

jan 2003 23493

50376
1996
234

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

N° d'ordre : 1792

Année 1996

Thèse

Présentée à l'Université des Sciences et Technologies de Lille
pour l'obtention du grade de Docteur d'Université

Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé
Option : Microbiologie

soutenue le 16 septembre 1996 devant la Commission d'Examen



Florence CHEVRON

**Dénitrification biologique d'une nappe phréatique
polluée par des composés azotés d'origine industrielle.**

**Expérimentations en laboratoire sur les cinétiques,
le métabolisme et les apports de nutriments.**

- Président M. Le Pr. R. TAILLIEZ (Institut Agricole et Alimentaire de Lille)
- Examineurs M. C. DEFIVES (Institut Universitaire et Technologique de Lille I)
M. PETITPAS (Directeur de l'usine Grande Paroisse à Mazingarbe)
M. P. LECOMTE (Bureau de Recherches Géologiques et Minières)
M. H-C. DUBOURGUIER (Institut Supérieur d'Agriculture de Lille)
- Rapporteurs M. Le Pr. W. VERSTRAETE (Université de Gand)
M. M. JAUZEIN (Institut de Recherches Hydrologiques.)

03

RESUME

Les eaux souterraines exploitées sont souvent peu profondes et facilement accessibles aux pollutions, notamment aux nitrates. Il est donc important d'étudier la faisabilité de systèmes simples et peu coûteux de dénitrification biologique *in situ*, de nappes phréatiques.

Dans le cas présent, l'aquifère crayeux a été pollué par des infiltrations en provenance d'une usine d'engrais azotés. Le panache de pollution de la nappe s'étend sur plusieurs kilomètres en aval du site. L'acquisition de paramètres physico-chimiques et biologiques, dans la zone d'étude, a montré de fortes teneurs en nitrates (parfois supérieures à 1500 mg NO₃⁻/l), une faible population bactérienne et l'absence de substrat carboné disponible pour ces micro-organismes.

Lors d'essais de reproduction de l'écosystème naturel, en réacteurs-pilotes à biofilms fixés sur des supports minéraux (craie ou pouzzolane), une dénitrification biologique rapide s'est mise en place lorsqu'un inoculum est introduit au démarrage. L'apport optimal en carbone organique est déterminé égal à 0,8-1 g DCO/g NO₃⁻ à éliminer, quelque soit la source de carbone utilisée (glucose ou éthanol). Une stabilisation de la concentration résiduelle en nitrates proche de 150 mg/l (85-90% d'élimination) est observée parallèlement à une concentration excessive de nitrites (60 mg/l) dans les effluents. L'addition de métaux, associés aux enzymes de la dénitrification (fer, cuivre, cobalt et molybdène), à l'état de traces a réduit la concentration résiduelle en nitrites de façon significative (80 à 98%), parallèlement à l'augmentation du rendement de dénitrification au-dessus de 95-98%. Par ailleurs, l'étude en culture pure de deux souches isolées lors de ces expériences (*Alcaligenes denitrificans* et une souche "H") a confirmé l'incidence, dans le processus de dénitrification, des éléments métalliques dès les très faibles concentrations (inférieures à 100 µg/l).

Au terme de ces travaux, il apparaît que la mise en place d'une installation pilote de terrain devra intégrer les résultats de laboratoire, et particulièrement le choix du système nutritif pour les micro-organismes, l'approvisionnement en apports carbonés et phosphorés et l'addition de métaux à l'état de traces, au moins lors du démarrage.

REMERCIEMENTS

Merci rempli d'affection à Maman & Hugues,

*Merci à Monique Bak, Isabelle Bouexière, Jean Breton,
Patrick Charbonnier, Pierre Conil, Dominique
Darmendrail, Francis Frémaux, Jean-Pierre
Hornez, Alain Landreau, Christophe Landry,
Valérie Leclère, José Leplat, Patrice Mary,
Frédéric Pernel, Charlotte Vinchon*

La travail de cette thèse, ici présenté, a été effectué, dans sa majeure partie, dans le laboratoire de Microbiologie Fondamentale et Appliquée de l'Université des Sciences et Technologies de Lille, dirigé par **Monsieur le Professeur Roger Tailliez**, Professeur à l'Institut Agricole et Alimentaire de Lille, vous m'avez eu comme étudiante dès 1989 avant de m'accueillir en 1992 dans votre laboratoire.

L'ensemble de ce travail a été réalisé sous la direction scientifique de **Monsieur Claude Defives**, Docteur d'Etat. Sa rigueur scientifique ainsi que ses suggestions ont rendu possible l'accomplissement de cette étude. Je tiens à lui exprimer tous mes remerciements pour la formation scientifique qu'il m'a prodiguée.

Monsieur le Professeur W. Verstraete, directeur du laboratoire d'Ecologie Microbienne de l'Université de Gand et membre fondateur de l'European Environmental Research Organization, me fait l'immense honneur d'avoir, en dépit de ses nombreuses occupations, accepté de consacrer de son temps à l'évaluation de ce travail et de siéger à mon jury de thèse.

Je remercie également **Monsieur M. Jauzein**, Directeur de Recherches à l'Institut de Recherches Hydrologiques à Nancy, d'avoir bien voulu juger ce travail et me faire ainsi profiter de ces connaissances dans le domaine du cuivre.

Je tiens à exprimer ma grande reconnaissance à **Monsieur Petitpas**, directeur de l'usine Grande-Paroisse, que j'ai eu le plaisir de connaître dans le cadre de cette étude et qui a facilité mon accès à son usine pour le bon déroulement de ces travaux.

Les essais en réacteurs de laboratoire à flux horizontal ont été réalisés au département "Environnement et Aménagement" de l'Institut Supérieur d'Agriculture de Lille. En m'accueillant dans ses locaux, avec mes volumineux réacteurs, pendant plusieurs mois, la direction m'a permis de poursuivre ma collaboration avec **monsieur H-C. Dubourguier**, Directeur de recherche INRA détaché. Après avoir dirigé mes premiers pas dans la recherche appliquée en 1992, vous m'avez fait profiter de votre grande connaissance des écosystèmes naturels. Je vous en remercie.

Les travaux relatifs à cette thèse de doctorat ont été rendus possibles grâce à une bourse du Bureau de Recherches Géologiques et Minières ainsi qu'à une aide salariale de la Direction de la Recherche du Conseil Régional Nord-Pas de Calais. Le B.R.G.M., et plus particulièrement **Monsieur P. Lecomte**, était chargé de coordonner l'ensemble des recherches.

Un comité de pilote constitué de l'Agence de l'Eau Artois-Picardie (représentée par Madame Dantin, Messieurs Mathian et Bernard), la Direction Régionale de l'Environnement (représentée par Monsieur Verley) et la Direction Régionale de l'Industrie, de la Recherche et de l'Environnement (représentée par Monsieur Kaltembacher) a participé à l'orientation des travaux de recherches.

INTRODUCTION	1
IERE PARTIE : ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE	4
<hr/>	
1. RISQUES ET REGLEMENTATIONS LIES A L'AZOTE	5
2. LA SITUATION	7
3. RAPPELS SUR L'EVOLUTION BIOLOGIQUE DE L'AZOTE	12
4. LA DENITRIFICATION BIOLOGIQUE	13
4.1. Les mécanismes biochimiques de la dénitrification	15
4.1.1. La voie assimilative	16
4.1.2. La voie dissimilative	16
4.1.3. La stoechiométrie	18
4.1.4. Les étapes de la dénitrification dissimilative	19
4.2. Les paramètres principaux de la dénitrification	24
4.2.1. Les formes minérales de l'azote	24
4.2.2. Le carbone	26
4.2.3. Le phosphore	32
4.2.4. L'oxygène	33
4.2.5. Le pH	35
4.2.6. La température	36
4.2.7. Les inhibiteurs potentiels	38
5. LES APPLICATIONS DANS LE TRAITEMENT <i>IN SITU</i>	39
5.1. Généralités	39
5.2. La dénitrification "<i>in situ</i>" naturelle	42
5.3. La dénitrification "<i>in situ</i>" provoquée	44
5.3.1. Principes de base	44
5.3.2. Dispositifs de terrain	46
5.4. La dénitrification sur site	47
5.5. La quantification de la dénitrification <i>in situ</i>	48
6. CONCLUSION	49
2EME PARTIE : MATERIELS ET METHODES	52
<hr/>	
1. TECHNIQUES MICROBIOLOGIQUES	53
1.1. Milieux de culture	53
1.1.1. Les milieux solides	53
1.1.2. Les milieux liquides	53
1.1.3. Préparation des milieux de culture liquides	55

1.2. Dénombrements	55
1.2.1. Réalisation des prélèvements	55
1.2.2. Sur milieu gélosé	55
1.2.3. Par mesure de l'absorbance à 600 nm	56
1.3. Identification	57
1.4. Préparation des cultures	58
2. TECHNIQUES MICROSCOPIQUES	59
2.1. Contrôle de la pureté des souches	59
2.2. Observations en microscopie électronique	59
2.2.1. Préparation des échantillons pour la microscopie électronique à balayage	59
2.2.2. Préparation des coupes pour la microscopie électronique à transmission	60
2.2.3. Matériels utilisés	60
3. ACQUISITIONS DE DONNEES DE TERRAIN	61
3.1. Analyses physico-chimiques	61
3.1.1. Sur les sols	61
3.1.2. Sur les eaux	63
3.2. Analyses microbiologiques	
4. ESSAIS DE DENITRIFICATION AU LABORATOIRE	66
4.1. Réacteurs de dénitrification a biofilms fixés	66
4.1.1. Réacteurs à flux ascendant ("up-flow") avec alimentation en glucose	66
4.1.2. Réacteurs à flux horizontal avec alimentation en éthanol	68
4.2. Suivis de cinétiques de dénitrification	69
4.3. Exploitation des résultats	70
5. ANALYSES BIOCHIMIQUES PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE	70
5.1. Préparation des échantillons	70
5.1.1. Conditions de croissance des cellules	70
5.1.2. Composition des réactifs	71
5.1.3. Préparation des échantillons	71
5.2. Mise en évidence de la composition des acides gras membranaires	72
5.2.1. Matériel utilisé et injection des échantillons	72
5.2.2. traitement des données	73
3EME PARTIE : RESULTATS ET DISCUSSION	74
<hr/>	
1. INVESTIGATIONS SUR LE SITE	75
1.1. Etat du site	75
1.2. Suivi de la pollution azotée après 1993	78
1.2.1. Analyses physico-chimiques	78
1.2.2. Analyses microbiologiques	86

1.3. Conclusion et perspectives de traitement	93
2. ESSAIS DE DENITRIFICATION EN REACTEURS A BIOFILMS FIXES	96
2.1. Déroulement des expériences	96
2.1.1. Les réacteurs up-flow	96
2.1.2. Les réacteurs horizontaux	98
2.2. Influence du substrat carboné et des phosphates sur la dénitrification	99
2.2.1. Sur la réduction des nitrates et des nitrites	99
2.2.2. Sur l'élimination de l'ammoniaque	105
2.2.3. Sur l'assimilation des phosphates	109
2.2.4. Sur l'élimination du carbone organique	110
2.2.5. Sur la variation de pH	114
2.3. Problème posé par l'accumulation des nitrites	116
2.4. Influence des métaux sur la dénitrification	118
2.5. Développement de la microflore	119
2.6. Observation des biofilms	125
2.7. Conclusion	132
3. DENITRIFICATION DE HAUTES TENEURS EN NITRATES PAR DES SOUCHES PURES	133
3.1. Description des souches étudiées	133
3.1.1. Sélection des souches	133
3.1.2. la souche <i>H</i> et <i>Alcaligenes denitrificans</i>	134
3.2. Accumulation de nitrites	141
3.3. Influence des métaux sur la dénitrification	142
3.4. Influences combinées du fer et du cuivre	149
3.5. Influence de la co-culture	152
CONCLUSIONS GENERALES	156
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	161
ANNEXES	178
Annexe 1 - Liste des sigles et définitions	179
Annexe 2 - Pilotes de dénitrification <i>in situ</i>	181
Figure 1 - Le système Daisy (d'après Mercado <i>et al.</i> , 1989)	182
Figure 2 - Le système Nitredox (d'après Braester <i>et al.</i> , 1988)	183
Figure 3 - Schéma de principe du procédé de dénitrification provoquée du site expérimental de Messac (d'après Collin <i>et al.</i> , 1984)	184

Figure 4 - Principe de restauration d'une nappe souterraine par dénitrification hétérotrophe sur des filtres de charbon actif (d'après Böckle <i>et al.</i> , 1984)	185
Annexe 3 - Milieux de culture	186
Annexe 4 - Analyses biochimiques par chromatographie en phase gazeuse	190
Figure 1 - Présentation de la colonne chromatographique	191
Figure 2 - Chromatographe d'étalonnage en phase gazeuse	192
Annexe 5 - Réacteurs de laboratoire	193
Planche 1 - Réacteurs de dénitrification à biofilms fixés et à flux ascendant	194
Planche 2 - Réacteurs de dénitrification à biofilms fixés et à flux horizontal	195
Annexe 6 - Méthodes d'analyses spectrophotométriques (HACH, DR/2000)	196
Annexe 7 - Normes AFNOR pour le dosage des formes minérales azotées	202
Annexe 8 - Qualité physico-chimique de la nappe de la craie (novembre 1993)	210
Tableau 1 - Normes des eaux destinées à la consommation humaine	211
Tableau 2 - Programme d'analyses effectuées sur la nappe de la craie (Institut Pasteur de Lille)	212
Tableau 3 - Analyses effectuées sur l'eau de la nappe	213
Tableau 4 - Analyses effectuées sur les formations géologiques	214
Figure 1 - Contrôle qualité du sol : coupe lithologique réalisée au droit du P12	215
Figure 2 - Contrôle qualité du sol : coupe lithologique réalisée au droit du P15	216
Figure 3 - Contrôle qualité du sol : coupe lithologique réalisée au droit du P16	217
Figure 4 - Contrôle qualité du sol : coupe lithologique réalisée au droit du P75	218
Annexe 9 - Essais de dénitrification en réacteurs	219
Tableau 1 - Analyse chimique de la craie	220
Tableau 2 - Résultats des analyses chimiques effectuées sur les effluents	221
Tableau 3 - Concentrations résiduelles en métaux dans les effluents	222
Annexe 10 - Cinétiques de dénitrification en batch	223
Figure 1 - Corrélation entre la mesure de la densité optique à 600nm et le nombre d'U.F.C. dénombrées par ml. (A) <i>Alcaligenes denitrificans</i> , (B) la souche <i>H</i>	224

LISTE DES FIGURES

Figure 1 - Présentation de la démarche séquentielle d'investigation et de traitement d'un site pollué	3
Figure 2 - Teneurs en nitrates dans les nappes souterraines de la région Nord-Picardie en 1991	10
Figure 3 - Diagramme de stabilité des formes minérales azotées (d'après Marsh, 1978)	11
Figure 4 - Cycle de l'azote (d'après Martin, 1979)	12
Figure 5 - Schéma de la dénitrification hétérotrophe	13
Figure 6 - Schéma de la dénitrification autotrophe	14
Figure 7 - Schéma de la dénitrification chez <i>Paracoccus denitrificans</i> (d'après Stouthamer, 1990)	17
Figure 8 - Influence du pH sur la dénitrification et la nature du produit final (d'après Leclerc, 1978)	35
Figure 9 - Evolution de la vitesse de dénitrification en fonction de la température	37
Figure 10 - Procédés de dépollution biologique des nappes souterraines	41
Figure 11 - Flowsheet d'expérimentation	54
Figure 12 - Carte piézométrique de la nappe à l'aval proche des bassins de décantation en 1990	62
Figure 13 - Localisation de la zone du site industriel et des bassins de décantation	76
Figure 14 - Carte piézométrique de la nappe à l'aval proche des bassins de décantation en octobre 1993	79
Figure 15 - Carte des isoconcentrations en nitrates (mg/l) (état de la nappe en novembre 1993)	81
Figure 16 - Répartition de la température dans la nappe de la craie (état de novembre 1993)	83
Figure 17 - Carte de répartition des concentrations en nitrites dans la nappe de la craie (état de novembre 1993)	84

Figure 18 - Carte de répartition des concentrations en ions ammonium dans la nappe de la craie (état de novembre 1993)	85
Figure 19 - Répartition des différentes espèces de micro-organismes viables et cultivables dénombrées dans la nappe au droit du piézomètre P01. (A) sur milieu PCA/glc, (B) sur milieu PCA/glc/NO ₃	89
Figure 20 - Carte reconstituant la pollution chronique de la nappe après 30 ans d'activité industrielle et 11,5 ans après la pollution accidentelle avec une diminution des rejets à 100 tonnes/an et 10 ans après la mise en place d'un puits de dépollution pompant en continu 150 m ³ /h	94
Figure 21 - Augmentation de la charge volumique en nitrates et variation du temps de séjour hydraulique dans les réacteurs up-flow	97
Figure 22 - Evolution du pourcentage de nitrates éliminés en fonction de la charge appliquée et de la nature du support	100
Figure 23 - Evolution du pourcentage de nitrites relargués en fonction de la charge appliquée dans le réacteur-craie	101
Figure 24 - Evolution du pourcentage de nitrites relargués en fonction de la charge appliquée dans le réacteur-pouzzolane	102
Figure 25 - Evolution du pourcentage de nitrates éliminés en fonction du temps et des apports réalisés	103
Figure 26 - Evolution du pourcentage de nitrites relargués en fonction du temps et des apports réalisés	106
Figure 27 - Evolution de la concentration en ions ammonium dans l'effluent en fonction de la charge appliquée et de la nature du support minéral	107
Figure 28 - Evolution de la concentration en ions ammonium dans les effluents en fonction du temps et des apports réalisés	108
Figure 29 - Influence de l'apport en glucose (rapport g DCO/ g NO ₃ ⁻) sur le taux de dénitratation	111
Figure 30 - Influence de l'apport en éthanol (rapport g DCO/ g NO ₃ ⁻) sur le taux de dénitratation	112
Figure 31 - Evolution du pH des effluents des réacteurs	114
Figure 32 - Evolution du pH dans les réacteurs	116

