétate y est intégré directement, sous forme d'acétyl CoA (Figure 1-8) ;
- le propionate est transformé en acétyl CoA via une suite de réactions, avec comme intermédiaires (entre autres) le succinate, le formate, le malate et le pyruvate ;
- le butyrate est transformé en 2 molécules d'acétyl CoA par la β oxydation ;

• le valérate est probablement dégradé lui aussi par la voie de la β oxydation, en donnant comme produit final une molécule d'acétyl CoA et une propionyl CoA (Gottschalk, 1986). Le propionyl CoA sera probablement transformé en acétyl CoA de façon identique au propionate.

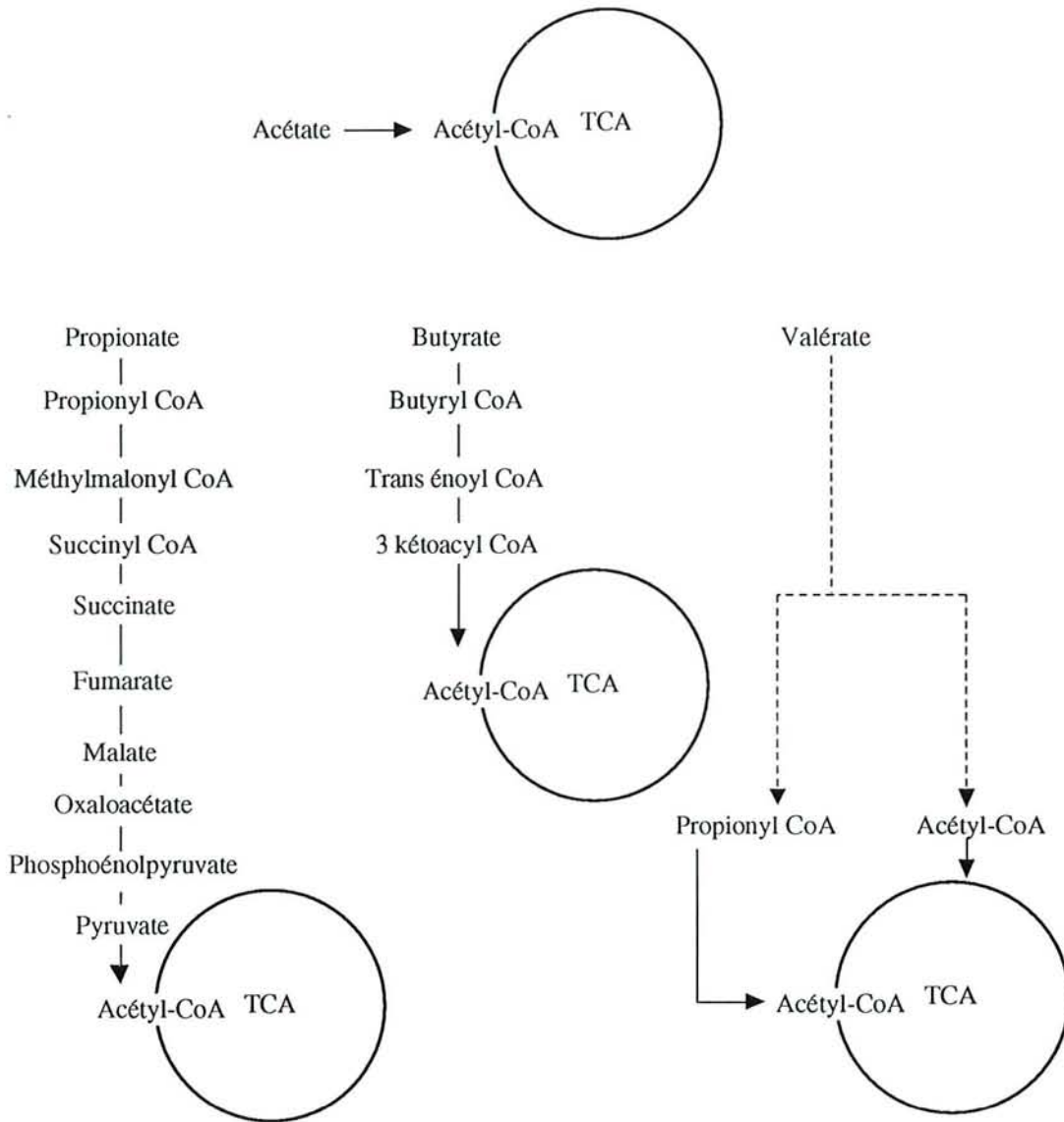


Figure 1-8 : Voies métaboliques de transformation des acides acétique, propionique, butyrique et valérique (d'après Gottschalk, 1986 ; Lehninger, 1982 ; Stryer, 1992) TCA : cycle des acides tricarboxyliques.

1-2-4 Équations théoriques de dénitrification

Toute réaction de transformation peut s'écrire sous la forme d'une équation stœchiométriquement équilibrée. Il existe de nombreux modèles pour prévoir les coefficients de chaque terme de l'équation. Parmi ceux-ci, McCarty (1969 et 1972) a proposé une méthode permettant de calculer les coefficients stœchiométriques de diverses réactions en faisant appel à des demi-équations décrivant la synthèse cellulaire et la production d'énergie. Le tableau 1-5 présente

les réactions globales de dénitrification, avec les nitrates en tant qu'accepteur d'électrons et source d'azote et divers composés en tant que donneurs d'électrons et source de carbone (formate, succinate, glucose, lactate, acétate, propionate, eau usée, et méthanol). L'intérêt de ces équations est qu'elles permettent de relier l'état d'oxydation moyen des atomes de carbone de chaque substrat avec la production de biomasse théorique et le rapport carbone / azote stœchiométrique (quantité de carbone à fournir pour réduire tous les nitrates en azote). Par contre, elles ne prennent pas en compte les facteurs expérimentaux, tels la nature du micro-organisme, le pH, la température...

Tableau 1-5 : Équations théoriques de dénitrification, calculées d'après McCarty (1969, 1972), en fonction de la source de carbone, avec les nitrates en tant que source d'azote. $C_5H_7O_2N$ représente la "formule molaire" d'une bactérie et $C_{10}H_{19}O_3N$ représente la "formule molaire" de l'eau usée.

Source de carbone	Équation correspondante
Formate	$HCOO^- + 0,21 NO_3^- + 0,21 H^+ + 0,20 CO_2 + 0,038 H_2O = 0,04 C_5H_7O_2N + HCO_3^- + 0,085 N_2$
Succinate	$(CH_2)_2(COO^-)_2 + 1,74 NO_3^- + 1,74 H^+ = 0,23 C_5H_7O_2N + 0,84 CO_2 + 2 HCO_3^- + 1,06 H_2O + 0,75 N_2$
Glucose	$C_6H_{12}O_6 + 2,65 NO_3^- + 2,65 H^+ = 0,47 C_5H_7O_2N + 3,66 CO_2 + 5,69 H_2O + 1,09 N_2$
Lactate	$CH_3CHOHCOO^- + 1,43 NO_3^- + 1,43 H^+ = 0,21 C_5H_7O_2N + 0,95 CO_2 + HCO_3^- + 1,98 H_2O + 0,61 N_2$
Acétate	$CH_3COO^- + 1,01 NO_3^- + 1,01 H^+ = 0,13 C_5H_7O_2N + 0,36 CO_2 + HCO_3^- + 1,06 H_2O + 0,44 N_2$
Propionate	$CH_3CH_2COO^- + 1,77 NO_3^- + 1,77 H^+ = 0,22 C_5H_7O_2N + 0,88 CO_2 + HCO_3^- + 2,1 H_2O + 0,77 N_2$
Eau usée	$C_{10}H_{19}O_3N + 6,05 NO_3^- + 6,05 H^+ = 0,85 C_5H_7O_2N + NH_4^+ + HCO_3^- + 4,71 CO_2 + 7,03 H_2O + 2,6 N_2$
Méthanol	$CH_3OH + 0,68 NO_3^- + 0,68 H^+ = 0,11 C_5H_7O_2N + 0,44 CO_2 + 1,95 H_2O + 0,29 N_2$

La figure 1-9 montre que l'état d'oxydation du carbone est corrélé avec le ratio C/N, ce qui était prévisible dans la mesure où plus le substrat peut fournir d'électrons (état moyen d'oxydation du carbone "petit") et moins il faut de carbone pour éliminer une quantité donnée de nitrates. Globalement, le ratio C/N est inversement proportionnel à Y (rendement de croissance).

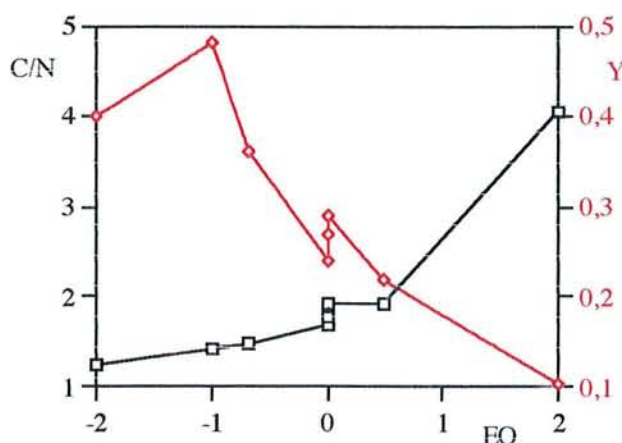


Figure 1-9 : Évolutions du ratio C/N initial et du Y (g MES produites. g⁻¹ substrat consommé) en fonction de l'état d'oxydation (EO) moyen du carbone avec les nitrates (adapté du tableau 1-5).

Cette figure permet d'effectuer un classement *a priori* des acides acétique, propionique, butyrique et valérique en terme d'élimination des nitrates. Leurs états d'oxydation respectifs étant de 0 ; -0,67 ; -1 et -1,2, on peut s'attendre à ce qu'avec le valérate la quantité de carbone à fournir soit la plus faible, et qu'avec l'acétate elle soit la plus élevée, pour éliminer une même quantité de nitrates. Par contre, la production de biomasse devrait être la plus élevée avec le valérate, et la plus faible avec l'acétate.

1-3 Paramètres influençant l'accumulation de nitrites

La présence de nitrites dans une eau d'alimentation est indésirable du fait de son effet toxique (risque de méthémoglobinémie, risque de formation de composés cancérigènes). Des normes strictes limitent la concentration en nitrites à $0,1 \text{ mg NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$ en eau potable (soit $0,03 \text{ mg N-NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$), tandis qu'aucune norme portant sur les nitrites n'existe en eau usée. Pourtant, de très nombreux facteurs ont une influence directe ou indirecte sur l'accumulation de nitrites dans le milieu. Parmi ceux-ci, nous avons choisi de présenter plus particulièrement (i) la nature de l'espèce bactérienne ; (ii) la présence d'oxygène ; (iii) la source de carbone et d'électrons ; (iv) le pH ; (v) la température.

1-3-1 Espèce bactérienne

Ce facteur est probablement le plus important pour expliquer quand et comment il peut se produire une accumulation de nitrites dans des conditions de dénitrification. Rappelons tout d'abord que la dénitrification est une réaction séquentielle, et que le nitrite est un intermédiaire obligatoire. Il est le premier produit de la réduction des nitrates (Figure 1-1), réalisée par la nitrate réductase. On comprend donc tout de suite que si une espèce bactérienne possède une nitrate réductase, mais pas de nitrite réductase, les nitrites vont alors s'accumuler dans le milieu. C'est le cas de *Comamonas testosteroni*, qui est intrinsèquement incapable de réduire les nitrites (Bergey's manual, 1984).

Mais posséder une nitrite réductase ne suffit pas pour empêcher toute accumulation de nitrites. En effet, Betlach et Tiedje (1981) ont clairement montré qu'*Alcaligenes odorans* et *Pseudomonas fluorescens* accumulent transitoirement les nitrites alors que *Flavobacterium* ne les accumule pas du tout, les conditions expérimentales étant les mêmes pour ces deux espèces (Figure 1-10).

Flavobacterium réduit les nitrates sans accumuler de nitrites, c'est-à-dire que la vitesse de réduction des nitrates est supérieure ou égale à celle des nitrites. Par contre *Pseudomonas fluorescens* réduit les nitrates en nitrites plus rapidement qu'il n'est capable de réduire les nitrites. En fait, les espèces qui accumulent les nitrites ont une vitesse spécifique de réduction des nitrates supérieure à celle des nitrites et inversement, celles qui n'accumulent pas les nitrites ont une vitesse de réduction des nitrites supérieure ou égale à celle des nitrates.

Ainsi, pour *Pseudomonas fluorescens* qui accumule les nitrites, les vitesses spécifiques de réduction des nitrates et des nitrites sont respectivement de $0,12$ et $0,07 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ protéine} \cdot \text{min}^{-1}$. Par contre, pour *Flavobacterium* (n'accumule pas les nitrites) ces vitesses spécifiques sont respectivement inférieures à $0,08$ et égales à $0,53 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ protéine} \cdot \text{min}^{-1}$.

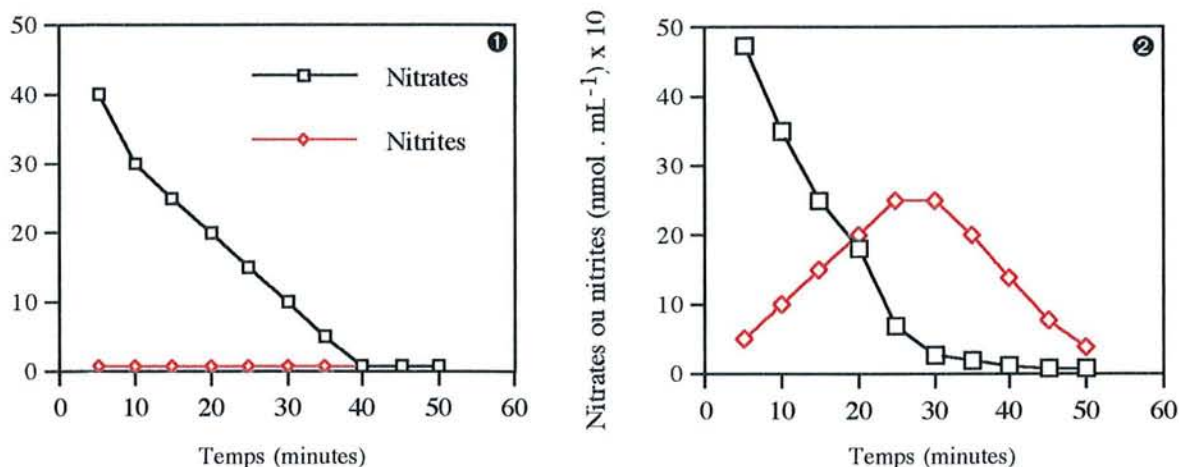


Figure 1-10 : Évolution des concentrations en nitrates et en nitrites au cours de la dénitrification par *Flavobacterium* (1) et *Pseudomonas fluorescens* (2) (modifié d'après Betlach et Tiedje, 1981).

D'autres auteurs ont également montré que l'accumulation de nitrites dépendait, entre autre, de la souche bactérienne : Lazarova *et al.* (1991) avec *Pseudomonas aeruginosa* (accumule les nitrites) et *Pseudomonas stutzeri* (n'accumule pas), Carlson et Ingraham (1983) avec *Pseudomonas stutzeri* et *Paracoccus denitrificans* (accumulent) et *Pseudomonas aeruginosa* (accumule moins que les 2 précédentes espèces).

Mais l'espèce bactérienne seule ne peut pas tout expliquer. En effet, Lazarova *et al.* (1991) montrent que les cultures avec *Pseudomonas stutzeri* ne présentent pas d'accumulation de nitrites, alors que Carlson et Ingraham (1983) montrent exactement le contraire.

1-3-2 Oxygène

Dans la plus part des cas, la dénitrification exige l'absence d'oxygène pour se réaliser. Toutefois, la sensibilité des micro-organismes vis à vis de l'oxygène est variable, puisqu'une espèce comme *Thiosphaera pantotropha* dénitrifie en présence d'oxygène (Robertson et Kuenen, 1984, 1988, 1990, 1992).

En fait, chaque espèce bactérienne possède sa propre sensibilité vis à vis de l'oxygène. Il semble toutefois que la présence d'oxygène bloque d'abord le fonctionnement de l'oxyde nitreux réductase (N_2OR), puis de l'oxyde nitrique réductase (NOR), de la nitrite réductase (NiR) et enfin de la nitrate réductase (NaR). Hochstein *et al.* (1984) ont démontré ce phénomène chez *Paracoccus denitrificans*, et Lloyd *et al.* (1987) ont confirmé que l'oxyde nitreux réductase était effectivement l'enzyme le plus sensible à l'oxygène. Bonin *et al.* (1989) ont démontré la même chose chez

Pseudomonas nautica : l'activité des enzymes est complètement bloquée pour des concentrations croissantes en oxygène, 0,25 mg O₂ . L⁻¹ pour la N₂OR, 2,15 mg O₂ . L⁻¹ pour la NiR et 4,05 mg O₂ . L⁻¹ pour la NaR.

Ainsi, pour une concentration en oxygène supérieure au seuil d'inhibition totale de la NiR, mais inférieure à celui de la NaR (c'est à dire de 2,15 à 4,05 mg O₂ . L⁻¹, chez *Pseudomonas nautica*) la réduction des nitrates se poursuivra tandis que celle des nitrites sera stoppée ; il en résultera donc une accumulation de nitrites. Cette accumulation est toutefois réversible, puisque si les concentrations d'oxygène diminuent la nitrite réductase et l'oxyde nitreux réductase fonctionneront de nouveau (Kawakami *et al.*, 1975 ; John, 1977 ; Waki *et al.*, 1980 chez *Paracoccus denitrificans*. Hernandez et Rowe, 1987 chez *Pseudomonas aeruginosa*. Körner et Zumft, 1989 chez *Pseudomonas stutzeri*).

1-3-3 Source de carbone et d'électrons

La source de carbone peut jouer un rôle sur l'accumulation de nitrites à deux niveaux : *primo*, en jouant sur les proportions relatives des différentes espèces bactériennes ; *secundo*, directement sur le métabolisme de la bactérie.

Blaszczyk *et al.* (1980) ont testé différents substrats carbonés en conditions dénitrifiantes avec une population bactérienne mixte. Le méthanol permettait la sélection de *Pseudomonas fluorescens*, l'éthanol de *Pseudomonas mendocina*, l'acétate de *Pseudomonas aeruginosa*, et enfin avec le glucose il y avait une seule espèce dominante : *Alcaligenes faecalis* (Tableau 1-6).

Tableau 1-6 : Espèces bactériennes dominantes en fonction de la source de carbone appliquée (batch, 26 °C, pH initial = 6, 1 g . L⁻¹ N-NO₃⁻) (modifié d'après Blaszczyk *et al.*, 1980).

Source de carbone (3,5 g . L ⁻¹)	Espèces bactériennes dénitrifiantes dominantes (%)
Méthanol	<i>Pseudomonas fluorescens</i> 91,2
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 5,6
Éthanol	<i>Pseudomonas mendocina</i> 88,9
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 11,1
Acétate	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 78,3
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> 13,0
Glucose	<i>Alcaligenes faecalis</i> 100,0

La source de carbone peut également avoir une action directe sur le métabolisme bactérien. Akunna *et al.* (1993) montrent que l'accumulation de nitrites est moindre en utilisant l'acétate plutôt que l'acide lactique, à la fois en terme de hauteur de pic (20 mg contre 110 mg N-NO₂⁻ . L⁻¹) qu'en terme de durée : en 40 heures il n'y a plus de nitrites avec l'acétate, il en faut 55 à l'acide lactique pour que tous les nitrites soient réduits en gaz. De même, Blaszczyk (1993) a testé le méthanol, l'acétate de sodium et l'éthanol en conditions de dénitrification chez *Paracoccus denitrificans*. Il montre que les 3 sources de carbone testées amènent une accumulation transitoire

de nitrites d'amplitude différente en fonction du micro-organisme : celle-ci est maximale avec le méthanol et l'acétate de sodium, et plus faible avec l'éthanol.

1-3-4 pH

Certaines souches bactériennes sont capables de dénitrifier entre pH 4 et 11 (Knowles, 1982), mais la zone de pH où le taux de dénitrification est maximal se situe plutôt entre 6 et 8,5 (Grady et Lim, 1980). Cependant, si la réduction des nitrites et celle des nitrates se font sensiblement au même pH optimal, l'activité de la nitrite réductase diminue bien plus rapidement que celle de la nitrate réductase lorsqu'on s'éloigne de cet optimum, et ce surtout vers les pH basiques ; une augmentation de pH d'une unité entre 7,5 et 8,5 entraîne une diminution de l'activité de la NiR de $0,225 \text{ mg N-NO}_2^- \cdot \text{mg}^{-1} \text{ cellules} \cdot \text{h}^{-1}$ à $0,13 \text{ mg N-NO}_2^- \cdot \text{mg}^{-1} \text{ cellules} \cdot \text{h}^{-1}$ (Dodd et Bone, 1975).

1-3-5 Température

Pour des températures comprises entre 5 et 30 °C, le taux de dénitrification augmente de façon exponentielle et suit une loi d'Arrhénius (Parker *et al.* cités par Grady et Lim, 1980). Toutefois, Knowles (1982) affirme que la dénitrification par une boue activée est possible entre 10 et 75 °C. Au-delà, les cinétiques de réduction déclinent rapidement. En fait, l'effet de la température varie d'une espèce bactérienne à l'autre (Grady et Lim, 1980). La température agissant directement sur les cinétiques enzymatiques, il n'est pas impossible qu'elle ait effet direct sur l'accumulation de nitrites, en accélérant ou en ralentissant l'activité de telle ou telle réductase.

CHAPITRE II :

MATERIEL ET METHODES

2-1 Milieux de culture	28
2-1-1 Bouillon peptoné et nitraté	28
2-1-2 Milieu gélosé	28
2-2 Mesures physico-chimiques	28
2-2-1 Dosage des nitrates	28
2-2-2 Dosage des nitrites	29
2-2-2-1 Faible concentration.	29
2-2-2-2 Forte concentration.	29
2-2-3 Dosage des ions ammonium	30
2-2-4 Dosage du carbone organique dissous	30
2-2-5 Détermination de la demande chimique en oxygène	30
2-2-6 Détermination des matières en suspension	31
2-2-7 Analyse élémentaire	31
2-2-8 Mesure d'absorbance	31
2-3 Microbiologie	31
2-3-1 Isolement des espèces bactériennes	31
2-3-2 Dénombrement total des bactéries	32
2-3-3 Identification des espèces bactériennes	32
2-3-3-1 Coloration de Gram	32
2-3-3-2 Test oxydase	33
2-3-3-3 Galerie API 20 NE	33
2-3-3-4 Tests complémentaires	34
2-3-3-4-1 Test glucose fermentation	34
2-3-3-4-2 Test glucose assimilation	34
2-3-3-4-3 Test à 42 °C	34
2-3-3-4-4 Test Mac Conkey	34
2-3-3-4-5 Test NaCl à 4 %	34
2-3-3-4-6 Test mobilité	35
2-3-2-4-7 Test sorbitol	35
2-3-3-4-8 Test O129/R	35

2-1 Milieux de culture

2-1-1 Bouillon peptoné et nitraté

La composition du bouillon peptoné BioMérieux (réf. 5 111 1) pour 1 litre est la suivante : infusion de cœur : 10 g ; biothione : 10 g ; chlorure de sodium : 5 g.

Après avoir pesé 25 g . L⁻¹ de cette préparation, 1,083 g de nitrate de potassium (Prolabo 26 857.368) sont ajoutés (concentration finale : 150 mg . L⁻¹ de N-NO₃⁻). Après 1 à 2 minutes de chauffage à ébullition pour dissoudre la poudre, le pH est ajusté à 7,3 par ajout de NaOH 10 N.

Le milieu est ensuite autoclavé 20 minutes à 121°C avant d'être conservé à + 5 ± 1 °C, au maximum pendant 2 semaines.

2-1-2 Milieu gélosé

La composition du milieu nutritif gélosé de base (BioMérieux 5 139 1) pour 1 litre est la suivante : biogélytone : 5 g ; extrait de viande de bœuf : 3 g ; NaCl : 8 g ; gélose : 15 g.

Après avoir pesé 31 g . L⁻¹ de cette préparation, 1,083 g de nitrate de potassium sont ajoutés (concentration finale : 150 mg . L⁻¹ de N-NO₃⁻). Après 1 à 2 minutes de chauffage à ébullition pour dissoudre la poudre, respectivement 89,5 et 77,5 et 72,0 et 68,0 µl d'acides acétique (Prolabo, Rectapur, réf. : 20 103 295), propionique (Prolabo, Rectapur, réf. : 20 645 264), butyrique (Prolabo, Rectapur, réf. : 20 230 294) et valérique (Prolabo, Rectapur, réf. : 20 750 187) sont ajoutés (concentration finale de 150 mg . L⁻¹ en carbone soit 37,5 mg . L⁻¹ de C pour chaque AGV). Le pH est ajusté à 7,3 par ajout de NaOH 10 N.

Le milieu est ensuite autoclavé 20 min à 121°C, avant d'être coulé en boîtes de pétri (90 mm de diamètre). Les boîtes sont conservées à + 5 ± 1°C, au maximum pendant 2 semaines.

2-2 Mesures physico-chimiques

2-2-1 Dosage des nitrates.

Le principe de la méthode est de réduire les nitrates présents dans l'échantillon en nitrites. Cette réduction se fait avec des sels de cadmium. Les nitrites ainsi produits réagissent alors en milieu acide avec l'acide sulfanilique pour former un sel de diazonium. Ce sel réagit avec l'acide gentisique pour former un complexe coloré ambre, dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de nitrates initialement présents. La longueur d'onde pour la réalisation des mesures spectrophotométriques est de 500 nm (Hitachi U-2000, B-Braun ScienceTech).

Dans la mesure où les nitrates sont réduits en nitrites, la présence de nitrites dans l'échantillon interfère. Cette interférence a été quantifiée sur plusieurs lots de réactifs, et fait l'objet d'une correction systématique : $C_{réelle}(\text{NO}_3^-) = C_{mesurée}(\text{NO}_3^-) - C_{mesurée}(\text{NO}_2^-) \times 1,78$.

Les matières en suspension de l'échantillon sont éliminées. Le surnageant est alors dilué dans de l'eau MilliQ afin de se trouver dans la zone de linéarité du dosage. Ensuite le kit de dosage NitraVer 5 (Hach 14 034-66) est versé dans un tube contenant un volume final d'échantillon dilué de 25 mL. Il est agité 1 minute sur agitateur vibrant. Après 6 min de repos, l'absorbance du complexe coloré formé est mesurée à 500 nm. La concentration de l'échantillon est déterminée à l'aide d'une gamme étalon préalablement établie pour des concentrations en nitrates allant de 5 à 25 mg N-NO₃⁻ . L⁻¹.

2-2-2 Dosage des nitrites

2-2-2-1 Faible concentration.

Les nitrites dans l'échantillon réagissent avec l'acide sulfanilique pour former un sel de diazonium, qui réagit avec l'acide chromotrope pour produire un complexe coloré rose, dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de nitrites présents. La longueur d'onde pour la mesure spectrophotométrique est égale à 507 nm.

L'échantillon (sans les matières en suspension) est dilué dans de l'eau MilliQ afin de se trouver dans la zone de linéarité du dosage. Puis le kit de dosage NitriVer 3 (Hach 14 065-66) est versé dans un tube contenant un volume final d'échantillon de 25 mL. Il est agité 15 secondes sur agitateur vibrant. Après 15 minutes de repos, l'absorbance du complexe coloré formé est mesurée à 507 nm. La concentration de l'échantillon est déterminée à l'aide d'une gamme étalon préalablement établie pour des concentrations en nitrites allant de 0 à 0,5 mg N-NO₂⁻ . L⁻¹.

2-2-2-2 Forte concentration.

La méthode utilise le sulfate ferreux en milieu acide pour réduire les nitrites en oxyde nitreux. L'ion ferreux se combine avec l'oxyde nitreux pour former un complexe brun verdâtre dont la coloration est proportionnelle à la quantité de nitrites présents. Le dosage se réalise à 585 nm par mesure spectrophotométrique.

L'échantillon est dilué dans de l'eau MilliQ afin de se trouver dans la zone de linéarité du dosage. Le kit de dosage NitriVer 2 (Hach 2219-66) est alors versé dans un tube contenant un volume final d'échantillon de 25 mL. Il est agité sur agitateur vibrant pendant 30 secondes. Après 10 minutes de repos, l'absorbance du complexe coloré formé est mesurée à 585 nm. La concentration de l'échantillon est déterminée à l'aide d'une gamme étalon préalablement établie pour des concentrations en nitrites allant de 5 à 80 mg N-NO₂⁻ . L⁻¹.

2-2-3 Dosage des ions ammonium

Les composés ammoniacaux se combinent avec le chlore pour former des monochloramines. Ces monochloramines se combinent avec le salicylate pour former du 5-aminosalicylate. Ce composé (jaune) est alors oxydé en présence d'un catalyseur au nitroprussiate, pour former un complexe coloré bleu. La coloration bleue est masquée par la coloration jaune en excès pour donner une solution finale colorée en vert. Le dosage est réalisé par spectrophotométrie à 655 nm.

L'échantillon est dilué dans de l'eau MilliQ afin de se trouver dans la zone de linéarité du dosage. Le kit de dosage réactif salicylate (Hach 21460-68) est alors versé dans un tube contenant un volume final d'échantillon de 25 mL. Il est agité sur agitateur vibrant pendant 30 secondes. Après 3 minutes de repos, le réactif cyanurate alcalin (Hach 21462-66) est versé dans le tube, agité de nouveau 30 secondes. Après 10 minutes de repos, l'absorbance du complexe coloré formé est mesurée à 655 nm. La concentration de l'échantillon est déterminée à l'aide d'une gamme étalon préalablement établie pour des concentrations en ions ammonium allant de 0,1 à 1 mg N-NH₄⁺ . L⁻¹.

2-2-4 Dosage du carbone organique dissous

Le carbone organique dissous (COD) est déterminé dans les surnageants d'échantillons dont les matières en suspension ont été éliminées par centrifugation, suivie éventuellement d'une filtration.

Deux à cinq millilitres de surnageant sont transvasés dans un tube traité au préalable à 550°C pendant 4 h. De l'eau MilliQ est ajoutée pour obtenir un volume final de 20 mL. Quarante microlitres d'acide nitrique à 65 % sont additionnés et un barbotage à l'oxygène ultrapur (5.0, Oxygène Liquide) est appliqué dans chaque tube afin d'éliminer le carbone minéral. Les tubes sont placés sur un passeur automatique et le dosage est effectué par un analyseur de carbone Dohrman DC80 préalablement étalonné à l'aide d'une solution de hydrogénéphthalate de potassium (Merck 4874) acide (pH = 2) à 10 mg C . L⁻¹ ou à 400 mg C . L⁻¹.

2-2-5 Détermination de la demande chimique en oxygène

La demande chimique en oxygène (DCO) est déterminée dans les surnageants d'échantillons dont les matières en suspension ont été éliminées par centrifugation à 20 000 g.

Le surnageant éventuellement dilué dans de l'eau MilliQ est transvasé dans des tubes prêts à l'emploi (10 à 160 mg DCO . L⁻¹ Aqualytic 418955), le volume final ajouté étant précisément de 2 mL. Les tubes sont alors placés dans un four (COD reactor Hach) préchauffé à 148 °C pendant exactement 2 heures. Après refroidissement, ils sont lus au spectrophotomètre à 438 nm. La gamme étalon est réalisée avec un étalon à 500 mg DCO . L⁻¹ (étalon DCO Aqualytic 420804).

2-2-6 Détermination des matières en suspension

Les matières en suspension (MES) sont déterminées après centrifugation de l'échantillon, à 3 000 ou à 20 000 g. Le culot de centrifugation est repris dans deux fois 4 mL d'eau MilliQ. Après agitation, la suspension est versée dans un creuset pré-pesé. Après chauffage pendant 24 heures à 105 °C, le creuset est de nouveau pesé et la différence de masses, rapportée à 1 litre, donne la concentration des MES en mg . L⁻¹.

2-2-7 Analyse élémentaire

L'analyse élémentaire est réalisée par le Service Central d'Analyses (CNRS, 69390 Vernaison) sur les matières en suspension, séchées par chauffage à 105 °C pendant 24 heures, puis broyées aussi finement que possible dans des tubes en verre traités à 550 °C (tubes Pierce).

Deux protocoles différents ont été suivis, d'abord pour les analyses décrites au chapitre III (Caractérisation des populations dénitrifiantes) puis pour les analyses décrites au chapitre V (Bilan électrons) :

(i) les analyses élémentaires réalisées sur la biomasse dénitrifiante telle qu'elle est décrite au chapitre III ont été faites sur un prélèvement d'environ 1,5 litres de culture bactérienne, centrifugé à 20 000 g pendant 10 minutes à +20 °C. Les culots bactériens ont été homogénéisés manuellement dans 250 mL d'eau MilliQ, puis centrifugés (20 000 g, 10 minutes, 20 °C) ; cette opération est répétée deux fois, puis les culots sont séchés à l'étuve pour envoi au CNRS ;

(ii) les analyses élémentaires réalisées sur les biomasses dénitrifiantes telle qu'elles sont décrites au chapitre V ont été faites sur un prélèvement d'environ 0,9 litre de culture bactérienne, centrifugé à 20 000 g pendant 10 minutes à +20 °C. Les culots bactériens ont été directement séchés à l'étuve à 105 °C pendant 24 heures pour envoi au CNRS.

2-2-8 Mesure d'absorbance

L'absorbance des suspensions bactériennes est mesurée à 620 nm par spectrophotométrie (Hitachi U-2000), éventuellement après dilution de l'échantillon dans de l'eau MilliQ.

2-3 Microbiologie

2-3-1 Isolement des espèces bactériennes

Un millilitre d'échantillon provenant d'un réacteur de dénitrification est ajouté à 9 mL d'eau MilliQ stérile à 9 g . L⁻¹ de NaCl. Après agitation de ce tube, une dilution d'un dixième est à nouveau réalisée, et ce jusqu'à 10⁻⁸ (adapté en fonction de la densité de la biomasse).

Un prélèvement de 0,1 mL des tubes 10⁻⁵ à 10⁻⁸ est étalé à l'aide d'une pipette Pasteur coudée sur milieu nutritif coulé en boîte de pétri, en triplicat. Les boîtes sont alors incubées 120 heures en

jarre anaérobie (BioMérieux ; BBL GasPack 96112 : disponible H₂ + carbon dioxide generator envelopes ; GasPack catalyst 96206 ; anaerobic indicator 96117) à + 20°C.

Après dénombrement des unités formant des colonies (UFC), quelques unes (entre 10 à 30 au total) sont isolées après avoir été choisies aléatoirement. Pour ce faire, un quadrillage de 1 cm de côté est appliqué aux boîtes pour lesquelles les colonies sont suffisamment isolées. Tous les deux ou trois carrés, toutes les colonies sont prélevées puis étalées séparément sur de nouvelles boîtes, en vérifiant que toutes les colonies morphologiquement différentes ont au moins été sélectionnées une fois. Deux isolements consécutifs sont effectués à 48 h d'intervalle.

2-3-2 Dénombrement total des bactéries

Le dénombrement total des bactéries est effectué au microscope à épifluorescence en traitant préalablement les échantillons au DAPI (4', 6-diamino-2-phénylindole).

La méthodologie est la suivante : 9 mL d'échantillon, dilué ou non dans de l'eau MilliQ stérile dépourvue de bactéries (filtrée sur filtre Millex GS de 0,22 µm de porosité, Millipore) est ajouté à 1 mL d'une solution de DAPI (Sigma) à 25 µg . mL⁻¹. Après homogénéisation et 15 minutes de temps de contact, l'échantillon est filtré sur un filtre noir en polycarbonate de 0,2 µm de porosité (Millipore GTBP). Le filtre est monté entre lame et lamelle en plaçant une goutte d'huile à immersion (Merck) sur le filtre. Il est ensuite examiné au microscope à épifluorescence (Leitz GMBH ; excitation 340 nm ; lecture 465 nm) avec un objectif plan (Leitz) à immersion (x 100).

La numération est réalisée sur 10 champs répartis sur le filtre à travers un oculaire quadrillé. Le résultat est exprimé en nombre total de bactéries par mL à partir de l'expression mathématique suivante : $N = \frac{X \cdot Sf}{V \cdot Sr} \times \frac{1}{D}$ où N est le nombre total de bactéries par mL, X la moyenne des bactéries comptées sur 10 champs, V le volume de l'échantillon (mL), Sf la surface utile du filtre (mm²), Sr la surface observée sous le réticule (mm²) et D la dilution de l'inoculum.

2-3-3 Identification des espèces bactériennes

Quelques souches bactériennes ont été d'abord identifiées au sein de notre laboratoire, puis ont été envoyées à l'Institut Pasteur (Paris) pour confirmer notre identification.

2-3-3-1 Coloration de Gram

Une colonie bactérienne pure (cf paragraphe précédent) est étalée sur une goutte d'eau milliQ stérile, puis fixée par chauffage modéré sur une lame. Après refroidissement du frottis, la lame est recouverte de cristal violet (Gram color coloration set Merck 11885). Le cristal violet est laissé 1 minute puis éliminé par entraînement avec du lugol. Le lugol reste sur la lame quelques secondes et est renouvelé. Ce temps de mordantage doit être égal ou légèrement supérieur au temps du violet. Puis la décoloration à l'alcool est effectuée jusqu'à ce que le liquide qui s'écoule de la préparation soit incolore. La préparation est ensuite rincée abondamment et est couverte d'eau. Quelques

gouttes de safranine sont versées à chaque extrémité de la lame, le temps de réaction étant de 10 à 20 secondes. Après recoloration par la safranine, la lame est rincée à l'eau et séchée.

Un examen au microscope à immersion est alors réalisé (grossissement x 1000). La coloration de Gram permet de classer les bactéries en deux grandes catégories : (i) les bactéries Gram positif qui gardent leur coloration violette après décoloration à l'alcool ; (ii) les bactéries Gram négatif qui décolorées par l'alcool, sont teintées par la safranine et apparaissent roses ou rouges.

2-3-3-2 Test oxydase

Ce test est réalisé sur une colonie pure ou sur plusieurs petites colonies. Celles ci sont prélevées à l'aide d'une pipette Pasteur à bout rond. Une goutte d'eau distillée est déposée sur un disque oxydase (BioMérieux 5 592 2). La colonie prélevée est étalée et frottée sur le disque.

L'apparition d'une couleur violette en quelques secondes à une minute indique une réaction positive, *i.e.* la mise en évidence de la cytochrome oxydase, enzyme de la chaîne respiratoire.

2-3-3-3 Galerie API 20 NE

La galerie API 20 NE (BioMérieux, 20 050) permet l'identification des bacilles Gram négatif non entérobactéries. Les galeries sont réalisées après 3 isolements consécutifs : les 2 premiers sont espacés de 48 heures, et le troisième de 72 heures.

A partir d'une ou plusieurs colonies bactériennes pures, une suspension de turbidité environ égale à celle de l'étalon 0,5 de McFarland (BioMérieux, 70 900) est réalisée dans une solution de NaCl stérile à 9‰. Cette suspension est utilisée pour ensemercer les huit premières cupules de la galerie, puis huit gouttes sont ajoutées dans l'ampoule AUX Médium (BioMérieux, 20 050). Les douze cupules restantes sont alors ensemençées à partir de cette ampoule et la galerie est incubée à 30 °C, pendant 24 h.

Après 24 heures à 30 ± 1 °C, le test NO_3^- est révélé : pour cela, une goutte de réactifs NIT 1 (BioMérieux 70 440) et NIT 2 (BioMérieux 70 450) sont ajoutés dans la cupule NO_3^- . Après 5 minutes de temps de contact, une couleur rouge indique la présence de nitrites (les nitrates initialement présents ont donc été réduits en nitrites). L'absence de coloration peut être due à la réduction des oxydes ioniques azotés en gaz : 2 à 3 mg de réactif Zn (BioMérieux, 70 380) sont ajoutés dans la cupule NO_3^- , le temps de réaction est de quelques minutes. Le zinc permet de réduire d'éventuels nitrates en nitrites. Par conséquent, une cupule restée incolore indique une réduction des nitrates en gaz, et une cupule colorée indique que les nitrates initiaux (maintenant réduits en nitrites par le zinc) n'ont pas été consommés.

Le test TRP est également lu à 24 heures. Une goutte de réactif JAMES (BioMérieux 70 540) est ajoutée dans la cupule TRP : une coloration rose indique une réaction positive (formation d'indole à partir du tryptophane).

Les autres tests sont lus à 24 et 48 heures. Les douze tests d'assimilation sont lus directement par apparition d'un trouble dans les cupules. En cas de doute sur la présence d'un trouble, la galerie peut être incubée jusqu'à 96 heures, et le trouble apprécié de nouveau à ce moment.

2-3-3-4 Tests complémentaires

Dans certains cas, le profil obtenu par la galerie API nécessite l'emploi de tests complémentaires pour affiner l'identification.

2-3-3-4-1 Test glucose fermentation

Ce test est un test de fermentation du glucose avec production de gaz. Il est réalisé en ampoules OF medium (BioMérieux 5011). A partir d'une suspension bactérienne, deux ampoules sont ensemencées par piqûre centrale ; seule une des deux ampoules est recouverte d'huile de paraffine. La lecture se fait au bout de 24 et 48 heures d'incubation à 30 °C. Une coloration jaune et une production de gaz dans l'ampoule recouverte d'huile signifie une réaction positive.

2-3-3-4-2 Test glucose assimilation

Ce test est un test d'assimilation du glucose par un mécanisme oxydatif. Il est réalisé en ampoules OF medium (BioMérieux 5011). A partir d'une suspension bactérienne, une ampoule est ensemencée par piqûre centrale. La lecture se fait au bout de 24 et 48 heures d'incubation à 30 °C. Une coloration jaune signifie une réaction positive.

2-3-3-4-3 Test à 42 °C

Ce test consiste à mettre en évidence les bactéries acceptant de pousser à 42 °C. Il est réalisé en bouillon peptoné (BioMérieux, 5 111 1). Après ensemencement de 2 tubes de bouillon stérile, l'un est placé dans un bain marie thermostaté à 42 °C, l'autre incubé à + 30 °C. L'incubation dure de 24 heures à plusieurs jours, et un trouble dans le tube à 42 °C signifie une réaction positive.

2-3-3-4-4 Test Mac Conkey

Le milieu Mac Conkey (BioMérieux 4 314 1) contient des inhibiteurs de croissance (sels biliaires...). Après étalement des colonies bactériennes, puis incubation au moins 48 heures à 30 °C, il suffit de noter quelles souches se sont multipliées. En parallèle, un témoin en gélose nutritive classique est réalisé pour s'assurer de la survie de la souche.

2-3-3-4-5 Test NaCl à 4 %

Des tubes de bouillon nutritif complété en NaCl (40 g de NaCl par litre de bouillon) sont préparés. Après stérilisation par autoclavage, ils sont ensemencés à partir d'une culture âgée de 72 heures. Les tubes sont mis à incuber à 30 °C pendant au moins 48 heures. Un trouble signifie que la bactérie croît en présence de NaCl à 4 %, une absence de trouble signifie une absence de croissance. Un tube témoin en bouillon nutritif sans NaCl est également réalisé.

2-3-3-4-6 Test mobilité

Le test mobilité est réalisé en tubes contenant un milieu mannitol. Le milieu est inoculé par piqûre centrale, à partir d'un inoculum en milieu liquide, et est incubé au moins 48 heures à 30 °C. Une croissance en halo autour de la piqûre signifie que le germe est doué de mobilité, une croissance uniquement autour de la piqûre signifie que la bactérie n'est pas mobile.

2-3-2-4-7 Test sorbitol

Des tubes contenant du sorbitol (1 g . L⁻¹) comme seule source de carbone, ainsi que 0,35 g de KH₂PO₄, 0,775 g de K₂HPO₄, 0,2 g de (NH₄)₂SO₄, 9 g de NaCl et 1 mL de solution d'oligo éléments sont préparés, autoclavés. Après ensemencement à partir d'une culture âgée de 72 heures, et incubation au moins 48 heures à 30 °C, un trouble signifie que la bactérie peut se développer avec du sorbitol comme seule de carbone, une absence de trouble impliquant le contraire. En parallèle, un témoin en bouillon nutritif est réalisé pour s'assurer de la survie de la souche.

2-3-3-4-8 Test O129/R

Le composé O129/R (2,4-diamino 6,7-diisopropylptéridine, Diagnostics Pasteur) est un composé vibriostatique, c'est-à-dire qu'il inhibe la croissance de certains germes. A partir d'une suspension bactérienne contenant 2 à 3 10⁶ bactéries . mL⁻¹, 4 mL sont étalés sur boîte de Pétri (milieu : gélose nutritive complémentée en nitrates et en AGV). Après homogénéisation, l'excès de liquide est aspiré (pipette Pasteur stérile), et la boîte est placée environ 15 minutes à 37 °C pour séchage. Ce temps écoulé, 3 disques imprégnés du composé O129/R sont déposés sur la boîte, loin les uns des autres. Après 18 à 24 heures d'incubation à 30 °C, la lecture est réalisée : un tapis bactérien uniforme signifie une réaction négative (le composé vibriostatique n'inhibe pas la croissance du germe considéré) tandis qu'une zone sans bactérie autour du disque signifie une réaction positive (le composé empêche la croissance de l'espèce testée).

CHAPITRE III :

**CARACTERISATION DES
POPULATIONS
DENITRIFIANTES**

3-1 Protocoles	38
3-1-1 Réacteur de dénitrification	38
3-1-1-1 Efficacité du réacteur.....	38
3-1-1-2 Population bactérienne	39
3-1-2 Influence du taux de dilution	39
3-1-2-1 Efficacité des réacteurs.....	39
3-1-2-2 Populations bactériennes	40
3-1-3 Métabolisme respiratoire de quelques espèces bactériennes faiblement dénitrifiantes.....	40
3-2 Résultats.....	41
3-2-1 Fonctionnement du réacteur de dénitrification	41
3-2-1-1 Efficacité du réacteur.....	42
3-2-1-2 Population bactérienne	43
3-2-2 Influence du taux de dilution sur le fonctionnement d'un réacteur de dénitrification	44
3-2-2-1 Efficacité des réacteurs.....	44
3-2-2-2 Calcul des paramètres cinétiques	46
3-2-2-3 Peuplement bactérien	48
3-2-3 Métabolisme respiratoire de quelques espèces bactériennes faiblement dénitrifiantes.....	51
3-3 Discussion.....	53
3-4 Conclusions.....	56

En milieu environnemental, la dénitrification est généralement le fait d'une population bactérienne mixte, plusieurs espèces pouvant facilement respirer les nitrates, les genres *Pseudomonas*, *Alcaligenes* et *Paracoccus* étant peut-être les plus connus (Tiedje, 1988 ; Zumft, 1992). Disposer d'un inoculum bactérien standard était absolument nécessaire pour pouvoir répéter et comparer les différentes expériences mises en œuvre. La seule manière simple de maintenir en laboratoire un écosystème bactérien stable consistait à travailler en chemostat. Aussi une culture en condition de dénitrification a été réalisée dans un réacteur alimenté en continu pendant 18 mois consécutifs dans le but de fournir pour chaque expérimentation la biomasse voulue, en principe dans le même état physiologique à chaque prélèvement. Cette biomasse a été caractérisée tant du point de vue des taux d'élimination du carbone et des nitrates que du point de vue de sa composition bactérienne. Une approche du métabolisme respiratoire de quelques espèces a été entreprise.

3-1 Protocoles

3-1-1 Réacteur de dénitrification

Le réacteur de dénitrification a étéensemencé à partir de boues activées et est alimenté avec un mélange de quatre AGV en tant que seule source de carbone et d'électrons. Le milieu d'alimentation contient (par litre) : 1,25 mL d'acide acétique, 1,085 mL d'acide propionique, 1,008 mL d'acide butyrique, 0,955 mL d'acide valérique, 13,3 g de KNO_3 , 0,45 g de KH_2PO_4 , 0,30 g de K_2HPO_4 , et 8 g de NaOH (pH ajusté vers 5). A 1 litre de milieu d'alimentation est ajouté 1 mL d'une solution stock d'oligo-éléments (0,25 g de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,5 g de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ et 0,13 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, qsp 1 litre d'eau MilliQ). Le ratio C/N est ajusté à 1,14. La température est régulée entre 18 et 22 °C. Le volume total de réacteur (matériau : Plexiglas) est de 10 litres, le volume utile étant de 9 litres. Un dispositif aimanté interne permet d'éliminer mécaniquement la population bactérienne sur les parois. Le temps de résidence hydraulique (TRH) de la biomasse dans le réacteur est fixé à 5 jours. Les charges volumiques exprimées en N-nitrates et C-AGV sont respectivement égales à 0,37 et à 0,42 g . L⁻¹ . j⁻¹.