Figure 33 - Principaux sites d'action des métaux couplés aux enzymes de la dénitrification	117
Figure 34 - Influence de la complémentation métallique sur l'élimination des formes minérales azotées	118
Figure 35 - Evolution de la flore libre totale dans les réacteurs en fonction de la distance	123
Figure 36 - Chromatographe des acides gras membranaires de la souche <i>H</i> en phase gazeuse.	137
Figure 37 - Corrélation entre la quantité initiale de nitrates et la quantité de nitrites accumulés chez <i>Alcaligenes denitrificans</i> et la souche <i>H</i>	141
Figure 38 - Cinétiques de dénitrification d' <i>Alcaligenes denitrificans</i> sous agitation, en anaérobiose et à 20°C	143
Figure 39 - Cinétiques de dénitrification de la souche <i>H</i> sous agitation, en anaérobiose et à 20°C	143
Figure 40 - Cinétiques de dénitrification d' <i>Alcaligenes denitrificans</i> sous agitation, en anaérobiose et à 20°C en milieu complémenté	146
Figure 41 - Cinétiques de dénitrification de la souche <i>H</i> sous agitation, en anaérobiose et à 20°C en milieu complémenté	146
Figure 42 - Influence de l'addition simultanée de fer et de cuivre sur l'accumulation de nitrites lors de la dénitrification par <i>Alcaligenes denitrificans</i> à 20°C, en anaérobiose	150
Figure 43 - Influence de l'addition simultanée de fer et de cuivre sur l'accumulation de nitrites lors de la dénitrification par la souche <i>H</i> à 20°C, en anaérobiose	150
Figure 44 - Effet du pH sur la concentration en cuivre en solution.	151
Figure 45 - Cinétiques de la dénitrification par une co-culture d' <i>Alcaligenes denitrificans</i> et la souche <i>H</i> sous agitation, en anaérobiose et à 20°C	153
Figure 46 - Comparaison des vitesses de dénitrification et de dénitrification entre cultures pures et cultures mixtes en milieu nitraté de base	154

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 - Evaluation des flux polluants en azote (N) vers la nappe selon le type d'activité ou d'occupation du sol (d'après l'Agence de l'Eau, 1994)	9
Tableau 2 - Relations stoechiométriques de la dénitrification hétérotrophe avec différents substrats carbonés	28
Tableau 3 - Influence du substrat sur la vitesse de dénitrification (d'après Degremont, 1989)	30
Tableau 4 - Principales substances ayant une action inhibitrice sur la dénitrification	38
Tableau 5 - Analyses physico-chimiques réalisées sur la nappe (octobre 1993) (Institut Pasteur de Lille)	80
Tableau 6 - Analyses microbiologiques effectuées sur les échantillons de sol (octobre 1993)	86
Tableau 7 - Analyses microbiologiques effectuées sur les échantillons d'eau (octobre 1993)	87
Tableau 8 - Caractérisation de la flore dénombrée dans la nappe au droit du piézomètre P01 (octobre 1993)	90
Tableau 9 - Déroulement des essais de dénitrification en réacteurs horizontaux	98
Tableau 10 - Dénombrement de la flore libre dans les réacteurs up-flow	104
Tableau 11 - Exemples de performances obtenues avec des procédés de dénitrification biologique hétérotrophe	120
Tableau 12 - Avantages et limites liés à la conception des réacteurs	132
Tableau 13 - Caractérisation de la flore libre des réacteurs horizontaux	135
Tableau 14 - Etude du métabolisme carboné de la souche <i>H</i>	136
Tableau 15 - Evolution des vitesses spécifiques et du taux de croissance à 20°C d' <i>Alcaligenes denitrificans</i> et de la souche <i>H</i> lors de la phase d'accumulation des nitrites, en fonction de la composition du milieu	147

Tableau 16 - Evolution des nitrites relargués et de la croissance au cours de la dénitrification chez <i>Alcaligenes denitrificans</i> et la souche <i>H</i> en fonction de la concentration en fer dans le milieu de culture	148
Tableau 17 - Evolution des nitrites relargués et de la croissance au cours de la dénitrification chez <i>Alcaligenes denitrificans</i> et la souche <i>H</i> en fonction de la concentration en cuivre dans le milieu de culture	149

LISTE DES PLANCHES

Planche 1 - Observation des films mixtes de dénitrification en microscopie électronique à balayage	127
Planche 2 - Observation des microcolonies bactériennes en microscopie électronique à transmission	129
Planche 3 - Observation de la souche <i>H</i> et de <i>Alcaligenes denitrificans</i> en microscopie électronique à transmission	140

INTRODUCTION

En France, au cours de la dernière décennie, le choc émotionnel provoqué par certaines catastrophes écologiques a suscité un intérêt accru - et une maturation - de l'opinion publique pour la protection de l'environnement*. Parmi les nombreuses nuisances pouvant affecter son équilibre, la pollution de l'eau apparaît certainement comme un des problèmes les plus sensibles, avec en particulier la protection des nappes phréatiques en tant que ressource première pour la fourniture d'eau potable (Hammer, 1993). De par son riche passé minier et industriel, la Région Nord-Pas de Calais est bien évidemment impliquée dans cette prise de conscience d'un Environnement qui fût malmené peu ou prou lors des décennies antérieures, et elle est donc, à ce titre, directement concernée par "la permanente confrontation entre la nécessité de produire et de redistribuer des richesses économiques en consommant les ressources naturelles, et celle de protéger l'environnement" (C.U.D.D.,1994).

Si en matière de protection de l'environnement, la mise en place de réglementations adaptées suit de près la prise de conscience de l'opinion publique, des industriels et des autorités, il n'en reste pas moins que les développements technologiques doivent permettre d'atteindre les objectifs qu'on se donne en matière de gestion et/ou de restauration de l'Environnement. Cependant, les types de pollution sont nombreux et les cas concrets bien souvent complexes à traiter et peu reproductibles d'un site à un autre. Le travail "sur le terrain" implique, en plus, de maîtriser de très nombreux paramètres dépendant directement de la nature du site, de celle de la pollution et de sa migration éventuelle au sein du milieu, et des risques que cela génère au niveau de "cibles" potentielles existant en aval (populations, écosystèmes,...). Qu'il s'agisse de caractérisation, de compréhension des processus, ou encore de mise au point de procédés, le passage par une expérimentation en laboratoire et son élargissement au terrain dans une phase pilote permettent de définir des entités techniques unitaires - des outils - bien maîtrisés et donc reproductibles, qui pourront être utilisés par la suite dans des opérations de routine.

* En 1992, 11 % des personnes interrogées se sont déclarés soucieux de la dégradation de l'environnement (Ifen, 1992)

Dans le cadre de ce travail de thèse, le choix s'est porté sur le traitement d'une pollution nitrique d'origine industrielle dans la nappe phréatique. Le thème de la dénitrification a été abordé souvent pour le traitement des eaux destinées à la consommation humaine ou pour des effluents industriels. Cependant, une des spécificités de ce travail consiste à envisager une approche de dépollution d'une nappe par voie biologique *in situ*. Dans le milieu naturel, les micro-organismes constituent une source majeure de purification des eaux souterraines polluées. La réduction totale et rapide des nitrates en azote moléculaire n'est toutefois généralement pas possible par des espèces isolées dans le milieu, mais requiert l'action de plusieurs espèces associées. Dans les milieux contaminés, les espèces bactériennes qui se développent sont celles qui seront capables de dégrader au maximum la matière organique ou les composés toxiques. Les techniques biologiques de dépollution devront viser à favoriser des micro-organismes endogènes plus adaptés au milieu naturel, à priori "hostile", que des souches allochtones, "élevées" en laboratoire. La mise en oeuvre d'une technologie spécifique au cas à traiter, ici "la dénitrification *in situ* d'une nappe phréatique" nécessite de comprendre d'abord les processus intervenant lors de la dénitrification, et mettre au point ensuite la méthode de biotraitement en laboratoire, afin de déterminer les rendements potentiels, les durées de traitement et les coûts, tels qu'ils pourront être extrapolés sur un site.

Faisant suite à une première étude réalisée par ailleurs par le BRGM sur le site d'expérimentation entre 1989 et 1991 pour le Ministère de l'Industrie, le travail de thèse comprend :

- une période d'acquisition d'informations complémentaires dans la zone d'étude choisie et d'interprétation des paramètres physico-chimiques en terme d'activité biologique potentielle (cette étape a notamment permis l'identification des populations bactériennes rencontrées) ;
- l'étude des conditions d'intervention pour provoquer ou stimuler un traitement *in situ* de dépollution par dénitrification ;
- la mise en place d'essais de reproduction de l'écosystème naturel, grâce à des dispositifs expérimentaux de laboratoire reproductibles *in situ*, avec pour objectif la recherche des

conditions optimales de développement et d'activités, et l'évaluation des paramètres physiologiques et métaboliques. Divers essais ont été effectués sur une période de deux ans, dans des conditions différentes de charge, de débit et de fixation des micro-organismes.

L'ensemble du travail vise donc ainsi à établir la faisabilité du biotraitement de l'eau contaminée par des composés azotés d'origine industrielle au travers d'un procédé nouveau et efficace, et à pouvoir proposer son application sur le terrain lors d'une phase pilote à une échelle industrielle.

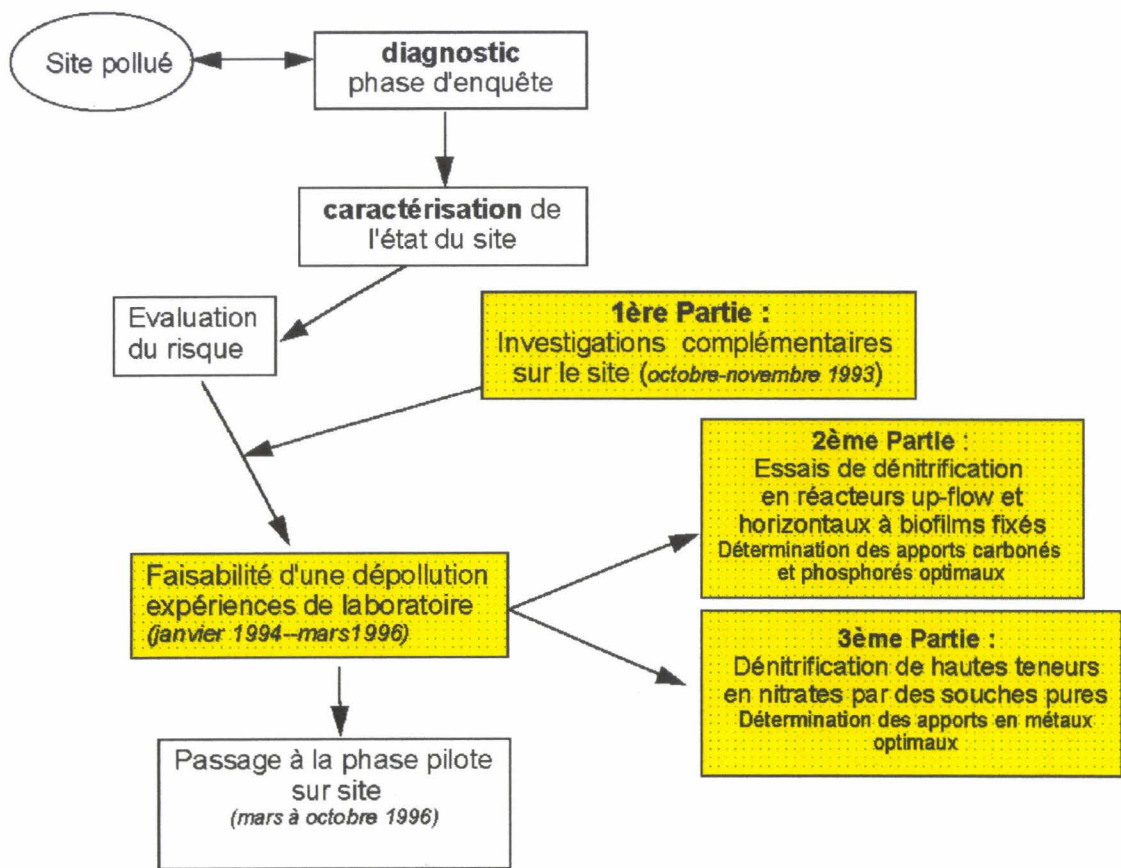


Figure 1 - Présentation de la démarche séquentielle d'investigation et de traitement d'un site pollué (modifié de Lecomte, 1995) [les étapes coloriées en gris sont celles ayant fait l'objet du travail de thèse et présentées dans ce mémoire]

1ere PARTIE :ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

Loi n°92-3 du 3 janvier 1992 sur l'eau

modifiée par la loi n°92-1336 du 16 décembre 1992 et par
la loi n°95-101 du 2 février 1995

(J.O. du 4 janvier 92, 23 decembre 92 et 3 février 1995).

Art. 1 - "L'eau fait partie du patrimoine commun de la nation.
Sa protection, sa mise en valeur et le développement
de la ressource utilisable, dans le respect des
équilibres naturels, sont d'intérêt général.
L'usage de l'eau appartient à tous dans le cadre des
lois et règlements ainsi que des droits antérieurement
établis".

1. RISQUES ET REGLEMENTATIONS LIES A L'AZOTE

De nombreux articles font état des inconvénients des nitrates. Il convient de resituer correctement le problème. En premier lieu, les nitrates ne sont pas des poisons, mais ce sont des éléments indésirables (Bernard et Bourel, 1991). Dans son rapport sur "l'eau et la santé", un groupe de travail réuni à l'INSERM (5 mars 1980) évoquait déjà les problèmes de pathologie chronique liés à la consommation d'eaux fortement nitratées :

" Une question d'importance concerne le taux de nitrates de nos ressources aquifères qui augmente progressivement au fil des années. En dehors des cas de méthémoglobinémie (dus aux nitrates et nitrites) du nourrisson dont on connaît mal la fréquence liée à l'usage de l'eau, les concentrations élevées des eaux en nitrates ont été mises en cause dans la genèse de certains cancers¹. Dans des conditions qui ne sont pas totalement éclairées, il existerait une relation entre ces taux et la production de nitrosamines et de nitrosamides au pH acide de l'estomac. Or, ces produits sont connus pour leur pouvoir carcinogène, mutagène et tératogène élevé."

Toute une série de dispositions réglementaires et législatives tendent à protéger les nappes phréatiques des nuisances environnementales. Cependant, une grande incertitude préside à l'établissement des normes sanitaires, généralement fixées, par sécurité, en-dessous du seuil d'apparition de la pathologie : les normes sont donc régulièrement révisées (Ifen, 1994).

Depuis la loi de 1964, l'eau devient "objet de négociation sociale". En 1977, l'O.M.S. classait les eaux destinées à la consommation humaine en trois catégories : "acceptable", "tolérable" et "à prohiber", selon leur teneur en nitrates (respectivement inférieure à 50 mg/l, comprise entre 50 et 100 mg/l et supérieure à 100 mg/l). En 1980, les normes C.E.E. (normes du Journal Officiel des Communautés Européennes du 30 août 1980) fixaient la concentration

¹ Il semble que de nombreux facteurs (pollutions bactériennes...) autres que la quantité de nitrates ingérée jouent un rôle dans la genèse de l'affection. L'O.M.S. considère, par ailleurs, qu'aucune preuve n'appuie la suspicion d'une action favorisante des nitrates dans l'apparition du cancer gastrique (Académie des Sciences, 1991).

maximale admissible à 50 mg/l ; la valeur recommandée étant de 25 mg/l. En ce qui concerne les nitrites et l'ammoniaque, les valeurs admissibles étaient fixées respectivement à 0.1 et 0.5 mg/l. La circulaire du **13 décembre 1989** précisait de façon officielle la nécessité de protéger les eaux souterraines, compte tenu des usages dont elles peuvent faire l'objet (l'alimentation humaine et/ou animale et l'irrigation). Ceci doit nous imposer une prudence extrême, en particulier dans une perspective de conservation à long terme des ressources naturelles. La circulaire DGS/PGE/1 D n° 1325 du **9 juillet 1990**, relative aux teneurs en nitrates dans les eaux destinées à la consommation humaine, précisait dans le chapitre consacré à la qualité de la ressource :

" L'arrêté d'autorisation (pour l'utilisation des eaux souterraines et superficielles pour la consommation humaine) pris à cette occasion, après avis du Conseil Départemental d'Hygiène , doit être soumis à l'avis du Conseil Supérieur d'Hygiène Publique en France (CSHPPF) lorsque les teneurs en nitrates de la ressource dépassent 50 mg/l dans le cas d'eaux superficielles et 100 mg/l dans les autres cas (eaux souterraines). [...]

D'une manière plus générale, quel que soit le type de ressources exploitées, un programme d'amélioration de la qualité de la ressource, basé sur un examen détaillé des flux de pollution azotée susceptibles d'être à l'origine de la contamination, doit être mis à l'étude dès que la valeur guide de 25 mg/l (NO_3^-) définie par la directive n°80/778 du 15 juillet 1980 se trouve dépassée."