Le réacteur est couvert d'une feuille de papier aluminium pour prévenir la croissance d'éventuels organismes photosynthétiques. Le pH est régulé ($7,30 \pm 0,06$) par l'ajout d'acide chlorhydrique 2,8 N. Un barbotage régulier et permanent d'argon est appliqué au système, ceci pour éviter la présence d'oxygène. Le réacteur est considéré comme étant parfaitement mélangé, car agité avec une pompe centrifuge immergée (débit de recyclage : 600 L . h⁻¹). Le potentiel redox est suivi avec une électrode redox Ingold (cellule de mesure : platine ; référence : Ag/AgCl), et est corrigé par rapport à une électrode à hydrogène en ajoutant +210,5 mV à 20 °C.

3-1-1-1 Efficacité du réacteur

Les prélèvements sont réalisés par soutirage de 40 mL de culture bactérienne du chemostat. Après centrifugation à 3 000 g pendant 15 minutes à température ambiante (de J0 à J333) où à

20 000 g pendant 10 minutes à +4°C (de J333 à J550) le surnageant est filtré sur filtre de 0,65 µm de porosité (DAWP02500, Millipore) (uniquement de J0 à J333), puis est utilisé pour le dosage des nitrates, nitrites et du carbone organique ; le culot sert pour la mesure des matières en suspension (MES).

3-1-1-2 Population bactérienne

La population bactérienne est estimée à la fois en terme quantitatif par des comptages du nombre total de cellules et du nombre d'unités formant colonies, et en terme qualitatif par la détermination des espèces bactériennes. Le chapitre Matériel et Méthodes, paragraphes 3-2 et 3-3 décrit ces techniques.

Les comptages du nombre total de cellules ont été réalisés sur des prélèvements faits à J12, J55, J109, J164, J195, J228, J263, J294, J343, J423 et J488 (J0 correspond au jour de l'inoculation du réacteur, et J "x" le x^{ième} jour de fonctionnement de ce réacteur).

3-1-2 Influence du taux de dilution

Chaque chemostat est rempli avec 3,6 litres de biomasse prélevés à partir du réacteur de dénitrification décrit au paragraphe précédent. Le milieu d'alimentation utilisé et la régulation température sont les mêmes que ceux décrits précédemment. Le pH est régulé à $7,4 \pm 0,05$ avec de l'acide chlorhydrique 2,8N, et le barbotage à l'argon est appliqué à chaque prélèvement, pendant environ 15 minutes. Le volume total du réacteur (Applikon) est de 5 litres, le volume utile étant de 3,6 L. Le tableau 3-1 présente les différents TRH testés, ainsi que les débits appliqués et les charges volumiques en carbone et en nitrates.

Tableau 3-1 : Caractéristiques de fonctionnement des chemostats en fonction du taux de dilution (D) appliqué.

	D (j ⁻¹)	0,2	0,25	0,29	0,33	0,4	0,5	0,67	1	1,11	1,18	1,25
	TRH (j)	5	4	3,5	3	2,5	2	1,5	1	0,9	0,85	0,8
	Vol (L)	3,6										
	Q (L . j ⁻¹)	0,72	0,9	1,03	1,2	1,44	1,8	2,4	3,6	4,0	4,2	4,5
Concentrations d'entrée	g C . L ⁻¹	2,1										
	g N . L ⁻¹	1,85										
Charges volumiques	g C . L ⁻¹ . j ⁻¹	0,42	0,52	0,6	0,7	0,84	1,05	1,4	2,1	2,33	2,47	2,62
	g N . L ⁻¹ . j ⁻¹	0,37	0,46	0,53	0,62	0,74	0,92	1,23	1,8	2	2,12	2,25
C/N appliqué		1,15										

Une fois l'état stationnaire caractérisé (mesures physico-chimiques et microbiologiques), un nouveau prélèvement de 3,6 litres est réalisé sur le réacteur décrit au paragraphe 1-1.

3-1-2-1 Efficacité des réacteurs

Les prélèvements (20 à 40 mL) sont réalisés tous les jours à tous les deux jours, selon le TRH testé. Le pH et le potentiel redox sont mesurés à ce moment.

La densité optique (D.O.) est lue après dilution de l'échantillon dans de l'eau MilliQ. Le reste du prélèvement est centrifugé soit à 3 000 g pendant 15 minutes à température ambiante (du TRH 5 jours au TRH 2,5 jours) soit à 20 000 g pendant 10 minutes à +4°C (du TRH 2 jours au TRH 0,8 jours). Le surnageant, filtré sur filtre de 0,60 µm de porosité (uniquement pour 5 < TRH < 2,5 jours), est utilisé pour le dosage des nitrates, nitrites et du carbone organique ; le culot sert pour la mesure des matières en suspension (MES).

3-1-2-2 Populations bactériennes

Au début de l'expérience ($t = 0$), ainsi qu'à l'état stationnaire (compter 3 à 5 fois le TRH), en plus des analyses décrites ci-dessus, un dénombrement des bactéries totales (coloration par le Dapi) et un étalement sur gélose nutritive (complémentée en nitrates et en AGV) sont réalisés. Environ 15 colonies isolées sont sélectionnées aléatoirement, puis repiquées deux fois sur le même milieu gélosé (température d'incubation : 30°C, 72 heures). Sur chacune de ces souches une galerie API 20 NE est réalisée, en plus du test oxidase et d'une coloration de Gram. De cette façon, la population bactérienne est caractérisée à la fois en terme de densité cellulaire (bactéries viables et totales) et d'espèces, pour chaque TRH testé.

3-1-3 Métabolisme respiratoire de quelques espèces bactériennes faiblement dénitrifiantes

L'expérimentation est réalisée en tubes à essai, à température contrôlée ($\approx 30^\circ\text{C}$). Les tubes sont remplis avec 15 mL de milieu de culture (Tableau 3-2), puis stérilisés 20 minutes à 121°C. Les souches bactériennes testées sont présentées dans le tableau 3-3.

Tableau 3-2 : Composition du milieu de culture des tubes à essai après dosages.

* : ajouté pour la croissance bactérienne, c-à-d pour être sûr que les nitrates ou les nitrites consommés sont respirés.

Acétate (mg C . L ⁻¹)	100
Nitrites ; nitrates ; rien (mg N . L ⁻¹)	47 ± 2 ; 48 ± 4 ; 0
NH ₄ Cl* (mg N . L ⁻¹)	10
KH ₂ PO ₄ (mg . L ⁻¹)	20
K ₂ HPO ₄ (mg . L ⁻¹)	16
Solution d'oligo-éléments (mL . L ⁻¹)	1
C/N appliqué	2,1
pH	7,65 ± 0,23
Eau du robinet	qsp 1 L

Un repiquage de chaque souche faiblement dénitrifiante est réalisé sur gélose nutritive complémentée en nitrates + nitrites (200 mg N-NO_x . L⁻¹). Après 72 heures d'incubation à 30°C, une suspension bactérienne concentrée est préparée dans de l'eau MilliQ stérile à 9‰ de NaCl. Un millilitre de cette suspension est ajouté dans 1 tube à essai. Après homogénéisation, le tube est fermé hermétiquement (bouchon à vis + joint), puis incubé à 30°C pendant 1 semaine. Un triplicat par souche est réalisé avec le milieu nitraté, et deux triplicats sont faits avec les témoins : (i) témoin nitraté (vérification que la souche respire ou non les nitrates) ; (ii) témoin oxygéné en tube (bouché

avec du coton cardé) contenant 10 mL de milieu sans nitrates et sans nitrites, continuellement agité (vérification de la viabilité des espèces, et que les espèces ne réduisant pas les oxydes azotés ioniques sont aérobies). En parallèle à l'incubation des tubesensemencés, 3 tubes par condition (nitrate ou nitrite ou rien) nonensemencés sont mis à incuber, et permettent de mesurer les quantités de nitrates ou nitrites ainsi que le pH sans inoculum bactérien. La densité optique des tubes oxygène a été mesurée pour toutes les souches juste après inoculation sur 1 tube par souche (tube sacrifié).

Après une semaine d'incubation, les tubes sont ouverts, et la biomasse est éliminée par centrifugation (20 000 g, 10 minutes à +4°C). Les nitrites et les nitrates résiduels sont dosés et le pH est mesuré. Si les nitrites ont été consommés, la souche est considérée comme dénitrifiante ; s'ils n'ont pas été consommés, et si les nitrates ne le sont pas non plus, la souche en question ne peut donc réduire ni les nitrates, ni les nitrites, et est considérée comme aérobie si elle a poussé en présence d'oxygène.

Tableau 3-3 : Souche bactérienne, provenance et codage.

① : Témoin "interne" (souche $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{N}_2$).

Code	Nom	Provenance
a	<i>Sphingobacterium spiritivorum</i>	Eau potable
b	<i>Ochrobactrum anthropi</i> sp. 1	Eau potable
e	<i>Ochrobactrum anthropi</i> sp. 2	Eau potable
h	<i>Ochrobactrum anthropi</i> sp. 3	Eau usée
c	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> sp. 1	Eau potable
d	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> sp. 2	Eau potable
f	<i>Moraxella</i>	Eau usée
g	<i>Paracoccus denitrificans</i> ①	Eau usée

3-2 Résultats

3-2-1 Fonctionnement du réacteur de dénitrification

Le réacteur chemostat (TRH = 5 jours, $17 < \text{température} < 23$ °C, $\text{pH} = 7,30 \pm 0,06$),ensemencé à partir d'une biomasse de type boues activées et alimenté avec un influent composé de 4 acides gras volatils (AGV) : acétate, propionate, butyrate et valérate, a mis environ 40 jours pour atteindre un état pseudo stationnaire. La phase transitoire, de J1 à J38 (Figure 3-1) correspond à une période d'adaptation bactérienne aux conditions expérimentales (substrats carbonés, présence de nitrates comme accepteur d'électrons, absence d'oxygène...). L'annexe 1 regroupe toutes les valeurs des différents dosages réalisés sur ce réacteur durant les 538 jours de fonctionnement.

L'accumulation de nitrites (Figure 3-2) visible pendant cette période de mise à l'équilibre prouve que le procédé de dénitrification est incomplet. A partir de J40 et jusqu'à J538, le chemostat est considéré comme étant à l'état pseudo stationnaire, en se basant sur les mesures des nitrates, nitrites, carbone et matières en suspension (MES). Les variations observées sur ces MES (Figure

3-1) correspondent généralement à des prélèvements de volumes importants (1 à 3,6 litres) de biomasse pour d'autres expérimentations.

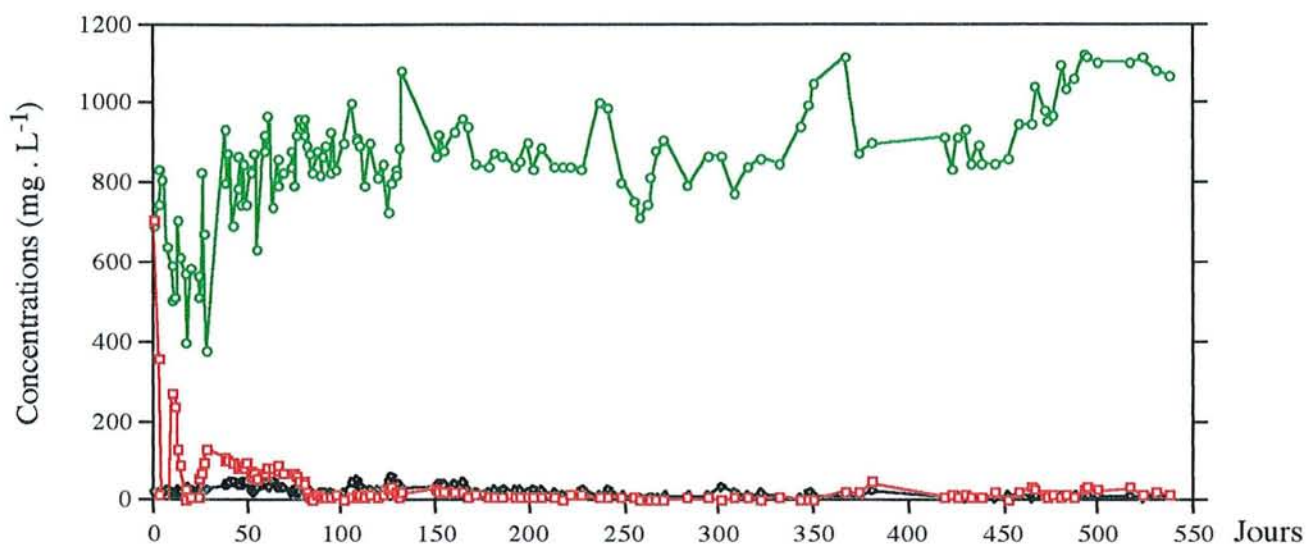


Figure 3-1 : Évolution des concentrations en N-nitrates (.....■.....), carbone (—■—) et MES (---○---) dans le chemostat en fonction du temps (jour).

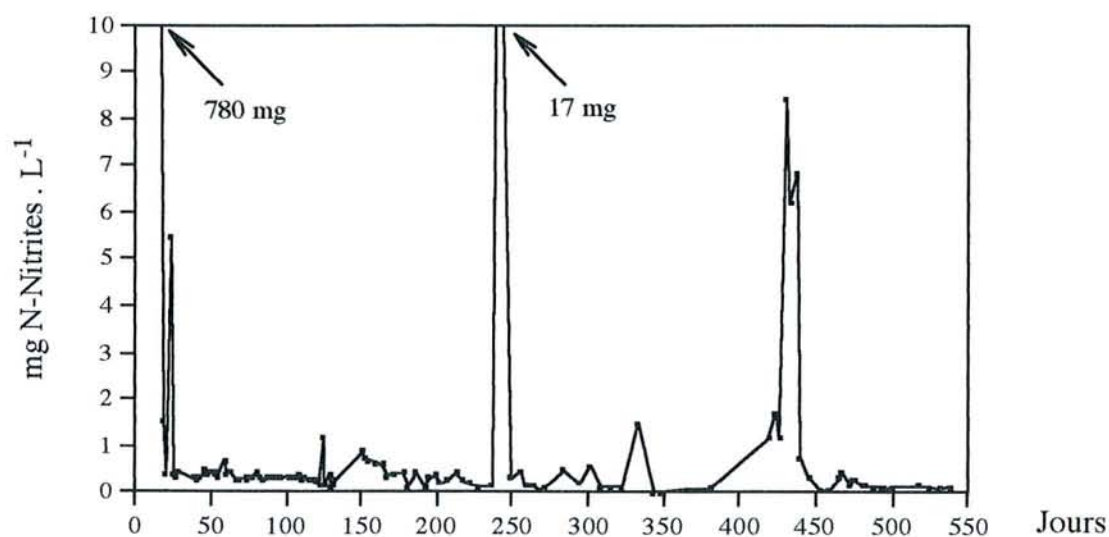


Figure 3-2 : Évolution des concentrations en nitrites ($\text{mg N-NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$) dans le chemostat au cours du temps (jour).

3-2-1-1 Efficacité du réacteur

Les résiduels de nitrates ($26 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) et de carbone ($24 \text{ mg C} \cdot \text{L}^{-1}$) sont faibles eu égard aux concentrations initiales (Tableau 3-4). Des analyses en chromatographie gazeuse (colonne DBWax 32m x 0,32 mm i.d.) ont prouvé que ces $24 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de COD contenaient moins de 2 mg d'AGV · L⁻¹ (sensibilité maximale : $0,5 \text{ mg C} \cdot \text{L}^{-1}$ pour chaque AGV). Ainsi ce résiduel correspond simplement à des produits de relargage bactériens, de lyse... Les efficacités d'élimination des

nitrate et du carbone sont excellentes, puisqu'elles sont supérieures à 98 %. De ce fait le ratio [C consommé / N consommé] calculé à partir du tableau 3-4 est égal à 1,15 ($\pm 0,02$; $n = 118$) et s'explique par le fait que le rapport C/N de l'influent (1,15) a été correctement choisi lors d'essais préliminaires. Les taux spécifiques de consommation des nitrates et du carbone à l'état stationnaire sont respectivement égaux à 16,4 mg N-NO₃⁻ . g⁻¹ MES . h⁻¹ et 18,8 mg C . g⁻¹ MES . h⁻¹.

Tableau 3-4 : Valeurs moyennes des concentrations en nitrates (mg N-NO₃⁻ . L⁻¹), nitrites (mg N-NO₂⁻ . L⁻¹), carbone (COD) et matières en suspension (MES) pour l'entrée ($n = 53$) et la sortie du chemostat ($n = 118$).

	Nitrates	Nitrites	COD	MES
Entrée du réacteur	1798 (74)	-	2067 (94)	-
Sortie du réacteur	26 (29)	0,65 (1,9)	24 (13)	888 (97)
Taux spécifique d'élimination (mg . g ⁻¹ MES . h ⁻¹)	16,4		18,8	
Efficacité d'élimination (%)	98,6		98,8	

Les concentrations moyennes en ions ammonium ont toujours été inférieures ou égales à 0,5 mg N-NH₄⁺ . L⁻¹. Le procédé fonctionne donc effectivement en dénitrification, et pas en réduction dissimilative des nitrates (accumulation d'ions NH₄⁺). Le potentiel redox moyen, après correction par rapport à l'électrode à hydrogène, est égal à + 110,5 mV (± 50 , $n = 93$), ce qui est une valeur classique de conditions finales de dénitrification (Mariotti, 1986 ; Vilorget, 1991). Le rendement Y, exprimé en biomasse produite rapportée au carbone consommé est égal à 0,43. L'analyse élémentaire réalisée sur la biomasse bactérienne a permis de calculer les quantités de carbone, hydrogène, oxygène et azote incorporées par cellule, soit respectivement 47,6 %, 6,8 %, 28,4 % et 10,2 %. De fait, la formule chimique de la biomasse peut être représentée par : C₄H_{6,8}O_{1,8}N_{0,7} (cf annexe 5 chapitre V). Ainsi, Y = 0,21 mg C biomasse . mg⁻¹ C consommé.

3-2-1-2 Population bactérienne

La biomasse bactérienne, non soniquée, apparaît à l'œil comme non floculée, et les observations microscopiques montrent de nombreuses cellules libres, et très peu de floccs.

La taille des cellules et/ou agrégats bactériens mesurée par l'analyse granulométrique laser (Malvern Mastersizer X) est comprise entre 1,09 et 3,22 μm, avec un maximum à 1,61 μm (Figure 3-3, ❶). Le nombre total de cellules est de 7,5 x 10¹² . L⁻¹, dont environ 5 % sont viables (capables de se multiplier sur agar nitraté en 5 jours). Eu égard à la quantité totale de matières en suspension, la masse moyenne d'une cellule bactérienne est voisine de 0,12 pg. Par comparaison, une boue activée de station d'épuration apparaît comme très floculée (Figure 3-3, ❷) avec un maximum à 124 μm. Les résultats du test d'adhésion à l'octane (adapté d'après Rosenberg par Jorand *et al.*, 1994) réalisé sur la suspension bactérienne montrent que cette population est hydrophile à 99,3 %. Ces résultats sont en accord avec le fait que ces cellules ne sont pas agrégées.

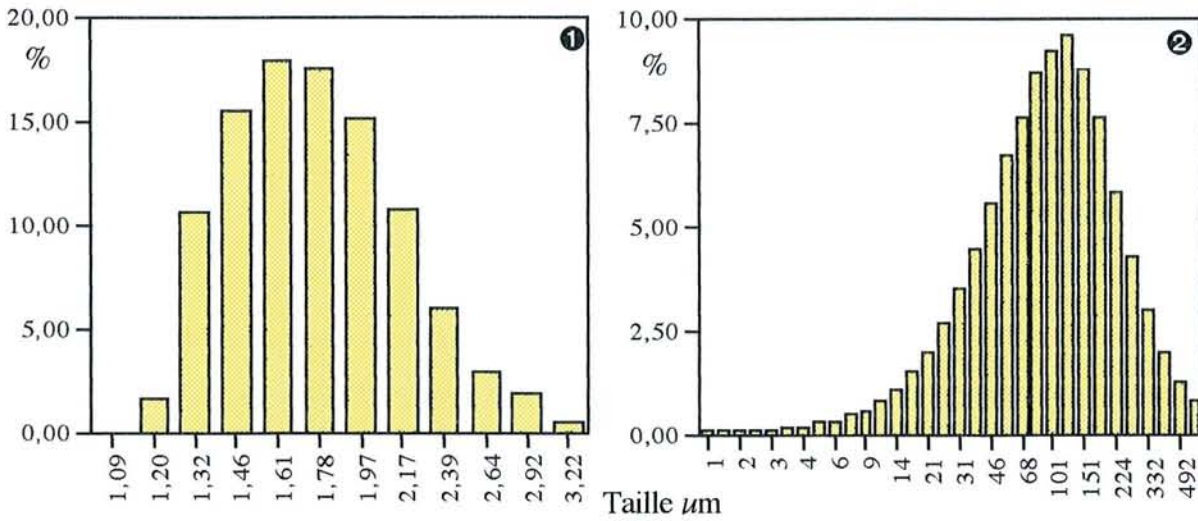


Figure 3-3 : Distribution relative (%) des classes de taille de la biomasse dénitrifiante ① et d'une biomasse de type boue activée ② (détermination par granulométrie Laser - appareil Malvern).

La population bactérienne présente dans le réacteur de dénitrification a été caractérisée 30 jours après l'inoculation. Les annexes 3, 4 et 5 présentent respectivement les profils bactériens obtenus sur galerie API 20 NE, les noms des espèces bactériennes et le nombre de bactéries identifiées. Trois espèces sont numériquement dominantes : *Alcaligenes denitrificans subsp denitrificans* (47 % de l'effectif total), *Aeromonas salmonicida* et *Ochrobactrum anthropi* (20 % chacune de l'effectif total). Les deux autres espèces identifiées (*Moraxella lacunata* et *Paracoccus denitrificans*) représentent chacune 7 % du nombre total de bactéries présentes dans le chemostat. Bien entendu, il est extrêmement probable que d'autres espèces soient présentes dans la culture, mais en nombre insuffisant pour avoir été isolées.

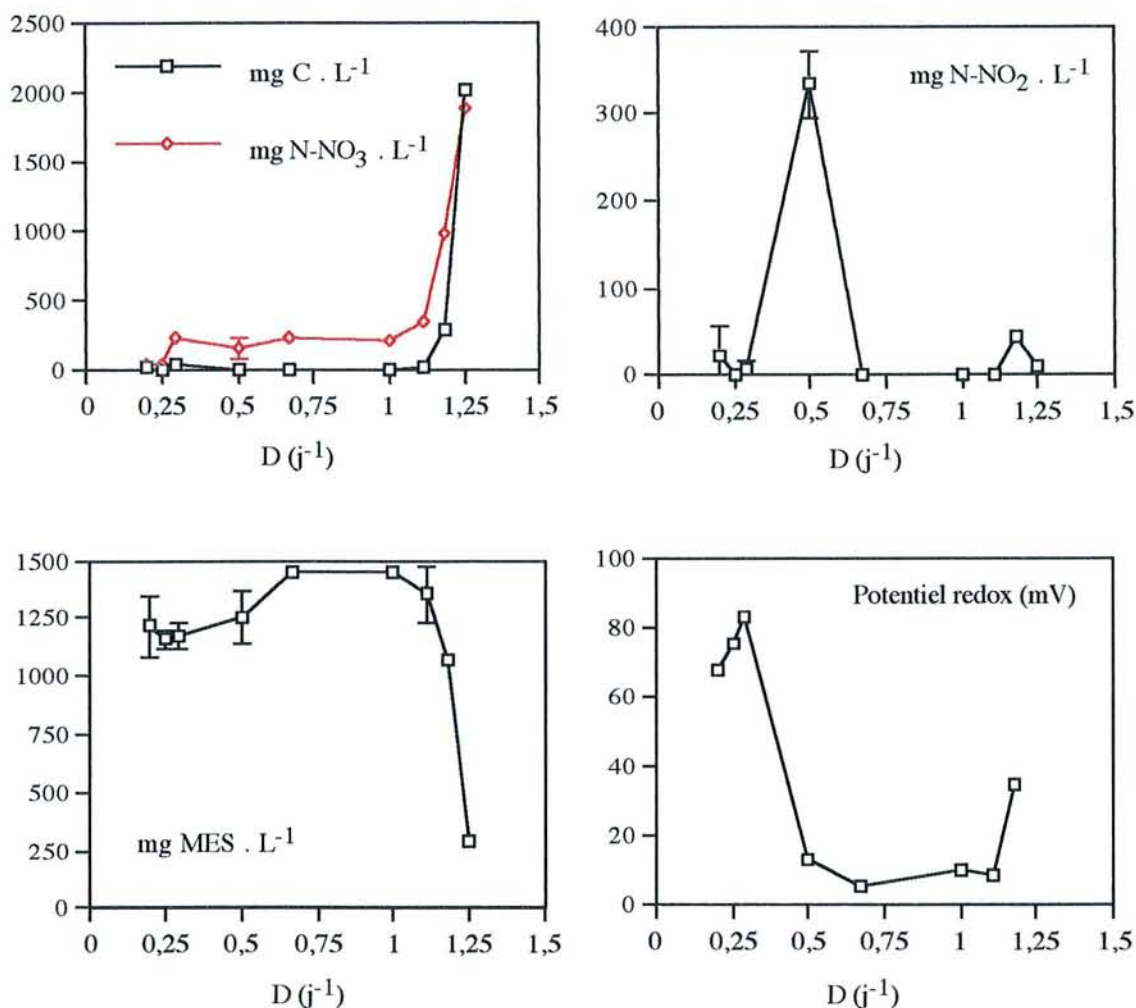
3-2-2 Influence du taux de dilution sur le fonctionnement d'un réacteur de dénitrification

Jannasch (1965 ; 1967), Veldkamp et Jannasch (1972), Lynch et Poole (1979), Kuenen et Harder (1982) ont déjà montré que le taux de dilution avait une forte influence sur l'écosystème bactérien en permettant la prolifération de telle espèce bactérienne aux dépens des autres.

Cette partie présente les résultats obtenus en testant successivement sur différents chemostats des taux de dilution (D) allant de 0,2 à 1,25 j^{-1} (i.e. des temps de rétention hydraulique variant respectivement de 5 jours à 0,8 jours), avec un nouvel inoculum bactérien à chaque fois.

3-2-2-1 Efficacité des réacteurs

Le suivi du réacteur à $D = 0,2 \text{ j}^{-1}$ en terme d'élimination des nitrates et du carbone, de production de biomasse et d'accumulation de nitrites est présenté dans le tableau 3-4, paragraphe précédent. Les concentrations résiduelles à l'équilibre étaient de 26 $\text{mg N-NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1}$, 24 $\text{mg C} \cdot \text{L}^{-1}$, 0,65 $\text{mg N-NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$ et de 888 $\text{mg MES} \cdot \text{L}^{-1}$.



Figures 3-4 : Évolutions du carbone organique résiduel ($mg\ C \cdot L^{-1}$), des nitrates et des nitrites résiduels ($mg\ N \cdot L^{-1}$), des MES ($mg \cdot L^{-1}$) et du potentiel redox (mV, corrigé), à l'équilibre, en fonction du taux de dilution (j^{-1}). Température comprise entre 18 et 22°C, alimentation avec un mélange d'AGV. Écarts types : répétition de 2 mesures.

En augmentant le taux de dilution (D), *i.e.* en diminuant le temps de séjour (TRH) de la biomasse dans le réacteur, les figures 3-4 permettent de mettre en évidence la rupture de pente se produisant entre $D = 1$ et $1,1\ j^{-1}$. Le carbone organique et les nitrates résiduels augmentent brutalement pour $D = 1,18\ j^{-1}$, *i.e.* juste avant le lessivage du système (observé pour $D = 1,25\ j^{-1}$). Des analyses complémentaires réalisées en chromatographie en phase gazeuse ont permis de montrer (à $D = 0,2\ j^{-1}$) que la concentration en carbone AGV était inférieure à $2\ mg\ C \cdot L^{-1}$, alors que les valeurs en COD pouvaient dépasser les $30\ mg\ C \cdot L^{-1}$. Les résiduels de nitrites sont faibles ($0,3$ à $23\ mg\ L^{-1}$) sauf pour $D = 0,5\ j^{-1}$, où ce résiduel dépasse les $300\ mg\ N-NO_2 \cdot L^{-1}$. Cette expérience à $D = 0,5\ j^{-1}$ a été réalisée en duplicat, et dans les 2 cas le résiduel de nitrites était très élevé (330 et $530\ mg\ N-NO_2 \cdot L^{-1}$). Les MES déterminées à l'équilibre présentent un profil inverse à celui du carbone ou des nitrates, puisqu'aux forts taux de dilution (supérieurs à $1\ j^{-1}$) les quantités de MES diminuent, *i.e.* le système commence à être lessivé. Le fait que les valeurs des MES soit

plus faible pour $0,2 \leq D < 0,5$ que pour $D \geq 0,5 \text{ j}^{-1}$ est sans doute lié à un changement du protocole opératoire (centrifugation des prélèvements réalisés dans les chemostats à 3 000 g pour $0,2 \leq D < 0,5$ et à 20 000 g pour $D \geq 0,5 \text{ j}^{-1}$). Quant au potentiel redox, il oscille entre +5 et +80 mV, valeurs représentatives d'un procédé en fin de dénitrification (élimination des nitrates et des nitrites).

3-2-2-2 Calcul des paramètres cinétiques

Nous avons tenté d'approcher le taux de croissance maximal apparent ($\mu_{\max \text{ app}}$) des populations bactériennes de 2 manières différentes : (i) d'abord classiquement, c'est-à-dire en utilisant les données du substrat résiduel (*i.e.* carbone) mais avec un risque d'erreur car le dosage du carbone n'est pas spécifique des AGV ; (ii) ensuite avec les valeurs des nitrates résiduels, qui reflètent directement la consommation de carbone par les micro-organismes.

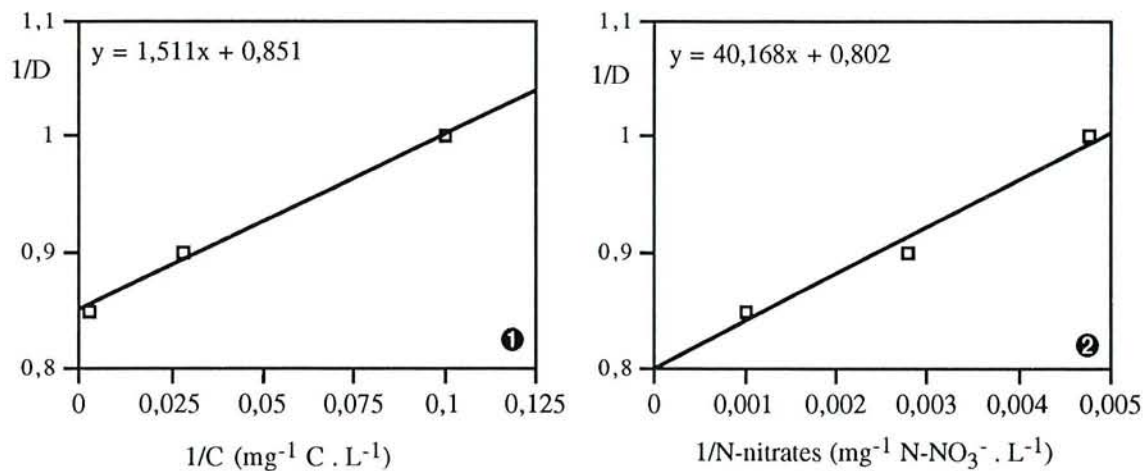


Figure 3-5 : Détermination du $\mu_{\max \text{ app}}$ après linéarisation de Lineweaver et Burk, pour le carbone (❶) et les nitrates résiduels (❷). En abscisse : $1/C$ ($\text{mg}^{-1} \text{ C} \cdot \text{L}^{-1}$) ou $1/N\text{-NO}_3^-$ ($\text{mg}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$) ; en ordonnées : $1/D$ (j).

Les figures 3-5 ❶ et ❷ présentent respectivement les évolutions de $1/D$ en fonction de $1/C$ et de $1/N\text{-nitrates}$ (linéarisation de Lineweaver et Burk). Le taux de croissance maximal apparent (donné par l'inverse de l'ordonnée à l'origine) est respectivement égal à 1,18 et 1,25 j^{-1} . Cette valeur correspond tout à fait à ce qui observé, dans la mesure ou le lessivage du réacteur a lieu que pour un taux de dilution compris entre 1,18 et 1,25 j^{-1} (correspondant respectivement à un temps de résidence hydraulique de 0,85 et 0,8 jours).

Le rendement de conversion Y_{apparent} , représentant la part de carbone transformée en cellules par rapport au carbone consommé a tendance à augmenter avec le taux de dilution, mais de façon non statistiquement significative. La représentation de $1/Y$ en fonction de $1/D$ (Figure 3-6) permet d'approcher le Y_{\max} (rendement maximum théorique avec le mélange des 4 AGV) en prenant l'inverse de l'ordonnée à l'origine : Y_{\max} est environ égal à 0,30 $\text{mg C-MES} \cdot \text{L}^{-1} / \text{mg C consommé} \cdot \text{L}^{-1}$. La pente de la droite (0,138) traduit l'énergie de maintenance utilisée par le système.

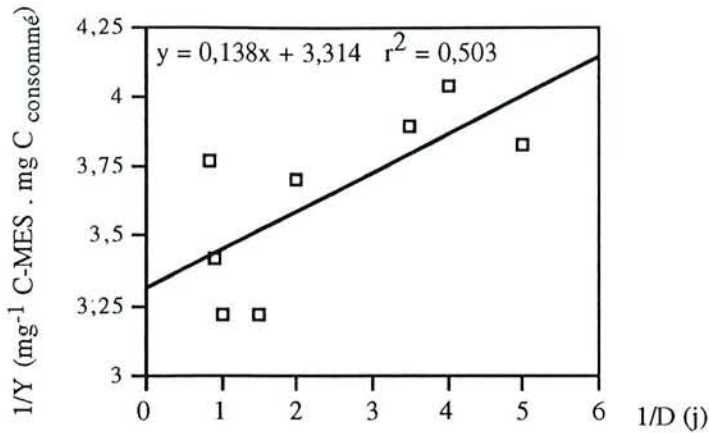


Figure 3-6 : Évolution de $1/Y$ ($\text{mg}^{-1} \text{C-MES} \cdot \text{mg C consommé}$) en fonction de $1/D$ (j).

Le rapport $C_{\text{consommé}} / N_{\text{consommé}}$ apparaît comme étant indépendant du taux de dilution, exception faite pour $D = 1,18 \text{ j}^{-1}$ où le système commence à être lessivé. Il varie entre 1,12 et 1,34 (Figure 3-7).

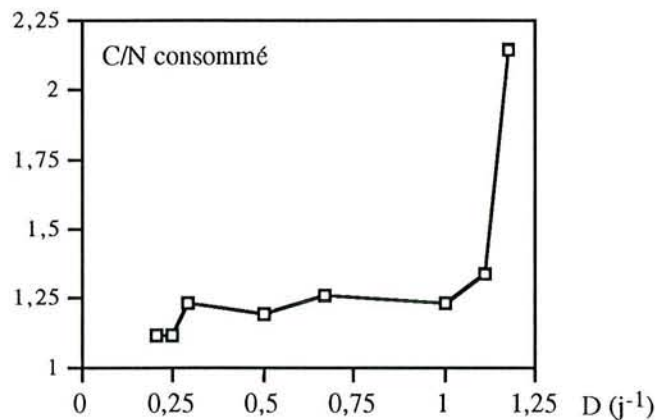


Figure 3-7 : Évolution du rapport carbone sur azote consommés, en fonction du taux de dilution appliqué (j^{-1}).

L'évolution des taux spécifiques de consommation du carbone et des nitrates en fonction du taux de dilution est présentée figure 3-8. Aussi bien pour le carbone que pour les nitrates il est possible de déterminer une zone linéaire où le taux spécifique augmente proportionnellement au taux de dilution. Le seul point écarté correspond à $D = 1,18 \text{ j}^{-1}$ (début du lessivage de la culture).

Pour le carbone le taux spécifique ($\text{mg C} \cdot \text{g}^{-1} \text{MES} \cdot \text{h}^{-1}$) vaut $T = 58,7 D + 3,4$

Pour les nitrates le taux spécifique ($\text{N-NO}_3^- \cdot \text{g}^{-1} \text{MES} \cdot \text{h}^{-1}$) vaut $T = 42,4 D + 3,7$.

Ces équations permettent d'extrapoler ce que devraient être les taux de consommation dans le réacteur décrit au paragraphe 1-1 ($D = 0,2 \text{ j}^{-1}$) soit $15,1 \text{ mg C} \cdot \text{g}^{-1} \text{MES} \cdot \text{h}^{-1}$, et $12,2 \text{ mg N-NO}_3^- \cdot \text{g}^{-1} \text{MES} \cdot \text{h}^{-1}$. En fait, les valeurs mesurées sont respectivement de 18,8 et 16,4.

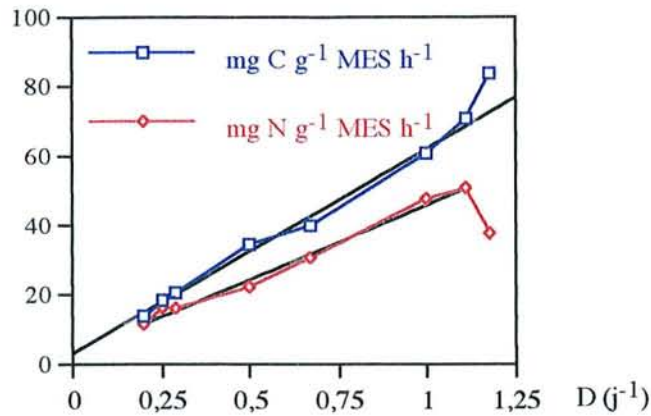


Figure 3-8 : Évolutions des taux spécifiques de consommation du carbone ($\text{mg C} \cdot \text{g}^{-1} \text{MES} \cdot \text{h}^{-1}$) et des nitrates ($\text{mg N-NO}_3^- \cdot \text{g}^{-1} \text{MES} \cdot \text{h}^{-1}$) en fonction du taux de dilution appliqué (j^{-1}).

3-2-2-3 Peuplement bactérien

Les espèces bactériennes ont été caractérisées systématiquement à chaque changement du taux de dilution à partir des colonies obtenues sur milieu gélosé nitraté, après 120 heures d'incubation à + 20 °C (cf chapitre Matériel et Méthodes). Les différents profils bactériens (soit un total de 21) déterminés avec les galeries API 20NE sont regroupés en annexe 3. Parmi les 21 profils obtenus en fonction des différents taux de dilution, 14 sont capables de réduire les nitrates en gaz ; 2 réduisent les nitrates uniquement en nitrites, et ne peuvent aller plus loin sur galerie API 20NE (24 heures, 30°C) ; enfin, 5 profils semblent incapables d'utiliser les nitrates en tant qu'accepteur d'électrons après 24 heures d'incubation. Parmi ces 5 profils, 2 sont capables de respirer lentement les nitrates en 7 jours d'incubation à 30 °C (résultats présentés et discutés paragraphe 2-3), les 3 autres profils n'ayant pas été testés.

L'examen du nombre de bactéries réduisant soit les nitrates en gaz, soit seulement en nitrites, ou soit ne les réduisant en 24 heures, en fonction du taux de dilution (Figure 3-9 et annexe 6) montre que les espèces bactériennes dénitrifiant jusqu'au stade gaz sont toujours majoritaires (à l'exception de $D = 0,29 \text{ j}^{-1}$, *i.e.* TRH 3,5j). Plus le taux de dilution est élevé, plus ces espèces dominent (93 à 100 % dès que $D \geq 0,50 \text{ j}^{-1}$). Au contraire, les espèces s'arrêtant au stade nitrites sont toujours minoritaires, leur proportion relative variant de 7 à 14 % selon D. Ces espèces sont lessivées pour des taux de dilution supérieurs à $0,33 \text{ j}^{-1}$. Enfin, les espèces ne réduisant pas les nitrates en 24 heures représentent entre 8 à 30 % de la population totale pour les taux de dilution compris entre 0,2 et $0,33 \text{ j}^{-1}$, à l'exception de $D = 0,29 \text{ j}^{-1}$ (64 %). Au delà de ces taux de dilution, les espèces s'arrêtant au stade nitrites et celles ne réduisant pas les nitrates en 24 heures sont soit complètement lessivées (sauf $D = 1,0 \text{ j}^{-1}$), soit plus probablement leur proportion devient très faible dans le réacteur, et elles ne sont plus détectées eu égard au nombre de colonies prélevées pour l'identification.

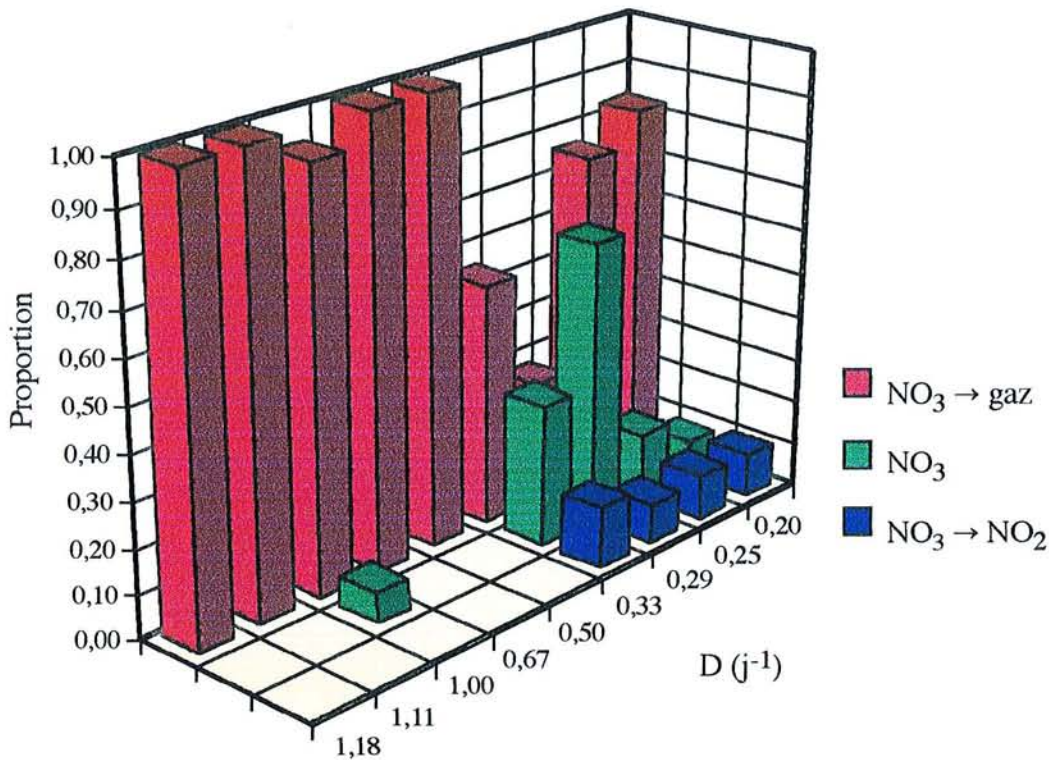


Figure 3-9 : Évolution des pourcentages de bactéries réduisant les nitrates soit en gaz (■), soit en nitrites (■), soit ne les réduisant pas (■) en fonction du taux de dilution appliqué.

De plus, la diversité bactérienne varie de façon inversement proportionnelle au taux de dilution appliqué : plus D est faible (*i.e.* plus le temps de résidence des espèces bactériennes dans le réacteur est élevé) et plus la diversité est élevée. Inversement, plus D augmente et plus le nombre d'espèces diminue (Figure 3-10). Pour $D = 0,2 \text{ j}^{-1}$, 8 espèces bactériennes sont mises en évidence, 5 le sont pour $D = 0,5 \text{ j}^{-1}$, et une seule pour $D = 1,18 \text{ j}^{-1}$.

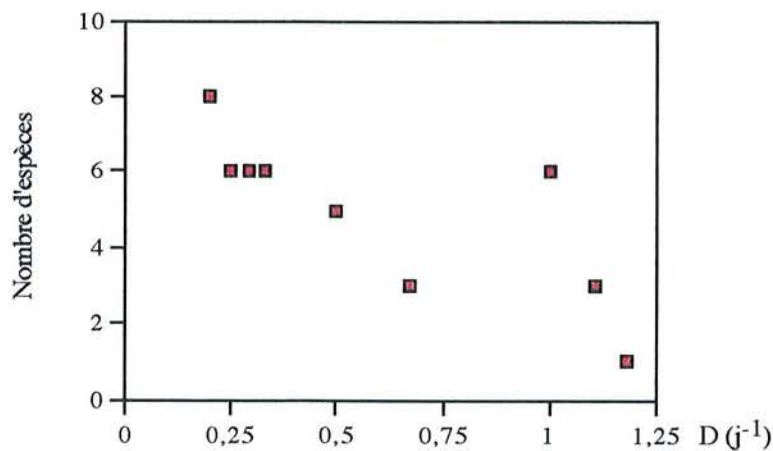


Figure 3-10 : Évolution du nombre d'espèces bactériennes en fonction du taux de dilution.

La figure 3-11 présente la proportion des espèces bactériennes en fonction du taux de dilution appliqué. Au total, 11 espèces différentes ont été isolées sur les réacteurs (annexes 4 et 5), mais

jamais toutes ensemble à un taux de dilution donné. Ceci s'explique soit parce que le nombre de colonies échantillonnées aléatoirement était insuffisant, soit parce que les proportions relatives de ces espèces était modifié par le taux de dilution. Cette seconde hypothèse est probablement correcte pour les forts D (supérieurs à $0,33 \text{ j}^{-1}$), puisqu'il ne reste plus qu'une espèce dominante dans ce cas : *Paracoccus denitrificans*. Aux autres taux de dilution, *Ochrobactrum anthropi* et *Alcaligenes denitrificans* sont les espèces dominantes. Enfin, *Aeromonas salmonicida* est présente quasiment quel que soit le taux de dilution.

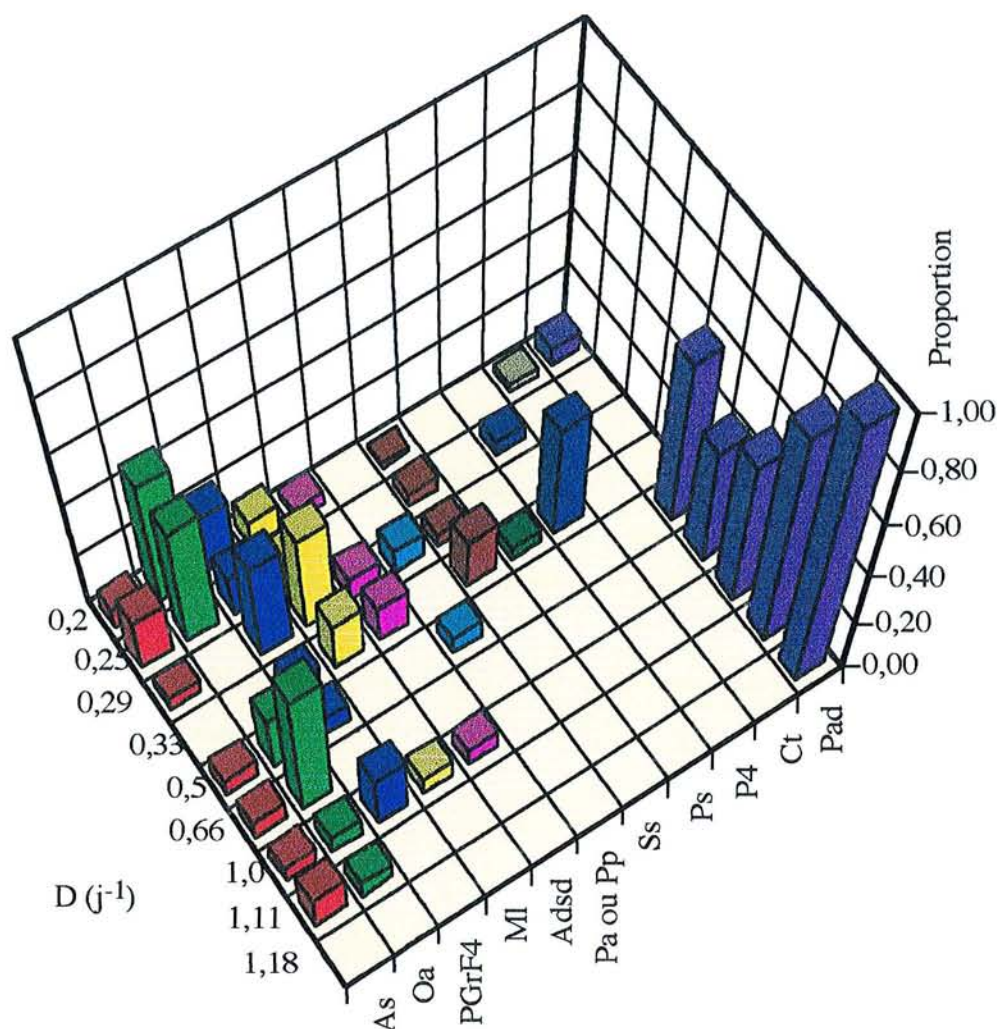


Figure 3-11 : Espèces bactériennes majoritaires dénitrifiantes isolées sur les réacteurs à l'équilibre, en fonction du taux de dilution (j^{-1}) appliqué.