Considérant que les nitrates d'origine agricole sont la cause principale de la pollution provenant de sources diffuses qui affecte les eaux de la Communauté, la directive n°91/676 du **12 décembre 1991** vise à réduire la pollution provoquée ou induite par les nitrates à partir de sources agricoles et à prévenir toute nouvelle pollution de ce type. Sur l'ensemble du territoire national, un ou des codes de bonnes pratiques agricoles feront l'objet de recommandations afin de préserver la qualité de l'ensemble des eaux.

La loi sur l'eau du **3 janvier 1992** affirme désormais le principe selon lequel l'eau fait partie du patrimoine commun de la Nation (Nicolazo, 1994). Cet intérêt collectif impose l'institution d'une police administrative unique et générale de contrôle de la qualité des eaux et du niveau de la ressource. Le Schéma d'Aménagement et de Gestion des Eaux (SAGE) est un outil de planification établi au niveau local et élaboré en concertation entre tous les partenaires usagers de l'eau. La loi de 1992 aboutit à l'émergence d'un droit de l'Eau. L'ensemble des déversements et des prélèvements deviennent réglementés quels que soient la nature et le statut juridique de l'eau.

Le **8 mars 1993**, le Conseil de L'Europe adopte une convention sur la responsabilité civile des dommages résultant d'activités dangereuses pour l'environnement.

Les données économiques de l'environnement (publication annuelle du Ministère de l'Environnement) chiffrent la dépense nationale de protection de l'environnement en 1992 à 1,4 % du produit intérieur brut (100,5 Milliards de francs), soit un effort supérieur à la moyenne communautaire (1,2 % du P.I.B.).

2. LA SITUATION

La principale source d'information est le recensement général agricole du Ministère de l'Agriculture et la meilleure façon de contrôler la répartition spatiale et l'évolution temporelle de la qualité des eaux est de disposer de points de mesure constituant un réseau de contrôle (puits, forages...).

En 1982, une enquête réalisée par le Ministère de la Santé sur les concentrations mesurées sur l'ensemble des réseaux publics de distribution montre qu'en France plus de 1 million de personnes utilisent une eau dont la teneur en nitrates est supérieure à la norme européenne de potabilité fixée à 50 mg/l. Les recommandations FAO/OMS fixent pour un adulte la dose journalière admissible (dose qu'un adulte peut consommer toute sa vie sans risque pour sa santé :

DJA) à 3,65 mg NO₃⁻/kg.jour. En France, les apports moyens en nitrates atteignent les valeurs suivantes :

- ◆ pour un adulte : de 134 mg/jour. Ces valeurs sont à rapprocher des résultats d'autres pays : Grande-Bretagne : 110 mg/l, ex-RFA : 100 mg/l, Pays-Bas : 137 mg/l, Etats-Unis : 90 mg/l).
- ◆ pour un nourrisson (3 mois, 6 kg), l'apport en nitrates est directement proportionnel à leur teneur en eau utilisée pour la composition du lait reconstitué. C'est au-dessus de 50 mg/l que des risques biologiques peuvent être constatés (référence établie par l'arrêté du 1er juillet 1976).

Une étude, conduite par la Direction Générale de la Santé en 1992, montre la place primordiale des aliments solides, principalement des légumes, dans la dose journalière de nitrates et nitrites ingérée par les Français. L'apport réel de l'eau ne représente que 22 % du total (Ifen, 1994).

L'évolution des teneurs en nitrates dans les eaux est d'autant plus préoccupante qu'il s'agit d'un phénomène lent et complexe. Les volumes considérables des aquifères, leur répartition géographique, les caractéristiques de leurs écoulements, leur vulnérabilité font des eaux souterraines un élément fondamental de la gestion des eaux (Detay, 1991). En ce qui concerne les eaux souterraines, un décalage important dans le temps (des années voire des décennies) entre les causes et les effets, occulte la gravité des phénomènes. Prédire le futur à long terme, en ce qui concerne les concentrations en nitrates dans les eaux souterraines, est difficile en raison des impacts possibles des changements des politiques agricoles de la Communauté Européenne (Académie des Sciences, 1991). Mais à moyen terme, on pense que le phénomène s'aggraverait dans les prochaines années. Là où la pollution en nitrates ne s'est pas encore manifestée, des études ont montré que le "front des nitrates" ne tarderait pas à atteindre ces aquifères (Agence de l'Eau, 1994) (tableau 1). De plus, les seules statistiques portant sur les seuls captages d'alimentation en eau en fonctionnement ne seraient pas correctes, car les plus mauvais sont abandonnés : entre 1985 et 1994, 40 captages ont été arrêtés dans le bassin Pas de Calais.

Activité ou occupation du sol	flux spécifique (N) vers la nappe (kg/ha.an)
décharge d'ordures ménagères	600
Agglomération	
- non assainie	350
- totalement assainie	90
Activité agricole	
- serre	100
- culture légumière de plein champ	50
- céréales	40
- zone de déboisement	5

Tableau 1 : Evaluation des flux polluants en azote (N) vers la nappe selon le type d'activité ou d'occupation du sol (d'après l'Agence de l'Eau, 1994)

Dans la région Nord - Pas de Calais, les nitrates constituent une source de pollution majeure des eaux souterraines. Cela a conduit à restructurer partiellement le réseau d'alimentation en eau potable, notamment dans le bassin minier. Les eaux souterraines participent pour 96 % à l'alimentation du bassin Artois-Picardie. La plupart d'entre eux prélève dans la nappe de la craie, en général proche du sol et donc vulnérable vis-à-vis de la pollution par les nitrates. C'est ainsi que près de la moitié de ces forages captent une eau qui se signale par un début de pollution nitratée (teneur supérieure à 35 mg/l), 12 % affichent plus de 50 mg/l et 1,5 % dépassent 100 mg/l (Agence de l'eau, 1994) (figure 2). Dans le bassin Artois-Picardie, l'altération de la qualité de l'eau souterraine est aujourd'hui bien plus fréquente (70 %) dans les forages sous influence urbaine que dans les forages où le bassin versant est uniquement rural.

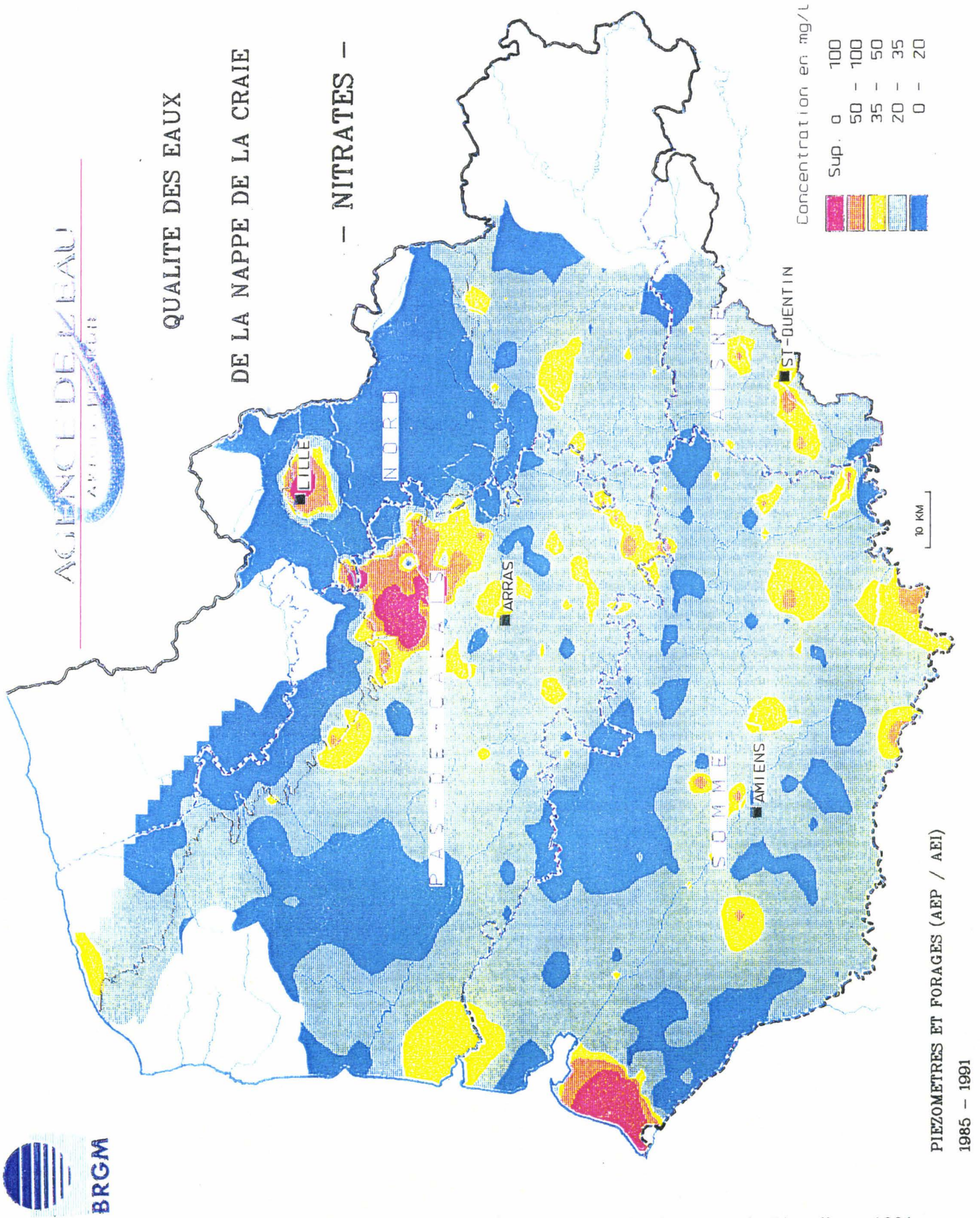


Figure 2 - Teneur en nitrates des nappes phréatiques dans la région Nord - Picardie en 1991

D'un point de vue purement thermodynamique, le problème posé par les nitrates dans les eaux souterraines devrait se résoudre à court terme. En effet, l'ion NO_3^- n'est pas une forme stable de l'azote dans les conditions naturelles des aquifères et tend à être réduit en azote gazeux (N_2) à pH 7 et lorsque le potentiel Redox est inférieur à 700 mV (figure 3) (Howard, 1985). De la même façon, dans un environnement réduit, ($E_h < -200$ mV à pH 7), l'ammoniaque est la forme stable de l'azote, la dénitrification devrait donc conduire à l'accumulation d'ions ammonium.

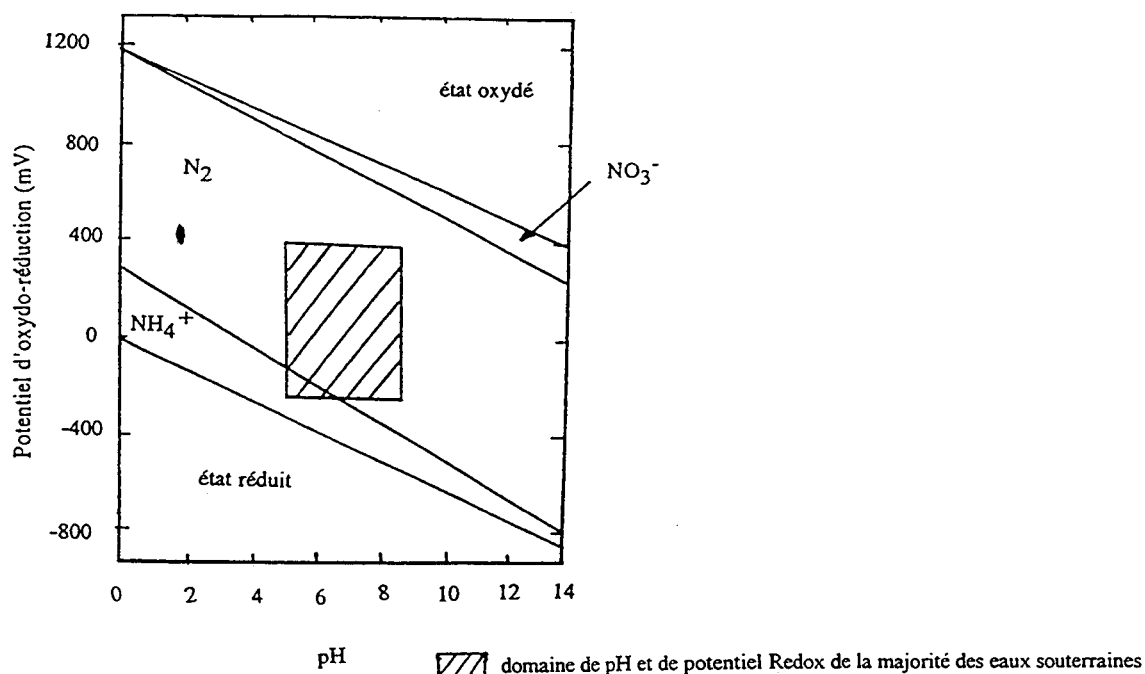


Figure 3 - Diagramme de stabilité des formes minérales de l'azote (d'après Marsh, 1978)
($T=25^\circ\text{C}$, $p=1$ atm, $N_{\text{total}}=14$ mg/l)

Dans un premier temps, nous allons étudier les différents mécanismes biochimiques impliqués au cours de la dénitrification biologique. Au-delà de cette approche fondamentale du phénomène, nous nous sommes particulièrement intéressés aux travaux réalisés par de nombreuses équipes de chercheurs qui essaient, depuis une dizaine d'années, de provoquer ou stimuler une dénitrification biologique *in situ* dans les eaux souterraines.

3. RAPPELS SUR L'EVOLUTION BIOLOGIQUE DE L'AZOTE

De par ses degrés d'oxydation très variables (de -3 à +5), l'azote est un élément présent en grande quantité dans notre environnement sous des formes très diverses (figure 4). C'est également un élément indispensable à la vie, puisqu'il est l'un des éléments constitutifs des acides aminés (Richard *et al.*, 1980).

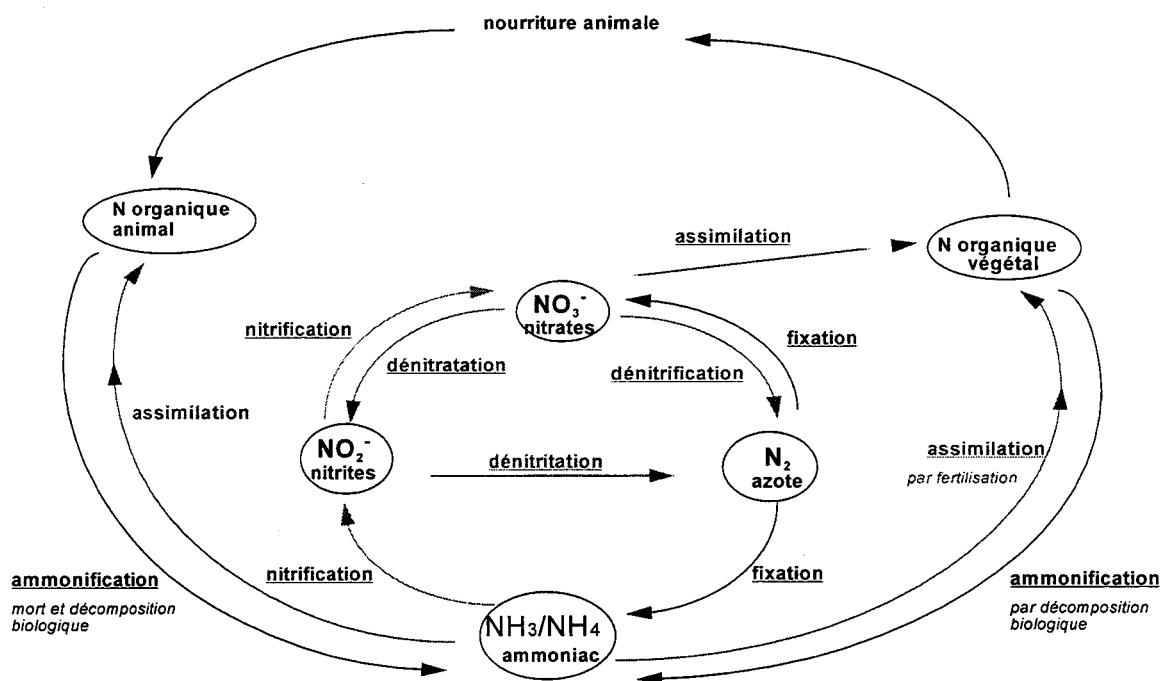


Figure 4 - Cycle de l'azote (schéma modifié d'après Martin, 1979)

Dans la plupart des sols, plus de 95 % de l'azote total est représenté par de l'azote organique, celui-ci se dégradant à un rythme de 1,5 à 2 % par an pour donner de l'azote minéral. Cette dégradation passe successivement par les stades azote ammoniacal, azote nitreux et azote nitrique. L'azote minéral peut être à nouveau utilisé par les micro-organismes du sol et transformé en azote organique. Ces deux processus de minéralisation et d'"immobilisation biologique" se déroulent simultanément dans les sols pendant toute l'année (Hebert *et al.*, 1981). Contrairement à

l'azote ammoniacal adsorbé énergétiquement à la surface des colloïdes argileux et organiques, l'azote nitrique est très mobile et suit le mouvement de l'eau vers le sous-sol. Il peut être dénitrifié et passer dans l'atmosphère sous forme d'azote moléculaire et de protoxyde d'azote. Inversement, l'azote de l'air peut être fixé par voie autotrophe ou symbiotique et entrer dans le cycle interne du sol.