As : *Aeromonas salmonicida* ; Oa : *Ochrobactrum anthropi* ; PGrF4 : *Pasteurella* Gr. EF4 ; MI : *Moraxella lacunata* ; Adsd : *Alcaligenes denitrificans* subsp *denitrificans* ; Pa ou Pp : *Pseudomonas alcaligenes* ou *Pseudomonas pseudoalcaligenes* ; Ss : *Sphingobacterium spiritivorum* ; Ps : *Pseudomonas stutzeri* ; Ct : *Comamonas testosteroni* ; Pad : *Paracoccus denitrificans*.

3-2-3 Métabolisme respiratoire de quelques espèces bactériennes faiblement dénitrifiantes

Au cours des essais précédents (paragraphe 2-2), nous avons isolé des espèces bactériennes qui ne réduisaient pas de façon mesurable les nitrates sur galerie API après 24 heures d'incubation à +30 °C (cf les profils P10, P11, P12, P13 en annexe 3 de ce chapitre, et P1, P3, P4, P7 et P12 en annexe 3 du chapitre 6). Pour déterminer pourquoi ces espèces *a priori* non dénitrifiantes (ou alors faiblement dénitrifiantes) arrivent à se maintenir dans les réacteurs chemostats, une approche de leur métabolisme respiratoire a été entreprise. Les figures 3-12 ❶, ❷ et ❸ présentent respectivement les densités optiques (présence d'oxygène), les concentrations en nitrates, les concentrations en nitrites ainsi que les pH, après 7 jours de croissance à + 30°C pour les 8 souches bactériennes testées ainsi que pour le témoin abiotique présent pour chaque condition (cf annexe 7).

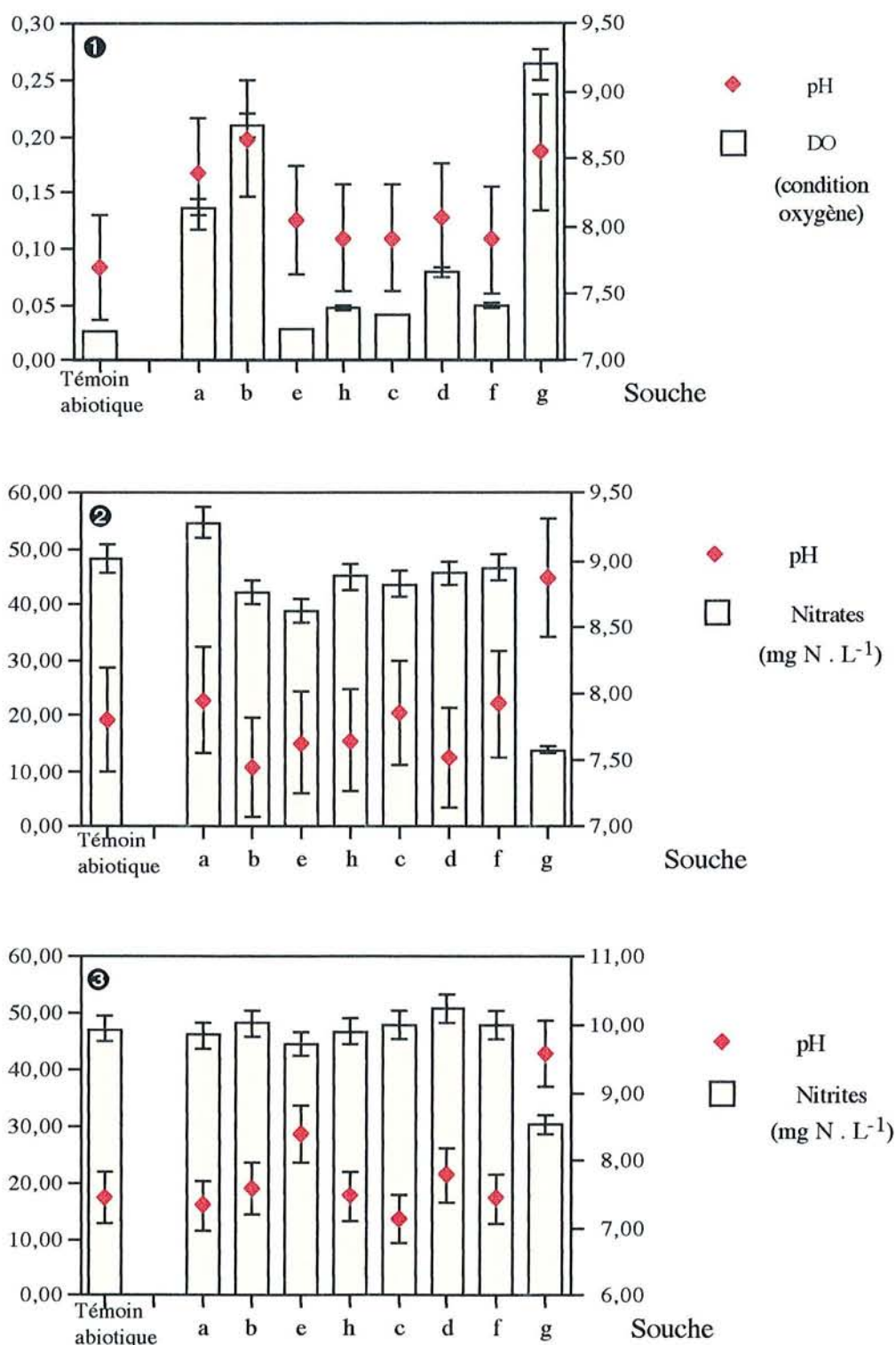
Globalement, toutes les souches testées, sauf "e" (*Ochrobactrum anthropi* sp. 2) et "c" (*Sphingomonas paucimobilis* sp. 1), arrivent à se multiplier de façon statistiquement significative (test ANOVA, risque d'erreur à 5 %, cf annexe 8) en présence d'oxygène (Figure 3-12 ❶). Il convient toutefois de séparer ces souches en 2 groupes, sur la base de production de biomasse matérialisée par l'augmentation des densités optiques : (i) les espèces dont la densité optique a plus que doublé au cours de la culture, qui correspondent aux souches codées a, b, d et g (témoin interne : *Paracoccus denitrificans*) ; (ii) les espèces dont la densité optique a au maximum doublé au cours de la culture, qui correspondent aux souches codées f et h.

Toutes les souches sauf "a" (*Sphingobacterium spiritivorum*), consomment les nitrates (de 1,5 à 9,4 mg N . L⁻¹) après 7 jours d'incubation à 30°C (Figure 3-12 ❷ et Tableau 3-5). Cette caractéristique, qui n'apparaît pas en galeries API (24 h d'incubation à 30°C), permet d'expliquer pourquoi ces souches peuvent se maintenir dans le chemostat eau usée (TRH = 5 jours). Toutefois cette consommation de nitrates est statistiquement significative uniquement pour les souches "e" (*Ochrobactrum anthropi* sp. 2) et g (*Paracoccus denitrificans*).

Enfin, aucune souche à l'exception de "g" (*Paracoccus denitrificans*) ne consomme les nitrites de façon statistiquement significative.

Tableau 3-5 : Quantités de nitrates (mg . L⁻¹) ou de nitrites (mg . L⁻¹) consommées par chaque souche bactérienne.

Souche	Nom	Nitrates	Nitrites
a	<i>Sphingobacterium spiritivorum</i>	0	0,97
b	<i>Ochrobactrum anthropi</i> sp. 1	5,82	0
e	<i>Ochrobactrum anthropi</i> sp. 2	9,36	2,66
h	<i>Ochrobactrum anthropi</i> sp. 3	3,08	0,42
c	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> sp. 1	4,54	0
d	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> sp. 2	2,52	0
f	<i>Moraxella</i>	1,55	0
g	<i>Paracoccus denitrificans</i>	34,35	16,84



Figures 3-12 : Évolutions des densités optiques, des concentrations en nitrates (mg N . L⁻¹), des concentrations en nitrites (mg N . L⁻¹) et du pH des 8 souches bactériennes testées, en présence d'oxygène (①), de nitrates (②) ou de nitrites (③). 7 jours d'incubation à +30°C.

Il est clair que toutes les souches, sauf "a", peuvent respirer lentement les nitrates, la consommation variant de 1,5 à 9,4 mg N . L⁻¹ (incubation 7 jours à 30°C). Ces résultats ne sont pas statistiquement significatifs, mais cette tendance se reproduit à tous les essais, et ne peut donc être

considérée comme étant due au hasard. Enfin toutes les souches à l'exception de *Ochrobactrum anthropi* sp. 2, profil "e" et de *Sphingomonas paucimobilis* sp. 1, profil "c", peuvent se multiplier (à des degrés divers) en présence d'oxygène comme seul accepteur d'électrons.

3-3 Discussion

Inoculer un réacteur chemostat de laboratoire (TRH = 5 jours, potentiel redox = +110 mV et présence de nitrates, mélange d'AGV comme seule source de carbone) avec un mélange aussi complexe qu'une boue activée, puis maintenir ce réacteur à l'état pseudo-stationnaire pendant 18 mois diminue nécessairement la diversité bactérienne du système. De nombreux auteurs se sont penchés sur la composition bactérienne d'une boue activée. Parmi ceux-ci, Dias et Bhat (1964), Pike et Curds (1971), Pipes (1966), Scow (1981) et Thomazeau (1982) retrouvent systématiquement dans leurs échantillons les espèces *Alcaligenes*, *Comamonas*, *Flavobacterium* et *Pseudomonas*, et quelques fois *Paracoccus* (ex-*Micrococcus*), au sein d'un mélange complexe de plus de 20 espèces différentes. Collin *et al.* (1979) précisent quelque peu ces résultats en répartissant la population bactérienne en 57 % de bacilles gram -, 23 % de coques gram + et 20 % de bacilles gram +. Par conséquent, le fait que 10 espèces cohabitent dans notre réacteur (*i.e.* diminution d'au moins 50 % du nombre d'espèces par rapport à une boue activée) semble cohérent avec les données bibliographiques, avec comme espèces présentes déjà citées *Pseudomonas*, *Comamonas*, *Paracoccus* et *Alcaligenes*. Ces espèces bactériennes, ainsi que *Aeromonas*, *Ochrobactrum*, *Pasteurella*, *Moraxella* et *Sphingobacterium* sont connues comme étant dénitrifiantes (Tiedje, 1988 ; Zumft, 1992), et les profils bactériens (Annexes 3 et 4) correspondent globalement aux données du Bergey's manual (1984) et de Richard et Kiredjian (1992).

Le tableau 3-6 présente, pour des souches bactériennes isolées dans le réacteur de dénitrification, quelques caractéristiques biochimiques tirées du Bergey's manual (1984) et de Richard et Kiredjian (1992). Il est intéressant de noter que ces souches ne se comportent pas de la même façon vis à vis des nitrates (certaines ne les réduisant pas - *Sphingobacterium spiritivorum* -, d'autres s'arrêtent au stade nitrites - *Comamonas testosteroni* -, et d'autres enfin vont jusqu'au stade gaz - *Ochrobactrum anthropi*, *Paracoccus denitrificans*...-) et vis à vis des AGV (par exemple, *Moraxella lacunata* ne peut pas métaboliser le propionate). Il est également nécessaire de garder à l'esprit d'une part que les repiquages successifs peuvent modifier le comportement de certaines souches bactériennes (environ 10 % des *Pseudomonas stutzeri* perdent leur capacité dénitrifiante après repiquage, Richard et Kiredjian, 1992), et d'autre part qu'une communauté d'individus va nécessairement procéder à des échanges génétiques. Il est évident que les caractéristiques biochimiques des individus isolés ne correspondent pas nécessairement aux données bibliographiques, généralement obtenues dans des conditions optimales pour chaque souche pure.

Tableau 3-6 : Caractéristiques dénitrifiantes et assimilation des AGV testés par les souches bactériennes isolées du réacteur de dénitrification (Bergey's manual, 1984 ; Richard et Kiredjian, 1992).

+ : plus de 90 % des souches sont positives ; [+] : plus de 80 % des souches sont positives

d : de 11 à 89 % des souches sont positives ; - : moins de 10 % des souches sont positives.

? : non rapporté

1 : ex- *Pseudomonas testosteroni* (Tamaoka *et al.*, 1987) ; 2 : ex- *Achromobacter* gr. Vd (Holmes *et al.*, 1988 ; Kiredjian et Richard, 1992) ; 3 : proche de *Pasteurella multocida* ; 4 : ex- *Flavobacterium spiritivorum*.

	NO ₂ ⁻	N ₂	Acétate	Propionate	Butyrate	Valérate
<i>Aeromonas salmonicida</i>	+	?	?	?	?	?
<i>Alcaligenes denitrificans</i> <i>subsp denitrificans</i>	[+]	[+]	+	?	?	?
<i>Comamonas testosteroni</i>	+	-	+	+	+	+
<i>Moraxella lacunata</i>	d	-	+	-	+	?
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Paracoccus denitrificans</i>	+	+	?	?	?	?
<i>Pasteurella</i> Gr. EF4	+	?	?	?	?	?
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	+	+	+	+	d	d
<i>Pseudomonas</i> <i>pseudoalcaligenes</i>	+	d	+	+	+	d
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	+	+	+	d	+	d
<i>Sphingobacterium</i> <i>spiritivorum</i>	-	-	?	?	?	?

Jannasch (1967), Jannasch et Mateles (1974) et Veldkamp et Jannasch (1972) montrent qu'en fonction du taux de dilution les proportions relatives des espèces sont modifiées, ce qui se comprend aisément car le taux de dilution appliqué à la culture en continu conditionne directement le taux de croissance des micro-organismes. Le fait qu'à TRH = 0,85 jours seul *Paracoccus denitrificans* est détecté peut donc signifier que toutes les autres espèces bactériennes sont lessivées, *i.e.* leur taux de croissance maximal (μ_{max}) est strictement inférieur à $1,25 \text{ j}^{-1}$. De plus, Jannasch et Mateles (1974) et Hantula *et al.* (1991) parlent d'état oscillatoire pour décrire l'état pseudo stationnaire, dans la mesure où la proportion des espèces bactériennes varie continuellement les unes par rapport aux autres, dans des conditions expérimentales apparemment stables, c'est-à-dire qu'un réacteur de type chemostat peut apparaître à l'état stationnaire en terme de physico-chimie (carbone résiduel, biomasse produite...), mais ne sera jamais à l'état stationnaire en terme d'espèces bactériennes. Grabinska-Loniewska (1991) montre une variation de la composition de la population bactérienne en fonction des charges appliquées en nitrates et en biomasse. Enfin, Arquiaga *et al.* (1993) observent qu'en augmentant l'âge des boues (*i.e.* le TRH) la proportion de "vrais dénitrifiants" (jusqu'au stade gaz) augmente au détriment des bactéries s'arrêtant au stade nitrites, contrairement à nos résultats.

L'analyse élémentaire réalisée sur la biomasse bactérienne dénitrifiante (cf annexe 5 chapitre V) permis de comparer sa composition avec les résultats de Hoover et Porges (1952), de Batteley (1991) et ceux cités par Pelmont (1993) pour *E. coli* (Tableau 3-7).

En terme de carbone et d'hydrogène nos résultats sont comparables à ceux de Hoover et Porges (1952), de Batteley (1991) et ceux cités par Pelmont (1993). Par contre, la composition en terme d'azote et d'oxygène est différente, avec un peu plus d'oxygène incorporé dans les bactéries dénitrifiantes par rapport aux autres cellules, et un peu moins d'azote. Nous ne savons pas si ce fait correspond à une réalité, ou plus vraisemblablement à des méthodologies d'analyses différentes réalisées sur des biomasses différentes (les résultats de Batteley et ceux de Pelmont portant sur une souche pure, *E. coli*, tandis que ceux de Hoover et Porges ont été réalisés sur une biomasse mixte).

Tableau 3-7 : Composition chimique d'une bactérie ; résultats exprimés en gramme de composé pour 100 grammes de biomasse sèche.

	C	H	O	N
Hoover et Porges	53	6	28	12
Batteley	50	7	25	15
Pelmont	50	8	20	12
Nos résultats	48	7	28	10

Les potentiels redox corrigés par rapport à l'électrode à hydrogène sont de +110 mV dans le réacteur de dénitrification, et varient entre +10 et +80 mV en fonction du TRH testé. Selon les auteurs, la dénitrification commence entre +100 à +400 mV (Mariotti, 1986), +200 à +300 mV pour Kralova *et al.* (1992), +210 mV pour Pavlostathis et Zhuang (1991) ou +225 mV pour Sikora et Keeney (1976). Ces potentiels redox traduisent simplement l'absence de quantités importantes d'oxygène. En fin de réaction de dénitrification, Manoharan *et al.* (1989) et Pavlostathis et Zhuang (1991) mesurent des redox entre -60 à -100 mV, tandis que Chen et Lin (1993) mesurent environ -150 mV avec 50 mg N-NO₃ · L⁻¹ résiduels ; cependant ces auteurs ne précisent pas s'ils corrigent la valeur par rapport à l'hydrogène. Il est toutefois à noter la difficulté dans l'interprétation du potentiel redox, dû au temps requis par l'électrode pour être en équilibre avec le milieu extérieur (Petersen *et al.*, 1991). Le potentiel redox de +10 à +100 mV mesuré dans nos expériences peut s'expliquer par le fait qu'il reste des nitrates et des nitrites dans le système, puisque Vilorget (1991) mesure +100 mV avec 20 mg N-NO₃⁻ · L⁻¹. Kralova *et al.* (1992) prouvent que l'oxyde nitreux est produit majoritairement à redox = 0, alors que l'azote moléculaire l'est à des potentiels redox inférieurs. Enfin, Vilorget (1991) indique des rendements de dénitrification de 80 à 100 % en terme d'élimination des nitrates pour des redox compris entre -100 et +200 mV.

Le μ_{\max} calculé (1,25 j⁻¹, soit 0,05 h⁻¹) semble assez faible par rapport à celui calculé par Claus et Kützner (1985) avec *Thiobacillus denitrificans* (0,11 h⁻¹), Hooijmans *et al.* (1990) avec *Thiosphaera pantotropha* (0,52 h⁻¹) en biomasse immobilisée, ou encore Dodd et Bone (1975) avec une population mixte (0,25 h⁻¹).

Le rendement de conversion Y calculé peut être exprimé de différentes façons : en gramme de cellules produites par gramme de N-nitrates consommés Y = 0,5, proche de 0,54 calculé par Hollo et Czako (1987) ; par gramme de biomasse produite par gramme de substrat consommé (carbone)

$Y = 0,44$, proche de 0,45 à 0,52 (Delachapelle *et al.*, 1991), et compris dans l'intervalle de 0,4 à 0,6 communément rencontré (Lynch et Poole, 1979).

3-4 Conclusions

Pour conclure ce chapitre sur la caractérisation des populations bactériennes dénitrifiantes, il apparaît que nous disposons d'un réacteur à l'équilibre en terme de paramètres physico-chimiques, et probablement en état oscillatoire permanent quant aux espèces bactériennes, dû aux inévitables petites variations de la température, du pH....

Une dizaine d'espèces cohabitent ensemble, parmi lesquelles *Ochrobactrum anthropi* et *Pasteurella* sont majoritaires. Elles sont toutes capables à des degrés divers de réduire les nitrates, soit en gaz (pour la majorité) soit seulement en nitrites. Deux types d'espèces font partie de cette dernière catégorie : (i) *Comamonas testosteroni*, connue comme étant incapable de réduire les nitrites en gaz ; (ii) certaines souches d'*Ochrobactrum anthropi* et de *Moraxella lacunata* s'arrêtent au stade nitrites alors que selon la littérature elles peuvent réduire les nitrates en gaz.

Cette biomasse bactérienne est capable d'oxyder les 4 acides gras volatils testés, à une vitesse spécifique de $18,8 \text{ mg C} \cdot \text{g}^{-1} \text{ MES} \cdot \text{h}^{-1}$, en réduisant en même temps les nitrates à $16,4 \text{ mg N} \cdot \text{g}^{-1} \text{ MES} \cdot \text{h}^{-1}$. Le taux de croissance maximal (μ_{\max}) du système est de $1,25 \text{ j}^{-1}$, le rendement maximal de croissance étant de $0,30 \text{ mg C-MES} / \text{mg C consommé}$.

Le temps de résidence hydraulique (TRH) est un paramètre important des cultures en continu puisqu'il conditionne directement la composition de la population bactérienne, dans la mesure où plus le TRH diminue, moins il reste d'espèces différentes. A TRH = 0,85 jours, une seule espèce bactérienne se maintient dans le chemostat : *Paracoccus denitrificans*. Le TRH a également une influence importante sur la répartition des espèces, puisque plus il diminue, plus la proportion d'espèces dénitrifiant jusqu'au stade gaz augmente, au détriment des espèces s'arrêtant au stade nitrites.

ANNEXES

Annexe 1 : Suivi du réacteur chemostat alimenté avec un mélange de quatre AGV.

Jour	Nitrates (mg N .L ⁻¹)		Nitrites (mg N .L ⁻¹)		Carbone (mg C .L ⁻¹)		MES (mg .L ⁻¹)		Redox (mV)	DO	
	Moy	ET	Moy	ET	Moy	ET	Moy	ET		Moy	ET
0	706,29	60,10	11,08	0,07	21,62	2,83	693,33	70,95	nm		
3	354,60	7,15	230,94	8,57	19,29	1,94	746,67	40,41	nm	1,544	0,003
4	12,86	7,59	614,50	26,01	16,33	0,21	833,33	97,13	nm	1,511	0,001
5	-175,38	14,68	780,08	14,00	17,37	0,56	803,33	70,24	nm	1,520	0,003
7	-85,76	15,27	593,50	14,30	27,81	10,22	640,00	131,15	nm	1,259	0,003
10	271,11	6,48	125,42	1,91	19,72	4,57	586,67	68,07	145,5	1,004	0,002
11	267,88	12,91	96,04	13,20	20,96	0,45	500,00	72,11	nm	0,912	0,002
12	231,54	1,59	126,73	14,84	23,06	2,40	506,67	56,86	nm	0,943	0,003
13	130,32	12,63	123,23	7,44	26,42	1,00	703,33	80,83	125,5	1,099	0,015
14	86,79	4,63	105,83	5,78	23,44	2,46	613,33	32,15	nm	1,321	0,020
17	26,26	8,00	14,98	3,49	25,79	0,30	570,00	36,06	nm	0,937	0,004
18	1,71	0,90	1,54	0,01	33,95	2,73	396,67	37,86	nm	0,753	0,003
20	7,71	5,35	0,38	0,01	29,65	0,41	580,00	45,83	nm	1,438	0,009
24	4,91	0,05	5,48	0,05	25,88	1,15	563,33	63,51	nm	1,406	0,014
25	53,06	0,01	0,39	0,01	20,74	2,96	506,67	32,15	nm	1,308	0,003
26	64,16	0,05	0,31	0,05	28,13	0,80	823,33	49,33	nm	1,646	0,005
27	93,48	9,40	0,32	0,02	24,84	8,38	670,00	26,46	nm	1,573	0,003
28	130,31	11,21	0,46	0,04	29,01	1,08	373,33	15,28	nm	1,397	0,002
38	107,71	22,29	0,31	0,04	39,78	3,46	930,00	78,10	nm	1,119	0,002
39	100,06	21,05	0,33	0,03	38,52	0,52	796,67	45,09	nm	1,063	0,002
40	103,23	11,53	0,29	0,11	44,77	1,73	870,00	60,83	nm	1,102	0,000
42	95,12	11,84	0,34	0,07	49,93	7,72	690,00	36,06	nm	1,414	0,000
45	81,94	2,83	0,39	0,01	42,49	0,48	786,67	45,09	nm	1,379	0,004
46	84,70	3,22	0,50	0,04	39,61	0,33	863,33	32,15	nm	1,433	0,001
47	82,41	7,62	0,37	0,00	48,30	0,57	746,67	5,77	nm	1,402	0,002
48	81,58	1,03	0,41	0,01	42,69	1,10	843,33	32,15	nm	1,420	0,002
49	94,48	3,29	0,46	0,00	45,12	0,90	743,33	51,32	nm	1,415	0,006
52	77,21	0,66	0,47	0,04	31,66	2,33	833,33	40,41	nm	1,366	0,002
53	61,67	1,21	0,40	0,01	22,05	0,21	826,67	11,55	nm	1,359	0,004
54	65,55	1,43	0,36	0,02	29,99	1,03	870,00	34,64	nm	1,355	0,006
55	52,31	1,90	0,42	0,01	33,10	2,84	630,00	34,64	nm	1,347	0,002
59	62,08	2,27	0,69	0,07	39,04	1,90	920,00	26,46	nm	1,357	0,010
60	67,69	1,55	0,39	0,00	39,78	0,02	876,67	30,55	nm	1,320	0,002
61	78,69	5,92	0,46	0,02	34,58	0,01	966,67	85,05	nm	1,496	0,002
63	82,51	2,14	0,46	0,01	47,39	0,26	736,67	0,00	nm	1,562	0,002
66	73,31	1,49	0,29	0,02	31,99	1,61	856,67	46,19	nm	1,589	0,013
67	84,74	3,01	0,30	0,00	31,16	2,54	793,33	50,33	nm	1,521	0,006
69	68,73	1,59	0,30	0,00	31,63	1,05	823,33	15,28	nm	1,473	0,003
73	63,96	2,52	0,28	0,00	21,97	3,03	836,67	11,55	nm	1,457	0,002
74	66,45	2,14	0,33	0,00	25,23	1,90	880,00	45,83	nm	1,466	0,002
75	69,09	1,32	0,33	0,00	22,27	1,28	790,00	26,46	nm	1,481	0,002
76	56,66	0,78	0,31	0,01	24,48	1,03	920,00	98,49	nm	1,463	0,001
77	48,90	3,14	0,32	0,06	23,48	3,39	956,67	87,37	nm	1,473	0,006
80	45,76	0,24	0,42	0,01	25,95	1,76	920,00	30,00	nm	1,505	0,008
81	37,62	2,83	0,41	0,01	24,44	0,99	960,00	5,00	nm	1,466	0,002
82	21,34	0,87	0,34	0,00	18,40	1,03	893,33	51,32	nm	1,441	0,002
83	6,45	2,66	0,34	0,00	26,18	2,26	870,00	60,83	nm	1,431	0,005
84	2,61	1,25	0,27	0,00	18,18	3,58	823,33	5,77	nm	1,463	0,004
88	11,96	0,30	0,33	0,00	20,31	2,70	880,00	20,00	nm	1,368	0,005
89	14,73	0,34	0,32	0,00	18,24	1,26	816,67	55,08	113,5	1,413	0,003
90	5,38	0,00	0,34	0,01	18,35	2,88	863,33	55,08	nm	1,385	0,006

.../...

.../...

Jour	Nitrates (mg N .L ⁻¹)		Nitrites (mg N .L ⁻¹)		Carbone (mg C .L ⁻¹)		MES (mg .L ⁻¹)		Redox (mV)	DO	
	Moy	ET	Moy	ET	Moy	ET	Moy	ET		Moy	ET
91	8,58	0,77	0,33	0,00	18,71	4,14	893,33	25,17	nm	1,371	0,002
94	9,26	0,61	0,35	0,01	22,28	4,09	823,33	55,08	124,5	1,390	0,007
95	6,31	0,76	0,33	0,01	15,94	0,83	923,33	20,82	125,5	1,362	0,004
97	11,22	0,79	0,33	0,01	15,55	0,27	830,00	55,68	125,5	1,373	0,004
101	3,23	2,33	0,36	0,01	20,03	3,11	896,67	35,12	118,5	1,455	0,003
105	10,13	1,33	0,32	0,00	45,03	6,68	1000,00	72,11	128,5	1,411	0,008
108	10,94	1,58	0,37	0,01	51,42	1,52	910,00	26,46	128,5	1,415	0,002
109	10,33	1,17	0,35	0,01	37,54	2,26	903,33	95,04	119,5	1,396	0,004
110	14,69	0,79	0,30	0,02	33,83	14,74	890,00	36,06	nm	1,392	0,002
112	5,13	2,25	0,35	0,01	26,83	4,66	790,00	117,90	nm	1,373	0,004
115	15,25	0,54	0,25	0,01	27,02	5,26	896,67	30,55	146,5	1,402	0,000
119	9,84	2,02	0,26	0,00	27,75	4,91	813,33	58,59	111,5	1,369	0,001
122	11,21	0,54	0,17	0,01	27,14	9,09	843,33	47,26	114,5	1,383	0,002
125	28,54	1,61	1,20	0,01	48,84	4,95	726,67	25,17	nm	1,375	0,004
126	36,12	0,85	0,17	0,01	60,74	1,17	800,00	17,32	112,5	1,363	0,005
129	18,05	2,27	0,37	0,01	42,35	0,73	833,33	35,12	nm	1,363	0,006
130	13,52	0,45	0,12	0,00	41,00	5,33	816,67	11,55	nm	1,419	0,005
131	8,32	1,32	0,14	0,01	25,53	2,38	886,67	55,08	nm	1,573	0,006
132	17,34	0,19	0,25	0,00	31,53	10,69	1080,00	26,46	nm	1,593	0,008
151	29,80	2,58	0,90	0,02	37,71	10,78	866,67	70,24	160,5	1,409	0,008
152	22,06	1,98	0,71	0,01	36,54	2,03	920,00	70,00	130,5	1,439	0,003
154	22,80	0,95	0,68	0,03	39,01	1,09	880,00	36,06	132,5	1,453	0,004
160	19,05	0,22	0,62	0,00	41,72	3,52	923,33	30,55	nm	1,458	0,009
164	16,72	2,08	0,60	0,01	44,92	3,97	960,00	26,46	156,5	1,473	0,003
167	4,33	1,32	0,36	0,01	25,29	2,16	936,67	41,63	nm	1,509	0,003
171	15,87	0,94	0,40	0,00	21,48	2,79	843,33	23,09	162,5	1,445	0,004
178	5,36	1,98	0,42	0,01	20,56	1,40	840,00	30,00	149,5	1,399	0,005
181	3,61	0,28	0,12	0,00	25,74	2,57	870,00	45,83	126,5	1,404	0,002
186	5,27	0,00	0,43	0,00	27,85	1,87	866,67	60,28	nm	1,415	0,008
192	4,04	0,47	0,11	0,01	25,74	0,26	840,00	43,59	nm	1,620	0,009
195	5,82	0,66	0,31	0,01	24,11	2,33	853,33	30,55	120,5	1,424	0,002
199	8,05	2,64	0,37	0,03	20,64	0,91	900,00	52,92	123,5	1,547	0,009
202	9,21	0,47	0,20	0,00	30,11	2,96	830,00	36,06	nm	1,561	0,004
206	7,65	0,32	0,25	0,02	23,66	3,56	886,67	49,33	nm	1,541	0,003
213	3,79	0,76	0,44	0,03	18,11	0,70	840,00	45,83	163,5	1,495	0,008
217	2,91	0,19	0,25	0,00	14,89	0,37	840,00	30,00	113,5	1,495	0,004
222	11,45	1,80	0,22	0,01	13,28	0,42	840,00	36,06	nm	1,489	0,002
228	14,96	1,80	0,12	0,00	27,32	1,11	833,33	23,09	nm	1,557	0,003
237	4,98	0,00	0,14	0,00	13,37	0,30	1000,00	79,37	137,5	1,558	0,002
241	8,69	1,32	16,96	0,16	29,85	3,55	986,67	30,55	nm	1,558	0,003
249	8,66	0,57	0,33	0,01	10,97	0,07	800,00	26,46	112,5	1,443	0,005
256	5,03	4,44	0,45	0,00	8,00	0,66	750,00	45,83	164,5	1,441	0,003
258	3,28	0,28	0,16	0,00	8,09	1,03	710,00	17,32	170,5	1,364	0,004
263	0,00	0,07	0,14	0,01	8,10	1,50	746,67	32,15	171,5	1,291	0,001
264	0,81	1,24	0,18	0,03	8,13	0,17	813,33	5,77	nm	1,315	0,002
267	0,23	0,07	0,07	0,00	5,99	0,01	875,00	35,36	nm	1,485	0,001
271	0,67	0,69	0,09	0,00	11,69	0,93	907,50	10,61	nm	1,391	0,004
284	3,98	0,23	0,48	0,01	11,30	1,04	793,33	40,41	122,5	1,303	0,003
294	4,70	0,37	0,22	0,00	11,09	0,21	866,67	25,17	118,5	1,412	0,002

.../...

.../...

Jour	Nitrates (mg N .L ⁻¹)		Nitrites (mg N .L ⁻¹)		Carbone (mg C .L ⁻¹)		MES (mg .L ⁻¹)		Redox (mV)	DO	
	Moy	ET	Moy	ET	Moy	ET	Moy	ET		Moy	ET
301	0,53	0,20	0,57	0,01	35,64	3,68	866,67	55,08	139,5	1,335	0,005
308	3,96	0,23	0,12	0,01	22,52	3,11	773,33	28,87	nm	1,375	0,005
315	6,80	0,26	0,13	0,00	12,22	0,31	836,67	20,82	nm	1,383	0,001
322	1,81	0,46	0,11	0,00	17,36	1,24	860,00	43,59	nm	1,380	0,002
333	6,72	0,00	1,50	0,11	8,27	1,41	845,00	0,00	172,5	1,202	0,116
343	0,00	0,00	0,00	0,00	5,69	1,12	937,50	10,61	nm	1,529	0,010
348	0,00	0,00	0,00	0,00	22,56	2,22	995,00	14,14	nm	1,310	0,009
350	0,00	0,00	0,00	0,00	12,96	0,67	1047,50	3,54	nm	1,364	0,001
367	20,15	0,47	0,06	0,00	11,47	1,11	1115,00	14,14	nm	1,387	0,001
374	17,12	0,54	0,07	0,00	10,98	0,72	872,50	10,61	nm	1,308	0,003
381	46,50	1,09	0,08	0,00	26,47	2,11	895,00	7,07	nm	1,279	0,001
419	8,94	1,73	1,17	0,01	9,31	0,14	912,50	3,54	189,5	1,295	0,001
423	12,48	4,21	1,71	0,03	10,38	0,30	832,50	60,10	160,5	1,329	0,008
426	7,30	0,49	1,16	0,14	10,31	0,32	912,50	3,54	179,5	1,388	0,003
430	12,86	8,80	8,41	0,18	9,25	0,03	930,00	14,14	169,5	1,423	0,002
433	7,63	0,07	6,17	0,10	8,56	0,01	847,50	3,54	180,5	1,421	0,000
437	-0,76	0,14	6,82	0,41	9,60	0,10	892,50	3,54	183,5	1,438	0,013
439	5,81	0,93	0,74	0,05	8,53	0,24	845,00	49,50	179,5	1,375	0,011
445	19,19	4,23	0,34	0,09	9,57	0,62	845,00	42,43	167,5	1,379	0,014
452	0,89	0,00	0,06	0,01	11,31	1,43	855,00	21,21	179,5	1,471	0,008
458	19,42	1,56	0,04	0,01	13,64	1,74	945,00	0,00	127,5	1,524	0,030
465	35,55	8,78	0,33	0,14	9,46	1,63	947,50	3,54	191,5	1,437	0,001
467	29,26	3,88	0,44	0,00	10,91	0,44	1040,00	77,78	186,5	1,481	0,005
472	12,14	0,22	0,16	0,16	12,42	0,54	980,00	28,28	119,5	1,431	0,006
474	8,47	0,29	0,29	0,01	13,81	1,52	955,00	0,00	111,5	1,427	0,016
476	10,86	0,56	0,27	0,01	11,80	1,11	962,50	17,68	nm	1,444	0,001
481	9,29	0,94	0,16	0,01	15,14	1,44	1090,00	7,07	nm	1,435	0,011
483	10,28	0,12	0,15	0,00	13,76	0,16	1035,00	21,21	nm	1,442	0,013
488	7,05	1,58	0,12	0,01	10,41	0,83	1060,00	28,28	nm	1,478	0,014
493	24,03	3,26	0,11	0,02	11,49	0,26	1122,50	10,61	nm	1,504	0,003
495	33,74	1,40	0,08	0,02	11,54	1,17	1110,00	14,14	nm	1,559	0,006
500	24,90	5,19	0,11	0,01	12,23	1,05	1100,00	14,14	nm	1,545	0,000
517	33,02	1,63	0,14	0,00	10,14	0,36	1100,00	28,28	nm	1,605	0,000
524	14,98	1,50	0,12	0,00	8,52	0,07	1112,50	3,54	nm	1,501	0,000
531	18,66	1,52	0,10	0,03	10,16	2,60	1080,00	28,28	nm	1,521	0,000
538	14,78	0,95	0,12	0,01	11,05	0,88	1067,50	31,82	nm	1,501	0,000

Annexe 2 : Concentrations résiduelles mesurées (ET : écart type, calculé sur 2 mesures) et paramètres calculés en fonction du TRH appliqué. Le potentiel redox est corrigé par rapport à l'électrode à hydrogène.

TRH (j)	D (j ⁻¹)	C- (mg/l)	ET	NO ₃ ⁻ (mg/l)	ET	NO ₂ ⁻ (mg/l)	ET	MES (mg/l)	ET	Y	C/N	T spé C (mg /mgMES/h)	T spé N (mg /mgMES/h)	redox (mV)
5	0,20	21	3	53	21	23,4	33,1	1214	135	0,58	1,12	14,27	12,17	67,5
4	0,25	16	4	47	13	1,03	2,03	1157	45	0,55	1,12	18,76	16,22	75,5
3,5	0,29	52	10	235	13	6,75	9,24	1176	60	0,57	1,23	20,73	16,28	82,5
2	0,50	15	1	165	75	333,3	37,7	1252	115	0,6	1,2	34,69	22,49	13,5
1,5	0,67	14	5	247	10	0,34	0,03	1446	30	0,69	1,26	40,07	30,79	5,5
1	1,00	10	2	210	7	0,53	0,2	1443	31	0,69	1,23	60,35	47,34	10,5
0,9	1,11	36	4	358	9	1,51	0,17	1352	117	0,65	1,34	70,68	51,04	8,5
0,85	1,18	290	0	990	34	45,78	0,6	1066	19	0,59	2,14	83,23	37,44	34,5
0,8	1,25	2000	0	1904	0	10,8	0	180	0	0	0			

Annexe 3 : Caractéristiques biochimiques (21 profils, de P1 à P17) d'après galeries API 20 NE des différentes colonies bactériennes isolées, et tests complémentaires.

glu f : fermentation du glucose

O129R : résistance au composé vibriostatique O129/R

Mac C : croissance sur milieu Mac Conkey

Mob : mobilité

NaCl : croissance en présence de NaCl à 4 %

42 °C : croissance à 42 °C en bouillon nutritif

Sorb : croissance sur sorbitol en tant que seule source de carbone.

+ : résultat positif (croissance, souche mobile).

± : résultat indéterminé

- : résultat négatif (pas de croissance, souche non mobile).

	P1	P2	P2b	P3	P4	P5	P5b	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14b	P14t	P14q	P15	P16	P17
NO ₂	-	-	-	-	-	+	+	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N ₂	+	+	+	+	+	-	-	+	±	+	+	-	-	-	(-)	+	+	+	+	+	+
TRP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ADH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
URE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ESC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
GEL	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
PNPG	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Glu	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+
Ara	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
Mne	+	±	±	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+
Man	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+
Nag	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
Mal	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
Gnt	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+
Cap	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
Adi	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	±	-	-	-	-	+	-	+
Mlt	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+
Cit	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
Pac	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OXI	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
glu f				-			-									-					
O129R				+				•	+							+					+
Mac C				+				-	+				+			-	+				+
Mob				-				+	-	-	+		-	-	+			-			-
NaCl										+	-	+	+								+
42 °C		+									+	+				+	+				+
Sorb																-					

Annexe 6 : Nombre et pourcentage d'espèces bactériennes réduisant les nitrates soit en gaz ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{gaz}$), soit en nitrites ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$), soit ne les réduisant pas (NO_3^-).

D (j^{-1})	TRH	$\text{NO}_3^- \rightarrow \text{gaz}$	$\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$	NO_3^-	$\text{NO}_3^- \rightarrow \text{gaz}$	$\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$	NO_3^-
0,20	5ja	14	1		0,93	0,07	
0,20	5j	60	7	6	0,82	0,10	0,08
0,25	4j	15	2	3	0,75	0,10	0,15
0,29	3,5j	6	2	14	0,27	0,09	0,64
0,33	3j	12	3	7	0,55	0,14	0,32
0,50	2j	15			1,00		
0,67	1,5j	14			1,00		
1,00	1j	14		1	0,93		0,07
1,11	0,9j	15			1,00		
1,18	0,85j	15			1,00		

Annexe 7 : Valeurs des pH, DO et concentrations en nitrates et nitrites mesurées après 7 jours d'incubation à 30 °C pour les différentes souches testées, lors des essais sur le métabolisme respiratoire.

Souche	Nitrates				Nitrites				Oxygène			
	N- NO_3	ET	pH	ET	N- NO_2	ET	pH	ET	DO	ET	pH	ET
Témoin	48,26	3,73	7,81	0,15	47,21	1,97	7,45	0,23	0,027	0,008	7,69	0,16
a	54,71	6,65	7,95	0,14	46,24	1,62	7,33	0,63	0,137	0,070	8,39	0,09
b	42,44	3,64	7,45	0,20	48,21	2,98	7,59	0,51	0,209	0,012	8,65	0,01
e	38,90	1,28	7,63	0,20	44,55	1,32	8,39	0,29	0,028	0,003	8,05	0,01
h	45,18	2,10	7,65	0,12	46,79	2,79	7,47	0,30	0,047	0,004	7,91	0,01
c	43,72	0,87	7,86	0,09	48,03	2,85	7,12	0,12	0,041	0,001	7,91	0,03
d	45,74	0,90	7,52	0,15	51,07	1,63	7,78	0,02	0,079	0,007	8,06	0,02
f	46,71	1,69	7,92	0,05	47,93	1,47	7,43	0,20	0,050	0,004	7,90	0,01
g	13,91	12,4	8,86	0,19	30,37	3,96	9,58	0,09	0,264	0,179	8,55	0,28

Annexe 8 : Seuil de significativité "l'expérimentation réalisée est différente du témoin au seuil de...%", lors des essais sur le métabolisme respiratoire.

Souche	Oxygène		Nitrates		Nitrites	
	DO	pH	N- NO_3^-	pH	N- NO_2^-	pH
a	99	99	88	78	50	32
b	99	99	93	97	42	38
c	89	87	91	40	36	93
d	99	99	70	96	97	94,2
e	24	97	99	82	91	99
f	99	92	47	73	33	10
g	98	99	99	99	99	99
h	98	94	75	83	20	06

CHAPITRE IV :

**VITESSES DE
DENITRIFICATION**

4-1 Protocoles	66
4-1-1 Biomasse mixte adaptée aux AGV : C limitant <i>versus</i> N limitant.....	67
4-1-2 Biomasse mixte peu adaptée aux AGV <i>versus</i> adaptée aux AGV	69
4-1-3 Souches pures <i>versus</i> population mixte	70
4-2 Résultats.....	71
4-2-1 Biomasse mixte adaptée aux AGV : C limitant <i>versus</i> N limitant.....	72
4-2-2 Biomasse mixte peu adaptée aux AGV <i>versus</i> adaptée aux AGV	76
4-2-3 Souches pures <i>versus</i> population mixte	77
4-2-3-1 <i>Alcaligenes denitrificans</i>	78
4-2-3-2 <i>Pseudomonas mendocina</i>	80
4-2-3-3 <i>Comamonas testosteroni</i>	81
4-3 Discussion.....	83
4-4 Conclusions.....	85

La réduction des nitrates en gaz (dénitrification) nécessite un apport d'électrons. Ceux-ci peuvent être fournis directement par la source de carbone utilisée pour la croissance des bactéries dénitrifiantes. Pour diminuer le coût et le risque lié à l'exploitation du méthanol en station d'épuration (Grady et Lim, 1982) l'utilisation d'acides gras volatils (AGV) semble être une voie intéressante à explorer. En effet, ces AGV sont produits lors de la phase d'hydrolyse partielle anaérobie des boues de station d'épuration, avec majoritairement les acides acétique, propionique, butyrique et valérique (Pérot, 1989). Paul *et al.* (1989) ont prouvé que ces AGV constituaient à la fois une source de carbone et d'électrons pour des bactéries dénitrifiantes. L'objet de ce travail est de déterminer quel AGV permet l'élimination la plus rapide des nitrates, avec si possible la plus faible production de biomasse bactérienne, dans l'objectif d'une utilisation en station d'épuration. Le chapitre précédent a permis de mettre au point un réacteur de dénitrification alimenté en continu avec un mélange des 4 AGV précédemment cités. La culture bactérienne est maintenue à l'équilibre, et la biomasse a été caractérisée en terme d'espèces dominantes et de constantes cinétiques.

Les vitesses de dénitrification et de consommation des AGV testés soit indépendamment les uns des autres soit tous les quatre ensemble sont calculées en conditions batch. Ces expériences sont réalisées avec plusieurs populations bactériennes, et différentes conditions opératoires : (i) soit une biomasse mixte, adaptée (directement extraite du réacteur chemostat) aux AGV, en conditions carbone limitant ou azote limitant ; (ii) soit une biomasse mixte non adaptée aux AGV ; (iii) soit en souche pure, sur trois espèces bactériennes isolées du fermenteur. Les souches pures sont utilisées pour tester l'effet "souche bactérienne" en fonction du substrat carboné fourni, tandis que la population bactérienne mixte permet davantage de se rapprocher de conditions d'exploitation d'une station d'épuration. Ces différents essais doivent nous permettre de choisir un AGV parmi les quatre pour son efficacité de dénitrification, ainsi que de discuter des conditions opératoires favorables à la dénitrification en présence d'acides gras volatils.

Après avoir brièvement décrit le protocole opératoire suivi, ce chapitre compare la dénitrification avec (i) des conditions opératoires carbone limitant et nitrate limitant ; (ii) des populations bactériennes mixtes adaptées et mixtes non adaptées aux AGV ; (iii) des populations bactériennes pures et mixtes.

4-1 Protocoles

Sauf spécification contraire, tous les inocula bactériens décrits dans cette partie proviennent du réacteur chemostat décrit dans le chapitre III (Caractérisation des populations dénitrifiantes) ; le moment du prélèvement est indiqué sous la forme J "x", x représentant le x^{ième} jour après le début de la culture en continu.

Les expérimentations pour calculer les vitesses sont réalisées en système batch, avec un rapport substrat initial sur biomasse initiale (S_0/X_0) "faible" (inférieur à 2, avec S_0 exprimé en DCO

et X_0 en MES), pour que le paramètre multiplication cellulaire soit le plus faible possible. Avec une concentration moyenne en biomasse de l'ordre de $0,8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, il a été décidé de fixer S_0 à $200 \text{ mg C} \cdot \text{L}^{-1}$.

4-1-1 Biomasse mixte adaptée aux AGV : C limitant versus N limitant

Ces expériences sont réalisées avec une biomasse adaptée à un mélange de 4 acides gras volatils, et deux conditions expérimentales sont testées : (i) une condition en carbone limitant et (ii) une condition en nitrates limitant.

- Pour les expériences en carbone limitant, et uniquement pour ces expériences, un second réacteur de dénitrification en continu est réalisé. Ses caractéristiques sont exactement les mêmes que celles décrites au chapitre III (Caractérisation des populations dénitrifiantes), à l'exception de la composition du milieu d'alimentation qui contient (par litre) : 1,075 mL d'acide acétique, 0,933 mL d'acide propionique, 0,867 mL d'acide butyrique, 0,821 mL d'acide valérique, 16,3 g de KNO_3 , 0,45 g de KH_2PO_4 , 0,30 g de K_2HPO_4 , et 8 g de NaOH (pH ajusté vers 5). A 1 litre de milieu d'alimentation est ajouté 1 mL d'une solution stock d'oligo-éléments. Le ratio C/N est donc ajusté à 0,8 (*i.e.* conditions carbone limitant). Les charges volumiques exprimées en N-nitrates et C-AGV sont respectivement égales à $0,45$ et à $0,36 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$. Les prélèvements sont réalisés par soutirage de 40 mL de culture bactérienne du chemostat. Après centrifugation à 3 000 g pendant 15 minutes à température ambiante le surnageant est filtré sur filtre de $0,65 \mu\text{m}$ de porosité (DAWP02500, Millipore) puis est utilisé pour le dosage des nitrates, nitrites et du carbone organique ; le culot sert pour la mesure des matières en suspension (MES).

Tableau 4-1 : Volumes d'AGV (μL) ajoutés pour 400 mL d'inoculum en conditions AGV seuls

	Volume d'AGV ajouté pour 400 mL (en μl)	Concentration résultante en $\text{mg C} \cdot \text{L}^{-1}$
Acide acétique, ou	190,5	200,0
Acide propionique, ou	165,3	200,0
Acide butyrique, ou	153,6	200,0
Acide valérique	145,5	200,1

Le volume d'inoculum bactérien nécessaire pour les essais batch est de 400 mL ; cet inoculum est prélevé au maximum une heure avant le début de l'expérience, et est caractérisé en terme de nitrates, nitrites, carbone, pH et MES. Pendant tout le déroulement de la manipulation, un barbotage à l'argon est réalisé dans les flacons batch aux travers de diffuseurs poreux, à la fois pour assurer une bonne homogénéisation du système, et limiter l'interférence avec l'oxygène. La température est mesurée et régulée à $19 \pm 1^\circ\text{C}$. Pour le volume prélevé (400 mL), les quantités d'AGV ajoutées dans chaque flacon figurent dans le tableau 4-1 (test de chaque AGV seul ; concentration finale : 200 mg C L^{-1}) ou dans le tableau 4-2 (test du mélange des 4 AGV ; concentration finale : 100, 200 et 300 mg C L^{-1}). La concentration en nitrates résiduels varie entre 700 et $800 \text{ mg N-NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1}$. Le pH n'est pas régulé.