4. LA DENITRIFICATION BIOLOGIQUE

La dénitrification par les micro-organismes résulte, soit de l'utilisation des nitrates pour la synthèse de composés cellulaires azotés (assimilation), soit de la réduction des nitrates en azote moléculaire (dissimilation). L'utilisation de la dénitrification à l'échelle industrielle repose essentiellement sur ce dernier mécanisme. Dans ce cas, la dénitrification biologique est accomplie par des micro-organismes qui utilisent les ions nitrates et nitrites comme accepteurs d'électrons dans des conditions anoxiques. Les ions nitrates et nitrites sont réduits en azote moléculaire mais ne constituent pas un substrat pour les micro-organismes.

On peut distinguer :

- la dénitrification hétérotrophe

Il s'agit d'un phénomène respiratoire se réalisant en conditions anaérobies, dans lequel les accepteurs finaux d'électrons sont les nitrates et les nitrites.

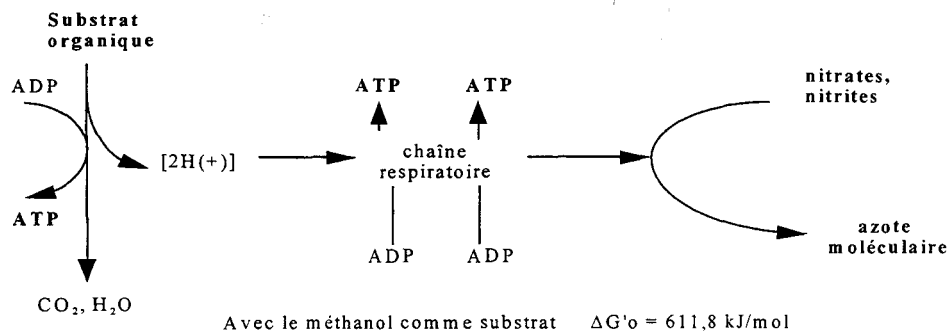


Figure 5 - Schéma de la dénitrification hétérotrophe

La chaîne de transport d'électrons est le mécanisme fondamental qui permet aux cellules de générer de l'énergie. Ce transfert d'électrons s'effectue depuis un donneur d'électron réduit (i.e., le substrat organique) vers un accepteur d'électron oxydé (i.e., les nitrates ou nitrites).

- la dénitrification autotrophe

Elle est réalisée par des micro-organismes qui ont pour caractéristique biologique commune de pouvoir oxyder des espèces minérales réduites du fer et du soufre, et de transférer les électrons libérés vers la réduction des nitrates via une chaîne respiratoire qui libère de l'énergie.

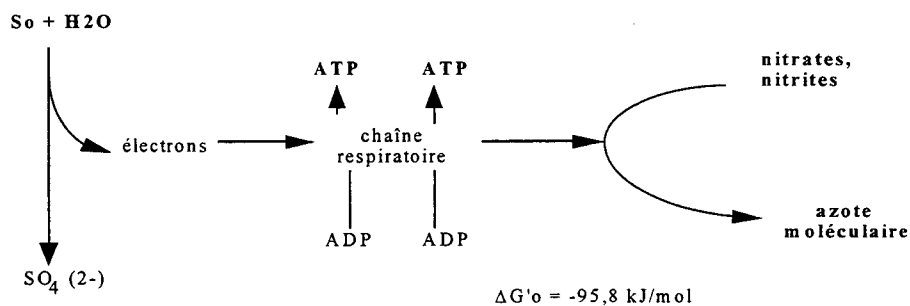


Figure 6 - schéma de la dénitrification autotrophe

Cependant, les bactéries autotrophes et hétérotrophes peuvent coexister puisque les variations des énergies libres standards ($\Delta G_o'$) des deux réactions sont proches. Dans la nature et les systèmes d'épuration, on a donc en fait des cultures mixtes. Néanmoins, les bactéries hétérotrophes présentent toujours un taux de croissance très supérieur à celui des autotrophes. En conséquence, les procédés de dénitrification hétérotrophe auront des potentialités beaucoup plus élevées que les procédés de dénitrification autotrophe.

En milieu anaérobie, la dénitrification est toujours plus efficace avec un organisme dénitrifiant strictement en anaérobiose. Ainsi, Robertson et Kuenen (1992) ont mis en évidence

que les bactéries dénitrifiant en anaérobiose uniquement (ex : *Paracoccus denitrificans*) dominent les bactéries dénitrifiant en aérobiose et en anaérobiose (ex : *Thiosphaera pantotropha*) lors de culture en chémostat, lorsque la source de carbone (acétate) est limitante et que l'oxygène correspond à 80% de saturation de l'air. Par contre, lors d'expériences en chémostat avec alternance de cycles aéro-anaérobiose, *T. pantotropha* est capable de s'adapter au changement environnemental plus rapidement grâce à un système dénitrifiant présent quel que soit le potentiel rédox du milieu.

4.1. Les mécanismes biochimiques de la dénitrification

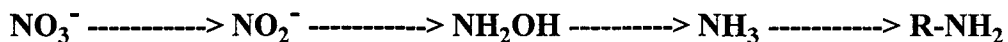
Des changements considérables se produisent au niveau du métabolisme énergétique de la microflore lorsque la disponibilité en oxygène est réduite. La respiration aérobie est remplacée par la respiration anaérobie durant laquelle l'oxygène est remplacé par un autre accepteur d'électrons. D'après Levy et Toutain (1979) et Mariotti (1990), dans un système en excès de nutriments carbonés, les ions oxydés présents dans le milieu vont être réduits successivement dans l'ordre décroissant de leur caractère oxydant, à savoir : l'oxygène, les nitrates, les ions manganiques et ferriques et finalement les ions sulfates. Cette séquence est retrouvée dans la nature à l'interface eau - sédiment.

D'un point de vue énergétique, les nitrates constituent donc le meilleur accepteur d'électrons alternatif en remplacement de l'oxygène. Du fait que les trois produits de la réduction des nitrates, NO, N₂O et N₂ sont des composés gazeux, ils sont évacués vers l'atmosphère, plus ou moins rapidement selon les conditions locales. C'est pourquoi ce procédé est appelé la dénitrification. En terme énergétique, la dénitrification est très compétitive vis-à-vis de la respiration de l'oxygène et débute alors qu'il existe encore de l'oxygène dissous dans le milieu. Au-dessous d'une certaine pression partielle de ce gaz, il devient énergétiquement plus facile pour des bactéries de respirer l'ion nitrate que l'oxygène moléculaire. En effet, en présence d'une source de carbone, l'énergie libre de réaction libérée lors de la dénitrification est très proche de

l'énergie libérée au cours de la respiration aérobie (-125,11 kJ/e⁻ pour la respiration aérobie contre -111,8 kJ/e⁻ pour la dénitrification)(Degrémont, 1989).⁷

La dénitrification est une succession de réactions de réduction faisant intervenir des enzymes différentes. On distingue deux voies de dénitrification : **la voie assimilative** et la **voie dissimilative**, uniquement employée par les bactéries.

4.1.1. La voie assimilative



R : radical carboné

La réduction assimilative des nitrates, utilisée par les plantes, les champignons et quelques bactéries, conduit à la production d'ammonium qui est utilisé pour la croissance des micro-organismes comme source d'azote. Les nitrates sont utilisés pour la synthèse cellulaire.

4.1.2. La voie dissimilative

Au cours de la dénitrification dissimilative, qui est un processus exclusivement bactérien, les nitrates sont réduits en produits gazeux. La première étape est identique à celle observée lors de la voie assimilative.



Dans une voie dissimilative, les nitrates sont utilisés en tant qu'accepteurs d'électrons lors de la production d'énergie grâce à une chaîne respiratoire. Dans la plupart des conditions, le produit final de la dénitrification dissimilative est l'azote moléculaire N₂, ou le dioxyde d'azote N₂O. Le schéma du transfert d'électrons, lors de la réduction des nitrates en azote moléculaire, chez *Paracoccus denitrificans* est présenté figure 7 (Stouthamer, 1990).⁸ Ce procédé est la voie principale de formation biologique de N₂. Thermodynamiquement, le gaz N₂ est la forme la plus stable de l'azote.

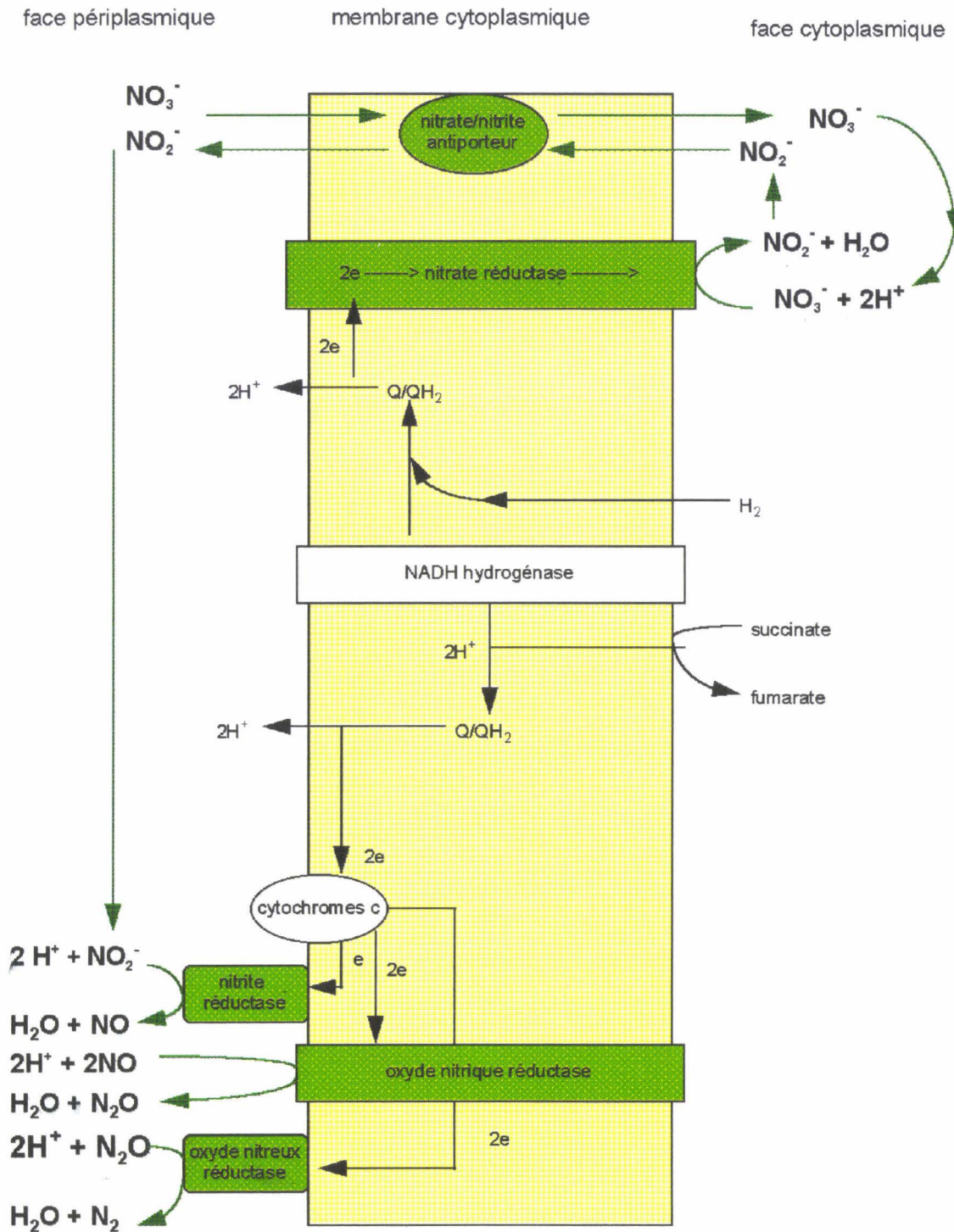


Figure 7 - Schéma de la dénitrification chez *Paracoccus denitrificans* (d'après Stouthamer, 1990 ; modifié)

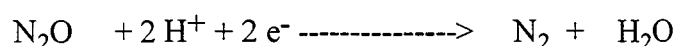
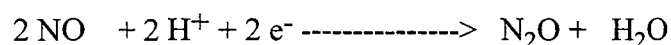
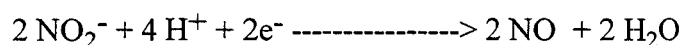
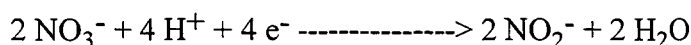
Les agents impliqués dans cette transformation appartiennent aux genres *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Thiobacillus*... (Schwartzbrod et Martin, 1985). Les bactéries contrôlant cette succession de réductions sont le plus souvent uniquement capables d'accomplir une ou deux de ces étapes : la microflore dénitrifiante est un ensemble complexe de micro-organismes fonctionnant en synergie (Mariotti, 1990).

4.1.3. Stoechiométrie

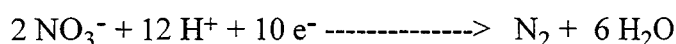
Seuls quelques éléments (C, N, H, O, S, Fe et Mn) participent à la régulation du potentiel Redox dans la nature. Au cours de la dénitrification, la réduction successive des formes minérales de l'azote fait intervenir des électrons, en nombre plus ou moins important, qui sont ensuite transférés sur une chaîne respiratoire.

Les équations stoechiométriques théoriques sont utilisées pour prévoir la quantité de donneurs d'électrons (i.e., substrat carboné) et d'accepteurs (nitrates, nitrites) consommés, ainsi que la masse de cellules produites au cours d'un procédé biologique. L'apport d'électrons doit être suffisant pour assurer une dénitrification efficace, ce qui suppose un apport en carbone réalisé en quantité équilibrée.

Les équations stoechiométriques, ainsi que les électrons qu'elles mettent en jeu pour effectuer la réduction de deux molécules de nitrates en azote moléculaire, sont données ci-dessous.



soit pour l'équation globale :



4.1.4. Les étapes de la dénitrification dissimilative

La dénitrification est une suite de réactions faisant intervenir un complexe de quelques 40 gènes formant des protéines et des cofacteurs (Stouthamer, 1992).

a/ La dénitratation

Cette étape permet la réduction des nitrates en nitrites. Elle se réalise grâce à l'activité d'une enzyme : la nitrate réductase (NaR). Les nitrates réductases de la voie dissimilative se différencient de celles associées à la réduction assimilative et fermentative par le produit final qui est, dans le cas de la dénitrification dissimilative, du dinitrogène (N_2), et par l'activité régulatrice qu'exercent l'oxygène et l'ammoniaque (Hochstein, 1993). D'une manière générale, la NaR de la voie assimilative est une protéine soluble alors que la NaR de la voie dissimilative est une protéine liée à la membrane. C'est une enzyme qui couple la réduction des nitrates en anaérobiose à la formation d'un gradient de protons engendrant une force protomotrice et ainsi une production d'énergie (Garland *et al.*, 1975 ; Daniel *et al.*, 1980).

La nitrate réductase a été particulièrement étudiée chez *Paracoccus denitrificans* (Stouthamer, 1990 ; 1992). C'est une molybdoenzyme contenant des groupements Fe-S et du molybdène. Elle contient trois polypeptides : alpha, bêta et gamma possédant chacun un co-facteur à molybdène (Chaudry et McGregor, 1983) et quatre complexes fer-soufre catalysant la réduction des nitrates avec un donneur d'électrons (Stouthamer, 1990). Ce caractère semble identique chez de nombreux organismes (Hochstein et Tomlinson, 1988). Ce complexe membranaire utilise le "pool" quinol membranaire comme donneur d'électrons pour la réduction des nitrates (Morpeth et Boxer, 1985). Les électrons sont ensuite transférés depuis les groupements hémiques de la sous-unité gamma, via les centres fer/soufre de la sous-unité bêta, vers le co-facteur à molybdène de la sous-unité alpha où la réduction des nitrates a lieu

(Bonney *et al.*, 1994). Ainsi, la source physiologique d'électrons pour la dénitrification est constituée par des substrats qui sont oxydés par des deshydrogénases (Stewart, 1988).

La nitrate réductase est inhibée par une concentration en oxygène supérieure à 60 μM , quelle que soit la concentration en nitrates. Sears *et al.* (1993) suggèrent que l'oxygène exerce une inhibition directe de la protéine effectuant le transport des nitrates à travers la membrane cytoplasmique. En effet, Stouthamer (1988) ont montré que le contrôle du transport des électrons, lors de la dénitrification, semblait dépendre de façon importante de la présence d'oxygène qui change l'état Redox de l'ubiquinone, ce qui contrôle le mouvement des nitrates. La disparition graduelle de l'oxygène favorise la synthèse normale de la nitrate réductase, alors que pour un changement trop rapide vers l'anaérobiose, la synthèse de la nitrate réductase ne s'effectue pas (Ouvrage collectif, 1990).