Tableau 4-2 : Volumes d'AGV (μL) ajoutés pour 400 mL d'inoculum en conditions mélange des 4 AGV

	Volume d'AGV (en μL) ajouté pour 400 mL, concentration résultante :		
	100 mg C . L ⁻¹	200 mg C . L ⁻¹	300 mg C . L ⁻¹
Acide acétique et	23,8	47,6	71,4
Acide propionique et	20,6	41,2	61,8
Acide butyrique et	19,2	38,4	57,6
Acide valérique	18,2	36,4	54,6

Les prélèvements d'un volume de 10 mL sont effectués toutes les 30 minutes. Ils sont centrifugés 15 minutes à 3 000 g à température ambiante. Le surnageant filtré au travers de filtres de 0,65 μm de porosité (DAWP02500, Millipore) sert (i) soit uniquement au dosage du carbone pour les essais avec un mélange d'AGV, et pour les essais réalisés à J45, J47, J62 et J108 (AGV testés seuls). Le pH n'est pas mesuré ; (ii) soit au dosage du carbone, des nitrates et des nitrites pour les essais avec les AGV seuls à J95 et J111. Dans ce cas, les prélèvements (volume : 20 mL) sont réalisés environ toutes les 90 minutes pendant 8 heures, puis 1 prélèvement est effectué à 24 heures, à 30 heures et à 54 heures. Le pH est mesuré à chaque prélèvement.

Le culot permet de mesurer les MES au début et à la fin des expériences. Les ions ammonium sont uniquement dosés en fin de manipulation, ainsi que les nitrates et les nitrites pour les essais avec un mélange d'AGV, et pour les essais réalisés à J45, J47, J62 et J108 (AGV testés seuls).

Le prélèvement au jour J dans le chemostat sert pour réaliser (i) soit 4 batchs (1600 mL sont donc prélevés) : conditions acétate, propionate, butyrate et valérate ; (ii) soit 3 batchs (1200 mL sont donc prélevés) : conditions mélange d'AGV à 100, 200 et 300 mg C . L⁻¹. Ces expériences sont répétées 6 fois pour chaque AGV testé isolément, avec au total 66 jours d'écart entre la première et la dernière expérience (J45 à J111), et 4 fois pour chaque concentration du mélange d'AGV avec 69 jours d'écart (J41 à J110).

De plus, 2 essais de respiration de nitrites sont réalisés pour tester l'aptitude que possède cette biomasse bactérienne à dénitrifier en commençant au stade nitrites. Les conditions expérimentales pour les essais de respiration des nitrites sont les mêmes que celles des essais respiration des nitrates, à une seule différence près : la biomasse bactérienne (environ deux litres) est prélevée la veille de l'expérience (avec stockage pendant 16 heures à +5°C ; essai 1) ou le jour même de l'expérience (essai 2). Elle est ensuite centrifugée 30 minutes à 1 500g, et seul le culot est conservé. Il est mis en suspension dans environ 80 mL d'une solution à [0,4 g . L⁻¹ de KH₂PO₄ et 0,27 g . L⁻¹ de K₂HPO₄] ; après 30 secondes de sonication à 50W pour la dispersion des culots, puis homogénéisation manuelle, environ 20 mL sont ajoutés par flacon contenant 400 mL d'une solution à 200 mg N-NaNO₂ . L⁻¹ (0,985 g de NaNO₂ . L⁻¹ d'eau du robinet). Entre le début de l'inoculation par la biomasse bactérienne, et le premier prélèvement (*i.e.* h = 0), environ 10 minutes peuvent s'écouler. Les prélèvements sont réalisés toutes les heures. Les AGV sont testés individuellement.

Les volumes d'AGV introduits par flacon de 400 mL sont indiqués dans le tableau, soit 200 mg C . L⁻¹. Le ratio C/N initial est donc égal à 1.

• Pour les tests en nitrate limitant, le volume d'inoculum bactérien (prélevé dans le réacteur de dénitrification décrit chapitre III) est de 1 litre. Pendant tout le déroulement de la manipulation, un barbotage à l'argon est réalisé dans le fermenteur. La température est mesurée et régulée à $19 \pm 1^\circ\text{C}$. Pour le volume prélevé (1000 mL), les quantités d'AGV ajoutées dans le fermenteur figurent dans le tableau 4-3 (test de chaque AGV seul ; concentration finale : 200 mg C L⁻¹) ou dans le tableau 4-4 (test du mélange des 4 AGV ; concentration finale : 200 mg C L⁻¹). La quantité de nitrates ajoutée est d'environ 500 mg de KNO₃, soit environ 70 mg N-NO₃⁻ . L⁻¹, pour se placer en conditions nitrate limitant. Le pH est réglé à $7,3 \pm 0,1$ avec de l'acide chlorhydrique 2,8 N.

Tableau 4-3 : Volumes d'AGV (μL) ajoutés pour 1000 mL d'inoculum en conditions AGV seuls

	Volume d'AGV ajouté pour 1000 mL (en μl)	Concentration résultante en mg C . L ⁻¹
Acide acétique, ou	477,6	200,0
Acide propionique, ou	414,8	200,0
Acide butyrique, ou	386,4	200,0
Acide valérique	364,8	200,1

Tableau 4-4 : Volumes d'AGV (μL) ajoutés pour 400 mL d'inoculum en conditions mélange des 4 AGV

	Volume d'AGV ajouté pour 1000 mL (en μl)	Concentration résultante en mg C . L ⁻¹
Acide acétique et	119,4	50,0
Acide propionique et	103,7	50,0
Acide butyrique et	96,6	50,0
Acide valérique	91,2	50,0

Les prélèvements d'un volume de 40 mL sont effectués toutes les heures ou toutes les heures et demi, selon l'expérience en cours. Ils sont centrifugés 15 minutes à 3 000 g à température ambiante. Le surnageant filtré au travers de filtres de 0,65 μm de porosité (DAWP02500, Millipore) sert au dosage des nitrates, des nitrites et du carbone. Le culot permet de mesurer les MES au début et à la fin des expériences. Les ions ammonium sont uniquement dosés en fin de manipulation.

Le prélèvement au jour J dans le chemostat sert pour réaliser 1 ou 2 batchs (2000 mL au maximum sont donc prélevés). Ces expériences sont répétées 4 fois pour chaque condition (chacun des 4 AGV seul et le mélange des 4 AGV), à plusieurs jours d'intervalle (de J81 à J132).

4-1-2 Biomasse mixte peu adaptée aux AGV versus adaptée aux AGV

Le protocole décrivant les expériences en biomasse adaptée aux AGV est décrit précédemment. Ce paragraphe présente uniquement le protocole décrivant les expériences en biomasse peu adaptée aux AGV.

Un litre et demi de culture bactérienne est prélevé dans le chemostat à J5, centrifugé 30 minutes à 3 000 g (température ambiante). Le culot est remis en suspension dans 40 mL d'une solution de KH_2PO_4 (0,41 g . L⁻¹) et de K_2HPO_4 (0,27 g . L⁻¹), homogénéisé manuellement et soniqué 30 secondes (sonde aiguille, Ø 4mm) à 5 W. Ce concentré de biomasse est alors ajouté à 960 mL milieu de culture (composition Tableau 4-5). L'agitation de la culture fermée (système batch) est mise en route (150 tours . min⁻¹) ainsi que le barbotage à l'argon. Le pH est régulé à 7,3 ± 0,1 avec de l'acide chlorhydrique 2,8 N.

Tableau 4-5 : Composition du milieu de culture pour le batch biomasse non adaptée aux AGV

Quantités introduites pour 1 litre d'eau milliQ	Équivalent C ou N
119,4 µL d'acide acétique, et	50,0 mg C . L ⁻¹
103,7 µL d'acide propionique, et	50,0 mg C . L ⁻¹
96,6 µL d'acide butyrique, et	50,0 mg C . L ⁻¹
91,2 µL d'acide valérique, et	50,0 mg C . L ⁻¹
722 mg de nitrate de potassium	100,0 mg N . L ⁻¹

Les prélèvements sont réalisés toutes les heures ; le premier est effectué environ 5 minutes après l'inoculation. Trois fois 10 mL sont soutirés, centrifugés 15 minutes à 3 000 g (température ambiante). Le surnageant filtré au travers de filtres de 0,65 µm de porosité (DAWP02500, Millipore) sert au dosage du carbone, des nitrates et des nitrites. Les MES sont déterminées au début et à la fin de l'expérience, les ions ammonium à 7 heures, 14 heures et à la fin de la manipulation.

4-1-3 Souches pures versus population mixte

Le protocole décrivant les expériences en population mixte est décrit précédemment. Ce paragraphe présente uniquement le protocole décrivant les expériences en souches pures.

Trois espèces bactériennes isolées du réacteur de dénitrification décrit au chapitre III (Caractérisation des populations dénitrifiantes) sont testées quant à leur vitesse spécifique de dénitrification et de consommation du carbone (chaque AGV étant testé séparément) : *Alcaligenes denitrificans*, *Pseudomonas mendocina* et *Comamonas testosteroni*. Ces espèces sont identifiées sur galerie API 20 NE, l'identification étant confirmée par la suite par l'Institut Pasteur.

Une öse de culture bactérienne est prélevée stérilement à partir d'un tube de gélose inclinée, puis est remise en suspension dans 10 mL de bouillon peptoné (composition : 25 g . L⁻¹ du bouillon peptoné BioMérieux réf. 5 111 1, complétement avec 1,083 g de nitrate de potassium Prolabo réf. 26 857.368 ; concentration finale : 150 mg N . L⁻¹ ; pH ajusté à 7,3 par ajout de NaOH 10 N). Après 24 heures d'incubation à + 20 °C à l'obscurité, le milieu est transvasé dans 2 litres de bouillon peptoné nitraté stérile. Une incubation de 60 h est à nouveau réalisée à + 20 °C.

A la fin de cette incubation la culture bactérienne en bouillon peptoné est centrifugée à 10 000 g à + 20 °C pendant 10 minutes. Le culot est lavé et centrifugé deux fois dans les mêmes conditions avec une solution de tampon phosphate stérile (pH = 7,2) puis il est remis en suspension dans 65

mL de tampon stérile. Vingt millilitres de cette biomasse sont versés dans trois flacons contenant 500 mL de milieu AGV stérile (Tableau 4-6). Ce milieu liquide contient comme unique source de carbone les 4 AGV. Le ratio C/N initial est égal à 2 et les concentrations en nitrates et en carbone sont respectivement égales à 100 mg N . L⁻¹ et 200 mg C . L⁻¹.

Tableau 4-6 : Composition du milieu de culture pour les batch souches pures

Éléments	Quantité
KNO ₃	361 mg
Reef Crystals (Aquarium Systems)	500 mg
FeSO ₄ (Prolabo 24 244.232)	2,5. mg
CH ₃ COOH ou CH ₃ CH ₂ COOH ou CH ₃ (CH ₂) ₂ COOH ou CH ₃ (CH ₂) ₃ COOH	239,5 µL 208,9 µL 194,0 µL 183,9 µL
eau Milli Q	q.s.p. 250 mL
Autoclavage 20 min à 121 °C	
Tampon phosphate pH 7,2 : KH ₂ PO ₄ (Rectapur 26 930.293) : 296 mL à 18,146 g/L + NaHPO ₄ , 2H ₂ O (Merck 6580) : 704 mL à 23,74 g/L	250 mL
Autoclavage 20 min à 121 °C	

Les deux solutions sont mélangées de façon stérile puis conservés à 5 ± 2 °C pendant deux semaines maximum.

Les flacons sont à une température de 20 ± 2 °C. Après inoculation, un barbotage à l'argon (Oxygène liquide 5.0) au travers de diffuseurs poreux est appliqué continuellement dans les flacons pour limiter la contamination en oxygène et pour assurer l'agitation de la culture bactérienne. Le premier prélèvement est effectué juste après l'ensemencement à proximité d'un bec bunsen à l'aide d'une pipette stérile (30 mL par prélèvement + 4 mL pour la mesure de DO) et constitue le temps zéro. Les prélèvements suivants sont réalisés environ toutes les heures. Après centrifugation des échantillons à 20 000 g pendant 10 minutes à + 4 °C, le surnageant est utilisé pour doser les nitrates, les nitrites et le carbone. Le culot sert à déterminer les MES initiales et finales. Enfin des mesures d'absorbance à 620 nm et de pH sont effectués à chaque prélèvement. Ces expériences sont répétées 3 fois par AGV testé et par souche bactérienne.

4-2 Résultats

Dans un premier temps les vitesses de dénitrification et de consommation de carbone par une population bactérienne mixte sont calculées, en comparant sur une biomasse adaptée aux AGV des conditions en carbone limitant et en nitrates limitant. Dans un second temps sont comparées les vitesses calculées sur une population adaptée et sur une population non adaptée aux AGV. Pour terminer, les vitesses sont déterminées pour 3 souches pures avec chaque AGV testé individuellement, et sont comparées à celles obtenues en population mixte.

4-2-1 Biomasse mixte adaptée aux AGV : C limitant versus N limitant

Deux conditions différentes ont été testées avec des populations bactériennes mixtes adaptées aux AGV cultivées en système batch : d'abord une condition en carbone limitant (C/N initial $\approx 0,3$), puis une condition en nitrates limitant (C/N initial $\approx 2,9$). Dans les deux cas, des vitesses initiales spécifiques de consommation de carbone et de nitrates ont été calculées, et sont comparées.

La figure 4-1 présente, à titre d'exemple, les courbes obtenues avec un mélange de 4 AGV (3 concentrations testées) en carbone limitant. Les données brutes sont présentées en annexe 1.

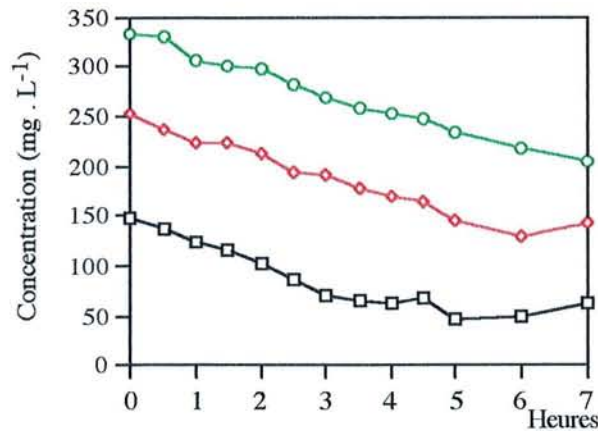


Figure 4-1 : Évolution d'un mélange de 4 AGV à 3 concentrations différentes (100 $\text{mg C} \cdot \text{L}^{-1}$; 200 $\text{mg C} \cdot \text{L}^{-1}$; 300 $\text{mg C} \cdot \text{L}^{-1}$) en fonction du temps. Carbone limitant.

Globalement, les allures des courbes sont similaires : le mélange d'AGV est consommé selon la même cinétique avec 100, 200 ou 300 $\text{mg C} \cdot \text{L}^{-1}$ disponible. Les concentrations en ions ammonium mesurées à la fin de chaque expérience sont inférieures à la limite de sensibilité de la méthode (0,1 $\text{mg N} \cdot \text{L}^{-1}$).

Les vitesses calculées (Tableau 4-7) sont identiques quelle que soit la concentration en carbone testée. Cette expérience prouve qu'avec 100 $\text{mg C} \cdot \text{L}^{-1}$ la biomasse bactérienne travaille V_{max} (vitesse maximale de consommation du substrat), soit 69 $\text{mg C} \cdot \text{g}^{-1} \text{MES} \cdot \text{h}^{-1}$ (vitesse maximale initiale spécifique).

Tableau 4-7 : Vitesses spécifiques ($\text{mg C} \cdot \text{g}^{-1} \text{MES} \cdot \text{h}^{-1}$) calculées avec un mélange de 4 AGV pour 3 concentrations testées (100 ; 200 ; 300 $\text{mg C} \cdot \text{L}^{-1}$), en fonction du jour de prélèvement. Batch, pH non régulé, $T = 19 \pm 1 \text{ } ^\circ\text{C}$, carbone limitant.

Jour du prélèvement de l'inoculum	MES ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	V spécifique pour des concentrations de ($\text{mg C} \cdot \text{L}^{-1}$)			Moyenne \pm (ET)	CV (%)
		100	200	300		
J109 et J110	0,75	67,9 (0,7)	67,7 (2,5)	71,5 (0,0)	68,9 (2,4)	3,4

Lorsque les AGV sont testés indépendamment les uns des autres, ils sont tous les quatre consommés à la même vitesse initiale spécifique, soit 44,6 $\text{mg C} \cdot \text{g}^{-1} \text{MES} \cdot \text{h}^{-1}$ (Tableau 4-8 et

annexe 2). Toutefois, dans les expériences suivantes, le propionate sera consommé nettement moins vite. La vitesse de consommation des AGV seuls est inférieure à celle calculée avec un mélange d'acides gras volatils ($69 \text{ mg C} \cdot \text{g}^{-1} \text{ MES} \cdot \text{h}^{-1}$) ce qui peut provenir soit du fait que la biomasse bactérienne est adaptée à un mélange d'AGV, soit qu'en présence du mélange des 4 AGV l'ensemble de la population bactérienne les biodégrade, alors qu'avec un seul AGV seule une fraction des micro-organismes les consommerait.

Tableau 4-8 : Vitesses moyennes initiales spécifiques de consommation de carbone ($\text{mg C} \cdot \text{g}^{-1} \text{ MES} \cdot \text{h}^{-1}$) calculées avec les 4 AGV testés individuellement à $200 \text{ mg C} \cdot \text{L}^{-1}$, en fonction du jour de prélèvement. Batch, pH non régulé, $T = 19 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, carbone limitant.

Jour du prélèvement de l'inoculum	MES ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	AGV ($\text{mg C} \cdot \text{g}^{-1} \text{ MES} \cdot \text{h}^{-1}$)				Moy (ET)
		Acétate	Propionate	Butyrate	Valérate	
J108 et J111	0,76	44,9 (6,1)	41,7 (10,4)	41,6 (5,6)	50,2 (4,1)	44,6 (6,4)

Pour les essais réalisés à J95 et J111, toujours en conditions carbone limitant, les cinétiques de consommation des nitrates et de production des nitrites ont été suivies, en présence des AGV testés individuellement. Ces vitesses initiales spécifiques moyennes calculées sont présentées dans le tableau 4-9. Malgré la variabilité importante des données, il est clair que les vitesses spécifiques initiales de réduction des nitrates sont les mêmes quel que soit l'AGV considéré ($22,8 \pm 3,4 \text{ mg N-NO}_3^- \cdot \text{g}^{-1} \text{ MES} \cdot \text{h}^{-1}$), ainsi que les vitesses moyennes spécifiques initiales de production des nitrites ($26,7 \pm 7,1 \text{ mg N-NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} \text{ MES} \cdot \text{h}^{-1}$), c'est-à-dire que les nitrates sont réduits de façon stœchiométrique en nitrites, à l'erreur expérimentale près. Le tableau 4-10 montre qu'effectivement les nitrates sont stœchiométriquement réduits en nitrites pour l'acétate, le propionate, le butyrate et le valérate. Ce phénomène est net en condition AGV seul et en mélange d'AGV à 200 et 300 $\text{mg C} \cdot \text{L}^{-1}$, mais de façon surprenante n'est pas vérifié avec le mélange d'AGV à 100 $\text{mg C} \cdot \text{L}^{-1}$.

Tableau 4-9 : Vitesses initiales spécifiques de réduction des nitrates et de production de nitrites versus la nature de l'AGV : moyenne des vitesses calculées sur les populations bactériennes prélevées à J95 et J111. Batch, pH non régulé, $T = 19 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, carbone limitant.

	AGV ($\text{mg N} \cdot \text{g}^{-1} \text{ MES} \cdot \text{h}^{-1}$)				Moy (ET)
	Acétate	Propionate	Butyrate	Valérate	
V_{nitrates}	26,1 (1,8)	24,3 (1,1)	18,4 (2,3)	22,3 (2,3)	22,8 (3,4)
V_{nitrites}	26,9 (16,3)	23,6 (8,7)	23,7 (0,9)	29 (11,6)	25,8 (8,6)

Tableau 4-10 : Fraction (%) de nitrates réduits en nitrites versus la nature de l'essai (AGV testés individuellement : $n = 6$, ou en mélange à 3 concentrations différentes $n = 3$) entre le début et la fin de l'expérience. Batch, pH non régulé, $T = 19 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, carbone limitant.

	AGV testés individuellement ($200 \text{ mg C} \cdot \text{L}^{-1}$)				Mélange ($\text{mg C} \cdot \text{L}^{-1}$)		
	Acétate	Propionate	Butyrate	Valérate	100	200	300
% $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$	88	98	113	119	66	105	113

Ces pourcentages élevés de réduction des nitrates en nitrites s'expliquent tout simplement par le fait de conditions expérimentales limitantes en carbone. Comme il n'y a pas assez d'électrons disponibles les nitrates sont réduits uniquement en nitrites (Tableau 4-10). Ceci implique que les vitesses de réduction des nitrates sont du même ordre de grandeur que celles de réduction des nitrites, et se vérifie par 2 essais de respiration des nitrites en présence de chaque AGV testé individuellement (Tableau 4-11). La vitesse initiale spécifique de réduction des nitrites calculée est effectivement très proche de la vitesse de réduction des nitrates, soit respectivement $26,7 \pm 7,1$ et $22,8 \pm 3,4$ mg N . g⁻¹ MES . h⁻¹.

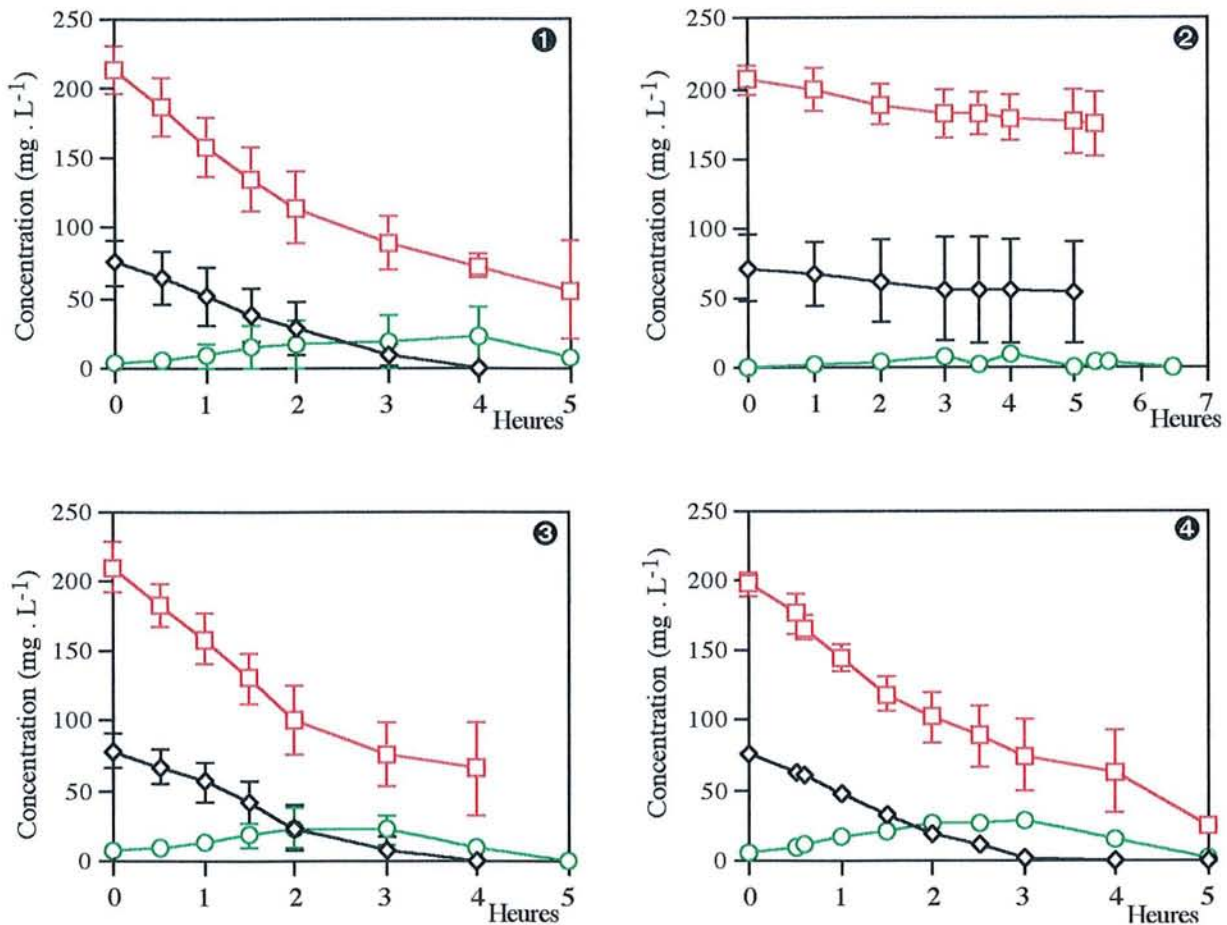
Tableau 4-11 : Vitesses spécifiques de consommation des nitrites vs nature de l'AGV : moyenne des vitesses calculées sur les populations bactériennes prélevées à J116 et J124. Batch, pH non régulé, $T = 19 \pm 1$ °C, carbone limitant.

Jour du prélèvement de l'inoculum	Acétate	Propionate	Butyrate	Valérate	Moy (ET)
	(mg N-NO ₂ ⁻ . g ⁻¹ MES . h ⁻¹)				
J116 et J124	26,5 (13,4)	27,6 (4,7)	23,1 (1,9)	29,4 (10,3)	26,7 (7,1)

Les expériences suivantes sont réalisées en conditions nitrate limitant, toujours avec une biomasse adaptée aux AGV. Les vitesses spécifiques initiales de consommation du carbone (AGV testés individuellement et en mélange), de réduction des nitrates en nitrites, des nitrites en gaz, et de dénitrification (disparition des NO_x, avec N-NO_x = N-NO₃⁻ + N-NO₂⁻) sont présentées dans le tableau 4-12. Les figures 4-2 ①, ②, ③ et ④ présentent, en fonction du temps, les évolutions observées du carbone, des nitrates et des nitrites avec respectivement comme source de carbone et d'électrons l'acétate, le propionate, le butyrate et le valérate (données en annexe 3).

L'acétate, le butyrate et le valérate sont consommés rapidement, ainsi que les nitrates, sans phase de latence. Les nitrites sont accumulés de façon transitoire et non stœchiométrique, ce qui signifie qu'une partie des nitrites est réduite en même temps que les nitrates. A la fin de l'expérience, la quasi totalité des nitrates et des nitrites est consommée, tandis qu'il reste du carbone : ceci est caractéristique des conditions opératoires en nitrate limitant. Par contre, le propionate est consommé beaucoup plus lentement que les 3 autres AGV ; par conséquent les nitrates sont eux aussi réduits lentement, et peu de nitrites sont formés.

Il n'y a pas de différence statistiquement significative (risque d'erreur = 5 %) entre les vitesses calculées pour l'acétate, le butyrate, le valérate et le mélange des 4 acides gras volatils (Tableau 4-12), *i.e.* l'acétate, le butyrate, le valérate et le mélange des acides gras sont consommés à la même vitesse (environ 60 mg C . g⁻¹ MES . h⁻¹) et permettent une dénitrification également à la même vitesse (19,5 mg N-NO_x . g⁻¹ MES . h⁻¹)



Figures 4-2 : Évolutions des concentrations ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) en carbone (—□—), N-nitrates (.....◇.....), N-nitrites (----○----) en fonction du temps. ① : acétate ; ② : propionate ; ③ : butyrate ; ④ : valérate. Conditions batch, $\text{pH} = 7,3 \pm 0,1$, $T = 19 \pm 1$ °C, nitrate limitant.

Tableau 4-12 : Taux spécifiques ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{MES} \cdot \text{h}^{-1}$) de consommation du carbone, des nitrates, des nitrites et des N- NO_x et d'accumulation des nitrites, avec l'acétate, le propionate, le butyrate, le valérate, et le mélange des 4 AGV (moyennes de 4 essais).

Substrat	Carbone (cons)	N-nitrate (cons)	N-nitrite (accu)	N-nitrite (cons)	N- NO_x (cons)
Acétate	60,8 (2,8)	29,5 (3,4)	8,9 (2,6)	18,5 (4,1)	19,0 (0,8)
Propionate	7,8 (4,2)	6,2 (7,9)	2,7 (2,7)	2,3 (1,8)	3,1 (2,9)
Butyrate	60,7 (8,3)	29,1 (4,1)	9,6 (6,1)	19,4 (2,7)	20,2 (3,2)
Valérate	57,6 (3,8)	29,5 (3,2)	11,8 (2,8)	17,6 (2,1)	18,0 (1,7)
Mélange d'AGV	59,9 (17,6)	31,9 (3,7)	15,7 (2,0)	16,0 (1,5)	19,9 (3,9)

En conclusion, l'excès de carbone ou de nitrates influence directement la production de nitrites, non consommés à la fin de l'expérience dans le cas d'un déficit en carbone. Par contre, quelles que soient les conditions opératoires fixées (carbone ou nitrate limitant), il apparaît

clairement que les vitesses de consommation des acides gras volatils sont (à l'exception du propionate) identiques entre elles et induisent des vitesses de dénitrification identiques.

Ces résultats sont surprenants dans la mesure où l'état d'oxydation moyen de l'atome de carbone dans les AGV est de 0 (acétate), -0,67 (propionate), -1 (butyrate) et -1,2 (valérate). Cela signifie que la valérate, transformé en CO_2 (état d'oxydation du carbone : +4) peut fournir d'avantage d'électrons que les 3 autres AGV. Dans la mesure où toutes les vitesses de consommation du carbone sont égales entre elles, nous devrions observer des vitesses de dénitrification (ou des vitesses de consommation de nitrates, tous les nitrates étant réduits en nitrites) maximales pour le valérate, puis décroissantes pour le butyrate, le propionate et l'acétate, *i.e.* des ratios C/N décroissants du valérate à l'acétate. Comme le contraire est observé, on peut supposer une compensation dans la production de biomasse, *i.e.* le valérate devrait permettre de produire davantage de cellules que le butyrate, le propionate et l'acétate (cf. chapitre V).

4-2-2 Biomasse mixte peu adaptée aux AGV *versus* adaptée aux AGV

La biomasse peu adaptée aux AGV a été prélevée dans un réacteur de dénitrification alimenté depuis 5 jours avec un mélange d'AGV (TRH = 5 jours, cf protocole § 1-1-2), *i.e.* la biomasse bactérienne n'est pas encore parfaitement adaptée aux AGV. Les cinétiques de consommation des nitrates, des nitrites et du carbone sont étudiées en système batch. La figure 4-3 présente les évolutions de ces trois composés au cours du temps. Il ressort clairement de cette figure que les nitrates sont totalement consommés en 5 heures (aux erreurs expérimentales près). Dans le même temps des nitrites sont produits, la source de carbone est consommée. Enfin les nitrites produits sont consommés uniquement lorsque tous les nitrates en solution sont réduits. Une légère augmentation du carbone résiduel apparaît au bout de 20 heures, pouvant traduire un phénomène de relargage.

La cinétique de consommation du carbone est biphasique : la première phase ($21,6 \text{ mg C} \cdot \text{g}^{-1} \text{ MES} \cdot \text{h}^{-1}$) correspond à la réduction stœchiométrique des nitrates en nitrites à la vitesse de $27,1 \text{ mg N} \cdot \text{g}^{-1} \text{ MES} \cdot \text{h}^{-1}$. La seconde phase ($5,1 \text{ mg C} \cdot \text{g}^{-1} \text{ MES} \cdot \text{h}^{-1}$) correspond à la réduction en gaz des nitrites produits, globalement à la vitesse spécifique de $6,2 \text{ mg N} \cdot \text{g}^{-1} \text{ MES} \cdot \text{h}^{-1}$. Les données brutes figurent en annexe 4.

Les ions ammonium sont présents à des concentrations inférieures à $0,05 \text{ mg N} \cdot \text{L}^{-1}$. La concentration en biomasse bactérienne augmente de 11 % pendant les 17 heures que durent l'expérience (de 980 à 1080 $\text{mg MES} \cdot \text{L}^{-1}$). Cette production de $100 \text{ mg MES} \cdot \text{L}^{-1}$ correspond globalement à la consommation de carbone ($120 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) observée au cours de l'expérience.

Apparemment, la faible adaptation de la biomasse bactérienne aux AGV détermine une accumulation transitoire de nitrites. En effet, lorsque le carbone n'est pas limitant les nitrates sont réduits stœchiométriquement en nitrites (Figure 4-3) uniquement dans le cas d'une population non adaptée aux AGV. Lorsqu'elle est adaptée, les nitrates sont réduits à la fois en nitrites et en gaz (Figure 4-2).

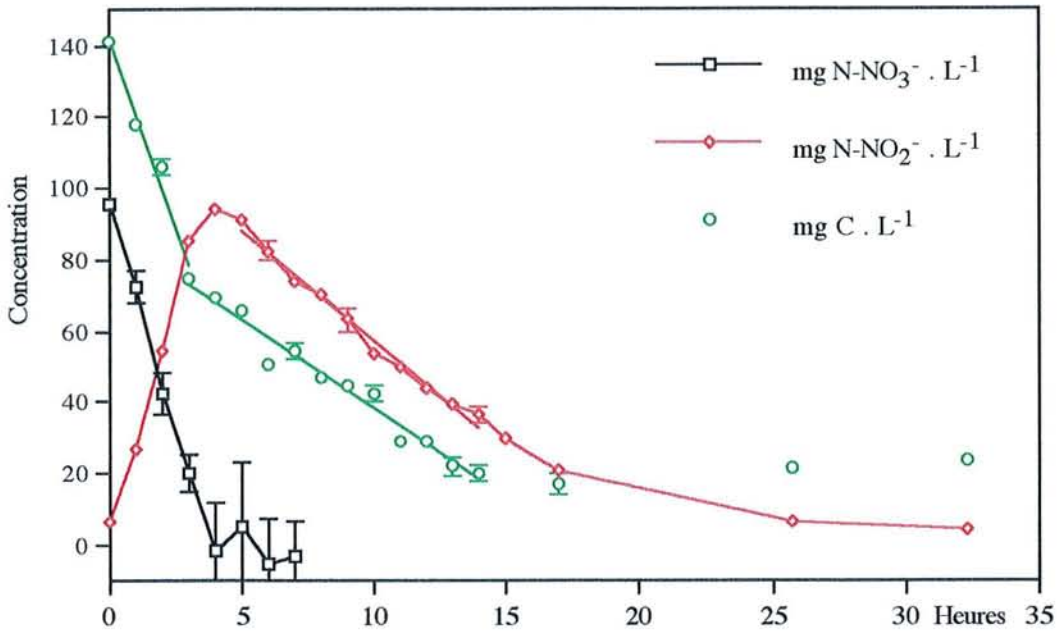


Figure 4-3 : Évolution des concentrations en nitrates, nitrites et carbone en fonction du temps. Batch, pH = 7,3 ± 0,1, T = 21 °C, mélange de 4 AGV ; MES = 0,98 g . L⁻¹, biomasse peu adaptée.

De plus, l'effet adaptation est également constaté sur la population bactérienne issue du chemostat (Tableau 4-13) : les vitesses de consommation du carbone ont été calculées sur une biomasse adaptée prélevée soit à J45 et J47, soit à J108 et J111. Les vitesses initiales spécifiques moyennes varient d'un facteur 4 (respectivement 10,6 et 44,6 mg C . g⁻¹ MES . h⁻¹). Ainsi, bien que le temps de résidence hydraulique du chemostat soit de 5 jours, la biomasse bactérienne de celui ci n'est toujours pas à l'équilibre 45 jours après l'inoculation. On peut penser que le ratio dégradeurs spécifiques des AGV / bactéries totales augmente au cours du temps, expliquant l'augmentation des vitesses.

Tableau 4-13 : Vitesses moyennes initiales spécifiques de consommation de carbone (mg C . g⁻¹ MES . h⁻¹) calculées avec les 4 AGV testés individuellement à 200 mg C . L⁻¹, sur une biomasse prélevée à 60 jours d'intervalle. Batch, pH non régulé, T = 19 ± 1 °C, carbone limitant.

Jour du prélèvement	MES (g.l ⁻¹)	AGV (mg C . g ⁻¹ MES . h ⁻¹)				Moy (ET)
		Acétate	Propionate	Butyrate	Valérate	
J45 et J47	1,41	9,8 (1,1)	11,3 (2,1)	11,0 (3,7)	10,3 (2,8)	10,6 (2,1)
J108 et J 111	0,76	44,9 (6,1)	41,7 (10,4)	41,6 (5,6)	50,2 (4,1)	44,6 (6,4)

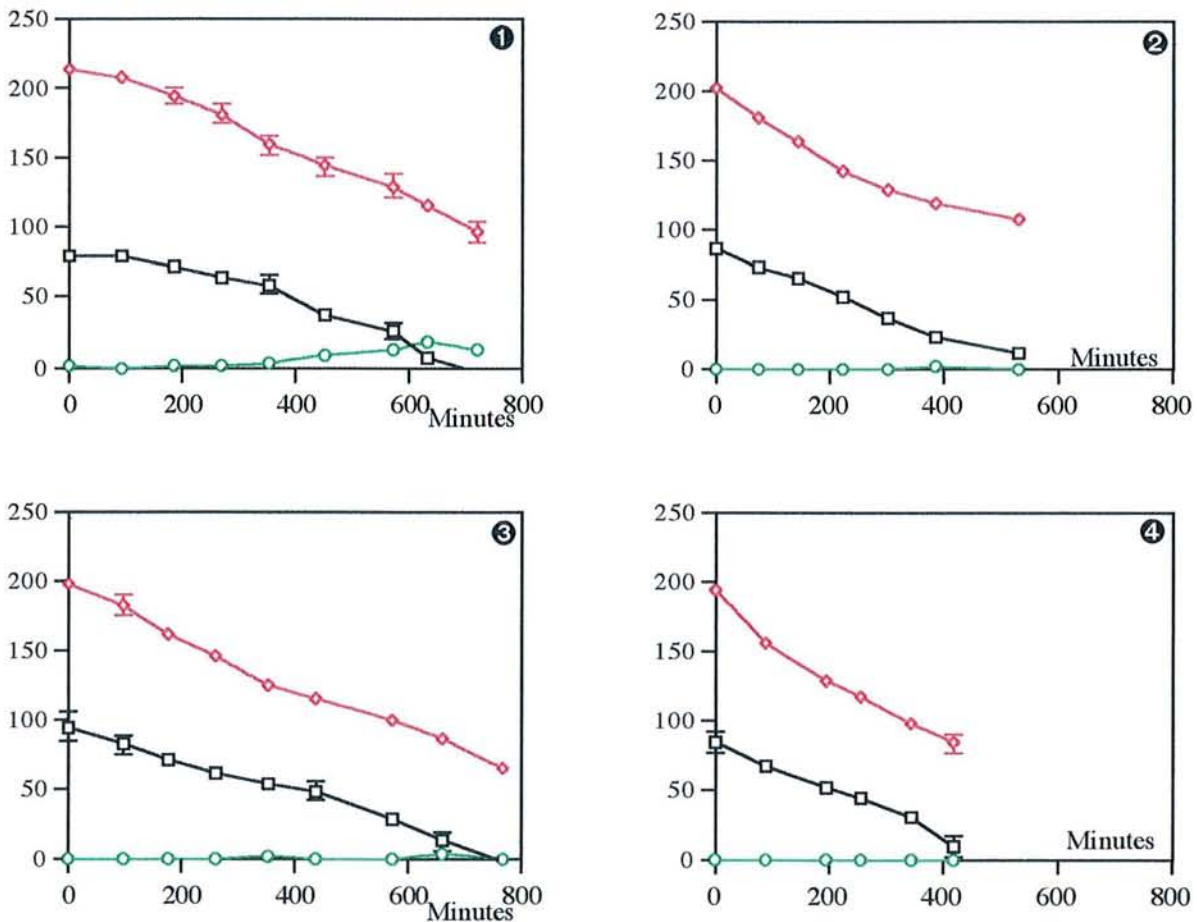
4-2-3 Souches pures versus population mixte

Trois souches bactériennes provenant de la culture dénitrifiante en continu ont été choisies : *Alcaligenes denitrificans* qui est l'espèce majoritaire 30 jours après l'inoculation du réacteur, *Pseudomonas mendocina* qui est morphologiquement différente des autres colonies sur gélose nutritive (coloration jaune intense), et enfin *Comamonas testosteroni* qui a la particularité de réduire les nitrates uniquement jusqu'aux nitrites. Ces trois souches sont testées individuellement pour

mesurer les vitesses de dénitrification (consommation des nitrates et / ou des nitrites) et de consommation du carbone avec chacun des 4 AGV testés individuellement.

4-2-3-1 *Alcaligenes denitrificans*

Les figures 4-4 ①, ②, ③ et ④ présentent les évolutions des nitrates, des nitrites et du carbone (AGV testés individuellement) en fonction du temps. Quel que soit l'AGV, les courbes présentent toutes la même allure : les nitrates sont réduits, le carbone est consommé et relativement peu de nitrites sont produits. La consommation du carbone s'effectue donc bien par un processus de respiration des nitrates. Il apparaît clairement que la souche *Alcaligenes* (souche dominante) est capable de dégrader les quatre AGV indépendamment les uns des autres, et ce en conditions de dénitrification. Une légère phase de latence est observée avec l'acétate pendant au maximum 90 minutes. Puis les nitrates et le carbone sont consommés à faibles vitesses jusqu'à 350 minutes, temps à partir duquel l'apparition des nitrites est significative. En présence d'acétate, il semble donc qu'une période d'adaptation soit nécessaire pour biodégrader cet AGV.



Figures 4-4 : Évolutions des concentrations en N-nitrates (—□—), N-nitrites (---○---) et carbone (.....◇.....) en fonction du temps (minutes) avec l'acétate (①), le propionate (②), le butyrate (③) et le valérate (④). Batch, milieu tamponné (pH = 7,2), T = 19 °C ; moyenne de 3 essais avec *Alcaligenes denitrificans*.

Au cours des essais, le pH augmente de 0,2 à 0,3 unités : le tampon utilisé est donc suffisamment fort pour stabiliser l'augmentation du pH due à la consommation de protons dans le milieu extérieur pendant la dizaine d'heures de l'expérience.

Le tableau 4-14 regroupe les vitesses spécifiques de consommation du carbone, des nitrates, des nitrites, et de production des nitrites et de la biomasse en fonction de la source de carbone fournie, les données brutes étant en annexe 5.

Tableau 4-14 : Vitesses spécifiques ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{MES} \cdot \text{h}^{-1}$) de consommation du carbone, des nitrates, des nitrites, et de production des nitrites et des MES ($\text{mg MES} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) en fonction de l'AGV testé (moyenne de 3 essais).

AGV testé	Carbone (cons)	N-NO ₃ ⁻ (cons)	N-NO ₂ ⁻ (prod)	N-NO ₂ ⁻ (cons)	MES (prod)
Acétate	18,5 (0,3)	18,1 (2,5)	5,1 (1,1)	≈ 0	5,3
Propionate	28,2 (1,4)	17,4 (0,8)	≈ 0	≈ 0	7,4
Butyrate	27,9 (0,6)	18,0 (5,2)	≈ 0	≈ 0	9,4
Valérate	22,4 (1,1)	17,2 (3,9)	≈ 0	≈ 0	10,1

Quel que soit l'AGV testé, les nitrates sont réduits sensiblement à la même vitesse spécifique soit en moyenne $17,7 \text{ mg N-NO}_3^- \cdot \text{g}^{-1} \text{MES} \cdot \text{h}^{-1}$ (au risque d'erreur de 5 %). De plus, les nitrites sont peu accumulés lors des essais (1,5 à $17,7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ selon l'AGV). Seule la culture avec l'acétate présente une vitesse apparente de production de nitrites significativement différente de zéro : au temps 350 minutes, les nitrites sont produits à une vitesse de $5,1 \text{ mg N-NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} \text{MES} \cdot \text{h}^{-1}$. Au contraire, les nitrites ne sont pas détectés avec les autres AGV. On peut donc admettre que les nitrites formés au cours de la dénitrification sont réduits directement en gaz à la même vitesse que les nitrates le sont en nitrites soit à une vitesse de $17,7 \text{ mg N-NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} \text{MES} \cdot \text{h}^{-1}$.

La vitesse de consommation du carbone varie en fonction de l'AGV testé : elle est la plus lente avec l'acétate ($18,5 \text{ mg C} \cdot \text{g}^{-1} \text{MES} \cdot \text{h}^{-1}$). Le propionate et le butyrate sont consommés à la même vitesse soit $28 \text{ mg C} \cdot \text{g}^{-1} \text{MES} \cdot \text{h}^{-1}$. Lorsque la source de carbone est le valérate, la vitesse initiale, calculée à partir des deux premiers points de l'expérience, est la plus élevée et est égale à $44,2 \text{ mg C} \cdot \text{g}^{-1} \text{MES} \cdot \text{h}^{-1}$. Cependant, une rupture de pente apparaît au temps 100 minutes, la vitesse moyenne calculée à partir de ce temps est alors égale à $22,4 \text{ mg C} \cdot \text{g}^{-1} \text{MES} \cdot \text{h}^{-1}$.

Les vitesses de réduction des nitrates sont identiques quel que soit l'AGV considéré, ceci signifie (si l'on admet que les nitrates sont réduits jusqu'au même oxyde gazeux azoté : N₂) que le flux d'électrons acceptés par les nitrates est le même. Ceci tend à impliquer que le flux initial, *i.e.* le flux d'électrons donnés par le carbone, devrait aussi être le même. Vu les états d'oxydation moyen du carbone de chaque AGV (0 : acétate ; -0,67 : propionate ; -1 : butyrate ; -1,2 : valérate), il faudrait que les vitesses de consommation des AGV soient classées comme suit : $V_{ac} > V_{pr} > V_{bu} > V_{va}$. Or les vitesses de consommation des donneurs d'électrons ne suivent pas du tout cet ordre. Les vitesses de consommation du carbone calculées (Tableau 4-14) nécessitent une compensation en biomasse, avec une production de biomasse maximale pour le valérate, puis décroissant pour le

butyrate, le propionate et enfin l'acétate. C'est ce que montre le tableau 4-14, en prenant comme point de départ la densité optique, mesurée à chaque prélèvement, l'ensemble des expériences précédentes ayant montré que $DO_{620} \approx 2,029 \times \text{MES} \text{ (mg} \cdot \text{L}^{-1}\text{)}$.

Alcaligenes denitrificans, comme la population mixte, est capable de consommer les quatre AGV, toutefois à des vitesses globalement 3 fois plus faibles (entre 18 et 28 $\text{mg C} \cdot \text{g}^{-1} \text{MES} \cdot \text{h}^{-1}$ pour les AGV seuls *versus* 60 $\text{mg C} \cdot \text{g}^{-1} \text{MES} \cdot \text{h}^{-1}$ pour le mélange d'AGV en nitrates limitant. Dans les deux cas les nitrates sont réduits en gaz avec une production intermédiaire non stœchiométrique de nitrites, les vitesses de dénitrification étant semblables (17 à 20 $\text{mg N} \cdot \text{g}^{-1} \text{MES} \cdot \text{h}^{-1}$).

4-2-3-2 *Pseudomonas mendocina*

Les figures 4-5 ①, ②, ③ et ④ présentent les évolutions des nitrates, des nitrites et du carbone (AGV testés individuellement) en fonction du temps. Contrairement à la souche précédente, les allures des courbes sont différentes en fonction de l'AGV testé : l'acétate est consommé le plus rapidement, et est le seul AGV parmi les 4 à permettre une accumulation des nitrites lors de la dénitrification. Les autres AGV sont consommés très lentement (cf. annexe 5).

Au cours des essais le pH augmente mais moins que précédemment (0,2 unités pH).

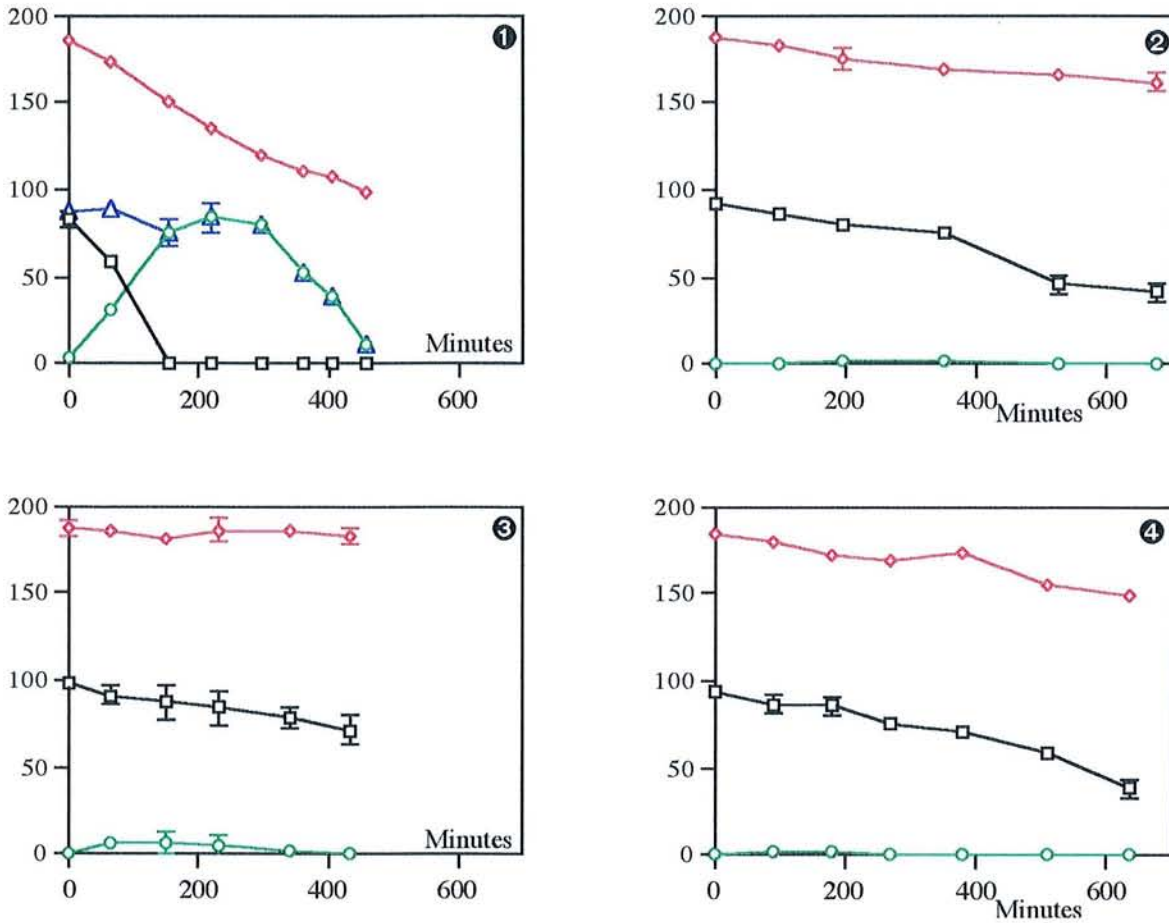
D'après le tableau 4-15, l'acétate constitue la source de carbone préférentiellement consommée (11,5 $\text{mg C} \cdot \text{g}^{-1} \text{MES} \cdot \text{h}^{-1}$), les autres AGV présentant des vitesses beaucoup plus faibles (de 2,6 à 7,5 $\text{mg C} \cdot \text{g}^{-1} \text{MES} \cdot \text{h}^{-1}$). De plus, la culture en milieu acétate est la seule présentant une accumulation transitoire de nitrites. Les nitrates sont tout d'abord réduits en nitrites puis lorsque tous les nitrates ont été consommés, les nitrites, après une phase de latence d'environ 100 minutes, sont à leur tour réduits en oxydes azotés gazeux.

Tableau 4-15 : Vitesses spécifiques ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{MES} \cdot \text{h}^{-1}$) de consommation du carbone, des nitrates, des nitrites, et de production des nitrites et des MES en fonction de l'AGV testé (moyenne de 3 essais).

AGV testé	Carbone (cons)	N-NO ₃ ⁻ (cons)	N-NO ₂ ⁻ (prod)	N-NO ₂ ⁻ (cons)
Acétate	11,5 (1,2)	28,0 (2,1)	23,7 (2,1)	20,0 (2,3)
Propionate	7,5 (2,4)	10,6 (1,7)	≈0	≈0
Butyrate	2,6 (2,3)	4,7 (1,2)	≈0	≈0
Valérate	6,3 (0,3)	9,9 (1,2)	≈0	≈0

Pseudomonas mendocina ne se comporte pas comme la population mixte, qui consomme les quatre AGV à la même vitesse spécifique à 60 $\text{mg C} \cdot \text{g}^{-1} \text{MES} \cdot \text{h}^{-1}$ en condition nitrates limitant. En effet, le propionate, le butyrate et le valérate sont consommés beaucoup plus lentement. Fort logiquement, les vitesses de réduction des nitrates sont elles aussi moins élevées (cf tableau 4-15). Il semble donc que ces AGV ne constituent pas les sources de carbone préférentiellement utilisées par

Pseudomonas mendocina. Dans le réacteur de dénitrification, l'acétate sera certainement consommé en priorité par cette espèce bactérienne à l'opposé des autres AGV.



Figures 4-5 : Évolutions des concentrations en N-nitrates (—□—), N-nitrites (.....○.....), N-NO_x (----▲----) et Carbone (.....◇.....) en fonction du temps (minutes) avec l'acétate (①), le propionate (②), le butyrate (③) et le valérate (④). Batch, milieu tamponné (pH = 7,2), T = 19 °C ; moyenne de 3 essais avec *Pseudomonas mendocina*

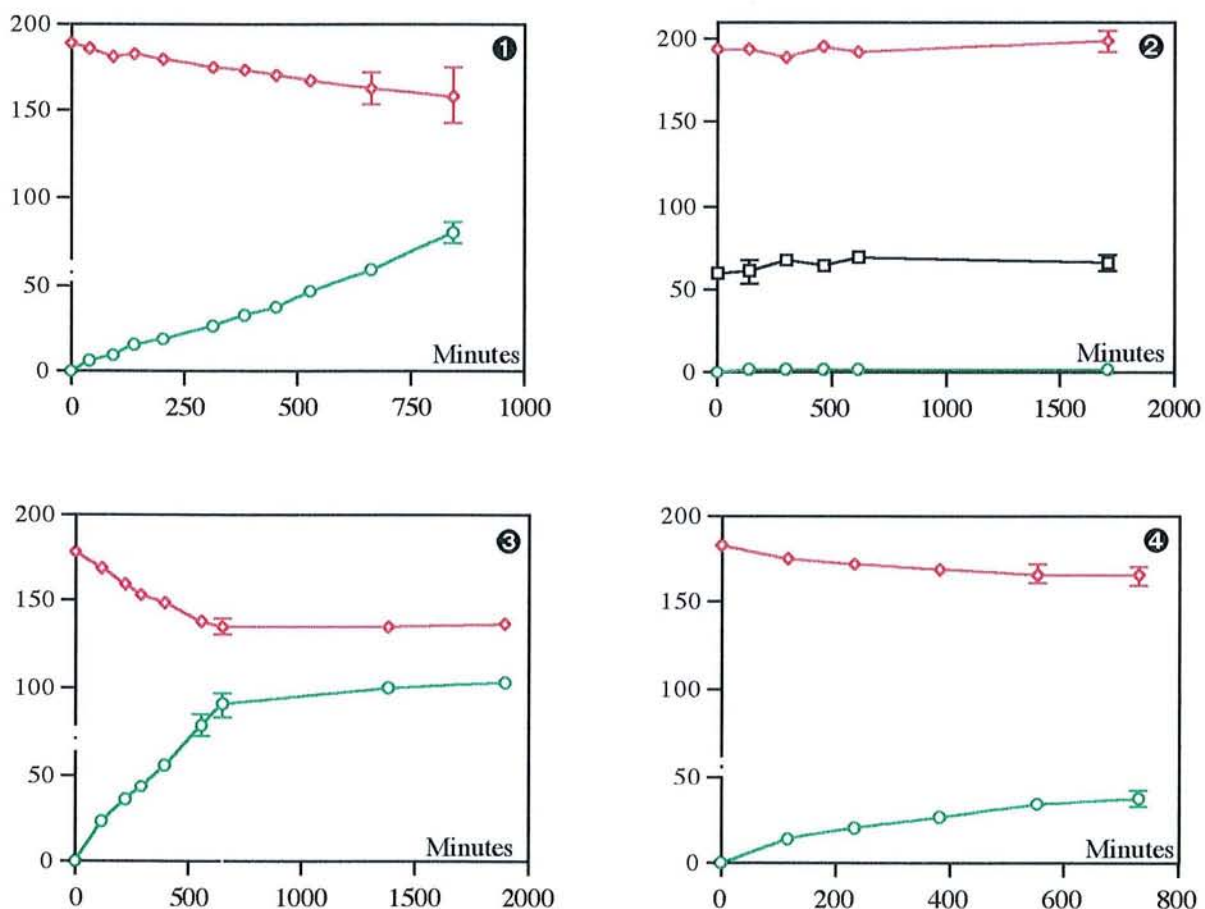
4-2-3-3 *Comamonas testosteroni*

Les figures 4-6 ①, ②, ③ et ④ présentent les vitesses de dénitrification et de consommation du carbone pour la souche *Comamonas testosteroni*, les données brutes figurant en annexe 5.

Il apparaît très clairement que la réduction des nitrates, quand elle a lieu, s'arrête au stade nitrites. En parallèle, le carbone est consommé, ce qui prouve bien qu'il s'agit d'un processus de respiration en anoxie. Ces résultats confirment bien le comportement de cette souche en galerie API. Les expériences sont prolongées jusqu'à 30 h d'incubation (Figures 4-6 ② et ③) pour s'assurer que les nitrites ne sont pas réduits ultérieurement. Au contraire, une faible augmentation du carbone due sans doute à un relargage de composés d'origine bactérienne est observée.

Le pH évolue moins fortement dans le temps en comparaison avec les souches précédentes. Ceci semble en accord avec la littérature puisque la réduction des nitrates en nitrites nécessite deux protons par molécule de nitrates alors que celle des nitrates en azote atmosphérique en demande cinq.

Le tableau 4-16 présente les vitesses spécifiques de consommation des nitrates, des nitrites et du carbone ainsi que les vitesses de production des nitrites. Le butyrate est consommé le plus rapidement ($17,3 \text{ mg C} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{MES} \cdot \text{h}^{-1}$), de même les vitesses de production des nitrites sont les plus élevées ($27,7 \text{ mg N} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{MES} \cdot \text{h}^{-1}$). L'acétate est ensuite consommé plus rapidement que le valérate, respectivement $8,6$ et $4,6 \text{ mg C} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{MES} \cdot \text{h}^{-1}$, et les nitrites sont aussi produits plus rapidement avec l'acétate qu'avec le valérate (respectivement $18,1$ et $9,6 \text{ mg N} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{MES} \cdot \text{h}^{-1}$).



Figures 4-6 : Évolutions des concentrations en N-nitrates (—■—), N-nitrites (---○---) et Carbone (.....●.....) en fonction du temps (minutes) avec l'acétate (①), le propionate (②), le butyrate (③) et le valérate (④). Batch, milieu tamponné (pH = 7,2), T = 19 °C ; moyenne de 3 essais avec *Comamonas testosteroni*.

Le propionate n'est pas consommé de façon significative, après 29 h d'incubation aucune évolution des concentrations en carbone n'est observée, alors qu'une très faible vitesse de production de nitrites est calculée ($0,7 \text{ mg N} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{MES} \cdot \text{h}^{-1}$).

Tableau 4-16 : Vitesses spécifiques ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{MES} \cdot \text{h}^{-1}$) de consommation du carbone, des nitrates, des nitrites, et de production des nitrites et des MES en fonction de l'AGV testé (moyenne de 3 essais).

AGV testé	Carbone (cons)	N-NO ₃ ⁻ (cons)	N-NO ₂ ⁻ (prod)	N-NO ₂ ⁻ (cons)
Acétate	8,6 (2,2)	nd	18,1 (0,6)	≈ 0
Propionate	≈ 0	nd	0,7 (0,1)	≈ 0
Butyrate	17,3 (0,6)	20,0 (5,0)	27,7 (2,3)	≈ 0
Valérate	4,6 (3,0)	nd	9,6 (1,5)	≈ 0

Comamonas testosteroni a donc un comportement totalement différent de la population bactérienne mixte, dans la mesure où cette souche est intrinsèquement incapable de réduire les nitrates au delà du stade nitrites. De fait, les nitrites produits par *Comamonas testosteroni* dans le chemostat sont consommés par d'autres espèces bactériennes, dans la mesure où le résiduel observé en nitrites est faible (cf. chapitre III). De plus, cette souche ne consomme pas du tout le propionate.

4-3 Discussion

Les acides gras volatils (AGV) testés (acétate, propionate, butyrate et valérate) sont des composés carbonés. A ce titre ils peuvent tout à fait servir de source de carbone aux bactéries. Il est possible de trouver dans les 4 volumes du Bergey's manual (1984, 1986, 1988 et 1989) de très nombreuses espèces bactériennes capables de les utiliser comme substrat carboné, soit en milieu simple, soit en milieu complexe. De nombreux auteurs ont étudiés la biodégradation de ces composés sur filtre anaérobie (Gourdon *et al.*, 1989), en lit fluidisé (Heppner *et al.*, 1992), en méthanogénèse (Lin *et al.*, 1986 ; Ozturk, 1991 ; Van Lier *et al.*, 1993). Toutefois ces AGV ont rarement été utilisés comme donneur d'électrons en dénitrification. Les travaux de Paul *et al.* (1989), Paul et Beauchamp (1989), Beauchamp et Dorland (1991), Audic et Blanc (1987) ont permis de prouver que ces AGV seuls ou en mélange avec d'autres substrats carbonés permettaient à des bactéries du sol ou de boues activées de dénitrifier. Paul *et al.* (1989) ont montré que l'acétate, le propionate et le butyrate testés séparément sur des sols permettaient de dénitrifier ; les quantités d'oxyde nitreux (N₂O, obtenu par la technique de blocage à l'acétylène) étaient maximales avec le butyrate, puis décroissaient avec le propionate puis avec l'acétate, après 216 heures d'incubation à 22 °C. Cependant, après 72 heures d'incubation les quantités de N₂O produites sont maximales avec l'acétate, puis diminuent avec le butyrate puis avec le propionate.

Audic et blanc (1987) ont montré que les vitesses de consommation des nitrates ($0,86 \text{ mg N-NO}_3^- \cdot \text{g}^{-1} \text{MES} \cdot \text{h}^{-1}$) étaient égales quel que soit l'AGV testé (acétate, propionate, butyrate et acétate + propionate), confirmant ainsi nos propres résultats avec l'acétate et le butyrate. Par contre, Kavanaugh et Randall (1993) trouvent moins de bactéries viables sur milieu propionate que sur milieux acétate et butyrate. Cette constatation peut éventuellement expliquer pourquoi nos vitesses spécifiques de consommation du propionate sont faibles : s'il y a peu de bactéries viables dans la

population, les quantités dégradées par unité de temps sont faibles et la vitesse spécifique calculée est donc peu élevée.

Nos essais, toutes conditions expérimentales confondues, démontrent sans ambiguïté que les vitesses de consommation de l'acétate, du butyrate et du valérate sont équivalentes entre elles, à la fois en conditions carbone limitant et nitrate limitant. Dans le même temps, il apparaît que les vitesses de dénitrification sont elles aussi identiques. D'après McCarty (1969), le flux d'électrons disponibles (*i.e.* le flux d'énergie) se répartit d'une part vers la synthèse cellulaire, et d'autre part vers la production d'énergie pour la cellule. Dans la mesure où : (i) le valérate (état d'oxydation : -1,2) est potentiellement plus "énergétique" que le butyrate (-1) et l'acétate (0), et (ii) la part vers la production d'énergie est la même quel que soit l'AGV, le flux d'électrons vers la synthèse cellulaire doit être valérate > butyrate > acétate. C'est ce qui observé dans le tableau 4-14 avec *Alcaligenes denitrificans*. Par contre, Paul *et al.* (1989) montrent effectivement que les quantités d'oxyde nitreux produites (donc équivalentes à celles de nitrates consommées car il n'y a pas de nitrites accumulés) sont maximales avec le butyrate et diminuent avec le propionate puis l'acétate.

De nombreux auteurs ont calculés des vitesses de dénitrification, variables en fonction des conditions expérimentales (pH, température, mode de culture, substrat carboné...). Le tableau en annexe 8 regroupe leurs résultats, en présentant les vitesses de consommation des nitrates, souvent assimilables à des vitesses de dénitrification dans la mesure où il n'y a pas (ou peu) de nitrites accumulés.

A part quelques exceptions (Bode *et al.*, 1987 ; Claus et Kützner, 1985 ; Dawson et Murphy, 1972) qui correspondent à des caractéristiques bien particulières (vitesses maximales, bactéries thermophiles) les vitesses de dénitrification varient de 1 à 60 mg N-NO₃⁻ . g⁻¹ . h⁻¹. Cette variation importante est due à des conditions opératoires différentes d'un auteur à un autre, tant du point de vue du type de culture utilisé (continue, avec ou sans recyclage, biomasse libre ou fixée) que du substrat apporté et des paramètres opératoires (pH, température...). Globalement, les vitesses de dénitrification calculées dans nos expérimentations, 20 mg N-NO₃⁻ . g⁻¹ MES . h⁻¹ sont proches des valeurs de Akunna *et al.* (1993) avec de l'acide acétique (28 mg N-NO₃⁻ . g⁻¹ . h⁻¹), de Dodd et Bone (1975) sur l'acétate (13 à 24 mg N-NO₃⁻ . g⁻¹ cellules . h⁻¹). Ce tableau permet de se rendre compte que les essais de dénitrification avec la matière organique de l'eau usée, au préalable hydrolysée, est un sujet d'actualité. Henze et Harremoës (1990) testent différentes techniques d'hydrolyse de la matière organique. Ils comparent les vitesses de dénitrification obtenues soit avec des boues hydrolysées, soit à l'acide acétique, soit au méthanol. A 20 °C ils obtiennent des résultats très comparables dans les 3 cas, respectivement 5 à 10, 10 et 10 mg N-NO₃⁻ . g⁻¹ VSS . h⁻¹.

Enfin, le paramètre adaptation des populations bactériennes à la source de carbone doit être pris en compte, dans la mesure où une population mixte peu adaptée aux AGV réduits d'abord les nitrates en nitrites, et seulement une fois que tous les nitrates ont disparus les nitrites commencent à être réduits à leur tour. De même, un réacteur chemostat peut mettre largement plus de 5 fois le

TRH pour que les populations bactériennes mises en jeu présentent des vitesses spécifiques de consommation du substrat identiques à quelques jours d'intervalle. Ceci peut être expliqué par une augmentation du nombre de dégradeurs spécifiques.

4-4 Conclusions

Ce chapitre avait pour but de présenter les vitesses de dénitrification et de consommation de carbone avec 4 AGV testés soit individuellement, soit en mélange. Les vitesses spécifiques sont variables en fonction des conditions expérimentales appliquées, mais il ressort systématiquement lors de l'utilisation d'une population bactérienne mixte :

(i) l'acétate, le butyrate et le valérate sont consommés à la même vitesse : $45 \text{ à } 60 \text{ mg C} \cdot \text{g}^{-1} \text{ MES} \cdot \text{h}^{-1}$, selon l'élément limitant (carbone ou nitrates) ;

(ii) les nitrates sont consommés à la même vitesse quel que soit l'AGV (acétate, butyrate ou valérate) : $23 \text{ à } 30 \text{ mg N-NO}_3^- \cdot \text{g}^{-1} \text{ MES} \cdot \text{h}^{-1}$, les vitesses de dénitrification étant de $19 \text{ mg N-NO}_x \cdot \text{g}^{-1} \text{ MES} \cdot \text{h}^{-1}$;

(iii) des nitrites sont accumulés, soit de façon stœchiométrique (en conditions carbone limitant), soit en partie (en conditions nitrate limitant). Les vitesses de réduction des nitrites en gaz (environ $26 \text{ mg N-NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} \text{ MES} \cdot \text{h}^{-1}$) sont équivalentes aux vitesses de réduction des nitrates en nitrites ;

(iv) les vitesses de consommation des AGV et de dénitrification étant les mêmes, il faut donc faire l'hypothèse que la production de biomasse est maximale avec le valérate, puis diminue avec le butyrate et avec l'acétate ;

(v) le propionate est consommé beaucoup plus lentement que les autres AGV : $7,8 \text{ mg C} \cdot \text{g}^{-1} \text{ MES} \cdot \text{h}^{-1}$. Cette faible vitesse spécifique permet néanmoins au propionate d'être consommé lorsqu'il est en mélange avec les autres AGV. La vitesse de dénitrification est de $3 \text{ mg N-NO}_x \cdot \text{g}^{-1} \text{ MES} \cdot \text{h}^{-1}$.

La population mixte parfaitement adaptée à un mélange d'AGV comporte différents acteurs. Parmi ceux-ci, *Alcaligenes denitrificans*, *Pseudomonas mendocina* et *Comamonas testosteroni* ont été isolés, et les vitesses de dénitrification et de consommation de carbone avec les 4 AGV testés individuellement ont été calculées. Il ressort que :

(a) la souche majoritaire, *Alcaligenes denitrificans*, est capable de consommer les 4 AGV, entre $18 \text{ et } 28 \text{ mg C} \cdot \text{g}^{-1} \text{ MES} \cdot \text{h}^{-1}$. Cette souche dénitrifie à $18 \text{ mg N-NO}_x \cdot \text{g}^{-1} \text{ MES} \cdot \text{h}^{-1}$, et accumule les nitrites ($5 \text{ mg N-NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} \text{ MES} \cdot \text{h}^{-1}$) uniquement avec l'acétate ;

(b) *Pseudomonas mendocina* consomme préférentiellement l'acétate ($11,5 \text{ mg C} \cdot \text{g}^{-1} \text{ MES} \cdot \text{h}^{-1}$) et quasiment pas le butyrate. Les nitrates sont réduits stœchiométriquement en nitrites

uniquement avec l'acétate, les autres AGV ne provoquant pas (ou peu) de production mesurable de nitrites ;

(c) *Comamonas testosteroni* consomme préférentiellement le butyrate ($17 \text{ mg C} \cdot \text{g}^{-1} \text{ MES} \cdot \text{h}^{-1}$) et pas du tout le propionate. Cette souche est incapable de réduire les nitrates au delà du stade nitrites, quel que soit l'AGV considéré.

Ainsi, des souches bactériennes ayant subi une pression de sélection identique (car issues du même réacteur de dénitrification) pendant au moins 6 mois conservent leurs propriétés intrinsèques.

ANNEXES

Annexe 1 : Concentrations en carbone ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) lors des essais batch réalisés en carbone limitant en fonction du temps (heure) sur une biomasse bactérienne adaptée aux AGV. Trois concentrations différentes (100, 200 et $300 \text{ mg C} \cdot \text{L}^{-1}$) d'un mélange de 4 AGV sont testées lors de 4 essais.

Temps (h)	Essai 1 (J41)			Essai 2 (J66)			Essai 3 (J109)			Essai 4 (J110)		
	100	200	300	100	200	300	100	200	300	100	200	300
0,0	88,4	185,8	270,8	148,3	252,4	332,5	143,0	245,2	350,2	129,6	226,8	323,0
0,5	98,1	171,6	250,8	136,4	235,2	330,3	109,3	219,6	319,0	105,2	195,2	274,2
1,0	84,0	153,2	230,2	123,4	222,6	306,7	91,2	186,3	288,6	71,5	171,8	251,6
1,5	74,4	145,1	224,4	115,7	222,8	301,7	76,0	162,6	269,6	55,4	151,0	216,0
2,0	52,8	126,5	213,1	102,2	211,5	297,2	59,7	142,3	229,6	53,6	127,1	194,6
2,5	48,6	104,3	190,0	86,6	194,5	282,3	68,9	116,1	197,4	64,1	90,8	155,5
3,0	42,7	95,5	177,0	71,0	190,4	269,3	63,3	95,8	184,2	68,9	83,7	131,8
3,5	47,7	87,7	166,2	65,5	178,5	259,0	68,1	76,1	148,1	58,8	60,8	113,7
4,0	45,8	73,1	137,7	62,0	170,0	253,0	58,6	74,3	132,1	62,6	97,6	96,7
4,5	56,3	71,8	130,7	69,0	163,0	246,4	58,3	80,6	104,9	61,1	65,3	78,4
5,0				46,2	146,6	233,9	59,0	69,3	73,4	62,0	60,2	82,8
5,5							62,5	64,2	65,7	54,0	74,3	66,6
6,0	46,7	39,2	95,8	48,8	130,2	218,5	66,2	65,7	74,9	48,8	59,3	56,9
6,5							77,8	74,8	79,2	61,2	60,9	47,0
7,0				63,3	144,0	203,2	97,3	95,5	122,6	90,0	74,5	64,3

Annexe 2 : Concentrations en carbone ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) lors des essais batch réalisés en carbone limitant en fonction du temps (heure) sur une biomasse bactérienne adaptée aux AGV. Quatre acides gras volatils à la même concentration ($200 \text{ mg C} \cdot \text{L}^{-1}$) ont été testées indépendamment les uns des autres lors de 6 essais.

Essai 1, réalisé à J45

Temps	Acétate	Propionate	Butyrate	Valérate
0,0	205,0	212,2	206,1	215,5
0,5	192,1	201,2	198,0	208,6
1,0	180,9	189,8	192,0	202,7
1,5	171,6	184,4	188,0	196,2
2,0	168,0	175,1	178,0	189,2
2,5	160,7	169,6	172,7	182,3
3,0	156,3	161,5	166,3	175,1
3,5	146,0	157,6	163,2	172,2
4,0	141,1	146,4	154,4	163,0
4,5	133,7	140,7	146,4	157,7
5,0	128,4	135,1	143,6	151,2
5,5	119,8	127,0	140,3	147,5
6,0	118,4	125,6	133,9	146,0
6,5	115,3	119,9	127,2	135,1
7,0	107,6	110,2	119,8	126,0

Essai 2, réalisé à J47

Temps	Acétate	Propionate	Butyrate	Valérate
0,0	184,0	193,5	186,6	197,3
0,5	169,4	186,5	177,5	179,2
1,0	156,7	179,0	169,9	181,6
1,5	152,3	165,1	158,5	170,1
2,0	147,0	158,3	149,1	163,0
2,5	137,8	150,2	141,8	153,4
3,0	130,0	135,3	137,5	147,6
3,5	124,9	127,6	119,3	135,8
4,0	116,8	122,4	109,8	128,5
4,5	110,1	114,5	103,0	117,9
5,0				
5,5	101,3	100,4	88,3	104,9
6,0	91,0	90,7	77,9	96,5
6,5	83,8	86,7	73,1	93,3
7,0	76,0	78,4	62,5	83,0

Essai 3, réalisé à J62

Temps	Acétate	Propionate	Butyrate	Valérate
0,0	204,1	215,6	208,0	214,2
0,5	203,1	214,0	193,9	200,3
1,0	189,4	192,5	186,0	180,0
1,5	179,5	188,3	175,8	181,7
2,0	168,1	182,0	168,2	173,2
2,5	161,2	166,5	155,6	
3,0		160,2	152,9	149,1
3,5	141,7	152,3	147,3	144,0
4,0				
4,5			131,1	128,8
5,0	118,4	114,3	114,8	123,8
5,5	104,0	103,7	105,3	118,2
6,0	101,7	91,3	95,3	106,2
6,5	90,0	87,7	92,5	93,5
7,0	119,3	92,3	101,7	109,4

Essai 4, réalisé à J95

Temps	AGV	N-NO ₃ ⁻	ET	N-NO ₂ ⁻	ET	C	ET	pH
0	Ac	696,1	20,6	1,6	0,1	284,3	4,7	6,9
0	Pr	679,0	17,6	1,4	0,0	280,2	3,1	6,95
0	Bu	702,6	23,9	1,3	0,1	274,6	11,9	7,1
0	Va	721,0	26,8	1,8	0,1	293,4	4,8	7,14
1,5	Ac	692,8	123,7	42,1	22,8	259,9	6,1	8,87
1,5	Pr	652,8	42,9	35,2	7,8	281,7	8,1	8,51
1,5	Bu	665,5	62,1	28,4	9,9	0,0	0,0	8,82
1,5	Va	620,9	25,9	69,6	4,8	285,7	7,8	9,03
3	Ac	654,3	29,6	57,8	15,6	232,2	12,2	9,28
3	Pr	620,9	2,0	58,8	3,9	275,8	4,2	8,86
3	Bu	646,8	42,1	67,3	21,7	238,7	0,7	9,18
3	Va	656,2	30,3	60,3	25,8	242,0	1,1	9,35
5	Ac	603,9	48,6	85,3	31,1	226,1	12,3	9,46
5	Pr	565,4	35,2	81,3	25,3	219,8	2,8	9
5	Bu	618,1	40,8	78,3	17,7	227,7	0,7	9,37
5	Va	608,1	23,7	102,5	7,4	239,7	2,7	9,51
6,5	Ac	576,1	11,6	111,3	7,9	214,7	6,6	9,54
6,5	Pr	629,5	33,2	79,8	21,8	223,2	9,9	9,07
6,5	Bu	600,8	72,1	110,9	28,4	219,2	3,1	9,46
6,5	Va	607,0	2,1	120,7	7,4	224,7	0,4	9,6
8	Ac	547,7	7,6	111,4	13,0	165,5	4,2	9,59
8	Pr	544,9	31,0	117,9	5,3	206,0	3,1	9,38
8	Bu	557,1	24,2	118,6	22,5	179,8	2,7	9,51
8	Va	525,9	19,7	152,8	2,1	205,5	2,7	9,64
24	Ac	456,2	26,6	266,6	2,0	125,7	0,5	9,75
24	Pr	449,8	37,0	268,7	26,0	166,6	6,0	9,74
24	Bu	493,5	40,0	264,7	27,0	164,1	6,9	9,7
24	Va	439,0	0,2	285,2	6,0	127,5	5,3	9,88
30	Ac	476,1	30,3	288,2	17,4	157,0	18,5	9,83
30	Pr	435,8	47,4	278,5	29,0	120,7	6,6	9,74
30	Bu	459,5	22,6	286,5	26,6	147,0	7,3	9,82
30	Va	443,9	1,0	319,3	7,5	141,1	5,0	9,96
54	Ac	334,3	51,8	407,0	1,9	125,7	12,9	9,98
54	Pr	342,1	19,1	343,5	24,3	121,0	8,9	9,65
54	Bu	325,0	96,9	383,9	16,1	119,9	5,0	9,99
54	Va	452,6	42,3	371,3	31,7	137,7	1,6	10,11

Essai 5, réalisé à J108

Temps	Acétate	Propionate	Butyrate	Valérate
0,0	216,0	213,6	215,4	224,4
0,5	205,4	214,8	204,4	219,4
1,0	186,6	209,8	194,5	210,9
1,5	166,9	202,2	179,9	200,7
2,0	152,9	185,4	168,7	180,1
2,5	134,2	176,8	156,6	163,9
3,0	125,6	174,4	149,5	148,6
3,5	109,8	152,8	133,2	130,1
4,0	89,9	140,9	115,9	113,7
4,5	75,7	125,6	106,9	96,7
5,0	91,2	112,1	92,3	80,5
5,5	74,7	91,4	81,5	75,4
6,0	73,6	78,2	76,7	72,5
6,5	67,9	75,2	62,5	64,3
7,0	71,3	74,4	66,8	68,4

Essai 6, réalisé à J111

Temps	AGV	N-NO ₃ ⁻	ET	N-NO ₂ ⁻	ET	C	ET
0	Ac	777,3	33,2	0,9	0,0	226,3	1,8
0	Pr	732,2	24,9	1,0	0,3	229,9	10,6
0	Bu	744,2	31,4	0,6	0,0	231,1	8,9
0	Va	809,8	22,8	0,9	0,1	242,5	25,0
1,5	Ac	711,5	37,3	56,6	8,8	167,8	7,2
1,5	Pr	700,3	20,2	42,6	16,3	191,4	0,9
1,5	Bu	712,8	21,5	42,1	2,0	210,7	7,5
1,5	Va	748,3	14,9	45,3	21,0	180,8	1,5
3	Ac	687,1	8,1	101,1	1,4	115,0	2,4
3	Pr	675,3	43,2	84,0	6,2	153,5	1,0
3	Bu	700,4	8,8	68,9	13,3	146,8	6,0
3	Va	735,2	26,3	96,8	7,6	174,9	7,3
4	Ac	667,2	0,5	110,0	3,5	85,7	1,5
4	Pr	648,7	43,1	103,1	12,1	106,0	0,0
4	Bu	668,7	15,1	86,9	17,4	112,2	0,8
4	Va	708,5	18,6	129,4	15,0	126,0	4,4
6	Ac	626,7	4,6	117,8	1,2	78,5	2,3
6	Pr	650,5	11,8	127,2	9,0	98,4	2,3
6	Bu	677,5	11,8	123,9	4,6	100,1	0,0
6	Va	678,4	13,6	141,8	4,5	95,0	2,8
7,5	Ac	614,8	28,4	129,0	19,6	89,9	0,2
7,5	Pr	608,1	11,9	139,3	4,3	94,9	7,2
7,5	Bu	647,6	31,4	139,6	15,3	95,9	1,4
7,5	Va	667,7	63,0	164,5	27,5	119,7	0,9
24,5	Ac	583,9	20,2	192,0	14,7	79,0	2,0
24,5	Pr	536,7	6,9	148,8	3,9	83,9	1,2
24,5	Bu	621,3	13,1	178,4	0,8	87,0	0,0
24,5	Va	624,2	36,4	234,7	7,4	91,1	1,6
30	Ac	549,8	21,4	218,0	13,0	95,6	2,7
30	Pr	534,9	0,8	154,4	9,7	95,1	1,2
30	Bu	609,5	3,0	196,9	10,0	111,7	5,7
30	Va	576,4	63,8	240,3	12,0	100,7	2,6

Annexe 3 : Concentrations (mg . L⁻¹) en carbone, N-nitrates et N-nitrites lors des essais batch réalisés en nitrate limitant en fonction du temps (heure). Quatre acides gras volatils à la même concentration (200 mg C . L⁻¹) ont été testées indépendamment les uns des autres lors de 4 essais.

Acétate, essai à J82

Temps	N-NO ₃ ⁻	ET	N-NO ₂ ⁻	ET	C-	ET
0	51,2398	2,8	3,1	0,0	194,5	1,1
1	21,2197	0,3	8,7	0,1	136,6	1,6
2	-2,7883	1,9	20,7	0,6	89,1	1,6
3	1,33477	0,8	0,3	0,0	74,1	0,4

Acétate, essai à J90

Temps	N-NO ₃ ⁻	ET	N-NO ₂ ⁻	ET	C-	ET
0	80,2923	1,6	3,1	0,0	204,0	1,9
1	62,496	1,8	5,1	0,3	144,6	0,3
2	39,4275	1,8	8,5	0,1	96,7	0,1
3	15,037	2,5	18,4	0,9	69,6	1,2
4	-3,604	2,0	13,6	0,5		
5			2,3	0,1	14,9	0,2

Acétate, 2 essais à J129

Temps	N-NO ₃ ⁻		N-NO ₂ ⁻		C	
0	89,45	80,21	1,83	2,10	222,60	233,00
0,5	80,27	68,34	6,45	7,00	195,00	210,60
1	65,23	54,18	8,30	13,10	170,20	180,70
1,5	50,26	41,59	17,30	20,40	145,70	160,90
2	41,55	30,76	17,50	22,30	127,40	145,30
3	17,10	7,17	25,45	31,00	104,80	105,90
4			27,85	23,00	93,40	81,07
5			11,02	8,31	83,20	68,70

Propionate, essai à J83

Temps	N-NO ₃ ⁻	ET	N-NO ₂ ⁻	ET	C-	ET
0	37,4861	2,1	0,3	0,0	202,3	2,2
1	32,3478	2,2	3,5	0,1	196,8	0,1
2	17,5963	0,2	9,4	0,2	184,4	0,7
3	-1,1087	0,6	14,2	0,8	170,9	0,6
4	2,69925	2,3	10,3	8,9	165,5	0,5
5,5			4,1	3,6		
6,5			0,4	0,0	152,3	-

Propionate, essai à J89

Temps	N-NO ₃ ⁻	ET	N-NO ₂ ⁻	ET	C-	ET
0	90,5792	3,1	0,5	0,0	221,4	1,9
1	80,0307	1,9	1,2	0,0	215,7	2,7
2	79,8342	1,6	3,8	0,0	205,4	0,8
3	79,965	3,7	4,1	0,1	204,1	3,1
5,33	77,4287	1,9	5,4	0,1	190,2	

Propionate, essai à J97

Temps	N-NO ₃ ⁻	ET	N-NO ₂ ⁻	ET	C-	ET
0	80,2418	3,1	1,4	0,0	201,6	13,2
1	78,4582	1,4	2,2	0,1	202,7	0,8
2	74,5775	2,2	2,6	0,0	193,6	0,2
3,5	72,8195	2,0	2,5	0,0	187,0	0,5

Propionate, essai à J104

Temps	N-NO ₃ ⁻	ET	N-NO ₂ ⁻	ET	C-	ET
0	79,465	0,3	0,2	0,0	199,2	1,0
1	79,0009	0,9	0,3	0,0	178,7	1,6
2		0,0		0,0	171,2	1,1
3		0,0		0,0	167,4	2,2
4					173,6	1,2
5	70,708	2,3	0,4		173,1	4,2

Butyrate, essai à J84

Temps	N-NO ₃ ⁻	ET	N-NO ₂ ⁻	ET	C-	ET
0	60,6072	0,5	9,3	0,1	194,9	1,3
1	37,0643	0,7	21,1	0,4	160,1	2,7
2	5,09933	9,1	37,8	4,8	101,1	0,9
3	2,13933	1,2	28,1	0,9	71,5	5,3
4			15,7	0,2	43,6	
5			0,3	0,3	0,0	0,0

Butyrate, 2 essais à J130

Temps	N-NO ₃ ⁻		N-NO ₂ ⁻		C	
0	91,12	80,41	4,65	5,03	228,60	223,20
0,5	79,42	69,19	8,95	6,10	195,00	196,50
1	69,25	59,16	12,95	7,55	169,80	171,30
1,5	58,36	46,71	14,80	9,35	140,80	146,70
2		37,57		10,10		124,30
3		18,22		10,30		100,20
4		-0,98		7,48		103,10

Butyrate, essai à J132

Temps	N-NO ₃ ⁻	ET	N-NO ₂ ⁻	ET	C-	ET
0	82,86		7,55		194,00	
0,5	70,46		4,91			
1	58,40		11,60		132,50	
1,5	38,58		20,80		105,50	
2	26,29		21,30		75,03	
3	0,06		27,30		54,55	
4			6,00		49,90	

Valérate, essai à J88

Temps	N-NO ₃ ⁻	ET	N-NO ₂ ⁻	ET	C-	ET
0	78,2513	1,8	3,6	0,0	188,2	0,1
1	50,9143	1,8	12,7	0,2	138,5	7,5
2	19,2927	0,8	28,3	0,6	88,6	5,4
3	3,51133	1,5	29,9	0,6	51,7	0,5
4	-2,4617	1,6	18,2	0,2	33,9	
5	-1,869	0,0	1,1	0,0	24,1	2,7

Valérate, 2 essais à J131

Temps	N-NO ₃ ⁻		N-NO ₂ ⁻		C	
0	70,78	69,30	5,80	6,35	205,70	203,00
0,58	51,45	65,95	10,70	13,20	177,30	168,60
1	42,38	42,92	17,40	21,00	157,90	144,40
1,5	30,57	29,50	21,90	22,50	132,10	124,50
2	14,84	17,07	28,80	29,40	120,90	114,80
2,5	7,99	8,72	27,90	27,60	108,70	106,90
3			30,90	28,60	95,40	99,56
4			15,03	14,93	85,10	93,20

Valérate, essai à J132

Temps	N-NO ₃ ⁻	ET	N-NO ₂ ⁻	ET	C-	ET
0	83,43		7,63		192,70	
0,5	67,84		10,20			
1	53,40		15,00		136,60	
1,5	36,82		21,00		104,40	
2	24,46		22,10		82,90	
3	0,54		26,10		53,20	
4			7,75		41,20	

Mélange, essai à J81

Temps	N-NO ₃ ⁻	ET	N-NO ₂ ⁻	ET	C-	ET
0	61,3415	6,1	4,7	0,0	196,4	1,4
1	38,1635	2,8	11,4	0,2	131,0	3,0
2	0,078	1,5	29,1	0,8	77,0	0,1
3	4,443	1,3	11,9	0,2	48,2	0,1
4	-0,4462	0,4	0,4	0,0	37,8	

Mélange, essai à J104

Temps	N-NO ₃ ⁻	ET	N-NO ₂ ⁻	ET	C-	ET
0	73,5895	1,6	7,2	0,6	199,5	0,4
1	47,6085	1,0	22,4	0,2	184,1	0,5
2	19,93	0,5	36,5	1,0	139,8	0,0
3	3,967	2,9	39,9	0,6	105,3	0,1
4			34,0	0,4	89,1	
5			20,2	0,7	75,0	0,4
6			6,9	0,0	68,1	1,0

Mélange, 2 essais à J126

Temps	N-NO ₃ ⁻		N-NO ₂ ⁻		C	
0	87,79	81,55	3,04	2,61	233,90	225,70
0,62	71,03	63,51	10,80	12,75	196,30	193,00
1	60,49	52,15	15,20	20,70	173,70	175,50
1,5	48,96	40,65	23,00	21,60		
2	34,14	25,11	26,30	29,60	135,70	135,10
2,75	14,03	7,31	29,90	30,50	114,40	116,10
3,5	1,30		27,95	21,30	108,30	95,10
4,25			20,25	8,92	80,90	86,50
5			9,73	1,68	81,90	78,90

Annexe 4 : Évolution des concentrations (mg . L⁻¹) en carbone, nitrates et nitrites en fonction du temps (heures) lors d'une culture batchensemencée avec une population bactérienne peu adaptée à un mélange d'AGV.

Temps	N-NO ₃ ⁻	ET	N-NO ₂ ⁻	ET	C	ET
0	95,5	0,9	6,3	0,1	141,1	1,6
1	72,3	4,5	26,7	0,2	118,4	1,1
2	42,5	6,3	54,6	0,6	105,9	2,3
3	19,9	5,1	85,5	1,0	74,6	0,3
4	-1,9	13,7	94,2	2,0	69,2	0,0
5	5,4	17,4	91,1	1,7	65,6	0,5
6	-5,0	12,1	82,4	2,5	50,4	-
7	-3,3	9,8	73,8	1,8	54,6	2,5
8	-6,7	8,4	70,3	2,2	47,0	0,0
9			63,3	3,3	44,7	0,4
10			53,8	0,3	42,6	2,3
11			50,1	0,6	29,0	1,9
12			43,9	0,6	29,3	0,3
13			39,8	0,4	22,1	2,6
14			36,4	2,3	19,9	2,3
15			29,9	0,3		
17			21,2	1,2	17,1	2,7
25,75			6,3	0,1	21,5	0,2
32,3			4,1	0,0	23,5	0,5

Annexe 5 : Évolution des concentrations (mg . L⁻¹) en N-nitrates, N-nitrites et carbone au cours du temps pour la souche *Alcaligenes denitrificans*.

Acétate

Temps (min)	Nitrates		Nitrites		Carbone	
	moy	ET	moy	ET	moy	ET
0	78,37	2,41	1,52	0,10	212,44	5,71
90	79,60	3,01	0	0,00	206,27	5,19
195	72,06	2,59	0,23	0,05	193,59	5,74
270	64,51	2,64	0,45	0,09	181,17	6,11
350	59,24	5,97	3,06	1,76	158,67	7,06
450	36,65	2,58	9,25	2,47	143,39	7,18
560	25,59	6,25	12,42	3,57	129,53	7,98
630	7,7	5,14	17,71	4,63	116,20	5,50
720	-3,08	1,04	11,71	4,14	96,18	6,98

MES : essai 1 = 0,570 g . L⁻¹ ; essai 2 = 0,570 g . L⁻¹ ; essai 3 = 0,580 g . L⁻¹

Propionate

temps (min)	Nitrates		Nitrites		Carbone	
	moy	ET	moy	ET	moy	ET
0	86,29	2,17	0,45	0,04	200,63	4,37
75	73,59	1,41	0,38	0,13	179,57	3,92
145	66,74	1,95	0,38	0,01	163,23	1,65
225	53,25	2,14	0,94	0,29	142,97	2,16
305	37,42	2,17	1,65	0,53	128,21	2,71
385	24,11	3,09	2,54	1,58	119,09	2,61
530	13,12	5,23	1,06	0,33	108,21	3,14

MES : essai 1 = 0,580 g . L⁻¹ ; essai 2 = 0,560 g . L⁻¹ ; essai 3 = 0,520 g . L⁻¹

Butyrate

Temps (min)	Nitrates		Nitrites		Carbone	
	moy	ET	moy	ET	moy	ET
0	95,14	10,20	0,40	0,05	197,21	2,50
95	82,42	6,11	0,25	0,18	182,97	7,72
175	71,71	4,27	0,23	0,06	161,30	3,29
260	61,44	1,45	0,72	0,25	146,27	2,77
350	54,99	3,10	2,25	0,59	124,85	3,31
435	49,11	6,94	1,29	0,77	116,28	2,08
570	29,69	4,20	1,51	0,78	101,11	4,74
660	13,44	7,19	5,68	1,91	86,38	5,38
765	-1,07	1,85	1,45	2,51	66,17	4,05

MES : essai 1 = 0,460 g . L⁻¹ ; essai 2 = 0,450 g . L⁻¹ ; essai 3 = 0,440 g . L⁻¹

Valérate

temps (min)	Nitrates		Nitrites		Carbone	
	moy	ET	moy	ET	moy	ET
0	85,08	8,41	0,43	0,07	193,85	3,93
90	66,92	5,43	0,39	0,01	156,03	4,42
195	53,08	1,52	0,28	0,01	128,17	3,84
255	44,88	3,90	0,28	0,06	117,58	3,90
345	32,25	2,99	0,45	0,07	98,66	4,29
420	10,39	7,29	1,45	0,24	84,15	6,92

MES : essai 1 = 0,570 g . L⁻¹ ; essai 2 = 0,570 g . L⁻¹ ; essai 3 = 0,570 g . L⁻¹

Annexe 6 : Évolution des concentrations ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) en nitrates, nitrites et carbone au cours du temps pour la souche *Pseudomonas mendocina*.

Acétate

Temps (min)	Nitrates		Nitrites		Carbone	
	moy	ET	moy	ET	moy	ET
0	83,28	5,17	4,15	0,02	184,95	3,43
65	58,02	3,65	31,09	2,12	172,65	2,82
155	0,31	0,54	75,28	7,89	150,01	3,22
220	0	0	84,08	8,28	135,04	2,27
295	0	0	79,77	2,48	120,50	3,75
360	0	0	52,59	2,31	111,17	1,91
405	0	0	38,42	2,19	106,95	0,31
460	0	0	11,35	1,47	99,19	0,86

MES : essai 1 = $1,13 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; essai 2 = $1,19 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; essai 3 = $1,17 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$

Propionate

temps (min)	Nitrates		Nitrites		Carbone	
	moy	ET	moy	ET	moy	ET
0	92,12	3,38	0,64	0,11	187,37	2,12
100	86,47	3,67	1,46	0,54	182,52	1,08
195	79,45	2,94	2,32	1,17	174,45	6,39
350	76,16	2,67	1,76	1,51	169,45	1,38
525	45,94	5,50	1,36	1,06	165,48	1,42
675	41,87	5,44	0,64	0,47	161,49	5,23

MES : essai 1 = $0,443 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; essai 2 = $0,460 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; essai 3 = $0,513 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$

Butyrate

temps (min)	Nitrates		Nitrites		Carbone	
	moy	ET	moy	ET	moy	ET
0	98,57	3,90	1,38	0,51	187,26	4,64
65	91,22	5,39	7,10	4,30	185,48	3,47
150	87,31	9,90	7,11	5,99	181,34	2,09
230	84,05	9,93	4,86	5,89	186,03	7,20
340	78,50	6,30	2,66	4,29	186,18	3,82
435	71,58	8,58	0,86	1,20	181,80	4,66

MES : essai 1 = $0,760 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; essai 2 = $1,05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; essai 3 = $0,70 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$

Valérate

temps (min)	Nitrates		Nitrites		Carbone	
	moy	ET	moy	ET	moy	ET
0	94,27	2,87	1,05	0,40	184,56	2,43
90	86,69	5,03	2,86	1,78	179,69	2,00
180	85,54	4,75	1,94	1,51	171,09	2,66
270	75,53	1,77	0,93	1,13	168,09	2,36
380	70,85	2,12	1,02	1,33	173,26	4,50
510	59,05	3,92	0,92	1,23	154,29	2,67
635	38,47	5,51	0,78	0,86	148,31	2,93

MES : essai 1 = $0,580 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; essai 2 = $0,510 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; essai 3 = $0,530 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$

Annexe 7 : Évolution des concentrations (mg . L⁻¹) en N-nitrates, N-nitrites et carbone au cours du temps pour la souche *Comamonas testosteroni*.