Récemment, une autre classe de NaR a été décrite (Michalski et Nicholas, 1984 ; Robertson et Kuenen, 1984 ; McEvan *et al.*, 1987 ; Bell *et al.*, 1990 ; Richardson *et al.*, 1990, 1992 ; Sabaty, 1993 ; Sears *et al.*, 1993 ; Siddiqui *et al.*, 1993 ; Warnecke-Eberz et Friedrich, 1993 ; Sabaty *et al.*, 1994). Contrairement à la NaR liée à la membrane qui est composée de 3 sous-unités, cette nouvelle enzyme périplasmique semble être constituée de deux sous-unités seulement (Bonney et Demoss, 1994). Elle n'est pas sensible à l'oxygène du fait, probablement, de sa localisation (Bell *et al.*, 1990) et s'exprime en conditions aérobies et anaérobies. Si son rôle dans la dénitrification n'est pas encore clairement défini, Bonney et Demoss (1994) considèrent que sa fonction principale consisterait en une adaptation à un métabolisme anaérobie en maintenant la balance redox au cours du passage de l'aérobiose à l'anaérobiose. De nombreux micro-organismes possèdent deux des nitrates réductases décrites. *Alcaligenes eutrophus* est, à ce jour, le seul organisme possédant les trois types de nitrate réductases (Warnecke-Eberz et Friedrich, 1993).

b/ La dénitrification

La réduction des nitrites en monoxyde d'azote constitue l'étape clé de la dénitrification. En effet, à des concentrations élevées, les nitrates sont réduits plus rapidement que les nitrites. Ces derniers ont alors tendance à s'accumuler.

Il apparaît que le produit final est également très dépendant de la composition du milieu. Pfitzner et Schlegel (1993) rapportent que l'activité nitrite réductase est induite exclusivement chez les cellules cultivées en anaérobiose. L'inhibition de l'activité nitrite réductase par l'oxygène semble être fortement dépendante de la concentration initiale des nitrites dans le milieu (Mitsutoshi *et al.*, 1984).

La nitrite réductase a été étudiée chez *Pseudomonas aureofaciens* (Zumft *et al.*, 1987), *Alcaligenes faecalis* S.G. (Godden *et al.*, 1991) et *Achromobacter cycloclastes* (Nishiyama *et al.*, 1993). La nitrite réductase (NiR) existe sous deux formes :

- une enzyme multihème avec deux types de groupes prosthétiques : hème c et d (Stouthamer, 1988 ; Hochstein et Tomlinson, 1988). Les sous-unités de cette protéine dimérique sont d'environ 60 kdaltons. Elle possède également une activité cytochrome-oxydase. Néanmoins, la principale fonction reste la réduction des nitrites. Ceci est mis en évidence par les valeurs des constantes d'affinité (K_m) de l'enzyme de *Paracoccus denitrificans* pour l'oxygène et les nitrites qui sont respectivement estimés à 80 et 6 μM (Timkovich *et al.*, 1982). La nitrate réductase à cytochrome cd est une enzyme périplasmique. Il a été montré que les protons consommés durant la réduction des nitrites sont puisés au niveau de face périplasmique de la membrane cytoplasmique (Boogerd *et al.*, 1981). La nitrite réductase est inhibée par la présence de NO en fortes concentrations (de l'ordre de 0,3 mM) (Kucera, 1992).

- une enzyme contenant du cuivre. Cette enzyme présente des sous-unités de taille et de degrés de polymérisation plus variables que la NiR multihème (Sann *et al.*, 1994). Le diethyldithiocarbamate (DDC) est un inhibiteur spécifique des nitrites réductases à cuivre (Shapleigh et Payne, 1985).

c/ La réduction du monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote (NO) est réduit en dioxyde d'azote. Le monoxyde d'azote est un composé toxique, en particulier à cause de sa réactivité avec les protéines contenant du fer hémunique et non hémunique. La nitrique oxyde réductase possède une constante d'affinité apparente (K_m) très faible et une vitesse maximale supérieure à celle de la nitrite réductase. Ceci explique que la concentration en NO dans le milieu n'atteint pas des niveaux toxiques à l'équilibre (Goretski et Hollocher, 1990). La nitrique oxyde réductase (NO réductase) est la seule enzyme connue capable de former les ponts N-N dans N_2O (Stouthamer, 1992). C'est une enzyme liée à la membrane chez *Paracoccus denitrificans* et *Pseudomonas stutzeri*. Elle est constituée de deux polypeptides de poids moléculaire 38 et 17 kDaltons (kDa) et contient des groupements hémiques b et c plus du fer non hème.

En tant qu'intermédiaire dans la dénitrification, une fonction importante du monoxyde d'azote est de servir d'accepteur d'électron et de conserver l'énergie. Ainsi chez *Paracoccus denitrificans*, une mole de NO réduite en N_2O permet la translocation de 0,5 mole de protons (Carr *et al.*, 1989). Dans la mesure où les protons consommés lors de la réduction des nitrites en dioxyde d'azote ou en dinitrogène sont pris dans l'espace périplasmique, le monoxyde d'azote doit être réduit sur la face périplasmique de la membrane cytoplasmique (Meijer *et al.*, 1979).

Selon Kucera (1992), les inhibiteurs de cette étape peuvent être classés en trois catégories distinctes :

- les composés inorganiques contenant de l'azote (N_2 , NH_2OH , N_2O , NO),
- les agents organiques lipophiles,

- les détergents.

Les concentrations catalytiques en nitrite réductase et NO réductase jouent un rôle cinétique critique gouvernant l'évolution de la dénitrification. La variation de ces paramètres entraîne l'installation d'un régime périodique. L'augmentation du rapport nitrite réductase / NO réductase semble être influencée par des variations de facteurs environnementaux tels que le pH. Selon Payne (1981) et Knowles (1982), lorsque le pH diminue, le produit final de la dénitrification passe de N₂ (à pH>=7) à N₂O (5<pH<7) puis à NO (ph=<5).

d/ La réduction du dioxyde d'azote (N₂O)

Cette réduction conduit à la formation de dinitrogène, N₂, produit final de la dénitrification dissimilative. A l'exception de quelques espèces dénitrifiantes telles que *Flexibacter canadensis* (Jones *et al.*, 1992), l'oxyde nitreux réductase est une enzyme soluble présentant des métalloprotéines contenant des atomes de cuivre. Néanmoins, le nombre d'atomes de cuivre par molécule semble différer selon le genre et l'espèce de la souche isolée (8 chez *Paracoccus denitrificans*, *Pseudomonas stutzeri* (Snyder et Hollocher, 1987) - 4 seulement chez *Alcaligenes faecalis* (Jones *et al.*, 1992)).

L'activité de l'oxyde nitreux réductase (N₂O réductase) est couplée à la formation d'ATP. Elle est inhibée par NO et est sensible à la présence d'oxygène. Des cellules de *P. denitrificans* ne sont pas capables de réduire les nitrites et le dioxyde d'azote en conditions aérobies. Dans ce cas, une compétition entre les réductases et les oxydases joue un rôle important (Kucera *et al.*, 1983).

Les dernières réductases de la séquence de dénitrification sont plus sensibles à l'oxygène que les précédentes.

4.2. Les paramètres principaux de la dénitrification biologique

Pour qu'il y ait dénitrification biologique efficace, plusieurs conditions doivent être remplies :

- ✓ les micro-organismes doivent présenter **l'information génétique nécessaire**,
- ✓ **cette information doit pouvoir s'exprimer**, c'est-à-dire ne doit pas être sujette à répression,
- ✓ **un apport d'électrons suffisant** pour la réduction des nitrates en azote moléculaire doit être assuré (☛¹ . §4.1.2.), ce qui implique **une source de carbone** en quantité équilibrée,
- ✓ les enzymes de la dénitrification ne doivent pas être soumises à **une inhibition fonctionnelle par des excès initiaux ou induits d'une forme particulière de l'azote**,
- ✓ toutes les synthèses cellulaires doivent être possibles, en particulier celles des enzymes de la dénitrification et des protéines transporteuses d'électrons ; ce qui implique **la biodisponibilité des métaux** qui leur sont associés,
- ✓ **les conditions environnementales** du milieu (pH, température, oxygène dissous..) doivent permettre la synthèse cellulaire et l'expression enzymatique.

4.2.1. Les formes minérales de l'azote

Tous les micro-organismes ont besoin d'azote pour leurs synthèses protéiques et leur croissance. L'azote représente un pourcentage non négligeable de la masse bactérienne avec une valeur moyenne de 7 à 12 %. La plupart des bactéries sont capables d'utiliser l'azote sous forme d'ions ammoniacque ou de nitrates. Néanmoins l'ammoniacque reste la forme préférentielle d'assimilation dans la mesure où il constitue la source la plus facilement utilisable pour la synthèse protéique (Gayle *et al.*, 1989).

En conditions anaérobies, le régulateur le plus important de l'activité dénitrifiante dans le sol est la disponibilité des nitrates (Baumgärtner et Conrad, 1992). Des concentrations croissantes en nitrates stimulent la dénitrification (Knowles, 1982 ; Payne, 1981). Les nitrates sont des sels

¹ le symbole "☛" renvoie au paragraphe ou au dessin indiqué

très solubles. L'azote nitrique, à la différence de l'azote ammoniacal et de l'azote organique, ne connaît pratiquement aucune interaction avec les particules du sol, qui puisse le retenir même temporairement.

Lors d'une étude sur des sédiments d'aquifères contenant des nitrates à des concentrations de 0,7 μM à 8,6 μM , Bradley *et al.* (1992a) ont observé une relation significative entre les taux de dénitrification et la teneur en nitrates, et ce principalement dans les sédiments les plus pauvres en nitrates ($[\text{NO}_3^-] < 1\mu\text{M}$), indiquant que la concentration en nitrates limite les activités dénitrifiantes des bactéries dans ces conditions. Des sédiments issus d'un site à Parris (Islande) recevant des eaux résiduaires nitratées ont montré des taux de dénitrification de 1,7 $\text{nmol N}_2\text{O/g.j.}$ pour des sédiments issus de profondeurs comprises entre 5 et 180 m et de 173 $\text{nmol N}_2\text{O/g.j.}$ pour des sédiments de surface (Morris *et al.*, 1988).

Les cinétiques de dénitrification diffèrent selon les concentrations en nitrates :

- $[\text{NO}_3^-] < 176 \text{ mg NO}_3/\text{l}$ ou substrat carboné non limitant : cinétique d'ordre 1 par rapport aux nitrates ($v_{\text{dénit}} = k [\text{NO}_3^-]^1$)
- $[\text{NO}_3^-] > 176 \text{ mg NO}_3/\text{l}$ ou substrat carboné limitant : cinétique d'ordre 0 ($v_{\text{dénit}} = k [\text{NO}_3^-]^0$)

Par ailleurs, lors d'essais de dénitrification par des cellules immobilisées sur un support synthétique, Nitisoravut et Yang (1992) ont pu mettre en évidence que la dénitrification était, dans ces conditions, une réaction d'ordre 1 pour des concentrations en nitrates dans l'eau d'alimentation variant de 56,9 à 845,6 $\text{mg NO}_3/\text{l}$.

De nombreuses études sur l'effet inhibiteur des nitrates ont été réalisées sur des souches pures, ce qui implique souvent des résultats contradictoires liés aux capacités dénitrifiantes des souches elles-mêmes. En culture mixte de micro-organismes fixés, une concentration seuil de 200 $\text{mg N-NO}_3/\text{l}$ est donnée (George et Antoine, 1982). Les perturbations dans la réduction des nitrates à plus haute concentration (960 $\text{mg NO}_3/\text{l}$) seraient dues à un effet inhibiteur des nitrites à

70 mg N-NO₂/l (Vossoughi, 1981). Cette influence des nitrites sur les cinétiques de dégradation est aussi mise en évidence par d'autres auteurs (Mycielski *et al.*, 1983).

4.2.2. Le carbone

Le rendement de dénitrification est très fortement dépendant de la nature du substrat carboné, les meilleurs taux étant obtenus avec les formes les plus facilement dégradables (Isaacs et Henze, 1995). Dans les eaux, le carbone est présent sous forme minérale : dioxyde de carbone dissous (CO₂ dissous), hydrogénocarbonates (HCO₃⁻) et carbonates (CO₃²⁻) ; ces composés sont libres ou forment des associations plus ou moins labiles. En dehors des constituants minéraux, l'eau renferme des substances organiques plus ou moins riches en carbone et plus ou moins concentrées pouvant être d'origine naturelle (acides aminés, sucres) ou liées à l'activité humaine (pesticides, hydrocarbures). A côté de ces substances carbonées non vivantes, il ne faut pas négliger un réservoir carboné important constitué par le plancton, les algues et les bactéries dans les eaux superficielles (Schwartzbrod et Martin, 1985). Dans les eaux souterraines, la concentration en carbone organique est limitée par l'oxydation de la matière organique en dioxyde de carbone. Dans les aquifères profonds, l'apport de carbone organique soluble du sol n'est pas important et la source potentielle de carbone dégradable est davantage constituée par le matériel géologique constituant la matrice (Hiscock *et al.*, 1991). D'une manière générale, les diverses expériences réalisées ont montré que les teneurs naturelles en carbone organique des eaux souterraines (moyenne de 0,7 à 3 mg Demande Chimique en Oxygène (DCO)/l) ne permettent qu'une réduction biologique potentielle d'environ 1 à 4,5 mg N-NO₃/l dans les conditions normales. De même, de nombreux chercheurs ont montré que l'addition de substances carbonées stimulait l'activité dénitrifiante dans les sédiments aussi bien au laboratoire que sur le terrain (Boussaid *et al.*, 1988, Jechlinger *et al.*, 1992).

Des comparaisons effectuées sur les activités de sédiments différents dans leur concentration en carbone organique ont confirmé la relation existant entre les taux de dénitrification et de carbone. Selon l'étude menée par Bradley *et al.* (1992a), la teneur en matière

organique intervient pour 80 % environ dans la variation de la dénitrification dans les sédiments étudiés dont la concentration en nitrates variaient de 0,7 μM à 8,6 μM . Au cours de cette étude, la relation hautement significative (probabilité < 0,001) entre la dénitrification et la teneur en matière organique totale dans les sédiments indique que la limitation en carbone peut être un facteur important contribuant à l'accumulation de nitrates dans les aquifères anaérobies. En 1975, Burford et Bremmer ont montré, sur 17 sols de nature et composition différentes, que l'importance de la dénitrification est plus fortement dépendante de la teneur en carbone assimilable (coefficient de corrélation $r^2 = 0,99$) que de la teneur en carbone total ($r^2 = 0,77$).

L'addition de matière organique facilement biodégradable doit couvrir deux besoins : une étape initiale où elle servira à éliminer l'oxygène dissous, ce qui permettra, dans une seconde étape, la dénitrification grâce aux électrons fournis lors de son oxydation. Par conséquent, le rapport Demande Chimique en Oxygène (DCO) /N-NO₃ est le premier facteur gouvernant la réduction complète des nitrates (Hanaki *et al.*, 1992). Sorensen (1987) a émis l'hypothèse que la réduction assimilative des nitrates en ammoniacque était prédominante lorsque la concentration en nitrates est faible et que les concentrations en carbone organique sont importantes. Suivant l'équation 7 (tableau 2), la valeur théorique du rapport DCO/N-NO₃ pour une dénitrification complète est de 2,24, lorsque le glucose est le substrat carboné. En fait, la demande en composés organiques pour la dénitrification hétérotrophique inclut non seulement la réduction des nitrates, mais aussi la synthèse de biomasse et la réduction du milieu (élimination de l'oxygène dissous). La composition cellulaire est modélisée par C₅H₇NO₂ (Hoover et Porgess, 1952), ce qui constitue le modèle communément utilisé dans les traitements des eaux et les systèmes de dénitrification (McCarty, 1971). Si on considère un milieu sans oxygène dissous, le ratio serait de 3,87 (équation 8). D'une façon générale, plus la molécule possède d'atomes de carbone, plus la diversité des micro-organismes pouvant se développer à partir de cette molécule sera grande. Par ailleurs, l'utilisation de composés avec de nombreux atomes de carbone pourra conduire à la formation de plusieurs métabolites de faible poids moléculaire, parfois toxiques, non compatibles avec l'utilisation humaine de l'eau.

STOECHIOMETRIE	g DCO/ gN-NO ₃	g substrat/ gNO ₃ éliminé	g biomasse produite / g NO ₃ éliminé	références
éthanol				
1. $5C_2H_5OH + 12NO_3^- \rightleftharpoons 10HCO_3^- + 20H^+ + 9H_2O + 6N_2$	2.85	0.31		Hamsch et Werner, 1989
2. $0.613C_2H_5OH + NO_3^- \rightleftharpoons 0.102C_5H_7NO_2 + 0.714CO_2 + 0.286H^+ + 0.98H_2O + 0.449N_2$	4.09	0.45	0.18	Hamsch et Werner, 1989
acide acétique				
3. $5CH_3OOH + 8NO_3^- \rightleftharpoons 8HCO_3^- + 2CO_2 + 6H_2O + N_2$	2.26	0.48		Lemoine <i>et al.</i> , 1988
4. $0.819CH_3OOH + NO_3^- \rightleftharpoons 0.068C_5H_7NO_2 + 0.301CO_2 + HCO_3^- + 0.902H_2O + 0.466N_2$	2.96	0.63	0.12	Hamsch et Werner, 1989
méthanol				
5. $5CH_3OH + 6NO_3^- \rightleftharpoons 6OH^- + 5CO_2 + 7H_2O + 3N_2$	2.84	0.43		Walker, 1990
6. $1.8CH_3OH + NO_3^- + H^+ \rightleftharpoons 0.065C_5H_7NO_2 + 0.76CO_2 + 2.44H_2O + 0.467N_2$	6.14	0.93	0.12	Lauch et Guter, 1986
glucose				
7. $C_6H_{12}O_6 + 5.6NO_3^- + 9.6H^+ \rightleftharpoons 6CO_2 + 10.8H_2O + 2.8N_2$	2.24	0.51		
8. $C_6H_{12}O_6 + 3.3NO_3^- + 7.3H^+ \rightleftharpoons 0.5C_5H_7NO_2 + 3.5CO_2 + 7.9H_2O + 1.4N_2$	3.87	0.88	0.28	
*équations stoechiométriques à l'équilibre : 1, 3, 5 et 7 ; équations associées à la croissance : 2, 4, 6 et 8				
* la composition cellulaire est notée ici C ₅ H ₇ NO ₂ (il n'est pas tenu compte de l'influence du substrat sur celle-ci)				

Les sources de carbone les plus utilisées dans le cas d'un traitement de l'eau par dénitrification de l'eau sont le méthanol (DCO = 1,5 g/g de méthanol), l'éthanol (DCO = 2,09 g/g d'éthanol), le glucose (DCO = 1,00 g/g de glucose) et l'acide acétique (DCO = 1,07 g/g d'acide acétique) (Mateju *et al.*, 1992).