Acétate

Temps (min)	Nitrates		Nitrites		Carbone	
	moy	ET	moy	ET	moy	ET
0	57,60	5,43	0,21	0,04	188,99	1,71
40	60,31	5,80	7,17	3,36	186,15	3,29
95	67,34	8,90	10,32	0,37	180,42	2,64
140	62,45	6,76	15,54	1,73	181,68	4,21
205	58,36	5,33	18,66	1,60	178,78	1,92
315	59,87	4,50	26,45	1,33	175,54	2,59
385	54,56	2,06	32,11	1,82	173,33	3,12
455	54,41	4,34	37,78	1,54	170,49	3,75
530	51,58	3,94	46,14	2,07	167,53	4,09
660	37,19	2,66	59,33	4,38	162,41	9,35
845			79,98	5,58	158,47	16,29

MES : essai 1 = 0,313 g . L⁻¹ ; essai 2 = 0,340 g . L⁻¹ ; essai 3 = 0,320 g . L⁻¹

propionate

temps (min)	Nitrates		Nitrites		Carbone	
	moy	ET	moy	ET	moy	ET
0	58,80	4,15	0,13	0,01	193,95	4,27
140	60,49	7,13	1,86	0,04	194,25	3,09
310	66,61	2,33	1,90	0,04	188,47	1,46
475	63,73	3,50	2,05	0,16	195,75	1,71
625	68,23	3,59	2,06	0,03	193,03	4,34
1710	65,76	4,82	1,58	0,25	199,11	6,86

MES : essai 1 = 0,243 g . L⁻¹ ; essai 2 = 0,267 g . L⁻¹ ; essai 3 = 0,260 g . L⁻¹

Butyrate

temps (min)	Nitrates		Nitrites		Carbone	
	moy	ET	moy	ET	moy	ET
0	71,35	5,71	0,39	0,14	178,33	1,38
115	53,11	3,04	23,70	1,39	163,35	2,40
220	54,77	2,10	36,24	1,12	160,0	2,49
295	44,45	5,77	43,80	2,03	153,37	1,53
390	41,03	3,19	55,50	3,18	148,50	4,35
560	18,81	10,10	78,48	5,92	138,72	4,47
655	13,90	14,37	90,25	6,93	134,96	5,16
1380			100,58	2,62	134,52	3,10
1890			102,73	3,84	136,80	4,24

MES : essai 1 = 0,280 g . L⁻¹ ; essai 2 = 0,287 g . L⁻¹ ; essai 3 = 0,290 g . L⁻¹

Valérate

temps (min)	Nitrates		Nitrites		Carbone	
	moy	ET	moy	ET	moy	ET
0	55,41	4,91	0,28	0,09	182,44	0,75
115	57,02	5,15	13,99	0,67	174,83	1,41
235	51,41	3,60	20,59	1,15	172,13	1,76
380	50,67	5,67	26,07	1,13	169,11	2,42
555	43,34	3,74	33,86	1,57	166,04	4,99
730	42,06	1,80	37,36	4,64	164,97	5,99

MES : essai 1 = 0,260 g . L⁻¹ ; essai 2 = 0,240 g . L⁻¹ ; essai 3 = 0,263 g . L⁻¹

Annexe 8 : Vitesses de dénitrification ($\text{mg N-NO}_3^- \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) en fonction du donneur d'électrons et du procédé.

0 : non précisé ; 1 : MLSS ; 2 : MES ; 3 : biomasse ; 4 : VSS ; 5 : MLVSS ; 6 : cellules ; 7 : solides totaux. SBR : sequencing batch reactor ; CFID : continuously fed intermittently decanted ; USB : upflow sludge blanket. PHA : poly β hydroxybutyrique acide.

Vitesse		Donneur d'électrons	Auteurs	Procédés
1 à 9	1	Boues primaires	Abufayed et Schröder, 1986	SBR
28		Acide acétique	Akunna <i>et al.</i> , 1993	Batch
28		Acide lactique		
0,6 à 1,5	2	Glucose et acétate de sodium	Argaman, 1986	CFID
0,86	2	AGV (ac pr bu)	Audic et Blanc, 1987	Batch
2 à 28	3	Glucose, citrate de sodium	Beccari <i>et al.</i> , 1983	
417 (V_{\max})	5	Eau usée	Bode <i>et al.</i> , 1987	Chemostat à 62°C
1,3	1	Eau usée	Christensen, 1975	batch à 20°C
1 à 9,5	4	Eau usée	Christensen et Harremoes, 1977	
1 à 25	5	méthanol		
0,1 à 6,5	4	Eau usée		
1 à 7	3	Eau usée	Chudoba, 1991	Culture continue nitrif + dénitrif
176 (v_{\max})	6	Thiosulfate	Claus et Kützner, 1985	Chemostat
12,5	4	Eau usée	Dalentoft, 1991	Culture continue nitrif + dénitrif
13 (5°C) à 160 (27°C)	6	Citrate de sodium	Dawson et Murphy, 1972	Batch à pH = 7
13 à 24	6	Acétate	Dodd et Bone, 1975	Chemostat
7 à 22	5	Méthanol	Francis et Mankin, 1977	Chemostat
0,5 à 13,5	1	Eau usée	Francis et Callahan, 1975	
1 à 15	4	≠	Hansson et Gunnarson, 1990	Batch
8,1 et 9,5	0	PHA	Heinemann et Muller, 1991	Bactéries libres et fixées
5 à 10	4	Eau usée	Henze, 1989	Batch
1 à 10	5	M.O. hydrolysée	Henze et Harremoes, 1990	Culture continue nitrif + dénitrif
5 à 7	5	M.O. hydrolysée	Hoffmann et Klute, 1990	
49,7	3	Propionate et éthanol	Hollo et Czako, 1987	Lit fluidisé
3,5	5		Huang et Draw, 1985	
3,5 à 5,3	4	M.O. hydrolysée	Jorgensen, 1990	Batch
16,7	7	Mélange d'alcools	Klapwijk <i>et al.</i> , 1981	USB
15 à 25	0	Hydrogène (H_2)	Kurt <i>et al.</i> , 1987	Batch
10 à 15	4	Eau usée	Tendaj <i>et al.</i> , 1992	Culture continue nitrif + dénitrif
32		méthanol	Timmermans et Van Haute, 1983	Culture continue

CHAPITRE V :
BILAN ELECTRONS

5-1 Protocole	104
5-1-1 Conditions expérimentales	104
5-1-2 Traitement des résultats pour réaliser le bilan électrons	106
5-1-2-1 Potentiel électrons initial	106
5-1-2-2 Potentiel électrons final	106
5-2 Résultats	107
5-2-2-1 Équivalents électrons initiaux	109
5-2-2-2 Équivalents électrons finaux	110
5-2-2-3 Bilan global	110
5-3 Discussion	112
5-4 Conclusions	113

L'objet de ce travail est de déterminer, parmi les acides acétique, propionique, butyrique et valérique, lequel permet la meilleure efficacité de dénitrification, l'efficacité étant définie à la fois par une vitesse spécifique maximale d'élimination des nitrates et par une production de biomasse minimale. Ces AGV produits lors de la phase d'hydrolyse anaérobie partielle des boues de station d'épuration (Pérot, 1989) peuvent être utilisés comme substitut au méthanol lors de l'étape de dénitrification. Les expériences précédentes ont permis d'obtenir un réacteur chemostat stable, dont la biomasse consomme les AGV testés individuellement (acétate, butyrate et valérate) à la même vitesse, et dénitrifie également à la même vitesse. Ce résultat est surprenant dans la mesure où les états d'oxydation des composés carbonés sont différents (acétate : 0 ; butyrate : -1 ; valérate : -1,2). Pour expliquer ce fait, des expériences visant à mesurer la consommation du carbone et des nitrates, et la production de biomasse ont été réalisées. N'ayant pu mesurer ni le gaz carbonique produit, ni l'azote dégagé, nous avons combiné les mesures effectuées avec des hypothèses de base concernant la production de ces gaz, et avons tenté de boucler le bilan pour vérifier la validité des hypothèses formulées en s'appuyant sur le modèle de McCarty (1969, 1972) : l'utilisation du substrat carboné génère deux flux principaux, le premier dirigé vers la production d'énergie (les électrons sont véhiculés tout au long de la chaîne respiratoire, puis sont acceptés par les nitrates et autres oxydés azotés) et le second vers la production de biomasse. Paul *et al.* (1989) ont prouvé dans leurs expériences que la production d'énergie était maximale avec le butyrate, puis décroissait avec le propionate puis avec l'acétate sans avoir mesuré la production de biomasse. L'objectif de ce chapitre est de comparer la croissance bactérienne (*i.e.* la production de biomasse) et l'efficacité de dénitrification avec les 4 AGV testés séparément, en conditions batch à partir d'inocula bactériens mixtes adaptés à un mélange d'AGV.

5-1 Protocole

5-1-1 Conditions expérimentales

Les inocula bactériens utilisés lors de ces expériences proviennent du réacteur de dénitrification décrit dans le chapitre 3 (Caractérisation des populations dénitrifiantes). Les prélèvements sont réalisés entre J 430 et J 493.

L'expérimentation est réalisée en batch, à température et pH contrôlés (respectivement à 21°C et $7,3 \pm 0,1$). Les caractéristiques du réacteur batch sont fournies dans le tableau 5-1.

Le jour de l'expérimentation, 250 mL de culture bactérienne sont prélevés dans le réacteur de dénitrification décrit au chapitre III (Caractérisation des populations dénitrifiantes). L'inoculum est centrifugé pendant 10 minutes à 10 000g à + 20°C. Le culot est remis en suspension dans 1 litre (volume final) de milieu de culture (composition présentée dans le tableau 5-2), après une vigoureuse homogénéisation manuelle. Pour chaque essai, soit 1 seul AGV (concentration : 500 mg C . L⁻¹) parmi les acides acétique, propionique, butyrique et valérique, soit le mélange des 4 AGV

(concentration : $4 \times 125 \text{ mg C} \cdot \text{L}^{-1}$), est testé. La concentration en nitrates appliquée est de $333 \text{ mg N} \cdot \text{L}^{-1}$, soit un ratio C/N appliqué égal à 1,5. Chaque condition est répétée 3 fois.

Tableau 5-1 : Caractéristiques du réacteur batch.

Volume (L)	1,0
Barbotage Argon	permanent
Rapport S_0/X_0 appliqué ($\text{mg DCO} \cdot \text{mg}^{-1} \text{MES}$)	14,7
Inoculum : culture mixte dénitrifiante (diluée 10 fois) adaptée à un mélange de 4 AGV, environ $90 \text{ mg MES} \cdot \text{L}^{-1}$	

Tableau 5-2 : Composition pour 1 litre de milieu de culture des réacteurs batch, avec soit les AGV testés individuellement, soit testés en mélange.

Acide acétique, ou acide propionique, ou acide butyrique, ou acide valérique (mL), ou Mélange des 4 AGV (mL)	1,19 1,033 0,960 0,909 0,30 (ac) + 0,26 (pr) + 0,24 (bu) + 0,23 (va)
KNO ₃ (g)	2,40
KH ₂ PO ₄ (mg)	100
K ₂ HPO ₄ (mg)	80
Solution d'oligo-éléments (mL)	1
C/N appliqué	1,5
Eau du robinet	qsp 1 litre

La croissance de la biomasse bactérienne est suivie par des mesures de densité optique à 620 nm (volume nécessaire : 5 mL, prélevés directement dans le réacteur), éventuellement après dilution de l'échantillon dans de l'eau milliQ. La croissance est suivie jusqu'à l'état stationnaire, considéré comme tel après 3 mesures identiques de la D.O. (moins de 1 % de variation) à 1 à 2 heures d'intervalle.

Tableau 5-3 : Concentrations ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) initiales ($h = 0$) en N-nitrates, N-nitrites, carbone, MES et DCO en fonction de l'AGV testé ($n = 3$).

Substrat	NO ₃ ⁻		NO ₂ ⁻		C-		MES		DCO	
	Moy	ET	Moy	ET	Moy	ET	Moy	ET	Moy	ET
Acétate	331,1	13,4	1,0	0,7	461,9	21,2	137,5	11,5	1227	40,3
Propionate	326,7	20,5	0,1	0,0	447,3	15,7	128,3	2,9	1413	52,1
Butyrate	338,8	2,0	0,3	0,1	461,9	24,7	100,8	16,6	1534	113,7
Valérate	347,5	6,7	0,3	0,1	486,6	27,8	100,0	17,5	1686	117,5
Mélange	342,0	0,7	0,3	0,1	477,4	27,3	117,5	3,5	1501	30,4

Au début de l'expérience et à l'état stationnaire un prélèvement (volume de 40 à 100 mL) est réalisé. Il est centrifugé à 20 000 g pendant 10 minutes à + 4 °C. Le surnageant est utilisé pour doser les nitrates, les nitrites, les ions ammonium, le carbone et pour mesurer la DCO (demande chimique en oxygène). Le culot sert à déterminer les MES initiales et finales. Le tableau 5-3 présente 5 minutes après l'inoculation les concentrations en carbone, nitrates, nitrites, matières en suspension et DCO. A la fin de l'expérience, la totalité de la culture (environ 900 mL) est centrifugée à 20 000 g pendant 15

minutes à + 4°C. Les culots sont séchés 24 heures à 105 °C, puis analysés pour déterminer les concentrations en carbone, azote et hydrogène (cf. Matériel et Méthodes, et annexe 4 de ce chapitre).

5-1-2 Traitement des résultats pour réaliser le bilan électrons

Pour réaliser le bilan électrons sur les systèmes batch entre le début et la fin de l'expérience, il faut standardiser en équivalent électrons les composés contenant du carbone et de l'azote, en fixant arbitrairement comme point de départ les composés les plus oxydés, à savoir le gaz carbonique (CO₂, état d'oxydation du carbone +4) et les nitrates (NO₃⁻, état d'oxydation de l'azote +5). Le tableau 5-3 regroupe la conversion en milli équivalents e⁻ . mmole⁻¹ pour les composés azotés et carbonés présents dans la culture bactérienne.

Tableau 5-3 : Conversion en milli équivalents e⁻ . mmole⁻¹ des composés azotés et carbonés présents dans la culture bactérienne. (a) : formule chimique d'une bactérie : C₄H_{6,8}O_{1,8}N_{0,7} (cf. annexe 5).

Composé carboné	meq e ⁻ . mmole ⁻¹	Composé azoté	meq e ⁻ . mmole ⁻¹
CO ₂	0	N-NO ₃ ⁻	0
C-cellules	4,27(a)	N-NO ₂ ⁻	2
C-acétate	4	N ₂	5
C-propionate	4,67	N-cellules	8
C-butyrate	5	N-NH ₄ ⁺	8
C-valérate	5,2	N-organique	8
C-mélange	4,71		

5-1-2-1 Potentiel électrons initial

Le potentiel électrons initial exprime tous les composés contenant du carbone et de l'azote en meq e⁻ . mmole⁻¹. La somme représente alors la quantité d'équivalents électrons présents dans le système à h = 0.

Tableau 5-4 : Formule appliquée aux composés azotés et carbonés présents à l'état initial pour les exprimer en équivalents électrons (meq e⁻ . mmole⁻¹). EO dépend de l'AGV considéré (+4 pour l'acétate, +4,67 pour le propionate... cf. Tableau 5-3).

Composé	Formule	Application numérique avec l'acétate
Carbone	Concentration x EO / 12	461,9 x 4 / 12 = 154
N-Nitrates	Concentration x 0 / 14	331,1 x 0 / 14 = 0
N-Nitrites	Concentration x 2 / 14	1 x 2 / 14 = 0,14
N-Ammonium	Concentration x 8 / 14	0
N-cellules	Concentration x 0,102 x 8 / 14	137,5 x 0,102 x 8 / 14 = 8,0
C-cellules	Concentration x 0,48 x 4,27 / 12	137,5 x 0,48 x 4,27 / 12 = 23,5

Le tableau 5-4 présente la formule appliquée à chaque composé pour l'exprimer en équivalents électrons. Une application numérique est présentée à titre d'exemple avec l'acétate.

5-1-2-2 Potentiel électrons final

Le potentiel électrons final exprime tous les composés contenant du carbone et de l'azote en meq e⁻ . mmole⁻¹. La somme représente alors la quantité d'équivalents électrons présents dans le

système à la fin de l'expérience. Le tableau 5-5 présente la formule à appliquer à chaque composé pour l'exprimer en équivalents électrons. Une application numérique est présentée à titre d'exemple avec l'acétate.

Tableau 5-5 : Formule appliquée aux composés azotés et carbonés présents à l'état final pour les exprimer en équivalents électrons ($\text{meq } e^- \cdot \text{mmole}^{-1}$). (b) : $1 \text{ mg DCO} = 0,125 \text{ meq électrons}$.

Composé	Formule	Application numérique avec l'acétate
Carbone	0	0
CO ₂	Concentration x 0	0
N ₂	$(\sum N_{\text{initial}} - \sum N_{\text{final}}) \times 5 / 14$	$[(1 + 331,1 + 137,5 \times 0,102) - (111,6 + 77,7 + 480 \times 0,102)] \times 5 / 14 = 38,5$
N-Nitrates	Concentration x 0 / 14	$77,7 \times 0 / 14 = 0$
N-Nitrites	Concentration x 2 / 14	$111,6 \times 2 / 14 = 15,9$
N-Ammonium	Concentration x 8 / 14	0
N-cellules	Concentration x 0,102 x 8 / 14	$480 \times 0,102 \times 8 / 14 = 32,6$
C-cellules	Concentration x 0,48 x 4,27 / 12	$480 \times 0,48 \times 4,27 / 12 = 82,0$
DCO	Concentration x 0,125 ^(b)	$34,2 \times 0,125 = 4,3$

5-2 Résultats

Ces essais ont pour objet de réaliser un bilan le plus complet possible en terme de carbone et de nitrates consommés, pour ainsi comprendre les directions des flux d'électrons d'une part cédés par le donneur (source de carbone) et d'autre part acceptés par l'accepteur (les nitrates). Le deuxième objectif est de déterminer la production de biomasse bactérienne avec chacun des quatre AGV testés séparément, pour comprendre pourquoi les vitesses de dénitrification et de consommation de carbone sont identiques pour l'acétate, le butyrate et le valérate. Ces essais sont réalisés en culture batch, avec chacun des AGV seul et en mélange, à pH et température contrôlés (respectivement à $21 \text{ }^\circ\text{C}$ et $7,3 \pm 0,1$).

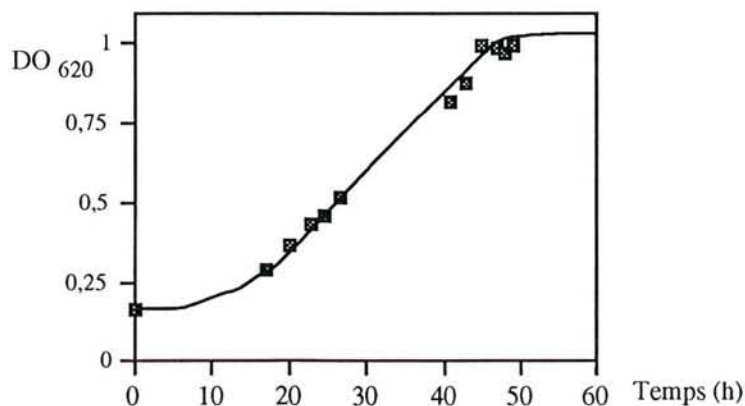


Figure 5-1 : Évolution de la densité optique en fonction du temps (heures) pour l'essai n°1 avec l'acétate. Batch ; $\text{pH} = 7,3 \pm 0,1$; $T = 21 \text{ }^\circ\text{C}$.

Les mesures ont été réalisées une fois la phase stationnaire de croissance atteinte depuis environ 3 heures. Celle-ci est déterminée par un suivi de la densité optique de la biomasse

bactérienne. A titre d'exemple, la figure 5-1 présente le suivi de la densité optique pour l'essai 1 avec l'acétate utilisé comme seul donneur d'électrons et source de carbone. Les données pour les différents essais figurent en annexe 1. Quatre mesures successives de la densité optique montrent que la phase stationnaire de croissance est atteinte avec l'acétate pour $h = 45$; les analyses pour déterminer les concentrations résiduelles en nitrates, carbone, nitrites... sont réalisées à $h = 49$, *i.e.* 4 heures après le début de la phase stationnaire. Pour le butyrate, le valérate et le mélange des 4 AGV le début de la phase stationnaire de croissance apparaît après environ 44 à 46 heures de culture (annexes 1 et 2) ; par contre avec le propionate il faut entre 98 à 140 heures pour atteindre cette phase stationnaire.

Les déterminations des résiduels de carbone, nitrates, de MES produites... ont été réalisées dès la phase stationnaire atteinte, à la fois pour éviter que les bactéries ne restent trop longtemps en conditions carbone limitant et limiter les effets de la respiration endogène, mais également pour que tout le substrat carboné initial soit consommé, *i.e.* avoir une production de biomasse bactérienne la plus élevée possible.

Tableau 5-6 : Quantités ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) consommées en N-nitrates, carbone et DCO, et quantités produites de MES et de N-nitrites en fonction de l'AGV testé. (Batch, $\text{pH} = 7,3 \pm 0,1$, $T = 21$ °C).

	NO_3^-	NO_2^-	C	MES	DCO
Acétate	253,4	110,5	452,0	342,5	1192,8
Propionate	282,7	94,4	427,3	232,5	1330,6
Butyrate	199,5	24,1	440,8	435,8	1456,8
Valérate	206,8	16,6	471,6	503,3	1635,4
Mélange	184,0	36,4	452,1	351,7	1377,8

Le tableau 5-6 regroupe les moyennes pour chaque substrat testé des quantités consommées de carbone, de nitrates et de la DCO, ainsi que les matières en suspension et les nitrites produits (cf annexes 1 et 2). Le ratio C/N initial est égal à 1,5 (cf protocole), *i.e.* la culture est en condition de carbone limitant. Il n'est donc pas surprenant que quel que soit l'AGV testé, à la fin de l'expérience la biomasse a épuisé tout le carbone AGV disponible. Les 10 à 25 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de carbone mesurés correspondent probablement à des produits de relargage, des exopolymères... dans la mesure où la DCO finale est supérieure à la DCO calculée sur la base du carbone final (annexe 3).

Les nitrates ne sont consommés que partiellement, et le résiduel est important avec le butyrate, le valérate et le mélange (140 à 160 $\text{mg N} \cdot \text{L}^{-1}$). Les nitrites sont principalement accumulés avec l'acétate et le propionate (95 à 110 $\text{mg N} \cdot \text{L}^{-1}$), nettement moins avec les 3 autres substrats (15 à 35 $\text{mg N} \cdot \text{L}^{-1}$). Enfin, la production de biomasse est minimale avec l'acétate, puis augmente avec le butyrate puis le valérate ; le mélange des 4 AGV amène une production de MES moyenne par rapport aux 4 AGV.

Les quantités de carbone consommé en 48 heures sont globalement semblables pour les cultures avec l'acétate, le butyrate et le valérate, soit environ 450 $\text{mg C} \cdot \text{L}^{-1}$ (Tableau 5-6), ce qui donne une vitesse moyenne de consommation du carbone d'environ 9,4 $\text{mg C} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Cette

vitesse de consommation du substrat réalisée à S_0/X_0 grand (*i.e.* condition de croissance bactérienne) n'est pas comparable à celles calculées dans les chapitres III et IV réalisées à S_0/X_0 petit (*i.e.* condition peu de croissance bactérienne). Par contre, de la même façon que dans le chapitre IV, les vitesses sont identiques avec l'acétate, le butyrate et le valérate.

Les vitesses de dénitrification, exprimées en mmole d'équivalents électrons $\cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$, sont calculées en additionnant les électrons acceptés par les nitrites et l'azote et en rapportant la somme à la durée moyenne de l'expérience (Tableau 5-7). Les vitesses sont très proches pour l'acétate, le butyrate et le valérate, et nettement plus faibles pour le propionate, confirmant les résultats du chapitre IV.

Tableau 5-7 : *Équivalents électrons (meq $e^- \cdot mmole^{-1}$) acceptés par les nitrites et l'azote versus l'AGV testé, et vitesse de dénitrification (meq $e^- \cdot mmole^{-1} \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$).*

Substrat	Durée moyenne de l'expérience	NO ₂ ⁻	N ₂	Σ	Vitesse de dénitrification
Acétate	48,3	15,9	38,5	54,4	1,13
Propionate	112	13,5	58,8	72,3	0,65
Butyrate	48	3,5	46,8	50,4	1,05
Valérate	48,3	2,4	49,6	52,0	1,08
Mélange	48,7	5,3	39,9	45,2	0,93

La composition élémentaire de la biomasse est nécessaire pour connaître les quantités de carbone et d'azote incorporées dans les cellules. L'annexe 4 présente les résultats de ces analyses réalisées sur la biomasse bactérienne en fonction de l'AGV testé. Par la suite, des essais complémentaires de traitement des échantillons bactériens ont été effectués (cf description au chapitre II, Matériel et Méthodes), et les résultats obtenus en terme de composition élémentaire de la biomasse diffèrent en fonction du protocole choisi. Nous avons décidé pour la suite de ce chapitre de considérer que la composition moyenne des bactéries au cours de tous nos essais comporte 47,6 % de carbone, 6,8 % d'hydrogène, 10,2 % d'azote et 28,3 % d'oxygène, soit une formule molaire de C₄H_{6,8}O_{1,8}N_{0,7} (Annexe 5), car il semble peu vraisemblable que la composition de la bactérie, régulée par des mécanismes génétiques, diffère fortement d'un AGV à l'autre, à la différence des vitesses d'incorporation des AGV.

A partir des données présentées en annexes 2, il est possible de calculer un bilan sur les réacteurs batch entre le début et la fin de l'expérience, exprimé en équivalents électrons initiaux et finaux.

5-2-2-1 Équivalents électrons initiaux

La méthode de calcul pour déterminer la quantité d'électrons initiale est présentée dans le protocole de ce chapitre, au paragraphe 5-1-2-1.

Le tableau 5-8 regroupe pour chaque substrat testé les équivalents électrons provenant de tous les composés carbonés et azotés présents à $h = 0$.

Tableau 5-8 : Équivalents électrons ($\text{meq } e^- \cdot \text{mmole}^{-1}$) pour tous les composés carbonés et azotés à $h = 0$ en fonction de l'AGV testé.

	NO_3^-	NO_2^-	CO_2	C	MES-N	MES-C	DCO	N_2	Σ
Acétate	0,0	0,1	0	154,0	8,0	23,5	0,0	0,0	185,6
Propionate	0,0	0,0	0	174,1	7,5	21,9	0,0	0,0	203,5
Butyrate	0,0	0,0	0	192,5	5,9	17,2	0,0	0,0	215,6
Valérate	0,0	0,0	0	210,9	5,8	17,1	0,0	0,0	233,8
Mélange	0,0	0,0	0	187,8	6,8	20,1	0,0	0,0	214,7

La culture avec l'acétate comporte le moins d'équivalents électrons, tandis que celle avec le valérate en comporte le plus, ce qui s'explique par les états d'oxydation respectivement de 0 et -1,2, *i.e.* des "potentialités énergétiques" plus élevés pour le valérate, et diminuant avec le butyrate le propionate et l'acétate.

5-2-2-2 Équivalents électrons finaux

La méthode de calcul pour déterminer la quantité d'électrons finale est présentée dans le protocole de ce chapitre, au paragraphe 5-1-2-1.

Tableau 5-9 : Équivalents électrons ($\text{meq } e^- \cdot \text{mmole}^{-1}$) pour tous les composés carbonés et azotés à la fin de l'expérience en fonction de l'AGV testé.

	NO_3^-	NO_2^-	CO_2	C	MES-N	MES-C	DCO	N_2	Σ
Acétate	0,0	15,9	0	0,0	28,0	82,0	4,3	38,5	168,7
Propionate	0,0	13,5	0	0,0	21,0	61,6	10,3	58,8	165,3
Butyrate	0,0	3,5	0	0,0	31,3	91,7	9,7	46,8	182,8
Valérate	0,0	2,4	0	0,0	35,2	103,0	6,4	49,6	196,6
Mélange	0,0	5,3	0	0,0	27,3	80,1	15,5	39,9	168,1

Le tableau 5-9 regroupe pour chaque substrat testé les équivalents électrons provenant de tous les composés carbonés et azotés présents à la fin de l'expérience.

5-2-2-3 Bilan global

Le bilan global (Tableau 5-10) entre le début et la fin de l'expérience s'obtient par combinaison des tableaux 5-8 et 5-9. Si le bilan est bouclé, les quantités d'électrons entre le début et la fin de l'expérience doivent être les mêmes.

Tableau 5-10 : Bilan global entre le début et la fin de l'expérience exprimé en $\text{meq } e^- \cdot \text{mmole}^{-1}$ en fonction de la source de carbone testée.

	État initial	État final	%
Acétate	185,6	168,7	91
Propionate	203,5	165,3	81
Butyrate	215,6	182,8	85
Valérate	233,8	196,6	84
Mélange	214,7	168,1	78

Le fait que les bilans ne sont pas bouclés à 100 % peut provenir d'au moins 2 raisons : (i) l'azote organique n'a pas été dosé à la fin de l'expérience ; or celui ci est très réduit (état d'oxydation : -3), et constitue un "réservoir" à électrons, ce qui pourrait expliquer le déficit d'électrons à la fin de l'expérience; (ii) la seconde cause d'erreur peut provenir d'erreurs expérimentales, soit de dosage, soit dans l'approximation réalisée au niveau de la composition de la biomasse (cf. annexe 5). Examinons ces deux possibilités :

(i) les concentrations en carbone résiduel varient entre 10 et 25 mg C . L⁻¹ (annexe 3) ; si l'on admet que tout les polymères relargués sont des protéines, l'azote organique représente dans ce cas au maximum 1/3 du carbone. Il y aurait ainsi au plus entre 3 et 8 mg N . L⁻¹ d'azote organique résiduel selon l'AGV (respectivement pour l'acétate et pour le mélange des AGV). cette concentration représente (3 à 8) x 8 / 14 = 1,7 à 4,6 meq e⁻ : mmole⁻¹. Cette valeur est largement insuffisante pour expliquer le déficit en électrons, de l'ordre de 17 à 46 meq e⁻ . mmole⁻¹ ;

(ii) le protocole opératoire déterminé pour les analyses élémentaires a été mis au point après ces expériences, aussi nous avons pris comme valeur moyenne de la biomasse C₄H_{6,8}O_{1,8}N_{0,7} ce qui correspond à 47,6 % de carbone, 6,8 % d'hydrogène, 10,2 % d'azote et 28,3 % d'oxygène. Or les données bibliographiques font plutôt référence à 50 à 53 % de carbone et 12 à 15 % d'azote (cf. Tableau 3-7, chapitre III). En testant la valeur maximale soit 53 % de carbone, 7 % d'hydrogène, 25 % d'oxygène et 15 % d'azote, nous obtenons comme formule bactérienne C_{4,4}H₇O_{1,56}N_{1,07} soit un état d'oxydation moyen du carbone de la biomasse égal à 0,15.

Nous pouvons alors recommencer les bilans état initial et état final en intégrant les remarques des (i) et (ii) :

Tableau 5-11 : Équivalents électrons (meq e⁻ . mmole⁻¹) pour tous les composés carbonés et azotés à h = 0 en fonction de l'AGV testé, en comptant 53 % de carbone et 15 % d'azote dans une bactérie. En gras, les paramètres modifiés.

	NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻	CO ₂	C	MES-N	MES-C	DCO	N ₂	Σ
Acétate	0,0	0,1	0	154,0	11,8	25,2	0,0	0,0	191,1
Propionate	0,0	0,0	0	174,1	11,0	23,5	0,0	0,0	208,6
Butyrate	0,0	0,0	0	192,5	8,6	18,5	0,0	0,0	219,6
Valérate	0,0	0,0	0	210,9	8,6	18,3	0,0	0,0	237,8
Mélange	0,0	0,0	0	187,8	10,1	21,5	0,0	0,0	219,4

Tableau 5-12 : Équivalents électrons (meq e⁻ . mmole⁻¹) pour tous les composés carbonés et azotés à la fin de l'expérience en fonction de l'AGV testé, en comptant 53 % de carbone et 15 % d'azote dans une bactérie. En gras, les paramètres modifiés.

	NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻	CO ₂	C	MES-N	MES-C	DCO	N ₂	N _{orga}	Σ
Acétate	0,0	15,9	0	0,0	41,1	88,0	4,3	32,7	1,9	183,9
Propionate	0,0	13,5	0	0,0	30,9	66,1	10,3	54,8	3,8	179,5
Butyrate	0,0	3,5	0	0,0	46,0	98,4	9,7	39,3	4,0	200,8
Valérate	0,0	2,4	0	0,0	51,7	110,6	6,4	41,0	2,9	214,9
Mélange	0,0	5,3	0	0,0	40,2	86,0	15,5	33,8	4,8	185,6

Tableau 5-13 : Bilan global entre le début et la fin de l'expérience exprimé en $\text{meq e}^- \cdot \text{mmole}^{-1}$ en fonction de la source de carbone testée, en comptant 53 % de carbone et 15 % d'azote dans une bactérie. En gras, les paramètres modifiés.

	État initial	État final	%
Acétate	191,8	186,4	96
Propionate	209,3	181,4	86
Butyrate	220,2	203,6	91
Valérate	238,3	218,1	90
Mélange	220,1	188,1	85

Dans ce cas, l'erreur observée varie de 4 % (acétate) à 15 % (mélange des AGV) ce qui devient très raisonnable, lorsque l'on sait que la précision des différents dosages (nitrates, nitrites, ammonium, carbone...) est d'environ 5 %.

5-3 Discussion

Pour toutes les expériences décrites précédemment, le substrat carboné représente pour la bactérie dénitrifiante à la fois la source de carbone pour son matériel cellulaire, sa croissance... et la source d'énergie. Plus la source de carbone est réduite (*i.e.* état d'oxydation du carbone faible) et plus elle est énergétique, dans la mesure où davantage d'électrons sont transférés, *via* la chaîne respiratoire, du donneur à l'accepteur (nitrates). Par conséquent, le valérate (état d'oxydation moyen du carbone : -1,2) est plus énergétique que l'acétate (état d'oxydation moyen du carbone : 0). Ceci peut se mesurer par exemple par le fait que le valérate permet de réduire davantage de nitrates que l'acétate, à quantité égales en carbone. C'est ce que montrent Paul *et al.* (1989) en suivant pendant 216 heures la production d'oxyde nitreux, qui est maximale avec le butyrate, puis décroît avec le propionate puis l'acétate. Nos expériences ne montrent pas ce phénomène, puisque les vitesses de consommation de l'AGV sont identiques aux vitesses de dénitrification, à l'exception du propionate. Puisque les flux d'électrons vers la production d'énergie sont identiques quels que soit l'AGV, il faut nécessairement qu'il y ait une compensation, probablement en production de biomasse (McCarty, 1969).

Cette compensation en biomasse, *i.e.* le fait qu'en condition de dénitrification le valérate permette de produire davantage de biomasse que le butyrate et l'acétate, est démontré par les expériences de ce chapitre. Toutefois l'examen du bilan électrons (électrons état initial - électrons état final) montre un déficit de l'ordre de 9 % (valérate), 15 à 19 % (propionate, butyrate et valérate) et 22 % (mélange des 4 AGV). A priori, il n'y a pas de raison pour que ces déficits dépendent de tel ou tel AGV, et deux causes principales d'erreur peuvent être suggérées : (i) l'azote organique à la fin de l'expérience n'est pas pris en compte ; (ii) des erreurs expérimentales ont pu intervenir, surtout au niveau de l'approximation de la composition de la biomasse bactérienne. En intégrant ces 2 paramètres, les bilans sont bouclés à 96 % pour le valérate et 85 % pour le mélange des AGV, validant ainsi les hypothèses posées. Enfin, il apparaît que dans nos expériences environ 30 % des électrons ont servi à la production d'énergie et 70 % à la production de biomasse, pourcentage inverse de ceux calculés avec le modèle de McCarty (1969).

5-4 Conclusions

Les objectifs de ce chapitre étaient de comparer la production de biomasse et l'efficacité de dénitrification avec chacun des 4 AGV testé individuellement et avec le mélange de ces 4 AGV, dans la mesure où les vitesses de consommation des substrats carbonés sont équivalentes, ainsi que les vitesses de dénitrification.

A l'issue de ces expériences, il apparaît clairement que :

(i) les acides acétique, butyrique et valérique sont consommés en quantités égales dans un intervalle de temps identique, c'est-à-dire que les vitesses de consommation de ces composés sont identiques entre elles (confirmation des résultats trouvés au chapitre IV) ;

(ii) les nitrates acceptent les électrons à la même vitesse dans le cas des cultures avec l'acide acétique, butyrique et valérique (confirmation des résultats trouvés au chapitre IV). Les nitrates sont réduits en gaz et en nitrites (avec l'acétate et le propionate), soit presque exclusivement en gaz (avec le butyrate, le valérate et le mélange) ;

(iii) la production de biomasse est maximale pour le valérate, puis diminue avec le butyrate et l'acétate. Cette production de biomasse différente en fonction de l'AGV explique que les vitesses de consommation de carbone et de respiration des nitrates sont les mêmes ;

(iv) le propionate se comporte différemment des autres AGV : il est consommé beaucoup moins vite, et produit moins de MES que tous les autres substrats ;

(v) le bilan général est bouclé entre 91 % (acétate) et 78 % (mélange) à partir des données expérimentales. Par contre, lorsque l'on prend les données bibliographiques pour déterminer la formule d'une bactérie, le bilan électrons est bouclé entre 96 % (acétate) et 85 % (mélange).

Ainsi, dans la mesure où les vitesses de dénitrification sont identiques avec l'acétate, le butyrate et le valérate, si le principal objectif du procédé industriel est d'éliminer rapidement les nitrates et de produire peu de biomasse bactérienne, l'acétate est le substrat carboné le plus indiqué. Par contre, si l'accumulation de nitrites est à éviter impérativement, le butyrate ou le valérate devront être préférentiellement utilisés à l'acétate.

ANNEXES

Annexe 1 : Concentrations (mg . L⁻¹) mesurées lors des essais "bilans" pour l'acétate, le propionate, le butyrate, le valérate, et le mélange d'AGV.

Acétate**J430**

Heures	N-NO ₃	N-NO ₂	C	MES	DO	DCO
0	341,45	1,575	474,7	135	0,16	1210
	328,8	1,8	464,1			
17					0,289	
20					0,368	
23					0,432	
24,5					0,457	
26,5					0,52	
41					0,816	
43					0,874	
45					0,999	
47					0,99	
48					0,966	
49	75,664	141,2	6,236	465	0,996	19,7
	84,466	137,8	6,132	495		

J437

Heures	N-NO ₃	N-NO ₂	C	MES	DO	DCO
0	352,53	1,105	480,3	150	0,158	1273
	331,57	1,225	476,3		0,156	
19					0,312	
20					0,327	
24					0,438	
26					0,517	
46					0,868	
48					0,902	
49	92,486	111,3	17,34	475	0,898	70,8
	68,698	118,4	15,02	480		

J465

Heures	N-NO ₃	N-NO ₂	C	MES	DO	DCO
0	326,57	0,24	437,7	130	0,143	1198
	305,78	0,265	438,1	125		
24					0,367	
26					0,414	
44					0,842	
46					0,846	
48	75,388	80,4	7,215	475	0,837	12,2
	69,369	80,2	6,98	490		

Propionate J458

Heures	N-NO ₃	N-NO ₂	C	MES	DO	DCO
0	332,93	0,04	431,3	130	0,141	1377
	313,38	0,065	432,8	120		
24					0,174	
48					0,19	
56	318,5	3,81	374,6	145	0,201	
47	314	3,73	374,4	135		
72					0,267	
120					0,45	
138					0,567	
142					0,585	
143					0,588	
144	61,798	89,65	5,635	340	0,585	18,3
	68,962	87,1	6,42	335		

J476

Heures	N-NO ₃	N-NO ₂	C	MES	DO	DCO
0	332,03	0,125	435,1	135	0,14	1390
	339,63	0,065	457,6	125		
24					0,151	
72					0,337	
80					0,398	
96					0,499	
97					0,497	
98	32,972	107,6	2,352	380	0,507	41,6
	28,992	111,1	2,144	345		

J483

Heures	N-NO ₃	N-NO ₂	C	MES	DO	DCO
0	330,58	0,095	464,7	125	0,141	1473
	351,34	0,09	462,3	135		
74					0,394	
79					0,441	
95					0,504	
96					0,524	
98	34,46	86,75	50,49	380	0,526	188
	36,27	84,75	53,11	385		

Butyrate J452

Heures	N-NO ₃	N-NO ₂	C	MES	DO	DCO
0	320,29	0,12	442	95	0,135	1439
	358,7	0,17	436	70		
4					0,141	
8					0,163	
25,5					0,613	
31					0,74	
33					0,811	
44					1,072	
46					1,1	
48	179,97	0,365	8,025	565	1,098	14,4
	179,48	0,43	7,965	525		

J467

Heures	N-NO ₃	N-NO ₂	C	MES	DO	DCO
0	339,88	0,405	449,5	120	0,146	1503
	340,91	0,385	467,5	90		
24					0,59	
26					0,624	
28					0,676	
42					1,034	
44					1,084	
46					1,101	
48	102,14	68,95	47,16	550	1,113	169,6
	101,63	68,75	46,12	555		

J474

Heures	N-NO ₃	N-NO ₂	C	MES	DO	DCO
0	330,97	0,295	489,9	120	0,137	1660
	342,13	0,35	486,3	110		
7					0,259	
22					0,58	
31					0,732	
46					0,88	
47					0,894	
48	140,03	4,675	8,132	505	0,895	47,5
	132,46	3,25	8,844	520		

Valérate J439

Heures	N-NO ₃	N-NO ₂	C	MES	DO	DCO
0	349,49	0,425	457,2	90	0,147	1581
	356,48	0,43	454,9	85	0,156	
23					0,402	
24					0,416	
31					0,584	
45					1,053	
47					1,083	
48					1,111	
49	148,97	17,435	18,88	610	1,078	68,7
	145,4	23,16	18,24	630		

J445

Heures	N-NO ₃	N-NO ₂	C	MES	DO	DCO
0	350,02	0,27	489	120	0,161	1813
	330,16	0,19	498,1			
2					0,158	
4					0,172	
23					0,548	
26,5					0,67	
43					1,154	
45					1,198	
47					1,237	
48	115,81	1,988	7,9	615	1,245	11,5
	93,047	1,94	9,2	595	1,243	

J472

Heures	N-NO ₃	N-NO ₂	C	MES	DO	DCO
0	348,2	0,17	509,9	100	0,148	1665
	350,58	0,165	510,7	85		
22					0,623	
31					0,788	
43					1,055	
45					1,094	
46					1,117	
47					1,128	
48	169,88	26,825	18,94	595	1,121	72,6
	171,27	29,625	17,03	575		

Mélange J481

Heures	N-NO ₃	N-NO ₂	C	MES	DO	DCO
0	332,8	0,255	497,3	105	0,143	1523
	350,17	0,325	496,1	125		
24					0,468	
30					0,639	
43					0,937	
46					0,998	
47					1,011	
48	131,19	51,65	45,76	485	1,002	194
	121,13	57,65	44,89	460		

J488

Heures	N-NO ₃	N-NO ₂	C	MES	DO	DCO
0	351,54	0,54	458,5	135	0,147	1480
	333,39	0,205	457,7	105		
8,5					0,178	
24					0,511	
32					0,713	
43					0,946	
45					0,991	
47					1,001	
48	204,09	0,37	8,3	445	0,982	80,6
	204,41	0,33	9,27	480		

J493

Heures	N-NO ₃	N-NO ₂	C	MES	DO	DCO
0	340,85	0,225	490	140	0,154	1540
	340,74	0,285	485,3	115		
8					0,187	
24					0,455	
32					0,594	
47					0,937	
48					0,968	
50	146,62	55,2	21,72	465	0,977	96,8
	140,67	55,45	21,6	480		

Annexe 2 : Concentrations (mg . L⁻¹) initiales (h = 0) et finales en N-nitrates, N-nitrites, carbone, MES et DCO en fonction de l'AGV testé. Batch, pH = 7,3 ± 0,1, T = 21 °C.

		NO ₃ ⁻		NO ₂ ⁻		C-		MES		DCO	
		Moy	ET	Moy	ET	Moy	ET	Moy	ET	Moy	ET
Acétate	h = 0	331,1	13,4	1,0	0,7	461,9	21,2	137,5	11,5	1227	40,3
	h ≈ 46	77,7	4,6	111,6	29,7	9,8	5,5	480,0	2,5	34,2	31,9
Propionate	h = 0	326,7	20,5	0,1	0,0	447,3	15,7	128,3	2,9	1413	52,1
	h ≈ 110	43,9	18,7	94,5	12,9	20,0	27,6	360,8	22,5	82,7	92,1
Butyrate	h = 0	338,8	2,0	0,3	0,1	461,9	24,7	100,8	16,6	1534	113,7
	h ≈ 46	139,3	39,0	24,4	38,5	21,0	22,2	536,7	21,3	77,2	81,7
Valérate	h = 0	347,5	6,7	0,3	0,1	486,6	27,8	100,0	17,5	1686	117,5
	h ≈ 46	140,7	33,5	16,8	13,5	15,0	5,6	603,3	17,6	50,9	34,2
Mélange	h = 0	342,0	0,7	0,3	0,1	477,4	27,3	117,5	3,5	1501	30,4
	h ≈ 46	158,0	41,0	36,8	31,5	25,3	18,5	469,2	5,8	123,7	61,2

Annexe 3 : Relation entre les concentrations résiduelles mesurées en carbone (mg . L⁻¹), la DCO théorique (mg . L⁻¹) et la DCO mesurée (mg . L⁻¹) pour chaque AGV testé en batch.

	C-	Équivalence C ↔ DCO	DCO théorique	DCO mesurée
Acétate	9,8	2,67	26,2	34,2
Propionate	20,0	3,11	62,2	82,7
Butyrate	21,0	3,33	70	77,2
Valérate	15,0	3,47	52	50,9
Mélange	25,3	3,14	79,6	123,7

Annexe 4 : Composition moyenne (pour 100 g, ± écart type) de la biomasse bactérienne en terme de carbone, hydrogène azote, en fonction de l'AGV testé. (RS : résidu sec).

	C		H		N	RS
Acétate (n = 2)	38,18	± 1,30	6,03	± 0,19	9,18	± 0,68 23,50
Propionate (n = 3)	38,77	± 1,60	6,06	± 0,31	9,81	± 0,99 14,50
Butyrate (n = 3)	47,04	± 0,83	6,58	± 0,17	9,17	± 1,07 7,80
Valérate (n = 2)	42,34	± 11,69	6,00	± 1,65	7,08	± 2,20 18,40
Mélange (n = 3)	45,68	± 1,34	6,68	± 0,14	8,26	± 0,16 10,83
Réacteur	45,13	0,53	6,64	0,19	10,00	0,02 6,45

Annexe 5 : Analyse élémentaire réalisée par le CNRS sur deux prélèvements de biomasse bactérienne, l'un à J = 536, l'autre à J = 556 du réacteur de dénitrification décrit au chapitre III (Caractérisation de la biomasse dénitrifiante).

Lavage : remise en suspension du culot après centrifugation (20 000 g, 20°C) dans 250 mL d'eau MilliQ.

Acidification : remise en suspension du culot après centrifugation (20 000 g, 20°C) dans 250 mL d'eau MilliQ, puis ajustement du pH à 2 avec de l'HCl, et enfin barbotage pendant 10 minutes à l'oxygène ultrapur.

nd = non déterminé. RS : résidu sec après combustion à 1100 °C.

	Condition opératoire	Composition moyenne en g d'élément pour 100 g de matière sèche							
		C	H	N	O	RS			
J536	0 lavage	44,11	6,59	10,85	nd	10,5			
	1 lavage	46,43	6,64	11,46	nd	8,2			
	2 lavages	46,3	6,69	11,54	nd	4,1			
		Moy <i>ET</i>	Moy <i>ET</i>	Moy <i>ET</i>					
J556	0 lavage	44,95	0,85	6,46	0,11	10,79	0,37	nd	8,6
	0 lavage puis acidification	48,17	0,33	6,77	0,05	11,76	0,17	nd	5,9
	2 lavages	47,61	0,14	6,82	0,06	10,24	0,11	nd	5,9
	2 lavages puis acidification	48,01	0,63	6,77	0,03	11,73	0,11	30,1	≤ 2

L'examen des résultats du prélèvement réalisé à J536 permet de tester l'effet du lavage. Sans aucun lavage à l'eau, le pourcentage de carbone est de 2 % inférieur à celui dosé après 1 ou 2 lavages, tandis que l'azote est environ 0,6 % plus faible sans laver qu'avec lavage. Les valeurs en hydrogène sont globalement semblables, avec ou sans lavage. Par contre, les valeurs mesurées pour le résidu sec sont très différentes, puisque sans lavage, il est de 10 %, après 1 seul lavage il est de 8 % et après 2 lavages il est de 4 %. En conclusion, 2 lavages (au moins) sont nécessaires pour obtenir des valeurs de carbone, d'hydrogène et d'azote stables, pour diminuer le résidu sec, mais sont insuffisants pour obtenir les quantités d'oxygène dans la biomasse.

Les résultats du prélèvement réalisé à J556 permettent de tester l'effet de l'acidification du prélèvement, pour éliminer le carbone minéral de l'échantillon, en présence de 2 témoins : le prélèvement non lavé et le même prélèvement lavé deux fois. Comme précédemment, l'effet du lavage est net à tous les niveaux : les concentrations en carbone, hydrogène et azote sont plus élevées après 2 lavages que sans lavage, et en parallèle le résidu sec est plus faible.