Les coûts d'utilisation du méthanol, de l'éthanol et de l'acide acétique, comme substrat carboné pour la dénitrification, en réacteur à lit fluidisé, ont été évalués par Croll (1985). Dans des conditions opératoires telles que les concentrations en nitrates de l'effluent traité soient de 12 à 14 mg NO₃⁻/l, le méthanol semble avoir le moindre coût pour un rendement de dénitrification identique ; l'acide acétique et l'éthanol étant respectivement de 50 à 25 % plus coûteux. En comparant l'acétate, le méthanol et le glucose, Tam *et al.* (1992) et Gerber *et al.* (1986) trouvent que l'acétate donnait le meilleur rendement de dénitrification suivi respectivement du méthanol et du glucose. Par contre, avec des eaux plus chargées en nitrates ([NO₃⁻] > 100 mg/l), l'éthanol est souvent la source de carbone retenue (Green *et al.*, 1994).

Dans le cas de stations d'épuration urbaines, l'eau résiduaire elle-même, ou la biomasse, peuvent être utilisées comme substrats. Henze (1989) a comparé les rendements de dénitrification avec les différentes sources de carbone citées ci-dessus. Il a constaté que le pourcentage d'élimination obtenu avec le carbone contenu dans les eaux usées était trois fois supérieur à celui relevé avec de l'acide acétique ou du méthanol. Le tableau 3 met en évidence la situation de dépendance entre la source de carbone et la vitesse de dénitrification.

Le rôle joué par la source de carbone lors de la dénitrification biologique varie considérablement selon le type d'installation utilisée. Il apparaît donc difficile de privilégier une source de carbone par rapport aux autres. De plus, il faut prendre en compte que tout le carbone présent n'est pas utilisable pour la dénitrification car une partie sera employée par les micro-organismes stockant des polyphosphates. Ainsi, Isaacs et Henze (1995) ont mis en évidence que la concentration en orthophosphates augmentait après une addition de substrat carboné (2-2,2 g DCO utilisé / g PO₄³⁻ relargués) (Kern-Jespersen et Henze, 1992 ; Wentzel *et al.*, 1992).

Substrat	vitesse à 20°C (mg N-NO ₃ ⁻ /g Matière Vivante . heure)
éthanol	5,1
acide acétique	4,9
méthanol	2,5
glucose	3,1
propionate	5,1
butyrate	5,1
respiration endogène	1,5

Tableau 3 - Influence du substrat sur la vitesse de dénitrification
(d'après Degrémont, 1989)

Des composés organiques gazeux, tels que le méthane et le monoxyde de carbone, peuvent également être utilisés comme substrats lors de la dénitrification biologique. Parmi les composés gazeux, le méthane est l'un des plus étudiés. Il existe des contradictions, au regard de son métabolisme, dans la littérature. De nombreux auteurs (Davies, 1973 ; Park et Hegeman, 1984) ont mis en évidence la possible utilisation du méthane comme donneur d'électrons par quelques bactéries dénitrifiantes. D'autres auteurs (Yull-Rhee et Futts, 1978) ont suggéré que l'oxydation du méthane nécessite des conditions aérobies ou microaérophiles et que, par conséquent, la dénitrification doit être le résultat d'une relation symbiotique entre deux groupes d'organismes ayant des besoins différents. Des études réalisées en Allemagne (Selenka *et al.*, 1986, Barrenstein *et al.*, 1986), évaluant les traitements *in situ* d'eaux contaminées par les nitrates soit par infiltration d'eau additionnée de carbone, soit par injection de méthane, ont montré que l'eau carbonée stimulait davantage les activités de dénitrification que le gaz naturel.

Selenka et Dressler (1990) ont effectué une dénitrification d'eaux souterraines dans des réacteurs par des micro-organismes chimolithotrophes, fixés à des filtres de polypropylène, avec de l'hydrogène comme source d'énergie. L'hydrogène présente l'avantage de ne pas être polluant et non toxique, ce qui autorise son utilisation pour des eaux destinées à la consommation humaine

(Dries *et al.*, 1988). Dans une installation à capacité horaire de 50 m³, Selenka et Dressler (1990) ont ramené la concentration en nitrates de 80 à 5 mg/l. Dans un premier temps, ces auteurs ont observé l'apparition de nitrites, mais après une période d'observation de 18 mois, la concentration en nitrites n'excédait pas 0,02 mg/l dans l'effluent. Par ailleurs, Dries *et al.* (1988) ont étudié la dénitrification avec de l'hydrogène dans des réacteurs à biofilms fixés sur des matrices de polyurethane. Une charge volumique de 2,2 kg NO₃⁻/m³.jour est atteinte à 20°C avec une concentration dans l'influent de 66 mg NO₃⁻/l. D'après ces auteurs, ce procédé de dénitrification n'est pas applicable en l'état à des eaux dont la concentration est supérieure à 50 mg NO₃⁻/l. Pour des concentrations plus élevées, la dénitrification chimolithotrophe devra être précédée par un procédé faisant appel à de la dénitrification hétérotrophe afin d'éliminer la majeure partie des nitrates présents.

Une étude réalisée en Suisse a évalué la dénitrification *in situ* lorsque la source d'énergie est l'hydrogène (Ginocchio, 1983). L'eau souterraine, polluée par les nitrates, était amendée avec de l'hydrogène, du dioxyde de carbone et des phosphates en surface puis réinjectée au sein de la nappe. Après 4 semaines, la concentration en nitrates de l'aquifère était passée de 92 à 11 mg/l. Lors d'essais de dénitrification autotrophique en lit fluidisé, Kurt *et al.* (1987) ont déterminé que le rapport des concentrations en hydrogène et nitrates, en vue d'une dénitrification complète, était de 0,35.

Dans la plupart des installations sur site, le méthanol constitue le choix le plus approprié du fait de son faible coût, d'une bonne production de biomasse et d'une faible émission de composés volatils (Moore et Schroeder, 1970 ; Francis *et al.*, 1977 ; Odegaard, 1994). Le méthanol reste le substrat présentant les meilleures caractéristiques d'exploitation. Néanmoins, étant donné sa toxicité potentielle vis-à-vis de l'homme (Keyvan-Larijani et Tannenberg, 1974 ; Clay *et al.*, 1975), il ne doit être envisagé pour la dénitrification des eaux *in situ* et/ou destinée à la consommation humaine que s'il est associé à une élimination complète du carbone résiduel. On lui préfère l'acide acétique ou l'éthanol (Martin, 1979).

Un des problèmes rencontrés, lors du choix de la source de carbone, est la sélection de souches pathogènes telles que *Pseudomonas aeruginosa* qui se développent alors préférentiellement. Différents auteurs ont montré que *Ps. aeruginosa* est notamment la souche dominante lorsque la source de carbone est l'acide acétique (Blaszczyk, 1983). Ce substrat ne pourra donc être retenu dans l'optique d'une dénitrification *in situ* ne faisant pas appel à un post-traitement bactériologique. Dans cette optique, les deux seuls substrats exogènes retenus sont le glucose et l'éthanol.

4.2.3. Le phosphore

Le phosphore, au même titre que le carbone et l'azote, est un constituant essentiel de la matière vivante. Le phosphore entre dans la composition des acides nucléiques, des nucléotides impliqués dans les phénomènes de phosphorylation, des métabolites et protéines phosphorylés, dans le stockage des polyphosphates ou la synthèse de polymères de réserve énergétique (glycogène et polyhydroxybutyrate). Il représente 1,5 à 2% du poids sec de biomasse. Il est à noter cependant, que ce pourcentage augmente avec le taux de croissance et varie inversement avec la température (Degrémont, 1989). Le phosphore influence le taux de croissance de la biomasse :

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \{[\text{NO}_3^-] / (K_p + [\text{NO}_3^-])\} \cdot \{[\text{Glc}] / (K_g + [\text{Glc}])\} \cdot \{[\text{PO}_4^{3-}] / (K_p + [\text{PO}_4^{3-}])\}$$

μ : taux de croissance (heure⁻¹)

K : constante d'affinité (mg/l)

On admet généralement que :

$K_p \# 0,2$ mg PO_4^{3-} / litre

$K_n \# 0,05$ à $0,06$ mg NO_3^- / litre

$K_g \# 1$ mg glucose / litre

D'après cette équation, les valeurs en phosphates doivent être de l'ordre de 2 mg PO_4^{3-} / litre pour obtenir une valeur proche de μ_{max} .

Selon Bradley *et al.* (1992b), l'addition de phosphates ne stimule pas la dénitrification à court terme. En effet, lors d'expériences menées sur des sédiments ayant une concentration en nitrates de 0 à 4 mM (soit 0 à 248 mg NO_3^-/l), l'addition de 1 mM de phosphate (PO_4^{3-}) n'a pas affecté de façon significative le taux de dénitrification sur une période d'étude de 20 jours. Lorsque la concentration initiale en nitrates est de 4 mM, les vitesses de dénitrification obtenues, en absence et en présence de phosphates, étaient respectivement de 0,5 et 0,6 nM N_2O /g.h. Ces résultats sont en contradiction avec d'autres résultats antérieurs montrant que l'addition de phosphates stimulait la dénitrification (Chapelle, *résultats non publiés*). La nature des sédiments utilisés par Bradley *et al.* (1992b) semble être à l'origine de cette différence de résultats. Il est regrettable qu'aucune détermination de la teneur en phosphates des sédiments n'ait été réalisée, à l'origine, car il semble probable que ces sédiments aient pu constituer une réserve en phosphates disponibles en concentration non limitante pour le métabolisme des micro-organismes.

4.2.4. L'oxygène

La dénitrification étant pour l'essentiel un procédé qui ne se produit qu'en anaérobiose ou du moins lorsque la pression en oxygène est réduite, il existe un seuil au-dessus duquel aucune réduction des nitrates n'est observée. L'oxygène étant en compétition avec les nitrates en tant qu'accepteur d'électrons lors du métabolisme énergétique des cellules, il est donc un important inhibiteur de la réaction de dénitrification. En effet, si l'oxygène et les nitrates sont disponibles comme accepteurs d'électron, le choix de l'accepteur final est, bien entendu, celui qui donne la plus grande quantité d'énergie par électron. Cette énergie étant plus grande dans le cas de l'oxygène, il en résulte que les électrons sont transférés en priorité sur l'oxygène, dans les conditions standards (pH 7, température $T=25^\circ\text{C}$, pression $p=1\text{atm}$, [substrats]=[produits]=1 Molaire). Dans la réalité, il est difficile de donner des concentrations limites en oxygène au-delà

desquelles la dénitrification est inhibée, car ces valeurs dépendent de la nature et de la concentration en carbone organique, des concentrations *in situ* des réactants et des produits, de la température et du pH. Par ailleurs, elles dépendent également de la taille des agrégats bactériens (floc ou biofilm), et donc des facilités de transfert plus ou moins grandes de l'oxygène vers les bactéries. Ces facteurs expliquent la variabilité des résultats publiés. Ainsi, Skerman et McRae (1957) ont démontré que la réduction des nitrates n'est pas observée à des concentrations en oxygène de l'eau supérieures à 6,25 μM (soit 0,2 mg/l). Pour Focht et Chang (1925), la concentration en oxygène, au-dessus de laquelle la réduction des nitrates est entièrement interrompue, est comprise entre 6 et 63 μM (soit 0,192 et 2,01 mg/l). D'autres études ont montré que les taux de dénitrification et de dénitrification augmentent pour des concentrations en oxygène inférieures à 20-30 μM (soit 0,64-0,96 mg/l) puis diminuent lorsque la concentration en oxygène est supérieure à 30-40 μM (soit 0,96 et 1,28 mg/l). Ces intervalles sont à mettre en relation avec les proportions des différentes espèces bactériennes présentes dans le milieu (Mitsutoshi *et al.*, 1984). Il est important de noter qu'une réduction significative des nitrites peut être observée en conditions aérobies, alors que la réduction des nitrates est complètement inhibée. En effet, des expériences menées sur des milieux synthétiques ont montré que la nitrate réductase est inhibée dès que la teneur en oxygène est supérieure à 0,35 μM (Nelson et Knowles, 1978) alors que la nitrite réductase ne l'est qu'à des valeurs supérieures à 5 μM (Sacks et Barker, 1949).

Une autre approche consiste à mesurer, non pas l'oxygène dissous, mais le potentiel d'oxydo-réduction. Bien que les chiffres rencontrés divergent fréquemment, on peut estimer que la dénitrification ne s'effectue dans des conditions acceptables que si le potentiel d'oxydo-réduction est inférieur à 220 mV (Degremont, 1989). Selon Zehnder et Stumm (1988), la réduction des nitrates en azote moléculaire se déroule dès que le potentiel rédox est inférieur à 0,75 Volt (V) et ce jusqu'à 0,5 V environ. Néanmoins, une réduction partielle des nitrates en nitrites se déroule lorsque le potentiel Redox est inférieur à 0,4 V. Il apparaît donc que le produit final de la réduction des nitrates sera fortement dépendant des conditions rédox du milieu.

De nombreux auteurs ont signalé que, dans les traitements biologiques aérobies, on constatait le plus souvent un déficit lorsqu'on effectuait le bilan en azote. Ceci est attribué à des pertes d'azote moléculaire par dénitrification, ce qui semblerait indiquer une bonne tolérance vis-à-vis de l'oxygène dissous.

4.2.5. Le pH

Les bactéries dénitrifiantes sont, pour la plupart, très légèrement basophiles avec un optimum de pH compris entre 7,5 et 8,5, mais la dénitrification est possible pour des pH variant de 4 à 11 (figure 8). Bradley *et al.* (1992b) rapportent que les taux de dénitrification diminuent avec le pH.

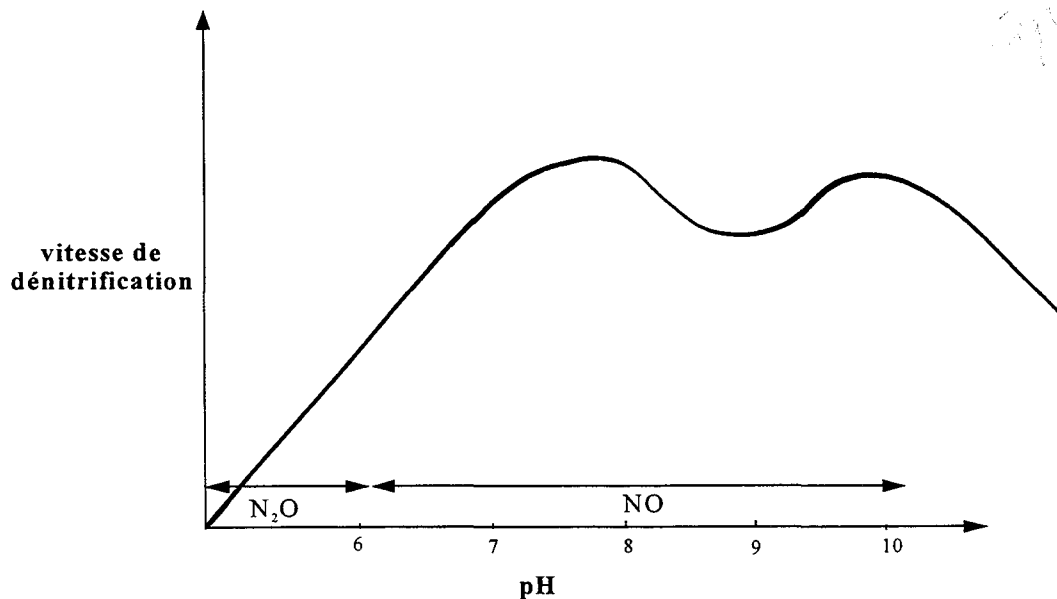


Figure 8 - Influence du pH sur la dénitrification et la nature du produit final (d'après Leblanc, 1978)

Ainsi à pH 4 et lorsque le pH est le seul facteur impliqué, ce taux est inférieur de 68 % au taux maximal observé à pH 7 pour des concentrations initiales en nitrates des sédiments de 2,3 μM (0,14 mg/l). L'inhibition par le pH semble être liée aux teneurs en nitrates et nitrites. L'augmentation de la concentration en acides non ionisés aux faibles pH pourrait expliquer, au moins partiellement, cette inhibition. Par ailleurs, l'effet du pH se caractérise par une modification des produits finaux. La part de N_2O augmente corrélativement à la baisse du pH jusqu'à être dominant à pH 4.

4.2.6. La température

La gamme des températures où s'effectue la dénitrification, de $+5^\circ\text{C}$ (Mulbarger, 1987 ; Dawson et Murph, 1972) à $+75^\circ\text{C}$, reflète la grande variété des micro-organismes capables d'effectuer la dénitrification. La température optimale n'est pas clairement définie mais il n'y a pas de dénitrification possible au-dessous de 3°C et au-dessus de 85°C . La température a une influence sur les taux de dénitrification et de dénitrification puisqu'ils augmentent entre 5 et 30°C selon l'équation (Degremont, 1989):

$$r_T = r_{20^\circ\text{C}} * Q^{(T-20)}$$

r_T et $r_{20^\circ\text{C}}$: vitesses de dénitrification à T et 20°C exprimées en mg $\text{N-NO}_3/\text{mg MV.h}$

Q : constante d'Arrhenius égale à 1,116 entre 5 et 27°C

Une simulation a été réalisée, d'après cette équation, avec quatre substrats différents (éthanol, acide acétique, glucose et méthanol) pour des températures variants de 5 à 27°C (figure 9). Il apparaît que l'apport de substrat carboné sous la forme d'éthanol ou d'acide acétique permet l'obtention de vitesses de dénitrification très supérieures à celles obtenues lorsque la source de carbone est le glucose ou le méthanol. De plus, le passage d'une température de 10°C (température d'une nappe phréatique) à 20°C (température du laboratoire) multiplie par 2,8 la vitesse de dénitrification.

Une étude comparative, mise en place par Lind (1983), à des températures de 10 et 25°C, correspondant respectivement à la température *in situ* et à la température de laboratoire, montrait que les basses températures diminuent l'activité microbienne et donc les vitesses de dénitrification.

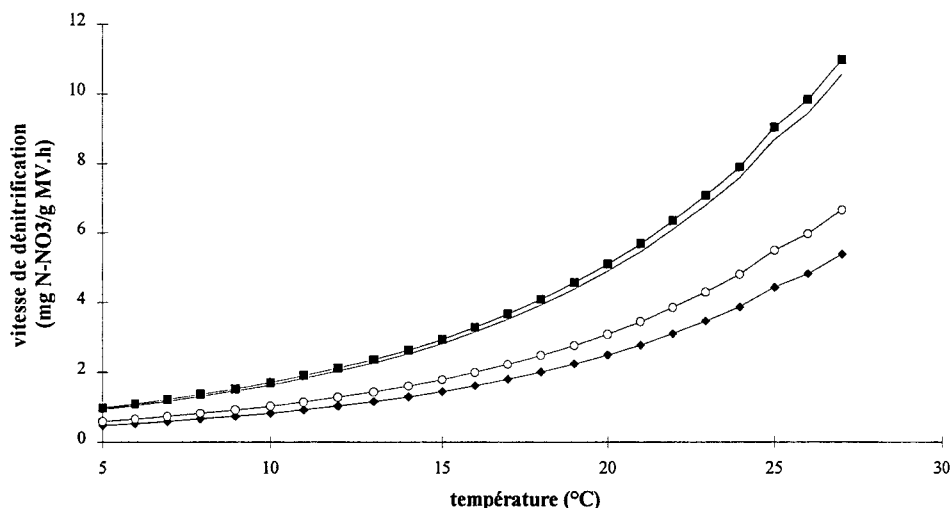


Figure 9 - Evolution de la vitesse de dénitrification en fonction de la température [éthanol (■), acide acétique (-), glucose (○), méthanol (◆)]

Lors d'une étude de dénitrification en bioréacteur sur des eaux contenant des concentrations de l'ordre de 40 à 75 mg/l, Eppler et Eppler (1988) ont déterminé qu'une augmentation de la température du réacteur de 10°C (de 12 à 22°C) doublait la vitesse de dénitrification, lorsque le substrat carboné est l'éthanol. La courbe obtenue avec l'éthanol (figure 9) donne une multiplication de la vitesse par 3 pour une même variation de température. Gauntlett et Craft (1979) expliquaient ce phénomène par les effets synergiques de la température et de l'oxygène : à des températures élevées, la solubilité de l'oxygène est moindre, augmentant ainsi la vitesse des procédés biologiques anaérobies.

4.2.7. Les inhibiteurs potentiels

Si le principal inhibiteur de la dénitrification reste la concentration en oxygène, d'autres substances sont connues pour les effets inhibiteurs qu'elles exercent sur la réduction des nitrates (tableau 4). Les plus importants sont les **composés sulfurés**. Knowles (1982) a mis en évidence l'action inhibitrice de l'acétylène sur la réaction N_2O/N_2 . Cette inhibition a donné naissance à une méthode ("the C_2H_2 block technique") permettant de quantifier l'activité dénitrifiante en dosant l'oxyde nitreux, N_2O , accumulé.

Inhibiteur	nature du milieu utilisé	Références
<u>fongicides</u> : captam, nabam, maneb	sol	Bollag et Henniger (1976)
<u>herbicides</u>	sol	
azoture (N_3^-) cyanure (CN^-)	milieu synthétique	Knowles (1982)
<u>pesticides</u> : napam, dalapon	sol	
SO_4^{2-} , S^{2-} Cd ($>50\mu g/ml$), Cu ($>50\mu g/ml$), Zn ($>500\mu g/ml$)	sol milieu synthétique	Kowalenko (1979) Bollag <i>et al</i> (1973)

Tableau 4 - Principales substances ayant une action inhibitrice sur la dénitrification

MacElhammon *et al.* (1981a, 1981b, 1984) ont constaté que la dénitrification était retardée par de très faibles quantités de pesticides ($< 1\mu g/g$ de sol) tels que l'atrazine, la simazine, la nitrapyrine et l'etridiazole. Néanmoins, dans une étude comparative, Bremmer (1986) n'a pu confirmer ces résultats.

La plupart des métaux lourds se comportent comme des toxiques vis-à-vis de la flore bactérienne. C'est le cas plus particulièrement du **cuivre**, du **chrome**, du **nickel**, du **zinc**, du **mercure** et du **plomb**. Ces métaux agissent soit en se fixant sur certains sites enzymatiques qu'ils

bloquent, soit en dénaturant certaines enzymes, soit enfin en modifiant la perméabilité de la membrane cellulaire.

Des anions comme les **cyanures**, les **fluorures**, les **arséniates**, les **chromates** et **bichromates** ont un comportement analogue (Degrémont, 1989). Dans la pratique, il est souvent possible d'adapter une culture bactérienne à la présence de toxiques ou d'inhibiteurs, et de reculer les seuils de toxicité. Ainsi, certains métaux peuvent se fixer sur le floc bactérien, sous forme de complexes organo-métalliques insolubles, sans perturber la croissance bactérienne.

L'**arsenic** inhibe les activités dénitrifiantes et contribue à l'accumulation des nitrates dans les eaux. Au cours d'une étude réalisée sur des sédiments où la teneur en nitrates excédait 56 mg/l, Bradley et Chapelle (1993) émettaient une distinction entre les effets sur la dénitrification d'une exposition à court terme à l'arsenic et d'une exposition chronique. Il apparaît que l'effet inhibiteur d'une exposition chronique à l'arsenic est partiellement réversible. Une diminution de sa concentration permettant une augmentation significative de l'activité dénitrifiante. Une augmentation sur une courte période de la teneur en arsenic ne semble avoir une influence négative sur la dénitrification uniquement lorsque les sédiments sont amendés en glucose. L'arsenic est supposé bloquer la production d'ATP par inhibition compétitive de la phosphorylation de l'ADP (Lehninger, 1970). Il est alors raisonnable de supposer qu'un tel mécanisme d'inhibition métabolique augmente de façon importante lorsque les réserves en ATP cellulaire s'épuisent (Bradley et Chapelle, 1993).

5. APPLICATIONS DANS LE TRAITEMENT IN SITU

5.1. Généralités

Actuellement, les exigences dans le domaine de la dépollution font naître de nouvelles opportunités en matière de technologies des procédés. Les ressources des micro-organismes dans

ce domaine sont immenses et les biotechnologies apparaissent comme les plus prometteuses. Des études, que les USA ont été les premiers à mettre en place, montrent les potentialités importantes des populations naturelles et tentent de les intégrer dans des processus de décontamination. Les procédés microbiologiques sont exploités à partir de réactions qui interviennent spontanément dans la nature quand les conditions sont favorables. Deux modes opératoires complètement différents existent pour les procédés de biotraitement (Hamer, 19..) : d'un côté les opérations *in situ* résultant de la stimulation des activités des micro-organismes indigènes, déjà présents dans l'environnement pollué ; de l'autre, le traitement des eaux et des sols pollués dans des installations de surface facilitant ainsi l'optimisation des conditions opératoires. En réalité, il existe une grande confusion de langage entre les différents procédés permettant le biotraitement de nappe. On distingue actuellement trois types de procédés (Figure 10):

- le procédé "*in situ*" **sensu stricto (type 1)** où l'eau reste en place et le traitement se réalise dans le milieu naturel, nécessitant uniquement un apport de nutriments en solution dans la nappe pour favoriser le développement des souches présentes. L'injection de solution grâce à des puits n'est envisageable que lorsque la matrice rocheuse réceptrice a une perméabilité supérieure à 10^{-6} m/s. Pour des valeurs inférieures, il s'avère nécessaire de fracturer au préalable la roche grâce à une injection d'air sous pression dans le puits.
- le procédé "**on site**" avec **dépollution "*in situ*" (type 2)** ; il nécessite le pompage de l'eau et sa ré-injection dans le sol après apport de nutriments, voire de micro-organismes,
- le procédé "**on site**" avec **bioréacteur (type 3)** ; l'eau polluée est pompée depuis la nappe et traitée en surface dans des installations spécifiques. L'eau traitée est ensuite ré-injectée dans la nappe.

Les procédés de traitement biologique de l'azote (nitrification et/ou dénitrification) sont bien connus et couramment utilisés dans les stations de traitement des eaux urbaines. Les industriels ont très souvent sur leur réseau d'effluents de process une station d'épuration traitant les composés azotés. S'ils existent la conception des systèmes de dépollution azotée des eaux industrielles est basée sur l'expérience acquise dans les installations d'épuration municipales.

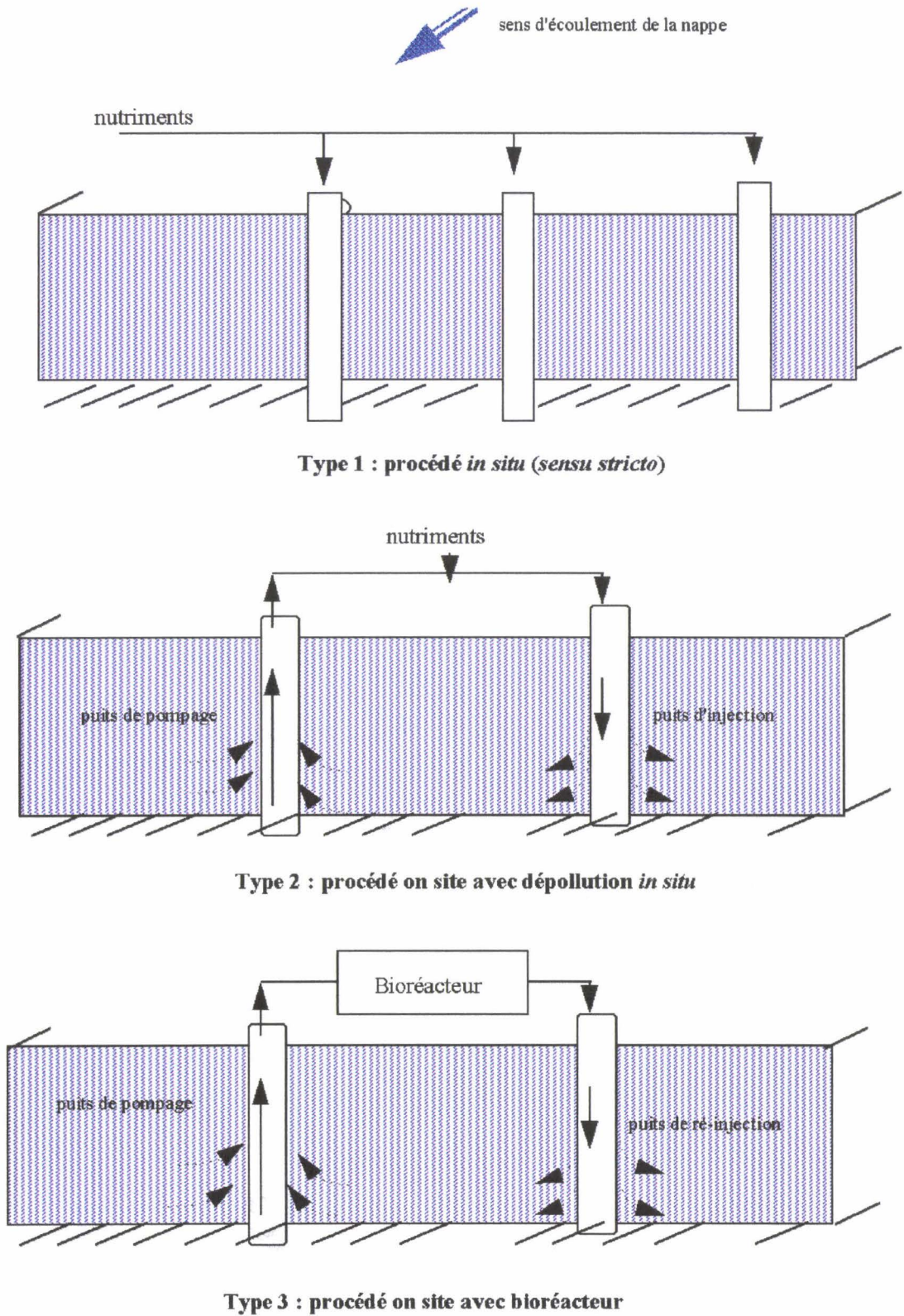


Figure 10 - Procédés de dépollution biologique des nappes souterraines

Cependant, il existe très peu d'applications de ces procédés pour le traitement des eaux industrielles hors stations d'épuration. Néanmoins, la compréhension du procédé fondamental de la dépollution azotée est impérative lors du passage à l'application industrielle, et ce d'autant plus que les eaux à traiter renferment très souvent des composés toxiques. Ainsi, dans le cas, de la dénitrification biologique, les nitrates sont convertis en nitrites puis en azote gazeux.

En conditions de stress, comme par exemple dans des eaux toxiques, la dénitrification peut être inhibée et entraîner une accumulation de nitrites. Comme les nitrites sont toxiques pour les micro-organismes dénitrifiants, cette accumulation diminue très sensiblement l'efficacité du procédé (Brond *et al.*, 1994). Un des facteurs les plus stressants pour les micro-organismes dénitrifiants est la carence en substrat carboné utilisable. Si le but premier à atteindre, lors de la mise en place d'un procédé de biotraitement, est l'élimination quasi-totale du polluant toxique, aucun des substrats ou compléments apportés ne doit :

- ✓ se retrouver dans l'eau, au terme de l'opération, à une concentration supérieure à celle autorisée par la norme ou par les objectifs fixés en concertation avec les partenaires institutionnels (objectifs fixés dans les conditions techniques et économiques du moment),
- ✓ donner lieu à des composés ou métabolites toxiques à des teneurs, elles aussi supérieures aux objectifs fixés (norme "eau potable",...).

5.2. La dénitrification "*in situ*" naturelle

Le principe du traitement biologique *in situ* repose sur la présence dans le sol et les eaux souterraines de nombreux micro-organismes capables de dégrader la plupart des produits organiques considérés comme des polluants. La dénitrification *in situ* souterraine pose quelques problèmes majeurs difficiles à résoudre, notamment les vitesses de dénitrification qui restent faibles et difficilement contrôlables car elles dépendent de facteurs tels que la dispersion au sein de l'aquifère et ses caractéristiques géologiques (Mateju *et al.*, 1992), le nombre de bactéries

présentes, leurs activités spécifiques, la présence d'une source d'électrons. D'une façon plus générale, Lallemand-Barrès et Bonnin (1989) signalent dans le rapport remis au Ministère de l'Industrie et de l'Aménagement du Territoire que la vitesse du processus dépend de différents facteurs comme la température, le pH, la perméabilité, qui doit être suffisante pour permettre une bonne circulation des additifs injectés, et de la présence de nutriments (rapport adéquate C/N/P). D'autres désavantages ou limites du traitement *in situ* sont constitués par le colmatage des espaces poreux de l'aquifère par les gaz produits lors de la dénitrification (Mariotti, 1990), la précipitation de sels minéraux et la mort du matériel biologique, phénomènes déjà rencontrés lors de contaminations faibles et auxquels nous risquons d'être confrontés de façon très importante lors de cette étude.

Dans le Nord de la France, les conditions géologiques entraînent l'existence d'un certain nombre de secteurs où la nappe de la craie passe de l'état libre à l'état captif sous un recouvrement imperméable alluvionnaire ou tertiaire. Lorsqu'on dispose de suffisamment de forages situés à proximité et de part et d'autre de l'interface nappe libre - nappe captive, on constate que de brusques diminutions des teneurs en nitrates s'effectuent sur de courtes distances (Caulier et Préaux, 1983). Le passage en captivité des nappes rend les échanges gazeux avec l'air atmosphérique plus difficiles. On observe une consommation de l'oxygène par les micro-organismes entraînant des teneurs très faibles dans la nappe captive et la baisse du potentiel d'oxydo-réduction. L'aquifère acquiert alors un caractère réducteur qui favorise la réduction des nitrates.