L'effet acidification, suivie d'un barbotage d'oxygène, entraîne probablement un relargage de polymères qui rendent le culot bactérien après centraifugation extrêmement visqueux. La composition en terme de carbone, d'hydrogène et d'azote est la même sur la biomasse acidifiée lavée à l'eau et acidifiée non lavée, et supérieure à la biomasse lavée à l'eau non acidifiée. La proportion relative d'azote après acidification augmente avec ou sans lavage à l'eau.

En conclusion, on considérera que l'analyse élémentaire d'une biomasse bactérienne doit être réalisée sur un prélèvement lavé au moins 2 fois à l'eau MilliQ et non acidifié. Ainsi, la composition bactérienne considérée ici est de 47,6 % de carbone, 6,8 % d'hydrogène, 10,2 % d'azote et 28,3 % d'oxygène.

CHAPITRE VI :

ACCUMULATION
TRANSITOIRE DE NITRITES

6-1 Protocoles	122
6-1-1 Impact d'une augmentation de pH sur l'accumulation des nitrites.....	122
6-1-1-1 Biomasse alimentée avec un mélange d'AGV	122
6-1-1-2 Biomasse alimentée avec de l'éthanol.....	123
6-1-2 Impact d'une variation de température sur l'accumulation des nitrites	123
6-2 Résultats.....	124
6-2-1 Impact d'une augmentation de pH sur l'accumulation des nitrites.....	124
6-2-1-1 Biomasse alimentée avec un mélange d'AGV	124
6-2-1-2 Biomasse alimentée avec de l'éthanol.....	126
6-2-2 Impact d'une variation de température sur l'accumulation des nitrites	127
6-3 Discussion.....	130
6-4 Conclusions.....	133

La présence de nitrites est fortement indésirable en particulier lors du traitement d'une eau de distribution (Hall, 1992), puisque la concentration maximale admissible dans l'eau de distribution est de $0,1 \text{ mg NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$ ($0,03 \text{ mg N-NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$). Dans la mesure où la réaction de dénitrification comporte les nitrites comme point de passage obligatoire ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$), leur présence peut s'expliquer par exemple par le fait de bactéries dépourvues de nitrite réductase. Lors des expériences précédentes, nous avons noté à plusieurs reprises des concentrations élevées en nitrites, qui dépendaient en particulier de la nature du substrat carboné (acétate), de la souche bactérienne (*Comamonas testosteroni*)... L'objet de ce chapitre est de tester 2 paramètres clés de toute culture bactérienne sur l'accumulation de nitrites : le pH et la température. Nous avons décidé de réaliser des augmentations brèves et brutales du pH ou de la température ("pulses" pH ou température) sur des cultures bactériennes en chemostat. Deux inocula différents sont utilisés : un inoculum alimenté avec un mélange d'AGV, issu d'un réacteur de dénitrification à l'équilibre depuis 8 mois, et un autre alimenté avec de l'éthanol. Ce deuxième inoculum provient directement d'une usine de traitement d'eau potable.

6-1 Protocoles

6-1-1 Impact d'une augmentation de pH sur l'accumulation des nitrites

6-1-1-1 Biomasse alimentées avec un mélange d'AGV

Un litre de culture bactérienne du réacteur de dénitrification est prélevé et sert d'inoculum bactérien pour un chemostat alimenté avec le même milieu de culture que celui décrit au chapitre "caractérisation des populations dénitrifiantes". Le réacteur (Biolaffite) d'un volume utile de 1 litre (volume total : 2 litres) est alimenté en continu, avec un débit de $16,3 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1}$ de manière à obtenir un TRH de 2,5 jours. L'équilibre devrait théoriquement être atteint en 10 jours (4 TRH). Les charges volumiques appliquées exprimées en N-nitrates et C-carbone sont respectivement égales à $0,72$ et à $0,84 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$.

La température et le pH sont régulés respectivement à $20 \pm 2^\circ\text{C}$ et à $7,25 \pm 0,1$ (Hanna, HCl 0,5N). Un barbotage permanent à l'argon est appliqué à ce réacteur hermétiquement clos, couvert d'une feuille de papier aluminium.

Les prélèvements se font en sortie du chemostat dans des tubes placés dans de la glace afin d'inhiber l'activité bactérienne. Pendant l'établissement de l'état stationnaire, environ un prélèvement par jour est réalisé ; il permet la détermination des concentrations en nitrates, nitrites, carbone, et MES.

Une fois l'état d'équilibre atteint, une augmentation brusque du pH jusqu'à 9 est réalisée. Elle est obtenue par ajout de soude 5N et maintenue pendant 12 heures, puis la régulation du pH à 7,3 est rétablie rapidement. Un prélèvement en début et en fin du pulse puis des prélèvements toutes les

heures pendant les 12 heures suivantes sont effectués. Seules les concentrations en nitrates et en nitrites sont mesurées. Cette expérience est répétée 3 fois dans les mêmes conditions.

6-1-1-2 Biomasse alimentées avec de l'éthanol

Un litre de culture bactérienne provenant d'un réacteur de dénitrification à biomasse fixée d'une unité de traitement d'eau potable sert d'inoculum bactérien pour cette expérience. Le milieu d'alimentation contient (par litre d'eau du robinet) : 5,48 mL d'éthanol, 4,08 g de KNO_3 , 3,4 g de NaNO_3 et 35 μL de H_3PO_4 . Le rapport C/N initial est donc de 2 (2,26 g C . L^{-1} et 1,13 g N-NO_3^- . L^{-1}). Le milieu est autoclavé 20 minutes à 121 °C.

Le réacteur (Biolaffite) d'un volume utile de 1 litre (volume total : 2 litres) est alimenté en continu, avec un débit de 8,3 mL . h^{-1} de manière à obtenir un TRH de 5 jours. Les charges volumiques appliquées exprimées en N-nitrates et C-carbone sont respectivement égales à 0,23 et à 0,45 g . L^{-1} . j^{-1} . La température et le pH sont régulés respectivement à $20 \pm 2^\circ\text{C}$ et à $7,65 \pm 0,1$ (Hanna, HCl 0,5N). Les prélèvements se font directement dans le réacteur, et sont immédiatement suivis d'un barbotage à l'argon pendant environ 10 minutes.

Pendant l'établissement de l'état stationnaire (environ 15 jours), un prélèvement par jour est réalisé. Il permet la mesure des concentrations en nitrates, nitrites, carbone, et MES.

Une fois l'état d'équilibre atteint, une augmentation rapide du pH d'une unité est réalisée grâce à l'ajout de soude 5N. Cette valeur est maintenue pendant 3 heures puis la régulation du pH à 7,65 est rétablie rapidement. Trois prélèvements à 1 heure d'intervalle pendant le pulse puis des prélèvements toutes les heures pendant les 5 heures suivantes sont effectués. Leur volume est d'environ 5 mL : les concentrations en nitrites et quelques fois en nitrates sont mesurées. Cette expérience est répétée 3 fois dans des conditions identiques.

6-1-2 Impact d'une variation de température sur l'accumulation des nitrites

Cette expérience est réalisée dans un nouveau chemostat alimenté à l'éthanol, une fois l'équilibre atteint. Ses caractéristiques sont en tout point identiques à celles du réacteur présenté précédemment.

La température du réacteur, placé dans un bain thermostaté, est régulée précisément à 20 °C. Celle ci va être augmentée plus ou moins rapidement selon les essais, entre 24 et 28 °C. Puis la température du réacteur va descendre doucement jusqu'à atteindre environ 20 °C. Des prélèvements de 5 mL effectués directement dans le réacteur sont réalisés toutes les heures pendant l'expérience. Ils permettent uniquement de doser les nitrites. Le pH et la température sont également relevés à chaque prélèvement. Cette expérience est répétée 4 fois.

6-2 Résultats

La première partie de ces résultats permet d'étudier l'influence d'une augmentation brutale du pH sur l'accumulation transitoire de nitrites, réalisée sur deux types de biomasses différents. La seconde partie s'intéresse quant à elle à l'influence de la température sur la production de nitrites.

6-2-1 Impact d'une augmentation de pH sur l'accumulation des nitrites

Les suivis des différents réacteurs chemostats, alimentation AGV ou éthanol, en terme de résiduels de carbone, nitrates, nitrites, MES... sont présentés en annexes 1 et 2.

L'étude de l'influence d'une augmentation du pH est réalisée sur 2 types de populations bactériennes : la première est alimentée par un mélange d'AGV, et est caractérisée dans le chapitre III (Caractérisation des populations dénitrifiantes). La seconde est alimentée avec de l'éthanol comme seule source de carbone, et est caractérisée en terme d'espèces bactériennes en annexe 3.

6-2-1-1 Biomasse alimentée avec un mélange d'AGV

La figure 6-1 présente les évolutions du pH et des nitrites résiduels en fonction du temps (annexe 4). L'augmentation du pH de 7,3 à 9 amène une augmentation de la concentration résiduelle en nitrites de 75 mg N-NO₂⁻ · L⁻¹ (de 75,7 à 151,3) en 12 heures. Dès que le pH est ajusté de nouveau à 7,3, les nitrites précédemment accumulés sont consommés. Il faut environ 30 heures pour que les nitrites retrouvent la concentration de 75 mg N-NO₂⁻ · L⁻¹. Cette disparition des nitrites est un phénomène passif qui est simplement dû à l'hydraulique du système (Figure 6-1, superposition des courbes "lessivage ----○----" et "mesure des nitrites —□—").

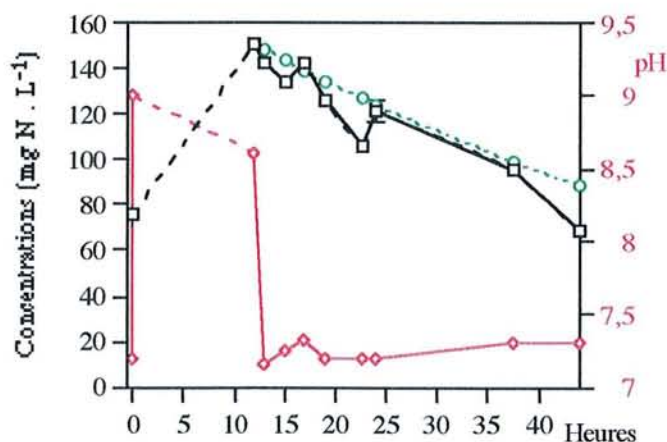


Figure 6-1 : Évolutions des nitrites (—□—) et du pH (-----◇-----) en fonction du temps (heures) sur le chemostat alimenté avec un mélange d'AGV. Lessivage théorique des nitrites produits (----○----).

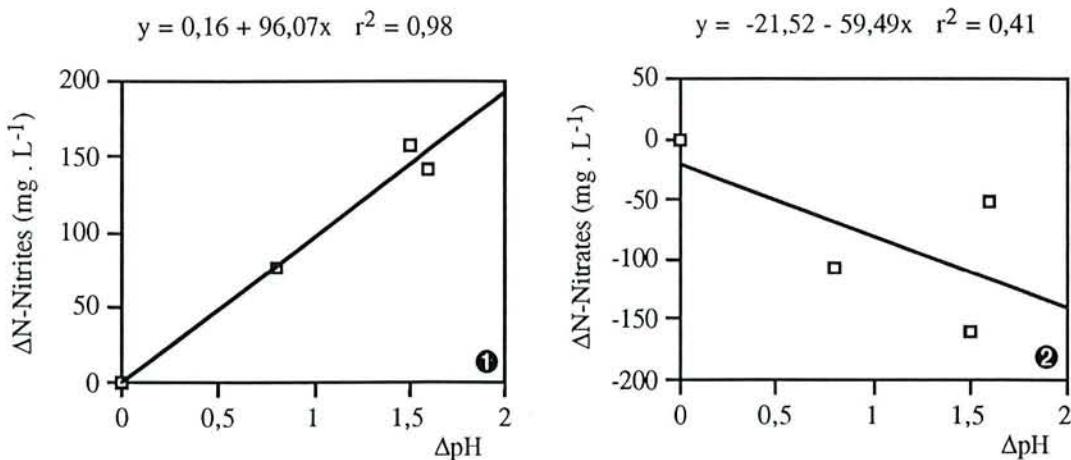
Les deux autres essais (cf. annexe 4) présentent globalement des allures similaires : l'augmentation du pH provoque une accumulation de nitrites, puis ceux-ci sont lessivés (phénomène passif) simultanément au ré-ajustement du pH.

Le tableau 6-1 synthétise les résultats des 3 essais réalisés, en présentant les variations des pulses pH, des concentrations en nitrites et en nitrates, ainsi que les vitesses de production ou de consommation de ces ions.

Tableau 6-1 : Synthèse des résultats obtenus pour les 3 essais augmentation pH avec la culture AGV. Δ_{\max} : production maximale de nitrites ou consommation maximale de nitrates ; Vit. spé. : vitesses spécifiques ($\text{mg N g}^{-1} \text{MES} \cdot \text{h}^{-1}$) de consommation (cons) ou de production (prod) ou d'accumulation (accu).

Essais n°	MES $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	ΔpH	Nitrites			Nitrates		
			Δ_{\max}	Vit. spé.		Δ_{\max}	Vit. spé.	
				prod	cons		cons	accu
1	0,895	+ 0,8	75,6	7,0	2,5	-106	10,8	4,2
2	0,920	+ 1,5	158,1	13,3	2,8	-160	12,1	1,8
3	1,055	+ 1,6	141,6	8,9	1,0	-52,1	3,3	1,35

Systématiquement, les vitesses spécifiques de production des nitrites sont supérieures à celles de consommation, la vitesse de consommation étant équivalente à la vitesse théorique de lessivage. Par contre, à chaque pic de nitrites correspond une diminution des concentrations en nitrates, soit équivalente (essai 2), soit supérieure (essai 1), soit inférieure (essai 3). En parallèle, les vitesses de consommation des nitrates sont quasi équivalentes à celles de production des nitrites. On peut penser soit que le pH agit directement sur la nitrate réductase en stimulant cet enzyme, ce qui va provoquer une accumulation de nitrites dans le milieu, soit que les protons sont prioritairement utilisés pour la réduction des nitrates en nitrites.



Figures 6-2 : Corrélations entre ΔpH et Δ nitrites (1) ou Δ nitrates (2).

Une étude de la corrélation entre les ΔpH et soit les Δ nitrites (Figure 6-2 1), soit les Δ nitrates (Figure 6-2 2) a été réalisée. Pour ce faire, nous avons émis comme hypothèse le fait que les variations observées en terme de nitrates et de nitrites sont dues exclusivement au pulse pH ce qui implique lorsque $\Delta\text{pH} = 0$ que Δ nitrites = Δ nitrates = 0.

La corrélation positive entre la variation de pH et l'accumulation de nitrites (Figure 6-2 ①) est statistiquement significative au risque d'erreur de 5 %. En conclusion de ces expériences, une augmentation de pH de 1 unité provoque une augmentation de la concentration en nitrites d'environ $96 \text{ mg N-NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$. Ceci est valable avec la culture bactérienne testée, avec les conditions expérimentales appliquées (chemostat à $D = 0,4 \text{ j}^{-1}$, $T^\circ = 20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7,25 \pm 0,1$, biomasse bactérienne telle qu'elle a été décrite au chapitre III, $C_v = 0,72 \text{ g N-NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ et $C_v = 0,84 \text{ g C} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$).

La corrélation négative entre la variation de pH et la consommation de nitrates (Figure 6-2 ②) n'est pas statistiquement significative au risque d'erreur de 5 % : la concentration en nitrates a tendance à diminuer quand une augmentation brutale du pH est réalisée, mais on ne peut malheureusement pas donner de conclusion quantitative.

6-2-1-2 Biomasse alimentée avec de l'éthanol

Une biomasse bactérienne issue d'une usine de traitement d'eau potable, alimentée avec de l'éthanol se comporte de la même façon qu'une biomasse alimentée avec un mélange de 4 AGV face à une augmentation brutale du pH : la concentration en nitrites augmente significativement (Figure 6-3). Cette accumulation de nitrites débute dès l'augmentation du pH, et se termine dès la baisse de ce dernier. L'amplitude du pic nitrites est variable selon les essais : de 1 à $6,6 \text{ mg N-NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$, alors que les pulses pH sont identiques d'un essai à l'autre (augmentation rapide du pH de 1 unité pendant 3 heures). Les données des 3 essais réalisés figurent en annexe 5, tandis que le tableau 6-2 synthétise les résultats de ces essais, en présentant les variations des concentrations en nitrites et en nitrates, ainsi que les vitesses de production ou de consommation de ces ions.

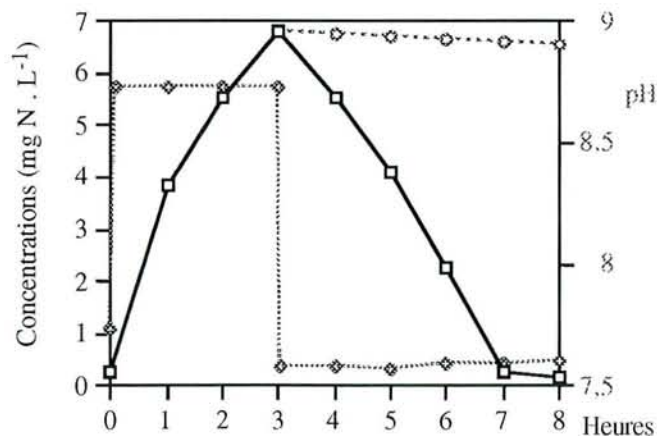


Figure 6-3 : Évolutions ($\text{mg N-NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$) des nitrites (—□—) et du pH (.....◇.....) en fonction du temps (heures) sur le chemostat alimenté avec l'éthanol. Lessivage théorique des nitrites (----◇----).

Les nitrites sont réellement consommés puisque la courbe théorique de lessivage se situe nettement au dessus de la courbe des concentrations mesurées (Figure 6-3). Pour les essais 2 et 3

(seuls essais où les nitrates et les nitrites ont été mesurés), à chaque pic nitrites correspond une consommation accrue en nitrates, et à la consommation de ces nitrites une accumulation en nitrates.

Tableau 6-2 : Synthèse des résultats obtenus pour les 3 essais pulse pH avec la culture éthanol. Δ_{max} : production maximale de nitrites ou consommation maximale de nitrates ; Vit. spé. : vitesses spécifiques ($mg\ g^{-1}\ MES \cdot h^{-1}$) de consommation (cons) ou de production (prod) ou d'accumulation (accum).

	MES	Nitrites			Nitrates		
		Δ_{max}	Vit. spé.		Δ_{max}	Vit. spé.	
			prod	cons		cons	accum
Essai 1	0,970	6,7	2,2	1,7	/	/	/
Essai 2	0,800	1,1	1,4	0,4	-13,1	-16,4	9,9
Essai 3	0,800	1,4	1,5	1,4	-10,1	-12,6	12,2
Moy			1,7 (0,4)	1,2 (0,7)	11,6 (1,5)	-14,5 (1,9)	11,0 (1,6)

En conclusion, de la même façon que pour la culture alimentée avec des AGV, une augmentation du pH entraîne une accumulation transitoire de nitrites. Les nitrites accumulés disparaissent, soit par lessivage, soit par un phénomène de réduction en gaz.

6-2-2 Impact d'une variation de température sur l'accumulation des nitrites

Cette expérience est réalisée avec une culture en continu alimentée avec de l'éthanol. Les résultats du suivi des concentrations en nitrates, nitrites, MES et carbone sur le chemostat sont présentés en annexe 6. La figure 6-4 présente, à titre d'exemple, la variation de la concentration en nitrites au cours du temps en fonction de la température pour l'essai numéro 4. Les résultats des autres expériences sont regroupés dans l'annexe 7.

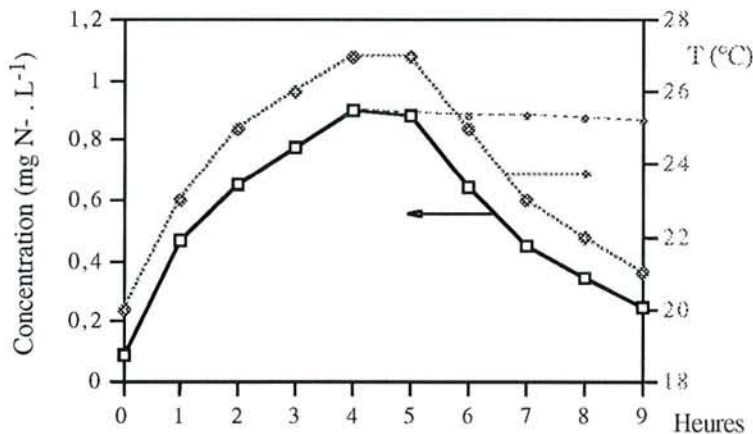


Figure 6-4 : Évolution des concentrations en nitrites (—□— $mg\ N-NO_2^- \cdot L^{-1}$) et de la température (.....◊..... °C) en fonction du temps (heures). Lessivage théorique des nitrites éliminés (.....◊.....). (Chemostat, $D = 0,2\ j^{-1}$, Essai n°4).

Il est clair pour cet essai que l'augmentation de la température amène une accumulation de nitrites, et que la diminution de la température s'accompagne d'une consommation des nitrites.

Cette diminution des nitrites n'est pas due au lessivage (cf la courbe simulation "nitrites éliminés" largement au dessus de la courbe "concentration mesurée") mais résulte réellement d'une réduction par la nitrite réductase. Les trois autres essais (annexe 7) réalisés présentent le même type de courbe, mais l'amplitude des pics nitrites et la montée en température sont différentes. Le tableau 6-3 regroupe les résultats obtenus pour les 4 essais, en présentant les vitesses spécifiques d'accumulation et de consommation des nitrites.

Tableau 6-3 : Synthèse des résultats obtenus pour les 4 essais augmentation de la température avec la culture éthanol. Δ_{max} : production maximale de nitrites ; Vit. spé. : vitesses spécifiques ($\text{mg g}^{-1} \text{MES} \cdot \text{h}^{-1}$) de consommation (cons) ou de production (prod).

Essais	MES	Nitrites		
		Δ_{max}	Vit. spé.	
			prod	cons
1	1710	1,27	0,74	0,098
2	1900	0,55	0,29	0,062
3	1860	0,66	0,36	0,041
4	1880	0,38	0,12	0,096
Moy (ET)	1837 (87)	0,71 (0,39)	0,38 (0,26)	0,074 (0,028)

Les vitesses spécifiques d'accumulation des nitrites varient entre 0,38 et 1,27 $\text{mg N g}^{-1} \text{MES} \cdot \text{h}^{-1}$, la vitesse moyenne étant de 0,7 $\text{mg N g}^{-1} \text{MES} \cdot \text{h}^{-1}$. Ces valeurs sont néanmoins largement supérieures aux vitesses spécifiques de consommation de ces nitrites accumulés, environ 10 fois plus élevées (0,7 versus 0,074 $\text{mg N g}^{-1} \text{MES} \cdot \text{h}^{-1}$).

Nous avons tenté une corrélation (Figure 6-5) entre les variations de température et de concentration en nitrites, en rapportant chaque Δt avec chaque $\Delta \text{N-NO}_2^-$.

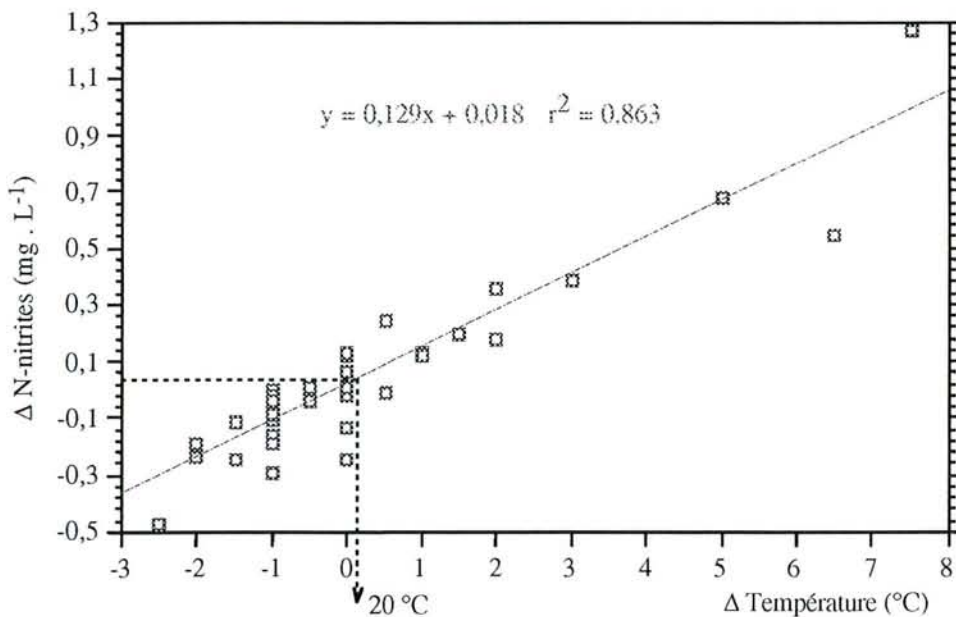


Figure 6-5 : Étude de la corrélation entre le Δ température ($^{\circ}\text{C}$) et le $\Delta \text{N-NO}_2^-$ ($\text{mg N} \cdot \text{L}^{-1}$). (Chemostat, $C_v = 0,23 \text{ g N-NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$, TRH = 5 jours).

Cette corrélation est statistiquement significative à 5 % d'erreur. La régression linéaire : $\Delta N\text{-NO}_2^- = 0,13 \Delta t + 0,018$ signifie qu'une augmentation de la température de 1 °C amène une production de nitrites de 0,15 mg N-NO₂⁻ L⁻¹, et une diminution de la température provoque une diminution de la concentration en nitrites d'environ 0,11 mg N-NO₂⁻ L⁻¹.

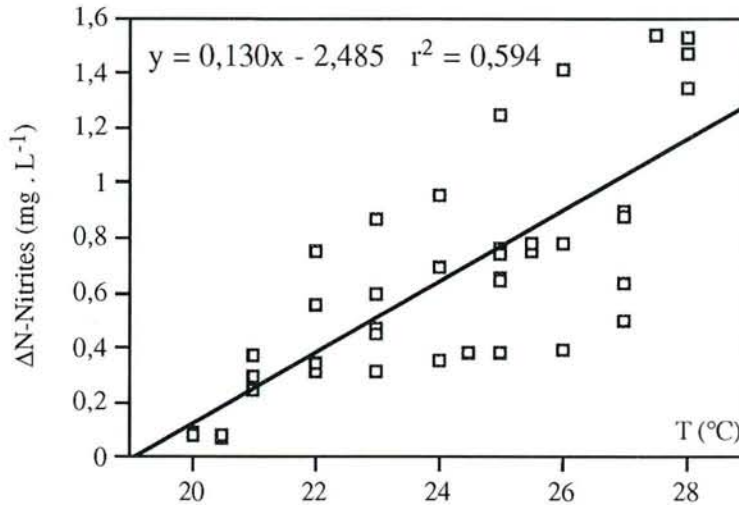


Figure 6-6 : Étude de la corrélation entre la température (°C) et le $\Delta N\text{-NO}_2^-$ (mg N · L⁻¹).
(Chemostat, $C_v = 0,23$ g N-NO₃⁻ · L⁻¹ · j⁻¹, TRH = 5 jours).

Pour s'assurer que les variations observées des concentrations en nitrites sont dues à la variation de la température, et non pas à un certain niveau de la température, nous avons (i) d'une part tracé la relation $\Delta N\text{-NO}_2^- = f(\text{température})$ et (ii) d'autre part réalisé une expérience d'adaptation à la température :

(i) la relation linéaire exprimant la variation des concentrations en nitrites en fonction de la température est : $\Delta N\text{-NO}_2^- = 0,130 \times \Delta t - 2,485$, avec $r^2 = 0,594$ (Figure 6-6). La valeur du r^2 est égale à 0,6, *i.e.* la température permet d'expliquer 60 % des variations observées des nitrites, alors que la variation de température permet d'expliquer 86 % des variations observées des nitrites ($r^2 = 0,863$). Ce sont donc principalement les variations répétées de la température qui sont responsables des variations des concentrations en nitrites ;

(ii) la culture bactérienne a été soumise à une température de 25 °C pendant plusieurs jours pour tester si la concentration résiduelle en nitrites pouvait retrouver la valeur qu'elle avait à 20 °C. La réponse est fournie par la figure 6-7, qui prouve nettement que la variation de la température entraîne effectivement une accumulation de nitrites, mais cette formation de nitrites disparaît au bout d'un certain temps à cette température. Ceci renforce notre propos du paragraphe précédent, à savoir que l'accumulation de nitrites dépend d'abord de la variation de la température, et non pas de la température elle-même.

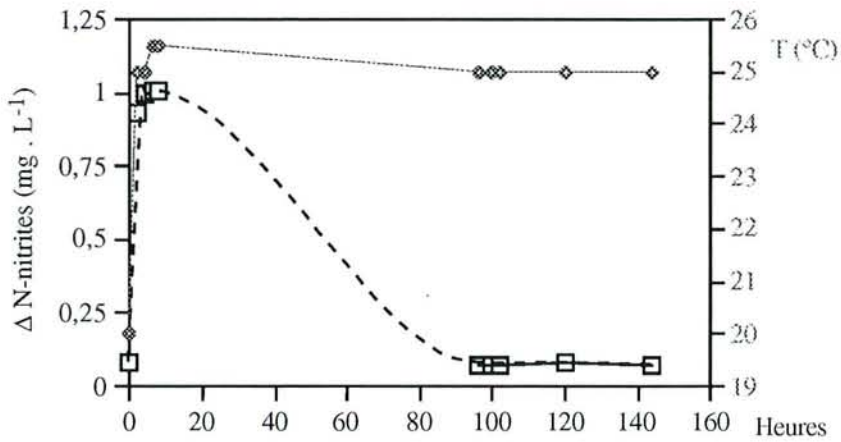


Figure 6-7 : Évolution de la concentration en nitrites (—□— mg N-NO₂⁻ L⁻¹) et de la température (.....◇..... °C) en fonction du temps (heure).

6-3 Discussion

Dans toute réaction de dénitrification, l'ion nitrite représente un intermédiaire obligatoire entre le nitrate et le gaz azoté produit. Selon les conditions opératoires mises en jeu, la réduction des nitrates en gaz peut s'accompagner d'une accumulation transitoire de nitrites. Cette présence de nitrites est indésirable, surtout lors du traitement d'une eau de distribution, et peut être reliée à différents paramètres : le Δ pH, le Δ température, l'espèce bactérienne, le substrat carboné.

L'augmentation du pH pendant une douzaine d'heures amène une augmentation significative de la concentration résiduelle en nitrites, de l'ordre de 96 mg N-NO₂⁻ · L⁻¹ avec une biomasse alimentée avec un mélange d'AGV, et de quelques milligrammes par litre (1 à 6,6) avec une biomasse alimentée avec l'éthanol. Cette différence d'amplitude du pic nitrites peut s'expliquer par des impulsions pH de durée et d'amplitude différentes, des biomasses bactériennes et des charges volumiques appliquées (respectivement 0,72 et 0,23 g N-NO₃⁻ · L⁻¹ · j⁻¹) très différentes.

Tableau 6-4 : Comparaison des amplitudes des pics nitrites en fonction de l'alimentation de la culture bactérienne, de la charge volumique appliquée en nitrates (mg N-NO₂⁻ · L⁻¹ · j⁻¹), et proportion de cette charge réduite uniquement en nitrites.

Alim.	Durée moyenne du pulse (h)	Amplitude moyenne du pic nitrites (mg N-NO ₂ ⁻ · L ⁻¹)	Amplitude du pic nitrites en 24 h (mg N-NO ₂ ⁻ · L ⁻¹ · j ⁻¹)	Charge volumique appliquée (mg N-NO ₃ ⁻ · L ⁻¹ · j ⁻¹)	% de la charge appliquée réduite en nitrites
AGV	13	96	177	720	25
Éthanol	3	3	24	230	10

Le tableau 6-4 permet de comparer les amplitudes des pics nitrites en fonction à la fois du substrat carboné apporté à la biomasse bactérienne et de la charge volumique appliquée au système. Il apparaît qu'avec la culture alimentée avec les AGV 25 % de la charge entrante en nitrates est

“détournée” en nitrites accumulés, alors que seuls 10 % de la charge entrante en alimentation éthanol est accumulée en nitrites.

En parallèle à l'augmentation de la concentration en nitrites, une diminution de la concentration en nitrates est systématiquement observée. Dodd et Bone (1975) observent des résultats similaires aux nôtres, puisqu'avec une culture mixte alimentée avec de l'acétate ils notent une accumulation de nitrites de $120 \text{ mg N-NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$ à pH 8,5 alors qu'à pH 7 ou 7,5 la concentration résiduelle est de $10 \text{ mg N-NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$. Simultanément, ils ont déterminé que l'activité de la NiR décroît plus rapidement face à une augmentation du pH que celle de la NaR, ceci pouvant expliquer l'accumulation des nitrites. Merkel *et al.* (1993) confirment également nos résultats dans la mesure où ils constatent que la concentration en nitrites dans leur système (culture en continu, alimentation avec de l'éthanol) augmente de $1,6 \text{ mg N-NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$ en parallèle avec une augmentation du pH de 6,3 à 7,8. Blaszczyk *et al.* (1981) montrent également une augmentation du résiduel de nitrites (de $24 \text{ mg N-NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$ à $51 \text{ mg N-NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$) quand le pH augmente de 6,0 à 7,0.

En parallèle, les variations de la température jouent un rôle au moins aussi important que le pH sur l'accumulation transitoire de nitrites. Il est connu que toute espèce bactérienne possède une zone optimale de température pour sa croissance (Bergey's manual, 1986). Mais le rendement de dénitrification dépend lui aussi de la température. En l'état actuel de nos connaissances, aucun auteur n'a testé des variations de température sur l'accumulation des nitrites. Par contre, Dawson et Murphy (1972) ont testé sur *Pseudomonas denitrificans* deux températures différentes de culture : 5 et 27 °C. Les accumulations transitoires de nitrites sont peu différentes. Nos résultats semblent cohérents avec les leurs, puisque nous montrons que le résiduel de nitrites à 20 °C est identique à celui mesuré à 25 °C.

La nature de l'espèce bactérienne est également très importante sur l'accumulation des nitrites. Il est clair qu'une espèce possédant une nitrate réductase et pas de nitrite réductase réduira les nitrates stœchiométriquement en nitrites (c'est probablement le cas de *Comamonas testosteroni*, Richard et Kiredjian, 1992 ; Bergey's manual, 1984). Nous avons isolé des souches bactériennes incapables de réduire les nitrates au delà du stade nitrites : par exemple *Moraxella lacunata* profil 5 ; *Ochrobactrum anthropi* profil 9, *Comamonas testosteroni* profil 5b... (cf. Tableau 6-4). Cependant les deux premières espèces comportent des souches capables de dénitrifier jusqu'au stade gaz (cf. respectivement p14q et p2, tableau 6-5) ont pu perdre cette capacité (au cours des repiquages sur gélose nutritive) ou sont dans un état physiologique défectueux, alors que *Comamonas testosteroni* est intrinsèquement incapable de réaliser une telle réaction. Une culture bactérienne dénitrifiante composée de ces individus présentera donc probablement des nitrites résiduels, qui ne seront pas provoqués par des conditions environnementales défavorables ou variables (pH, température), mais seront simplement le reflet de la nature ces bactéries.

Tableau 6-5 : Réduction des nitrites de quelques espèces bactériennes isolées au cours de nos expériences en fonction de la source de carbone fournie, et comparaison avec les données du *Bergey's manual* (1984).

Nom	Profil n°	Substrat	NO ₂ ⁻ → gaz	
			Nos résultats	Bergey's
<i>Aeromonas salmonicida</i>	P13	Éthanol	-	+
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	P2	Éthanol	+	+
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	P14	Éthanol	-	+
<i>Comamonas testosteroni</i>	P5b	AGV	-	-
<i>Moraxella lacunata</i>	P5	AGV	-	+
<i>Moraxella lacunata</i>	P14q	AGV	+	+
<i>Pasteurella</i> gr. EF4	P5	Éthanol	-	+
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	P2	AGV	+	+
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	P2b	AGV	+	+
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	P8	Éthanol	+	+
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	P9	Éthanol	-	+
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	P6	Éthanol	-	+
<i>Pseudomonas vesicularis</i>	P11	Éthanol	-	+

Betlach et Tiedje (1981) ont montré que l'accumulation des nitrites dépendait de la souche bactérienne, par des vitesses de réaction différentes des nitrate et nitrite réductases : si la vitesse de réaction de la NaR est 5 fois inférieure à celle de la NiR, il n'y aura pas de nitrites accumulés dans le milieu ; par contre, si la vitesse de réaction de la NaR est 5 fois supérieure à celle de la NiR, il y aura réduction stœchiométrique des nitrates en nitrites (*i.e.* une fois que tous les nitrates ont été réduits en nitrites, alors seulement ces derniers commencent à être réduits en gaz). Bonin *et al.* (1987), Timmermans et Van Haute (1983) et Nishimura *et al.* (1980) confirment l'importance des vitesses de réaction des NaR et NiR respectivement chez *Pseudomonas nautica*, *Hyphomicrobium* spp. et *Pseudomonas denitrificans*.

La nature de la source de carbone intervient aussi sur la production de nitrites. L'acide acétique utilisé comme source de carbone avec une population mixte en batch amène une accumulation transitoire de nitrites supérieure à celle constatée avec l'éthanol (Blaszczyk *et al.*, 1980). Nous avons fait la même constatation dans le chapitre IV (Vitesses de dénitrification et de consommation de carbone), avec *Pseudomonas mendocina*. Les essais ont été réalisés en même temps, avec un inoculum bactérien identique et partagé en 4 fractions d'égal volume : seule la culture en présence d'acétate présente une accumulation transitoire de nitrites, les autres AGV n'induisant pas (ou peu) de nitrites accumulés. Par contre, Akunna *et al.* (1993) montrent que l'accumulation de nitrites est plus faible avec l'acétate qu'avec l'acide lactique, à la fois en terme de hauteur de pic (20 mg contre 110 mg N-NO₂⁻ · L⁻¹) qu'en terme de durée : en 40 heures il n'y a plus de nitrites avec l'acétate, il en faut 55 à l'acide lactique pour que tous les nitrites soient réduits en gaz. Blaszczyk (1993) démontre que l'accumulation transitoire de nitrites est maximale avec le méthanol et l'acétate de sodium, et plus faible avec l'éthanol chez *Paracoccus denitrificans*.

6-4 Conclusions

Tout au long des expériences présentées dans ce chapitre, nous nous sommes efforcés de créer des situations qui provoquaient une accumulation transitoire de nitrites. Il ressort très clairement que le ΔpH , le $\Delta\text{température}$, la souche bactérienne et la source de carbone influent directement sur la présence de nitrites, en culture batch comme en chemostat.

Plus précisément, nous avons tiré comme conclusions les points suivants :

(i) L'augmentation du pH en culture en continu provoque une augmentation de la concentration résiduelle en nitrites. Dans nos conditions expérimentales, une augmentation du pH de 1 unité provoque une augmentation de la concentration en nitrites de $177 \text{ mg N-NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$, ce qui correspond à 25 % de la charge volumique entrante (culture alimentée avec un mélange d'AGV) ou de $24 \text{ mg N-NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$, ce qui correspond à 10 % de la charge volumique entrante (culture alimentée avec de l'éthanol). Ces nitrites accumulés disparaissent soit par simple lessivage (alimentation AGV) soit par consommation par la biomasse bactérienne (alimentation éthanol) ;

(ii) La variation de température sur une culture en chemostat (alimentation éthanol) joue également un rôle dans l'accumulation des nitrites. Une augmentation de la température de 1°C amène une production de nitrites de $0,15 \text{ mg N-NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$. De plus, il apparaît que cette accumulation de nitrites dépend des variations de la température et non pas de la température elle-même (dans nos conditions expérimentales) ;

(iii) La souche bactérienne joue un rôle très important dans l'accumulation transitoire des nitrites. Il est même possible que le paramètre "souche bactérienne" soit le paramètre le plus important dans cette production de nitrites. Effectivement, il existe des souches qui de part leurs propriétés intrinsèques sont incapables de réduire les nitrates au delà du stade nitrites (par exemple *Comamonas testosteroni*). Il est donc clair que cette souche produit toujours des nitrites. Mais il y a aussi d'autres souches bactériennes qui, lorsqu'elles dénitrifient, produisent toujours des nitrites (en quantité stœchiométrique ou non) puis les réduisent en gaz. On peut citer à titre d'exemple *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*... Il existe enfin des souches qui peuvent perdre leurs propriétés dénitrifiantes à la suite de repiquages : *Pseudomonas stutzeri*. Ces espèces étant largement minoritaires dans le chemostat (elles représentent quelques pour cents du nombre total de bactéries), les nitrites résiduels sont à un niveau bas ($0,65 \text{ mg N-NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$), *i.e.* les nitrites produits sont consommés par les autres espèces dénitrifiantes.

(iv) Pour terminer, la nature du substrat carboné influence aussi directement la production transitoire de nitrites. Il semble en effet que l'acétate amène systématiquement une accumulation plus ou moins importante de nitrites dans le milieu de culture.

ANNEXES

Annexe 1 : Suivi du réacteur chemostat alimenté avec un mélange d'AGV pour les expériences pulse pH

Temps (jours)	DO	ET DO	N-NO ₃ ⁻ (mg/l)	ET NO ₃	N-NO ₂ ⁻ (mg/l)	ET NO ₂	N-NO _x (mg/l)	COT (mg/l)	ET COT	MES	pH
1	1,39	0,00	0	0,00	0,0945	0,00	0,0945	11,35	1,06	915	7,6
2	1,87	0,01	31,8	1,13	24,75	0,53	56,55	12,3	0,00	1085	7,3
3	1,78	0,00	53,8	0,42	6,6125	0,02	60,41	16,8	0,57	995	8,4
4			596,35	44,19	0,5175	0,00	596,87	513,75	9,55		7,25
6	1,93	0,01	396,95	1,91	335,3		732,25	47,85	6,43	1045	8,9
7	2,18	0,01	286,55	44,76	335,8	3,54	622,35	22,8	0,00	937,5	7,3
8	2,33	0,00	185,05	13,08	391,1	6,22	576,15	13,87	1,38		7,23
9			154,4		412,95	59,47	567,35	19,60	0,42	810	7,2
10	1,93	0,01	0	0,00	485,7		485,7	23,76	0,68	810	7,24
11	1,95	0,03	116,7	0,71	424,6	7,64	541,3	62	0,57		7,23
13	1,65	0,01	99,4	30,97	251,65	8,56	351,05	24,04		1200	7,2
14	1,81	0,00	65,45	0,00	227,35	6,58	292,8	28,76	2,63	890	7,25
15	1,89	0,01	153,85	59,04	200,25	4,03	354,1			845	7,25
16	1,95	0,00	149,65	32,60	179,15	1,20	328,8			1270	7,25
17	2,18	0,01	77,25	13,08	177,4	8,63	254,65				
19			224,55	24,11	104,05	1,91	328,6				7,3
20	2,17	0,00	200,55	15,49	101,2	1,70	301,75			1210	7,3
21	2,17	0,00	462,45	10,35	69	2,60	531,47	21,1		1230	7,3
22	2,14	0,01	374,95	22,35	41,7	1,27	416,65	24,5	0,10	1195	7,3
23			445,9	6,00	5	0,25	450,9				8,7
23,5	2,15	0,03	454,9	23,50	35,75	0,85					7,32
24			475,7	8,25	24,75	0,75	500,5				7,29
25			427,7	10,45	1,05	0,00	428,75				7,29
28	1,86	0,04	369,7	2,25	72,25	0,38	441,95	13,3	0,30		7,33
28,5	1,87	0,00	291,5	0,50	109,5	7,50	401				7,31
29	1,91	0,00	238	13,00	190	6,40	428	40,8	1,10	1100	7,29
29,5			275	23,50	205,3	4,30	480,3				7,25
30	2,10	0,01	209	11,50	196,6	5,60	405,6	12,5	0,50	830	7,3
30,5			230,9	1,01	171,7	3,20	402,6				
31	1,91	0,02	250	6,00	136	1,60	386				
32	1,77	0,01	328,6	14,80	14,06	0,31	343,4				7,15
33	1,66	0,00	217,2	2,75	72,75	18,20	289,95			895	7,15
34			253,7	7,15	67,7	1,90	321,4				7,25
34,5	1,62	0,01	181,67	17,00	75,66	0,10	257,33				7,2
35	1,51	0,00	75,7	21,45	151,25	0,50	226,95	59,2			8
35,5			137,05	1,65	121,7	4,00	258,75				7,2
36	1,63	0,01	129,4	13,75	95,75	1,50	225,15	46,4		920	7,3
36,5			190,6		68,5		259,1				7,3
37			52	5,50	226,6	14,10	278,6	38			8,61
37,5			81,6	4,40	191,5	4,00	273,1				7,26
38			88,75	12,60	160,6	3,30	249,35	15			7,22
41			0	0,00	182,65	2,95	182,65	26,5		895	7,3
42	2,01	0,02	7,7	3,70	200,66	10,50	208,36	16		1035	7,25
43	2,38	0,03	36,9	1,40	223	7,18	259,9	20,6		1055	7,31
43,5	2,40	0,01	55	1,00	194,2	5,40					7,27
44	2,22	0,00	0	0,00	335,8	3,50		13			8,83
44,5			25,8	10,00	295,6	9,00					7,33
45	2,53	0,01	135,2	37,70	295	4,40					7,31
46	2,52	0,01	81,5	16,00	258,6	2,40					7,8
48	1,81	0,00	32,9	8,80	215,1	8,10		24,8	0,50		8,26
49			19,1	0,50	223,8	2,25		11,2	0,80		7,3
50	1,74	0,00	135,2	33,40	219	1,25		10,6		619	7,25
51			189	4,45	229,2	2,30		11,2	1,30	815	7,2
52	1,17	0,01	263,2	12,80	251,4	1,03					

Annexe 2 : Suivi du réacteur chemostat alimenté avec l'éthanol pour les expériences de pulse pH.

Temps (jours)	DO	ET DO	N-NO ₃ ⁻ (mg/l)	ET NO ₃	N-NO ₂ ⁻ (mg/l)	ET NO ₂	COT (mg/l)	ET COT	MES	pH
0	0,821	0,005	25,9	0	3,9	0,125	37,3	0		8,45
1			69,1	4	1,15	0	112,7	0,15	283	6,95
2	0,915	0,02			0,06	0	411	10,15	450	7,7
3			1,01	0	0,048	0	26,42	0,176	713	7,78
4	1,729	0,035	0		0,07	0				7,63
5	1,726	0,015	0		0,1075	0				7,68
4,5					0,3275	0,0025				8,63
5,3			0							8,68
5,6					0,3025	0,0025				7,68
6	1,698	0,042	0		0,085	0	352,5	0		7,67
9					0,055	0				
10			0		0,05	0	425	4		7,63
11	1,907	0,015			0,065	0	463,3	6,15		7,65
12			0		0,095	0				7,63
12,5					0,12					8,63
13	1,854	0,004	0		0,055	0	472	0,8	840	7,68
16	1,758	0,023	0		0,225	0	255,2	1,3	1070	
17	2,017	0,015			0,16	0,005	92,9			7,73
18	1,936	0,034	0		0,26	0,005				7,61
18,1					0,13	0				7,62
18,3										8,62
18,4			0		1,665					7,59
19	2,046	0,016			0,12	0	78,4			7,73
19,2					6,825	0				8,73
19,4					0,135	0				7,6
20	1,455	0,013	0		0,3325	0,0025			970	7,58
24		0	77,9	3,4	0,3457	0				7,58
25					0,2	0				7,67
25,1			123	0	1,31					8,67
26	1,549	0,037	225	9	0,3725	0				7,65
26,1			215		1,79	0				8,65
26,3					0,375	0				7,6
27	1,456		249,3	6,05	0,25					7,42

Annexe 3 : Caractéristiques biochimiques (14 profils, de P1 à P14) d'après galeries API 20 NE des espèces bactériennes présentes dans la culture en continu alimentée avec de l'éthanol.

NaCl : croissance en présence de NaCl à 4 %

O129R : résistance au composé vibriostatique O129/R

Mac C : croissance sur milieu Mac Conkey

42 °C : croissance à 42 °C en bouillon nutritif

Glu a : assimilation du glucose avec production de gaz

Mob : mobilité

+ : résultat positif (croissance, souche mobile).

± : résultat indéterminé

- : résultat négatif (pas de croissance, souche non mobile).

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14
NO ₂	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+
N ₂	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
TRP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ADH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
URE	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
ESC	+	+	+	±	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
GEL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
PNPG	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+
Glu	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Ara	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
Mne	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+
Man	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+
Nag	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+
Mal	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+
Gnt	-	-	±	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+
Cap	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Adi	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
Mlt	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-
Cit	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pac	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
OXI	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl							-		-			+		
O129R							-							
Mac C		+	-		+	+				+		+		
42 °C							+							
Glu a														+
Mob										+		-	-	

Profil	Nombre de colonies	Espèce bactérienne
P1	1	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> (jaune citron)
P2	2	<i>Agrobacterium radiobacter</i> (incolore)
P3	1	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>
P4	2	<i>Ochrobactrum anthropi</i>
P5	1	<i>Pasteurella gr. EF4</i>
P6	1	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>
P7	1	<i>Ochrobactrum anthropi</i>
P8	1	<i>Ochrobactrum anthropi</i>
P9	1	<i>Ochrobactrum anthropi</i>
P10	13	<i>Pseudomonas sp</i>
P11	1	<i>Pseudomonas vesicularis</i>
P12	1	<i>Sphingomonas spiritivorum</i>
P13	1	<i>Aeromonas salmonicida</i> (incolore)
P14	2	<i>Agrobacterium radiobacter</i>

Annexe 4 : Évolutions des concentrations moyennes (n = 2) en nitrates (mg N-NO₃⁻ . L⁻¹), nitrites (mg N-NO₂⁻ . L⁻¹) et carbone (mg C . L⁻¹) lors des trois essais d'augmentation du pH sur le réacteur alimenté par un mélange d'AGV.

Essai 1 (réalisé à J34 - J35)

Temps (h)	pH	N-NO ₃ ⁻		N-NO ₂ ⁻		COT
		Moy	ET	Moy	ET	
0	9	181,7	17	75,7	0,1	21
12	8	75,7	21,45	151,25	0,5	43
13	7,15	48,8	0,55	142,3	0,025	
15	7,25	85,6	11,5	134,56	1,06	
17	7,32	97,7	11	142,1	0,5	59,2
19	7,2	77,75	0	125,7	0,8	
22,5	7,2	117,95	9,85	105,8	1,42	
24	7,2	137,05	1,65	121,7	4,4	32,8
37,5	7,3	129,4	13,75	95,75	1,5	46,4
44	7,3	190,57	18,65	68,5	3,3	18,5

Essai 2 (réalisé à J36 - J37)

Temps (h)	pH	N-NO ₃ ⁻		N-NO ₂ ⁻		COT
		Moy	ET	Moy	ET	
0	9	190,6	18,65	68,5	3,3	18,5
13	8,61	52	5,5	226,6	14,6	38
14	7,28	30,75	3,85	232	1,45	
16	7,29	95	9,9	215,4	3,7	22,6
18	7,27	24,4	6,6	231,6	1,9	
19,5	7,17	30,4	13,2	230,1	7,9	34
21,5	7,26	81,6	4,4	191,5	4	
37	7,21	101	27,5	167,6	2,4	
39,5	7,22	88,75	12,6	160,6	3,3	17,5
43	7,19	89,9	6,6	156	3,8	14,4
44,5	7,27	89,5	15,6	155,4	2,5	

Essai 3 (réalisé à J43 - J44)

Temps (h)	pH	N-NO ₃ ⁻		N-NO ₂ ⁻		COT
		Moy	ET	Moy	ET	
0	9	55	1	194,2	5,4	20,6
15	8,83	2,9	2,9	335,8	3,5	13
16	7,34	27,1	0	309,3	3,2	14,8
18	7,32	34,5	11	291,3	1,05	13,8
21	7,33	25,8	10	295,6	9	
23	7,3	62,2	7,5	319	13,6	
26	7,3	40,8	3,3	317,4	9,1	
37,5	7,31	135,2	37,7	295	4,4	
40	7,3	51,3	9,3	310	2,8	
47,5	7,2	57,1	10	284,8	2,7	
62,5	7,8	81,3	16	258,6	2,4	

Annexe 5 : Évolutions des concentrations moyennes (n = 2) en nitrates (mg N-NO₃⁻ . L⁻¹) et en nitrites (mg N-NO₂⁻ . L⁻¹) lors des trois essais d'augmentation du pH sur le réacteur alimenté par l'éthanol (nm : non mesuré).

Temps (heures)	ESSAI 1		ESSAI 2			ESSAI 3		
	pH	N-NO ₂ ⁻	pH	N-NO ₂ ⁻	N-NO ₃ ⁻	pH	N-NO ₂ ⁻	N-NO ₃ ⁻
0	7,73	0,28	7,67	0,20	nm	7,65	0,40	225
1	8,73	3,83	8,67	1,31	123	8,65	1,55	nm
2	8,73	5,54	8,67	0,7	110	8,65	1,79	215
3	8,73	6,83	8,67	0,69	140	8,65	1,45	225
4	7,58	5,51	7,71	0,24	155	7,6	0,40	nm
5	7,57	4,13	7,70	0,20	150	7,54	0,21	244
6	7,59	2,25	7,69	0,15	nm	7,54	0,09	nm
7	7,59	0,28	7,68	0,22	nm	7,55	0,2	240
8	7,60	0,18	7,66	0,12	166			
9	7,60	0,14						

Annexe 6 : Suivi du réacteur chemostat alimenté avec l'éthanol pour les expériences de variation de la température.

Temps (jours)	N-NO ₃ ⁻ (mg/l)	ET NO ₃	N-NO ₂ ⁻ (mg/l)	ET NO ₂	COT (mg/l)	ET COT	MES	ET
0	0	0,00	0,000	0,00	58,98	0,39		
4	123	2,19	3,370	0,05	341,70	1,98	1462	11
11	0	0,00	0,108	0,00	215,45	1,34	1985	14
14	0	0,00	0,113	0,00	176,05	6,15	2082	39
18	0	0,00	0,123	0,00	164,45	1,91	2160	85
19	0	0,00	0,130	0,01	207,65	0,49	1845	71
20	0	0,00	0,118	0,00	202,15	2,90	1765	49
21	0	0,00	0,120	0,01	197,10	0,28	1785	78
22	0	0,00	0,100	0,01	200,05	2,05	1675	21
25	0	0,00	0,098	0,00	139,30	1,56	1774	105
26	0	0,00	0,095	0,00	145,85	3,75	1615	276
27	0	0,00	0,075	0,00	153,55	3,04	1710	14
28	0	0,00	0,085	0,00	147,45	9,12	1900	42
32	0	0,01	0,090	0,01	141,40	3,82	1860	28
36	0	0,01	0,098	0,01	152,05	0,92	1880	42
39	0	0,00	0,083	0,00	145,75	2,19	1870	14
46	0	0,00	0,080	0,00	141,80	4,38	1890	28
53	0	0,00	0,078	0,00	150,85	4,88	1860	28
57	0	0,00	0,070	0,00				
58	0	0,00	0,08	0,00				
59			0,075	0,00				

Annexe 7 : Évolutions des concentrations en nitrites ($\text{mg N-NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$) en fonction de temps (heure) lors des quatre essais d'augmentation de température ($^\circ\text{C}$) sur le réacteur alimenté avec l'éthanol.

Temps	Essai 1 (J27)		Essai 2 (J28)		Essai 3 (J32)		Essai 4 (J36)	
	t°	N-NO_2^-	t°	N-NO_2^-	t°	N-NO_2^-	t°	N-NO_2^-
0	20,5	0,075	20,5	0,085	20	0,09	20	0,085
1	28	1,345	27	0,631	25	0,76	23	0,47
2	28	1,465	27	0,5	25,5	0,75	25	0,65
3	28	1,525	26	0,394	25,5	0,78	26	0,78
4	27,5	1,535	25	0,381	25	0,74	27	0,9
5	26	1,415	24,5	0,387	24	0,69	27	0,88
6	25	1,25	24	0,35	23	0,6	25	0,64
7	24	0,955	23	0,319	22	0,56	23	0,45
8	23	0,865	22	0,312	21	0,37	22	0,34
9	22	0,755	21	0,294			21	0,25

CHAPITRE VII :

CONCLUSIONS
GENERALES

L'objectif principal de ce travail était de choisir, parmi les acides acétique, propionique, butyrique et valérique, lequel possédait la meilleure efficacité de dénitrification, à la fois en terme de vitesse et de quantité, avec si possible le rendement de croissance le plus faible, en vue d'une utilisation en station d'épuration.

Pour pouvoir mesurer des vitesses de dénitrification à partir d'inocula bactériens identiques d'une expérience sur l'autre, il a été nécessaire de réaliser une culture en continu alimentée avec les 4 AGV et maintenue à l'état pseudo stationnaire pendant 18 mois. Cette culture a été caractérisée en terme d'espèces bactériennes majoritaires, ainsi qu'en terme de constantes cinétiques. Une dizaine d'espèces cohabitent ensemble, avec entre autre *Alcaligenes*, *Ochrobactrum anthropi* et *Pasteurella*, qui sont largement connues comme étant dénitrifiantes. Le temps de résidence hydraulique (TRH) du réacteur conditionne directement la composition de la biomasse mixte ; plus le TRH diminue, moins il reste d'espèces différentes. A TRH = 0,85 jours, il ne reste plus qu'une seule espèce bactérienne dans le chemostat : *Paracoccus denitrificans*. Le TRH a également une influence importante sur la répartition des espèces, puisque plus il diminue, plus la proportion d'espèces dénitrifiant jusqu'au stade gaz augmente, au détriment des espèces s'arrêtant au stade nitrites. Enfin, au sein d'un mélange aussi complexe que celui du chemostat, les espèces bactériennes conservent leurs propriétés intrinsèques, puisqu'une souche connue pour réduire les nitrates uniquement en nitrites (*Comamonas testosteroni*) a été mise en évidence.

Dans un deuxième temps, les vitesses de dénitrification et de consommation du carbone ont été déterminées, avec les 4 AGV testés indépendamment les uns des autres ainsi qu'en mélange équimolaire des 4. Il est clair, que les conditions initiales soient en carbone limitant (*i.e.* C/N initial = 0,3) ou en nitrate limitant (*i.e.* C/N initial = 2,9), que l'acétate, le butyrate et le valérate sont consommés à la même vitesse spécifique, soit environ $60 \text{ mg C g}^{-1} \text{ MES} \cdot \text{h}^{-1}$. Le propionate est consommé environ 10 fois moins vite. Par contre, les vitesses de dénitrification dépendent étroitement des conditions expérimentales, puisqu'en carbone limitant les nitrates sont réduits en nitrites, et ceux ci sont accumulés sans être consommés ultérieurement. En condition de nitrates limitant, quel que soit l'AGV considéré (sauf le propionate) les vitesses de dénitrification sont identiques, soit $20 \text{ mg N-NO}_x \cdot \text{g}^{-1} \text{ MES} \cdot \text{h}^{-1}$. Ce résultat est assez surprenant eu égard aux états d'oxydation moyen du carbone propres à chaque AGV : 0 pour l'acétate, -0,67 pour le propionate, -1 pour le butyrate et -1,2 pour le valérate. Ce résultat s'explique par le fait que le valérate est l'AGV qui induit la production de biomasse maximale, et l'acétate qui en produit le moins. Dans le même temps un bilan électrons entre le début et la fin des expériences a été effectué, pour vérifier la validité de nos hypothèses et de nos mesures. Avec l'acétate le bilan est bouclé à 91 %, tandis qu'il ne l'est qu'à 78 % avec le mélange des 4 AGV, et l'est à environ 82 % avec les trois autres AGV. En posant quelques hypothèses concernant la composition élémentaire de la biomasse bactérienne, il est possible de ramener ces chiffres respectivement à 96 %, 85 % et environ 90 %, ce qui signifie que l'erreur expérimentale varie entre 5 à 15 %.

Enfin, quatre paramètres au moins ont une influence directe sur l'accumulation transitoire de nitrites : les variations du pH, de la température, la nature de la souche bactérienne et la source de carbone pour la biomasse dénitrifiante.

(i) L'augmentation brutale du pH induit une augmentation de la concentration résiduelle des nitrites. Dans nos conditions expérimentales, une augmentation du pH de 1 unité provoque une augmentation de la concentration en nitrites de $177 \text{ mg N-NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$, ce qui correspond à 25 % de la charge volumique entrante (culture alimentée avec un mélange d'AGV) ou de $24 \text{ mg N-NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$, ce qui correspond à 10 % de la charge volumique entrante (culture alimentée avec de l'éthanol). Ces nitrites accumulés disparaissent de la culture soit par simple lessivage (alimentation AGV) soit par consommation par la biomasse bactérienne (alimentation éthanol).

(ii) Dans un second temps nous avons montré que la variation de température sur une culture en chemostat joue également un rôle dans l'accumulation des nitrites. Une augmentation de la température de $1 \text{ }^\circ\text{C}$ amène une production de nitrites de $0,15 \text{ mg N-NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$. Cette accumulation de nitrites dépend des variations de la température et non de la température elle-même, dans la limite des essais effectués (*i.e.* augmentation de 19 à 27 $^\circ\text{C}$).

(iii) Certaines souches présentes dans la culture bactériennesl sont incapables de par leurs propriétés intrinsèques de réduire les nitrates au delà du stade nitrites (par exemple *Comamonas testosteroni*). Il est donc clair que cette souche produit toujours des nitrites. Cette souche minoritaire dans le réacteur chemostat (elle représente environ 3 % de la population bactérienne totale) n'amène pas d'accumulation de nitrites dans la culture en continu, *i.e.* ces nitrites sont consommés par d'autres espèces dénitrifiantes.

(iv) Enfin l'acétate amène systématiquement dans nos expériences une accumulation plus ou moins importante de nitrites dans le milieu de culture.

Ainsi, dans la mesure où les vitesses de dénitrification sont identiques avec l'acétate, le butyrate et le valérate, si le principal objectif du procédé industriel est d'éliminer rapidement les nitrates et de produire peu de biomasse bactérienne, l'acétate est le substrat carboné le plus indiqué. Par contre, si l'accumulation de nitrites est à éviter impérativement, le butyrate ou le valérate devront être préférentiellement utilisés à l'acétate.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Abraham Z.H.L., D.J. Lowe and B.E. Smith, 1993, Purification and characterization of the dissimilatory nitrite reductase from *Alcaligenes xylosoxidans subsp. xylosoxidans* (NCIMB 11015) - Evidence for the presence of both type-1 and type-2 copper centres, *Biochem.J.*, **295**, 587-593.
- Abufayed A.A. and E.D. Schroeder, 1986, Kinetics and stoichiometry of SBR/denitrification with a primary sludge carbon source, *J. Water Poll. Control Fed.*, **58**, 398-404.
- Akunna J.C., C. Bizeau and R. Moletta, 1993, Nitrate and nitrite reductions with anaerobic sludge using various carbon sources - glucose, glycerol, acetic acid, lactic acid and methanol, *Water Res.*, **27**, 1303-1312.
- Alefounder P.R., J.E.G. McCarthy and S.J. Ferguson, 1981, The basis of the control of nitrate reduction by oxygen in *Paracoccus denitrificans*, *FEMS Microbiol. Lett.*, **12**, 321-326.
- Arai H., Y. Igarashi and T. Kodama, 1991, Nitrite activates the transcription of the *Pseudomonas aeruginosa* nitrite reductase and cytochrome c-551 operon under anaerobic conditions, *FEBS Lett.*, **288**, 227-228.
- Argaman Y., 1986, Nitrogen removal in a semi-continuous process, *Water Res.*, **20**, 173-183.
- Arquiaga M.C., L.W. Canter and D.A. Sabatini, 1993, Microbiology of high-sodium-nitrite-wastewater treatment, *Environ. Pollut.*, **81**, 1-6.
- Batteley E.H., 1991, Calculation of the heat of growth of *Escherichia coli* K-12 on succinic acid, *Biotech. Bioeng.*, **37**, 334-343.
- Beauchamp E.G. and S. Dorland, 1991, Volatile fatty acid production with alfalfa (*Medicago sativa*) and glucose in denitrifying soil at different temperatures, *Biol. Fertil. Soils*, **12**, 195-198.
- Beccari M., R. Passino, R. Ramadori and V. Tandoi, 1983, Kinetics of dissimilatory nitrate and nitrite reduction in suspended growth culture, *J. Water Poll. Control Fed.*, **55**, 58-64.
- Bergey's manual of systematic bacteriology, volumes 1, 2, 3, 4, 1984, Holt J.C. (Ed), Williams and Wilkins, Baltimore and London.
- Betlach M.R., 1982, Evolution of bacterial denitrification and denitrifier diversity, *Antonie van Leeuwenhoek*, **48**, 585-607.
- Betlach M.R. and J.M. Tiedje, 1981, Kinetic explanation for accumulation of nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide during bacterial denitrification, *Appl. Environ. Microbiol.*, **42**, 1074-1084.
- Blackburn T.H. and N.D. Blackburn, 1992, Model of nitrification and denitrification in marine sediments, *FEMS Microbiol. Lett.*, **100**, 517-521.
- Blasco F., C. Iobbi, G. Giordano, M. Chippaux and V. Bonnefoy, 1989, Nitrate reductase of *Escherichia coli* : completion of the nucleotide sequence of the nar operon and reassessment of the role of the alpha and β subunits in iron binding and electron transfer, *Mol. Gen. Genet.*, **218**, 249-256.
- Blaszczyk M., 1992, Comparison of denitrification by *Paracoccus denitrificans*, *Pseudomonas stutzeri* and *Pseudomonas aeruginosa*, *Acta Microbiol. Polon.*, **41**, 203-210.
- Blaszczyk M., 1993, Effect of medium composition on the denitrification of nitrate by *Paracoccus denitrificans*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 203-210.
- Blaszczyk M., M. Przytocka-Jusiak, U. Kruszewska and R. Mycielski, 1981, Denitrification of high concentrations of nitrites and nitrates in synthetic medium with different sources of organic carbon I. acetic acid, *Acta Microbiol. Polon.*, **30**, 49-58.
- Blaszczyk M., R. Mycielski, H. Jaworowska-Deptuch and K. Brzostek, 1980, Effect of various sources of organic carbon and high nitrite and nitrate concentrations on the selection of denitrifying bacteria. I. Stationary cultures, *Acta Microbiol. Polon.*, **29**, 397-406.
- Bode H., C.F. Seyfried and A. Kraft, 1987, High-rate denitrification of concentrated nitrate wastewater, *Water Sci. Tech.*, **19**, 163-174.
- Bonin P., M. Gilewicz and J.C. Bertrand, 1987, Denitrification by a marine bacterium *Pseudomonas nautica* strain 617, *Ann. Inst. Pasteur/Microbiol.*, **138**, 371-383.

- Bonin P., M. Gilewicz and J.C. Bertrand, 1989, Effects of oxygen on each step of denitrification on *Pseudomonas nautica*, *Can. J. Microbiol.*, **35**, 1061-1064.
- Bonin P. and N. Raymond, 1990, Effects of oxygen on denitrification in marine sediments, *Hydrobiol.*, **207**, 115-122.
- Boogerd F.C., H.W. Van Verseveld and A.H. Stouthamer, 1981, Respiration-driven proton translocation with nitrite and nitrous oxide in *Paracoccus denitrificans*, *Biochim. Biophys. Acta*, **638**, 181-191.
- Boogerd F.C., H.W. Van Verseveld and A.H. Stouthamer, 1983, Dissimilatory nitrate uptake with *Paracoccus denitrificans* via a μH^+ dependent system and a nitrate-nitrite antiport system, *Biochim. Biophys. Acta*, **723**, 415-427.
- Bradley P.M., M. Fernandez and F.H. Chapelle, 1992, Carbon limitation of denitrification rates in an anaerobic groundwater system, *Environ. Sci. Technol.*, **26**, 2377-2381.
- Braun C. and W.G. Zumft, 1991, Marker exchange of the structural genes for nitric oxide reductase blocks the denitrification pathway of *Pseudomonas stutzeri* at nitric oxide, *J. Biol. Chem.*, **266**, 22785-22788.
- Braun C. and W.G. Zumft, 1992, The structural genes of the nitric oxide reductase complex from *Pseudomonas stutzeri* are part of a 30-kilobase gene cluster for denitrification, *J. Bacteriol.*, **174**, 2394-2397.
- Carlson C.A. and J.L. Ingraham, 1983, Comparaison of denitrification by *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Paracoccus denitrificans*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 1247-1253.
- Carr G.J. and S.J. Ferguson, 1990, The nitric oxide reductase of *Paracoccus denitrificans*, *Biochem. J.*, **269**, 423-429.
- Chen K.C. and Y.F. Lin, 1993, The relationship between denitrifying bacteria and methanogenic bacteria in a mixed culture system of acclimated sludges, *Water Res.*, **27**, 1749-1759.
- Chiang R.C., R. Cavicchioli and R.P. Gunsalus, 1992, Physical map location of the narQ gene of *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, **174**, 7882.
- Christensen M.H., 1975, Denitrification of sewage by alternating process operation, *Prog. Water Technol.*, **7**, 339-347.
- Christensen M.H. and P. Harremoës, 1977, Biological denitrification of sewage : a literature review, *Prog. Water Technol.*, **8**, 509-555.
- Chudoba J., 1991, Operational experience with an anoxic selector treating rendering-plant wastewaters, *Water Sci. Tech.*, **24**, 1-7.
- Claus G. and H.J. Kützner, 1985, Physiology and kinetics of autotrophic denitrification by *Thiobacillus denitrificans*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **22**, 283-288.
- Cole J., 1991, The environmental implications of the biological nitrogen cycle, *International Symp. Environ. Biotechnol., part I*, Oostende (Belgium), 27-35.
- Collin J.F., J.C. Block, M.A. Imbs and P. Laban, 1979, Contribution à l'étude des bactéries aérobies hétérotrophes d'une boue activée, *Journal Français d'Hydrologie*, **10**, 47-58.
- Coyle C.L., W.G. Zumft, P.M.H. Kroneck, H. Korner and W. Jacob, 1985, Nitrous oxide reductase from denitrifying *Pseudomonas perfectomarina*. Purification and properties of a novel multicopper enzyme, *Eur. J. Biochem.*, **153**, 459-467.
- Coyne M.S., A. Arunakumari, R.A. Averill and J.M. Tiedje, 1989, Immunological identification and distribution of dissimilatory heme cd1 and nonheme copper nitrite reductases in denitrifying bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 2924-2931.
- Coyne M.S. and J.A. Tiedje, 1990, Distribution and diversity of dissimilatory NO₂-reductases in denitrifying bacteria, in *Denitrification in soil and sediment*, Revsbech N.P. and J. Sorensen (Eds), Plenum Press, New York and London, 21-35.
- Dalientoft E., 1991, Biological treatment of a high strength nitrogen wastewater, *International Symp. Environ. Biotechnol., part I*, Oostende (Belgium), 45-48.

- Dawson R.N. and K.L. Murphy, 1972, The temperature dependency of biological denitrification, *Water Res.*, **6**, 71-83.
- Delachapelle S., M. Renaud and P. Vignais, 1991, Etude de la production d'hydrogène en bioréacteur par la bactérie photosynthétique *Rhodobacter capsulatus*. 2. Transformation du lactate et bilans carbonés, *Revue des Sciences de l'Eau*, **4**, 101-120.
- Delwiche C.C. (Ed.), 1981, Denitrification, nitrification, and atmospheric nitrous oxide, John Wiley & Sons, New York. Chichester. Brisbane. Toronto.
- Dermastia M., T. Turk and T.C. Hollocher, 1991, Nitric oxide reductase - Purification from *Paracoccus denitrificans* with use of a single column and some characteristics, *J. Biol. Chem.*, **266**, 10899-10905.
- Dias F.F. and J.V. Bhat, 1964, Microbial ecology of activated sludge I: dominant bacteria, *Appl. Microbiol.*, **12**, 412-417.
- Dodd D.J.R. and D.H. Bone, 1975, Nitrate reduction by denitrifying bacteria in single and two stage continuous flow reactors, *Water Res.*, **9**, 323-328.
- Dubourdieu M. and J.A. Demoss, 1992, The narJ gene product is required for biogenesis of respiratory nitrate reductase in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, **174**, 867-872.
- Egan S.M. and V. Stewart, 1990, Nitrate regulation of anaerobic respiratory gene expression in NarX deletion mutants of *Escherichia coli* K12, *J. Bacteriol.*, **172**, 5020-5029.
- Fenchel T. and T.H. Blackburn (Eds), 1979, The nitrogen cycle, in *Bacteria and mineral cycling*, Academic Press London New York, 101-126.
- Fillery I.R.P., 1983, Chap. 2, Biological denitrification, 33-64.
- Firestone M.K., R.B. Firestone and J.M. Tiedje, 1979, Nitric oxide as an intermediate in denitrification : evidence from nitrogen-13 isotope exchange, *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **91**, 10-16.
- Francis C.W. and J.B. Mankin, 1977, High nitrate denitrification in continuous flow-stirred reactors, *Water Res.*, **11**, 289-294.
- Francis C.W. and M.W. Callahan, 1975, Biological denitrification and its application in treatment of high-nitrate waste water, *J. Environ. Qual.*, **4**, 153-163.
- Gottschalk G. (Ed), 1986, *Bacterial metabolism*, Springer-Verlag, New York Berlin Heidelberg Tokyo.
- Gourdon R., C. Comel, P. Vermande and J. Veron, 1989, Kinetics of acetate, propionate and butyrate removal in the treatment of a semi-synthetic landfill leachate on an anaerobic filter, *Biotech. Bioeng.*, **33**, 1167-1181.
- Grabinska-Loniewska A., 1991, Biocenosis diversity and denitrification efficiency, *Water Res.*, **25**, 1575-1582.
- Grady C.Pl. Jr and H.C. Lim (Eds), 1980, Denitrification, chap. 22, in *Biological wastewater treatment. Theory and applications*, Marcel Dekker Inc., New York and Basel, 887-923.
- Gunsalus R.P., 1992, Control of electron flow in *Escherichia coli* : coordinated transcription of respiratory pathway genes, *J. Bacteriol.*, **174**, 7069-7074.
- Hall T., Biological denitrification for potable water treatment, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **54**, 185-186.
- Hamon M., 1990, Etude d'un procédé de dénitrification "in situ" des eaux souterraines, *Thèse de Doctorat*, Université Paul Sabatier, Toulouse, 150 p.
- Hamon M. and E. Fustec, 1991, Laboratory and field study of an insitu groundwater denitrification reactor, *J. Water Poll. Control Fed.*, **63**, 942-949.
- Hansson B. and L. Gunnarson, 1990, The use of industrial by-products as a carbon source for denitrification, in *Chemical water and wastewater treatment*, Hahn H.H. and R. Klute (Eds), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 531-541.

- Hantula J., Kurki A., Vuoriranta P. and Bamford D.H., 1991, Rapid classification of bacterial strains by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis : population dynamics of the dominant dispersed phase bacteria of activated sludge, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **34**, 551-555.
- Heiss B., K. Frunzke and W.G. Zumft, 1989, Formation of the N-N bond from nitric oxide by a membrane bound cytochrome bc complex of nitrate-respiring (denitrifying) *Pseudomonas stutzeri*, *J. Bacteriol.*, **171**, 3288-3297.
- Henry Y. and P. Bessieres, 1984, Denitrification and nitrite reduction : *Pseudomonas aeruginosa* nitrite-reductase, *Biochimie*, **66**, 259-289.
- Henze M. and P. Harremoës, 1990, Chemical-biological nutrient removal. The HYPRO concept, in *Chemical water and wastewater treatment*, Hahn H.H. and R. Klute (Eds), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 499-510.
- Henze M., G.H. Kristensen and R. Strube, 1993, Rate-capacity characterization of wastewater for nutrient removal processes, *Conférence IAWQ AGHTM*, "Les microorganismes dans les boues activées et les biofilms", 27-28 septembre, 101-107.
- Heppner B., G. Zellner and H. Diekmann, 1992, Start-up and operation of a propionate-degrading fluidized-bed reactor, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **36**, 810-816.
- Hernandez D. and J.J. Rowe, 1987, Oxygen regulation of nitrate uptake in denitrifying *Pseudomonas aeruginosa*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 745-750.
- Hochstein L.I. and G.A. Tomlinson, 1988, The enzymes associated with denitrification, *Annu. Rev. Microbiol.*, **42**, 231-261.
- Hochstein L.I., M. Betlach and G. Kritikos, 1984, The effect of oxygen on denitrification during steady-state growth of *Paracoccus halodenitrificans*, *Arch. Microbiol.*, **137**, 74-78.
- Hoffmann E. and R. Klute, 1990, Improving the denitrification potential in biological wastewater treatment by dosing carbon from sludge hydrolysis, in *Chemical water and wastewater treatment*, Hahn H.H. and R. Klute (Eds), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 543-560.
- Hollo J. and Czako L., 1987, Nitrate removal from drinking water in a fluidized-bed biological denitrification reactor, *Acta Biotechnol.*, **7**, 417-423.
- Holmes B., M. Popoff, M. Kiredjian and K. Kersters, 1988, *Ochrobactrum anthropi* gen. nov., sp. nov. from human clinical specimens and previously known as group Vd, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **38**, 406-416.
- Hooijmans C.M., S.G. Geraats, E.W. Van Niel, L.A. Robertson, J.J. Heijnen and K. Luyben, 1990, Determination of growth and coupled nitrification/denitrification by immobilized *Thiosphaera pantotropha* using measurement and modeling of oxygen profiles, *Biotech. Bioeng.*, **36**, 931-939.
- Hoover S.R. and N. Porges, 1952, Assimilation of dairy wastes by activated sludge. II The equation of synthesis and rate of oxygen utilization, *Sew. Ind. Wastes J.*, **24**, 306-312.
- Huang J.Y.C. and D.M. Drew, 1985, Investigation of the removal of organics and nitrogen in an oxidation ditch, *J. Water Poll. Control Fed.*, **57**, 151-156.
- Ingledeu W.J. and R.K. Poole, 1984, The respiratory chains of *Escherichia coli*, *Microbiol. Rev.*, **48**, 222-271.
- Jannasch H.W., 1965, Continuous culture in microbial ecology, *Lab. Pract.*, **14**, 1162-1167.
- Jannasch H.W., 1967, Enrichments of aquatic bacteria in continuous culture, *Arch. Microbiol.*, **59**, 165-173.
- Jannasch H.W. and R.I. Mateles, 1974, Experimental bacterial ecology studied in continuous culture, 165-212.
- John P., 1977, Aerobic and anaerobic bacterial respiration monitored by electrodes, *J. Gen. Microbiol.*, **98**, 231-238.
- Jorand F., P. Guicherd, V. Urbain, J. Manem and J.C. Block, 1994, Hydrophobicity of activated sludge flocs and laboratory grown bacteria, *Water Sci. Tech.*, in press.

- Jorgensen P.E., 1990, Biological hydrolysis of sludge from primary precipitation, *Chemical water and wastewater treatment*, Hahn H.H. and R. Klute (Eds), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 511-520.
- Kapralek F., E. Jechova and M. Otavova, 1982, Two sites of oxygen control induced synthesis of respiratory nitrate reductase in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, **149**, 1142-1145.
- Kavanaugh R.G. and C.W. Randall, 1993, Bacterial populations in a biological nutrient removal plant, Conférence IAWQ AGHTM, "Les microorganismes dans les boues activées et les biofilms", 27-28 septembre, 29-38.
- Kawakami Y., B. Pacaud and H. Nishimura, 1985, Inhibition of denitrification by oxygen in *Paracoccus denitrificans*, *J. Ferment. Technol.*, **63**, 437-442.
- Klapwijk A., J.C.M. Van Der Hoeven and G. Lettinga, 1981, Biological denitrification in an upflow sludge blanket reactor, *Water Res.*, **15**, 1-6.
- Knowles R., 1982, Denitrification, *Microbiol. Rev.*, **46**, 43-70.
- Koike I. and A. Hattori, 1975, Energy yield of denitrification : an estimate from growth yield in continuous cultures of *Pseudomonas denitrificans* under nitrate-, nitrite- and nitrous oxide-limited conditions, *J. Gen. Microbiol.*, **88**, 11-19.
- Koike I. and A. Hattori, 1975, Growth yield of a denitrifying bacterium, *Pseudomonas denitrificans*, under aerobic and denitrifying conditions, *J. Gen. Microbiol.*, **88**, 1-10.
- Kolesnikow T., I. Schroder and R.P. Gunsalus, 1992, Regulation of narK gene expression in *Escherichia coli* in response to anaerobiosis, nitrate, iron, and molybdenum, *J. Bacteriol.*, **174**, 7104-7111.
- Körner H. and W.G. Zumft, 1989, Expression of denitrification enzymes in response to the dissolved oxygen level and respiratory substrate in continuous culture of *Pseudomonas stutzeri*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 1670-1676.
- Kralova M., P.H. Masscheleyn, C.W. Lindau and W.H. Patrick, 1992, Production of dinitrogen and nitrous oxide in soil suspensions as affected by redox potential, *Water Air and Soil Pollution*, **61**, 37-45.
- Kristjansson J.K. and T.C. Hollocher, 1981, Partial purification and characterization of nitrous oxide reductase from *Paracoccus denitrificans*, *Current Microbiol.*, **6**, 247-251.
- Kristjansson J.K., B. Walter and T.C. Hollocher, 1978, Respiration-dependent proton translocation and the transport of nitrate and nitrite in *Paracoccus denitrificans* and other denitrifying bacteria, *Biochem.*, **17**, 5014-5019.
- Kuenen J.G. and W. Harder, 1982, Microbial competition in continuous culture, in *Experimental microbial ecology*, Burns R.G. and J.H. Slater (Eds), Blackwell Scientific Publications, London, 342-367.
- Kurt M., I.J. Dunn and J.R. Bourne, 1987, Biological denitrification of drinking water using autotrophic organisms with H₂ in a fluidized-bed biofilm reactor, *Biotech. Bioeng.*, **29**, 493-501.
- Lazarova V., B. Capdeville and L. Nikolov, 1991, Influence of seeding conditions on nitrite accumulation in a fluidized bed biofilm reactor for drinking water denitrification, *Water Res.*, submitted.
- Lehninger A.L. (Ed), 1985, Transport des électrons, phosphorylation oxydative et régulation de la production d'ATP, chapitre 17, in *Principes de biochimie*, Flammarion médecine-sciences, Paris, 467-510.
- Lin C.Y., K. Sato, T. Noike and J. Matsumoto, 1986, Methanogenic digestion using mixed substrate of acetic, propionic and butyric acids, *Water Res.*, **20**, 385-394.
- Lloyd D., L. Boddy and K.J.P. Davies, 1987, Persistence of bacterial denitrification capacity under aerobic conditions : the rule rather the exception, *FEMS Microbiol. Ecol.*, **45**, 185-190.
- Lynch J.M. and N.J. Poole (Eds), 1979, Microbial population and community dynamics, chapitre 2.3, in *Microbial ecology, a conceptual approach*, Blackwell Scientific Publications, London, 45-63.

- Mancinelli R.L. and L.I. Hochstein, 1986, The occurrence of denitrification in extremely halophilic bacteria, *FEMS Microbiol. Lett.*, **35**, 55-58.
- Manoharan R., S. Liptak, P. Parkinson and D. Mavrinic, 1989, Denitrification of a high ammonia leachate using an external carbon source, *Environ. Technol. Lett.*, **10**, 707-716.
- Mariotti A., 1986, La dénitrification dans les eaux souterraines, principes et méthodes de son identification : une revue, *J. Hydrol.*, **88**, 1-23.
- Martin G. (Ed), 1979, Le problème des nitrates dans les eaux, *Tec. et Doc.*, Lavoisier, Paris, 279 p.
- Matsubara T., 1971, Studies on denitrification. XIII. Some properties of the N₂O-anaerobically grown cell, *J. Biochem.*, **69**, 991-1001.
- McCarty P.L., 1969, Energetics and bacterial growth, *Fifth Rudolph Res. Conf.*, Rutgers. New Brunswick New Jersey.
- McCarty P.L., 1972, Stoichiometry of biological reactions, in *International conf. "toward a unified concept of biological waste treatment design"*, Atlanta, Georgia.
- McCarty G.W. and J.M. Bremner, 1993, Factors affecting the availability of organic carbon for denitrification of nitrate in subsoils, *Biol. Fertil. Soils*, **15**, 132-136.
- Megusar F., I. Mahne, P. Cadez and I. Mandic, 1986, Development of NR and NiR in respiratory nitrate consumption of nitrate and accumulation of nitrite, in *Perspective in Microbial Ecology*, MEGUSAR F. and M. GANTAR (Eds), Slovene Society for Microbiology, Ljubljana., 625-630.
- Merkel W., E. Bohler and F.H. Frimmel, 1993, Heterotrophic denitrification - The influence of oxygen and pH value, *Acta hydrochim. hydrobiol.*, **21**, 249-257.
- Moir J.W.B., D. Baratta, D.J. Richardson and S.J. Ferguson, 1993, The purification of a cd1-type nitrite reductase from, and the absence of a copper-type nitrite reductase from, the aerobic denitrifier *Thiosphaera pantotropa* - The role of pseudoazurin as an electron donor, *Eur. J. Biochem.*, **212**, 377-385.
- Nishimura Y., T. Kamihara and S. Fukui, 1980, Diverse effects of formate on the dissimilatory metabolism of nitrate in *Pseudomonas denitrificans* ATCC 13867 : growth, nitrite accumulation in culture, cellular activities of nitrate and nitrite reductases, *Arch. Microbiol.*, **124**, 191-195.
- Noji S., T. Nohno, T. Saito and S. Taniguchi, 1989, The narK gene product participates in nitrate transport induced in *Escherichia coli* nitrate-respiring cells, *FEBS Lett.*, **252**, 139-143.
- Ozturk M., 1991, Conversion of acetate, propionate and butyrate to methane under thermophilic conditions in batch reactors, *Water Res.*, **25**, 1509-1513.
- Paul J.W. and E.G. Beauchamp, 1989, Denitrification and fermentation in plant-residue-amended soil, *Biol. Fertil. Soils*, **7**, 303-309.
- Paul J.W. and E.G. Beauchamp, 1989, Effect of carbon constituents in manure on denitrification in soil, *Can. J. Soil Sci.*, **69**, 49-61.
- Paul J.W., E.G. Beauchamp and J.T. Trevors, 1989, Acetate, propionate, butyrate, glucose, and sucrose as carbon sources for denitrifying bacteria in soil, *Can. J. Microbiol.*, **35**, 754-759.
- Pavlostathis S.G. and P. Zhuang, 1991, Effect of temperature on the development of anaerobic cultures from a contaminated subsurface soil, *Environ. Technol.*, **12**, 679-687.
- Payne W.J., 1976, Denitrification, *Trends Biochem. Sci.*, **1**, 220-222.
- Payne W.J. (Ed), 1981, *Denitrification*, John Wiley & Sons, New York. Chichester. Brisbane. Toronto.
- Pelmont J., 1993, Bactéries et environnement : adaptations physiologiques, Presses Universitaires de Grenoble, 899 p.
- Pérot C., 1989, Optimisation de la digestion anaérobie en deux étapes des boues de stations d'épuration : étude de l'étape d'hydrolyse de la matière organique, *Thèse de Doctorat*, Université de Clermont-Ferrand II, 147 p.
- Pichinoty F., 1973, La réduction bactérienne des composés oxygénés minéraux de l'azote, *Bull. Inst. Pasteur*, **71**, 317-393.

- Pike E.B. and C.R. Curds, 1971, The microbial ecology of the activated sludge process, in *Microbial aspects of pollution*, Sykes G. and Skinner F.A. (Eds), Academic Press, London, 123-147.
- Pipes W.O., 1966, The ecological approach to the study of activated sludge, in *Advances in applied microbiology*, Umbreit W.W. (Ed.), Academic Press, New York and London, 77-103.
- Porte F. and P.M. Vignais, 1980, Electron transport chain and energy transduction in *Paracoccus denitrificans* under autotrophic growth conditions, *Arch. Microbiol.*, **127**, 1-10.
- Remde A. and R. Conrad, 1991, Metabolism of nitric oxide in soil and denitrifying bacteria, *FEMS Microbiol. Ecol.*, **85**, 81-94.
- Richard C. and M. Kiredjian, 1992, Laboratory methods of the identification of strictly aerobic gram negative bacilli, Institut Pasteur (Ed), Paris.
- Robertson L.A. and J.G. Kuenen, 1984, Aerobic denitrification : a controversy revived, *Arch. Microbiol.*, **139**, 351-354.
- Robertson L.A. and J.G. Kuenen, 1988, Heterotrophic nitrification in *Thiosphaera pantotropa* : oxygen uptake and enzyme studies, *J. Gen. Microbiol.*, **134**, 857-863.
- Robertson L.A. and J.G. Kuenen, 1990, Physiological and ecological aspects of aerobic denitrification, a link with heterotrophic nitrification, in *Denitrification in soil and sediment*, Revsbech N.P. and J. Sorensen (Eds), Plenum Press, New York and London, 91-104.
- Robertson L.A. and J.G. Kuenen, 1992, The effect of electron acceptor variations on the behaviour of *Thiosphaera pantotropa* and *Paracoccus denitrificans* in pure and mixed cultures, *FEMS Microbiol. Ecol.*, **86**, 221-228.
- Scow K.M., 1982, Rate of biodegradation, chapitre 9, in *Handbook of chemical property estimation methods, Environmental behavior of organic compounds*, Lyman W.J., W.F. Reehl and D.H. Rosenblatt (Eds), McGraw-Hill Book Company, New York, 85 p.
- Sikora L.J. and D.R. Keeney, 1976, Evaluation of a sulfur *Thiobacillus denitrificans* nitrate removal system, *J. Environ. Qual.*, **5**, 298-303.
- Snyder S.W. and T.C. Hollocher, 1987, Purification and some characteristics of nitrous oxide reductase from *Paracoccus denitrificans*, *J. Biol. Chem.*, **262**, 6515-6525.
- Spiro S., 1992, An FNR-dependent promoter from *Escherichia coli* is active and anaerobically inducible in *Paracoccus denitrificans*, *FEMS Microbiol. Lett.*, **98**, 145-148.
- Stouthamer A.H., 1976, Biochemistry and genetics of nitrate reductase in bacteria, *Adv. Microbiol. Physiol.*, **14**, 315-375.
- Stouthamer A.H., 1991, Metabolic regulation including anaerobic metabolism in *Paracoccus denitrificans*, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **23**, 163-185.
- Stouthamer A.H., F.C. Boogerd and H.W. Van Verseveld, 1982, The bioenergetics of denitrification, *Antonie van Leeuwenhoek*, **48**, 545-553.
- Stryer L. (Ed), 1992, La biochimie de Lubert Stryer, Médecine-Sciences, Flammarion, Paris, 1088p.
- Tamaoka J., D.M. Ha and K. Komagata, 1987, Reclassification of *Pseudomonas acidovorans* den Dooren de Jong 1926 and *Pseudomonas testosteroni* Marcus and Talalay 1956 as *Comamonas acidovorans* comb. nov. and *Comamonas testosteroni* comb. nov., with an amended description of the genus *Comamonas*, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **37**, 52-59.
- Tendaj M., L.G. Reinius and J. Hultgren, 1992, Some observations on nitrification and denitrification following full-scale trials at Henriksdal and Bromma sewage treatment plants in Stockholm, *Water Sci. Tech.*, **25**, 195-202.
- Thomazeau R., 1982, Ecologie bacterienne et boues activées II: étude des populations présentes, *Rev. Ecol. Biol. Sol.*, **19**, 335-344.
- Tiedje J.M., 1988, Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium, chapter 4, in *Biology of anaerobic microorganisms*, Zehnder A.J.B. (Ed), John Wiley and Sons, New York, Chichester, 179-244.
- Timmermans P. and A. Van Haute, 1983, Denitrification with methanol, *Water Res.*, **17**, 1249-1255.

- Van Lier J.B., K.C.F. Grolle, C.T.M.J. Frijters, A.J.M. Stams and G. Lettinga, 1993, Effects of acetate, propionate, and butyrate on the thermophilic anaerobic degradation of propionate by methanogenic sludge and defined cultures, *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 1003-1011.
- Van Verseveld H.W. and A.H. Stouthamer, 1978, Electron-transport chain and coupled oxidative phosphorylation in methanol-grown *Paracoccus denitrificans*, *Arch. Microbiol.*, **118**, 13-20.
- Veldkamp H. and Jannasch H.W., 1972, Mixed culture studies with the chemostat, *J. Appl. Chem. Biotechnol.*, **22**, 105-123.
- Vilorget F., 1991, Intérêt pratique de l'utilisation de la mesure du Redox pour la conduite de l'élimination de l'azote en boues activées, in *Texte des Conférences, AGHTM, Annecy 71e congrés*, 15-19 Avril 1991, 115-138.
- Waki T., K. Murayama, Y. Kawato and K. Ichikawa, 1980, Transient characteristics of *Paracoccus denitrificans* with changes between aerobic and anaerobic conditions, *J. Ferment. Technol.*, **58**, 243-249.
- Walker M.S., J.A. Demoss, 1992, Role of alternative promoter elements in transcription from the nar promoter of *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, **174**, 1119-1123.
- Zhang C.S. and T.C. Hollocher, 1993, The reaction of reduced cytochromes-c with nitrous oxide reductase of *Wolinella succinogenes*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1142**, 253-261.
- Zhang C.S., T.C. Hollocher, A.F. Kolodziej and W.H. Orme-Johnson, 1991, Electron paramagnetic resonance observations on the cytochrome c-containing nitrous oxide reductase from *Wolinella succinogenes*, *J. Biol. Chem.*, **266**, 2199-2202.
- Zumft W.G., 1992, The denitrifying prokaryotes, in *The prokaryotes, 2nd ed. vol. 1*, Balows A., Truper H.G. (Eds), Springer Verlag, Heidelberg, Berlin, 554-582.
- Zumft W.G. and T. Matsubara, 1982, A novel kind of multi-copper protein as terminal oxidoreductase of nitrous oxide respiration in *Pseudomonas perfectomarinus*, *FEBS Lett.*, **148**, 107-112.



Nom, prénom : F A S S Sylvain

Nature de la thèse : Doctorat de l'Université de Nancy 1

en Chimie et Microbiologie de l'Eau

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le 21 JUIL. 1994 n°233

Le Président de l'Université de Nancy 1



Jean Pierre FINANCE

Résumé

L'objet principal de cette thèse est de déterminer parmi les produits de l'hydrolyse anaérobie des boues (acides gras volatils - AGV -, parmi lesquels figurent les acides acétique, propionique, butyrique et valérique) lequel de ces substrats permet d'éliminer les nitrates à la vitesse la plus élevée, et si possible avec la production de biomasse la plus faible.

Une culture en continu en condition de dénitrification (réduction des nitrates en gaz) a été réalisée avec les 4 AGV comme seuls donneurs d'électrons. Cette culture a été caractérisée en terme d'espèces bactériennes majoritaires, ainsi qu'en terme de constantes cinétiques. Il apparaît que le propionate se différencie des autres AGV avec une vitesse de consommation du carbone égale à $8 \text{ mg C} \cdot \text{g}^{-1} \text{ MES} \cdot \text{h}^{-1}$ et des oxydes d'azotes de $3 \text{ mg N-NO}_x \cdot \text{g}^{-1} \text{ MES} \cdot \text{h}^{-1}$. Les trois autres AGV (acides acétique, butyrique et valérique), quelles que soient les conditions expérimentales, sont consommés à la même vitesse spécifique d'environ $60 \text{ mg C} \cdot \text{g}^{-1} \text{ MES} \cdot \text{h}^{-1}$, les vitesses de dénitrification étant également du même ordre de grandeur soit $19 \text{ mg N-NO}_x \cdot \text{g}^{-1} \text{ MES} \cdot \text{h}^{-1}$. Ce résultat s'explique par le fait que la production de biomasse est maximale avec le valérate, minimale avec l'acétate et intermédiaire avec le butyrate.

Enfin, il a été démontré l'importance des variations du pH, de la température, de l'espèce bactérienne et de la source de carbone sur l'accumulation transitoire de nitrites.

En résumé, si l'objet premier du procédé industriel est d'éliminer rapidement les nitrates et de produire peu de biomasse bactérienne, l'acétate est le substrat carboné le plus indiqué. Par contre, si l'accumulation de nitrites est à éviter, le butyrate ou le valérate devront être préférentiellement utilisés à l'acétate.

Mots-clés : dénitrification, acides gras volatils, culture en continu, test batch, accumulation de nitrites, population bactérienne mixte, pH, température.

Abstract

The aim of this thesis is to determine between the anaerobic hydrolysis sludge products (volatile fatty acids - VFA -, for example acetic, propionic, butyric and valeric acids) which substrate is able to denitrify at the higher rate, with the lowest biomass production.

A denitrifying (reduction of nitrates into dinitrogen) culture was carried out with the four VFA as sole electron and carbon source. Bacterial species were characterised, as well as kinetic constants. The propionate is consumed at $8 \text{ mg C g}^{-1} \text{ SS h}^{-1}$ and provides a denitrification rate close to $3 \text{ mg N-NO}_x \text{ g}^{-1} \text{ SS h}^{-1}$. The three other VFA are consumed at the same rate $60 \text{ mg C g}^{-1} \text{ SS h}^{-1}$, and the denitrification rates are the same $19 \text{ mg N-NO}_x \text{ g}^{-1} \text{ SS h}^{-1}$. This result is explained by a highest biomass production with valerate, intermediate with butyrate and lowest with acetate.

It was then demonstrated the importance of pH and temperature variations, of the bacterial species and of the carbon source on the transitory nitrites accumulation.

To sum up, if the aim of the denitrifying industrial process is to quickly remove nitrates and minimise biomass production, acetate is the better carbonaceous substrate. On the other hand if nitrites accumulation must be avoided, butyrate or valerate should be used.

Key words : denitrification, volatile fatty acids, continuous culture, batch test, nitrites accumulation, mixed bacterial population, pH, temperature.