Dans le cas de sols calcaires, Erickson *et al.* (1990) ont rapporté que le transport au sein des agrégats se réalise largement par diffusion. Dans les aquifères anaérobies, de nombreuses études ont montré que la disponibilité en azote et en carbone, de même que le pH, la concentration initiale et apportée en oxygène, et, bien sûr, la population de bactéries dénitrifiantes sont susceptibles de limiter les potentialités dénitrifiantes des sols (Payne, 1981 ; Mitsutoshi *et al.*, 1984).

5.3. La dénitrification "*in situ*" provoquée

5.3.1. Principes de base

De nombreux chercheurs (Dahab et Lee, 1992 ; Soares *et al.*, 1988) ont entrepris des études afin de mettre en évidence l'intérêt de la dénitrification biologique provoquée en place pour la réduction des nitrates dans les eaux souterraines. On a vu précédemment que l'efficacité des procédés biologiques dépendait de deux paramètres principaux, à savoir la concentration en biomasse (conditionnant la Charge Volumique) dans les installations, et les constantes cinétiques spécifiques des micro-organismes (conditionnant la Charge Massique), lesquelles sont soumises aux paramètres environnementaux (température, pH...). L'optimisation des procédés d'épuration biologique passe donc par une augmentation de la quantité des micro-organismes dans les bioréacteurs, et ce principalement grâce à leur fixation sur un support mobile ou immobile.

Dans le traitement *in situ*, le réacteur est constitué par le milieu naturel ce qui présente plusieurs intérêts par rapport au traitement *ex situ* en bioréacteurs :

- ✓ le matériel géologique constitue une carrière filtrante au sein de l'aquifère qui va permettre l'adsorption des micro-organismes.
- ✓ dans un tel procédé, on traite l'eau et la matrice simultanément sans nécessiter de pompage important de l'eau hors de l'aquifère ce qui diminue les coûts en équipements physiques. Selon Eppler et Eppler (1988), le coût d'une opération de dénitrification biologique en réacteur comprend les coûts de maintenance, de personnel, de fonctionnement et bien sûr du réacteur lui-même, soit environ 10% des coûts annuels totaux.
- ✓ le traitement *in situ* diminue très nettement les risques de variations saisonnières de température.

Ces mêmes auteurs reportent que le rendement d'épuration des nitrates ($r = ([NO_3]_{\text{entrée}} - [NO_3]_{\text{sortie}}) \times 100 / [NO_3]_{\text{entrée}}$) de ce traitement biologique variait entre 90 et 100% lorsque la concentration initiale en nitrates des eaux est de 60 mg/l et que l'apport en éthanol est de 27 mg/l. Il est intéressant de noter à ce niveau que tout procédé biologique possède une limite inférieure de rendement. Dans le cas d'un traitement d'une pollution azotée, il est donc plus important de s'intéresser à la teneur en nitrates dans l'effluent.

Le traitement *in situ* présente également des inconvénients :

- ✓ le contrôle du procédé *in situ* est rendu plus difficile, notamment par la difficulté de mettre en place des outils de mesure travaillant en continu dans l'aquifère et l'impossibilité d'ajuster instantanément les apports à réaliser.
- ✓ l'aspect non homogène de l'aquifère crayeux rend très difficile une répartition uniforme des nutriments apportés (la perméabilité de la craie diminuant avec la profondeur, par exemple). En admettant que les nutriments, avant toute utilisation par les bactéries, doivent d'abord être dissous dans l'eau de la nappe, leur utilisation par les micro-organismes sera dépendante de leur solubilité et de leur diffusibilité dans cette phase (Hamer, 19..). Il devient alors nécessaire de mettre en place de nombreuses zones d'injections du substrat pour optimiser la répartition des nutriments dans l'ensemble de la zone à traiter. Dans les cas précédemment étudiés, l'injection est réalisée grâce à des puits.

Afin d'aboutir à un transport immédiat du substrat du puits d'injection vers l'aquifère, celui-ci est très souvent injecté par pulsion et par intermittence. Ce système présenterait l'avantage de limiter la production de biomasse autour du puits et par conséquent de minimiser les problèmes de colmatage au niveau des puits. Selon Mercado *et al.* (1988), l'injection intermittente du substrat par pression aboutit à la respiration endogène des nitrates limitant ainsi la production de la biomasse et prévenant d'éventuels colmatages de l'aquifère. Lors de toutes les études

précédemment citées, il ne faut pas oublier que les concentrations en nitrates à traiter restaient inférieures à 300 mg NO₃⁻/l, induisant des apports en source carbonée qui restaient malgré tout limités. Lors des injections intermittentes, Dahab et Lee (1992) ont observé une chute importante de la fraction de nitrates réduits au début de chaque cycle, mettant ainsi en évidence que lors de chaque période de dormance, où l'alimentation en carbone est interrompue, les bactéries dénitrifiantes sont contraintes à effectuer la respiration endogène devenant ainsi moins actives. Le système retrouve une activité dénitrifiante dès que l'alimentation reprend.

5.3.2. Dispositifs de terrain

Quelques systèmes de dénitrification sur site avec biotraitement *in situ* ont été proposés, nécessitant tous l'installation de puits. Quelques uns de ces systèmes, considérés à ce jour comme les plus performants, sont proposés ci-dessous.

5.3.2.1. Le système Daisy

Proposé par Mercado *et al.* (1988), le système Daisy est constitué de plusieurs puits d'injection disposés concentriquement par rapport à un puits de pompage (Annexe 2, figure 1). En comparaison d'autres systèmes où l'alimentation et le pompage sont réalisés sur le même puits ("vertical doublet system in a large diameter well"), ou le système constitué de deux puits de profondeurs différentes ("recharge and pumping at the same well"), il présente l'avantage de ne nécessiter qu'un seul puits de pompage de l'eau et donc de diminuer les coûts. La dispersion hydrodynamique est un paramètre important gouvernant l'efficacité du système Daisy. Dans le cadre de l'étude menée par Mercado *et al.*, la réduction des nitrates de 100 à 50 mg/l nécessiterait 5 à 6 puits d'injection dans un périmètre de quelques mètres. Ces résultats, qui peuvent apparaître médiocres, sont interprétés comme le résultat d'un mauvais mélange entre l'eau de la nappe et l'eau injectée et d'un colmatage important par des produits gazeux. Par ailleurs, le choix du saccharose, sucre fermentescible, apparaît inadapté car son pouvoir de sélection des seules souches dénitrifiantes est faible (Mariotti, 1990).

5.3.2.2. Le système Nitredox

Dans ce système, les puits d'injection sont disposés sur deux cercles concentriques (Annexe 2, figure 2). Les injections de substrat sont réalisées simultanément à un pompage dans les puits adjacents du cercle externe afin d'assurer une bonne homogénéisation. Les puits situés sur le cercle interne servent au pompage de l'eau via un aérateur où le dinitrogène est enlevé et où l'eau est saturée en oxygène ; ceci afin d'oxyder les nitrites résiduels. Le puits central permet le pompage de l'eau après traitement.

Proposé en Autriche par Braester et Martinell (1988), le système Nitredox est constitué de 9 puits sur l'anneau externe et 9 sur le cercle interne. De l'eau et du méthanol sont injectés dans l'anneau externe. Ce principe leur a permis d'obtenir, avec un débit de 215 m³/h, un abattement de la concentration en nitrates de plus de 100 à moins de 25 mg NO₃⁻/l, et de maintenir la concentration en nitrites inférieure à 0,02 mg/l. Ce procédé devrait limiter le colmatage, permettre, dans la partie intérieure oxydante du dispositif, la totale minéralisation par oxydation du carbone organique résiduel non utilisé lors de la dénitrification (Mariotti, 1990).

5.4. La dénitrification sur site

La dénitrification sur site correspond à un système de dénitrification aérien en réacteur suivi d'une ré-injection de l'eau dans le sous-sol (☛ figure 8, type 3). Cette troisième approche est la plus utilisée à l'heure actuelle car elle permet un contrôle facile de l'ensemble des paramètres.

Collin *et al.* (1984) et Boussaid *et al.* (1985) rapportent une expérimentation sur la nappe alluviale de la Vilaine dont la teneur en nitrates des eaux varie entre 50 et 60 mg NO₃/l. Une parcelle de 1,5 hectare a été équipée de la façon suivante : un forage central et trois réacteurs dénitrifiants à lits fixés de 1 m³ disposés en étoile autour du forage à environ 15 mètres de ce dernier (Annexe 2, figure 3). Le support utilisé est le sable calcaire et l'apport de carbone est réalisé sous forme de matières organiques végétales. Un plot de 1 m² de surface reçoit ensuite

l'eau. Avec un débit d'exploitation de 3 m³/h (20 à 30 % étant recyclés), environ 200 à 300 l/h sont envoyés sur chaque réacteur. Un abattement de la teneur en nitrates de 65 % est alors observé en sortie des réacteurs.

En 1986, Böckle *et al.* relatent les résultats obtenus lors d'essais de dénitrification sur site. Le procédé est composé de deux étapes : la première consiste en un traitement de l'eau à la surface suivie d'une étape qualifiée de "naturelle" dans le sol qui a pour rôle principal d'éliminer la DCO résiduelle. L'eau polluée par les nitrates est pompée. Après addition de nutriments (acide acétique et phosphates), l'eau subit une dénitrification dans un réacteur à lit fixé composé de charbon actif. L'eau est ensuite enrichie en oxygène, afin d'éliminer les nitrites éventuellement présents en sortie de réacteur, avant d'être ré-injectée dans l'aquifère par un puits (Annexe 2, figure 4). Lors des essais menés par Böckle *et al.* (1986), il a été mis en évidence une diminution sensible du pourcentage d'élimination des nitrates lorsque la DCO de sortie était fixée à 0,1 mg/l comparativement à ceux obtenus avec une DCO résiduelle de 1 mg/l. En maintenant une DCO résiduelle supérieure à 1,5 mg/l, une diminution de la concentration en nitrates en sortie de réacteur de 92 % (de 60 à 5 mg NO₃/l) est obtenue. Après infiltration de l'eau dans le sous-sol, aucune diminution de la concentration en nitrates n'est observée ; par contre, la DCO diminue.

5.5. La quantification de la dénitrification *in situ*

De nombreuses méthodes de caractérisation de la dénitrification (mesure du potentiel Redox, dosage des gaz, analyse de la flore,...) ont été proposées dans la bibliographie (Mariotti, 1990), mais il n'existe pas de méthode universelle permettant de quantifier, de façon simple et fiable, la dénitrification en milieu naturel.

Au niveau de la dénitrification dans les sols, la constitution de la microflore dénitrifiante semble une variable très aléatoire et ne constitue donc pas un paramètre de mesure réaliste. De même, l'aptitude à produire du N₂O est un caractère peu stable qui varie avec les bactéries

(Germon et Henault, 1994). Dans les eaux, le dosage des nitrates et nitrites résiduels reste la méthode la plus simple à mettre en oeuvre.

Une approche directe consiste à utiliser le traçage isotopique naturel de l'azote qui accompagne le processus de dénitrification. L'azote possède deux isotopes, stables ^{14}N et ^{15}N , présents en quantités différentes dans l'environnement. Il existe donc un effet isotopique important puisqu'il y a une différence de masse entre les deux isotopes. Lors de la dénitrification biologique, les enzymes conduisant à la réduction des nitrates en azote gazeux sont beaucoup plus actives avec l'isotope ^{14}N car les liaisons établies entre l'oxygène et l'azote léger ^{14}N sont plus facilement rompues que celles établies avec l'azote lourd ^{15}N (Mariotti, 1990). Cette technique de mise en évidence de la dénitrification trouve sa limite lors du traitement d'eaux contenant de l'ammoniaque parallèlement aux nitrates. En effet, lors du prélèvement, l'aération des échantillons conduit à une oxydation de l'ammoniaque, qui, lorsque les concentrations en ammoniaque présent sont importantes, modifie de façon importante la concentration en azote nitrique résiduel.

6. CONCLUSION

L'avenir semble donc prometteur pour les nouvelles technologies de traitement des nappes phréatiques polluées par les nitrates au moment où est publié, après quatre ans d'attente, le décret "nitrates" réclamé par Bruxelles (Journal Officiel du 5 mars 1996). Face à une prise de conscience collective du patrimoine que constitue l'eau, les nouvelles technologies devront s'intégrer dans l'environnement tout en prenant en compte les contraintes économiques fortes qui pèsent aujourd'hui sur les entreprises responsables de la pollution.

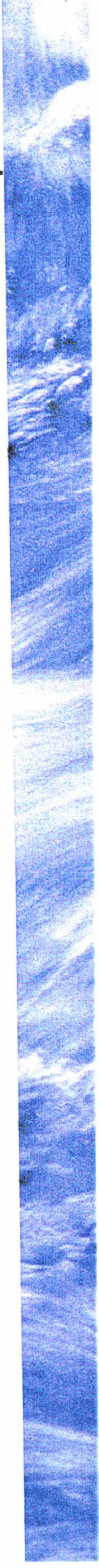
La dénitrification biologique nécessite de nombreuses conditions quant à son démarrage et son déroulement optimal. Dans de très nombreux cas, la dénitrification est limitée par la présence

d'un donneur d'électron et non par la présence de bactéries dénitrifiantes qui semblent omniprésentes (Mariotti, 1990). La majorité des expériences actuellement mises en place font appel à des donneurs d'électrons tels que l'éthanol ou le méthanol. De plus, les expériences reportées correspondent à des expériences où le volume d'eau traité varie de 20 à 60 m³/h, avec des capacités de réduction des nitrates de 25 à 97 %, ce qui correspond à des taux de réduction faibles de 0.11 à 0.31 Kg N/h, qui plus est sur des concentrations initiales faibles, par comparaison avec des méthodes de traitement en réacteur de surface (Mariotti, 1990). L'efficacité des interventions directes sur la nappe reste très discutée. En Allemagne, il ressort d'une étude statistique sur une centaine de cas que la réussite totale est impossible, notamment en raison du coût (Académie des Sciences, 1991). Aux U.S.A., l'Environmental Protection Agency (E.P.A.) a démontré que les coûts des travaux de décontamination sont d'autant plus élevés et leur réussite meilleure que le diagnostic et les études préalables font l'objet d'une bonne approche scientifique. Cette approche passe par la maîtrise des paramètres nutritionnels des micro-organismes.

L'arrivée accidentelle ou provoquée de carbone organique dans un aquifère permet le plus souvent à la dénitrification de démarrer mais l'analyse des cas étudiés montre que ces techniques d'épuration in situ sont encore trop rustiques et trop brutales, gérant mal les problèmes de prolifération bactérienne, génératrice de colmatage (Mariotti, 1990). Dans l'état actuel des connaissances et des techniques, l'expérience prouve qu'il est encore difficile et coûteux de réussir la réhabilitation d'une nappe contaminée, quels que soient le type de polluant concerné, les moyens mis en oeuvre, la rapidité d'intervention. Il est notamment exceptionnel de pouvoir la rendre utilisable pour la consommation humaine. Il se confirme donc que seule la prévention peut assurer la pérennité de la qualité des nappes phréatiques (Rapport de l'Académie des Sciences, 1991).

Le programme de recherches mis en place pour le déroulement de la thèse a compris une période d'acquisition d'informations complémentaires dans la zone d'étude choisie et d'interprétation des paramètres physico-chimiques en terme d'activité biologique potentielle. Cette phase est passée par la réalisation de sondages carottés courts au droit des différents points de la nappe phréatique, l'analyse des paramètres physiques et l'identification des micro-organismes présents tant au niveau des sols prélevés que des eaux. Il convenait alors d'avoir une phase de réflexion et d'analyse des résultats et de la bibliographie pour examiner de quelle manière, compte tenu du contexte physique, il était possible d'intervenir pour provoquer ou stimuler un traitement *in situ* de dépollution par dénitrification. Il s'est alors avéré nécessaire de mettre en place des essais de reproduction de l'écosystème naturel grâce à la mise en oeuvre de pilotes de laboratoire reproductibles *in situ*, essais qui visaient la recherche des conditions optimales de développement et d'activité, et l'évaluation des paramètres physiologiques et métaboliques.

2EME PARTIE : MATERIELS ET METHODES



Au cours de cette étude, les différentes analyses effectuées sur le site et au laboratoire ont nécessité l'utilisation de techniques très différentes (Figure 11) :

- ✓ des techniques microbiologiques afin de mettre en évidence, de dénombrer puis d'identifier les micro-organismes présents,
- ✓ des techniques physico-chimiques de dosage des éléments minéraux et organiques,
- ✓ des techniques biochimiques d'identification des bactéries grâce à l'analyse qualitative de leurs acides gras membranaires.

1. TECHNIQUES MICROBIOLOGIQUES

1.1. Les milieux de culture

1.1.1. Les milieux solides

Les milieux PCA (Plate Count Agar) servent au dénombrement des bactéries sur boîte de Pétri. Deux types de milieux gélosés ont été utilisés : un milieu sans nitrates (PCA+glc) et un milieu nitraté (PCA+glc+NO₃⁻). Ils ont la composition suivante :

hydrolysate peptidique de caséine	5 g/l
extrait de levure	2,5 g/l
glucose	1 g/l
agar	15 g/l

Pour le milieu nitraté, 2 g/l de nitrate de potassium sont ajoutés.

1.1.2. Les milieux liquides

La composition du milieu d'enrichissement utilisé est la suivante (pH 7,2):

phosphate disodique	3,58g/l
phosphate monopotassique	0,98g/l
sulfate de magnésium	0,03g/l
nitrate de potassium	2g/l
glucose	2g/l
carbonate de calcium	5g/l

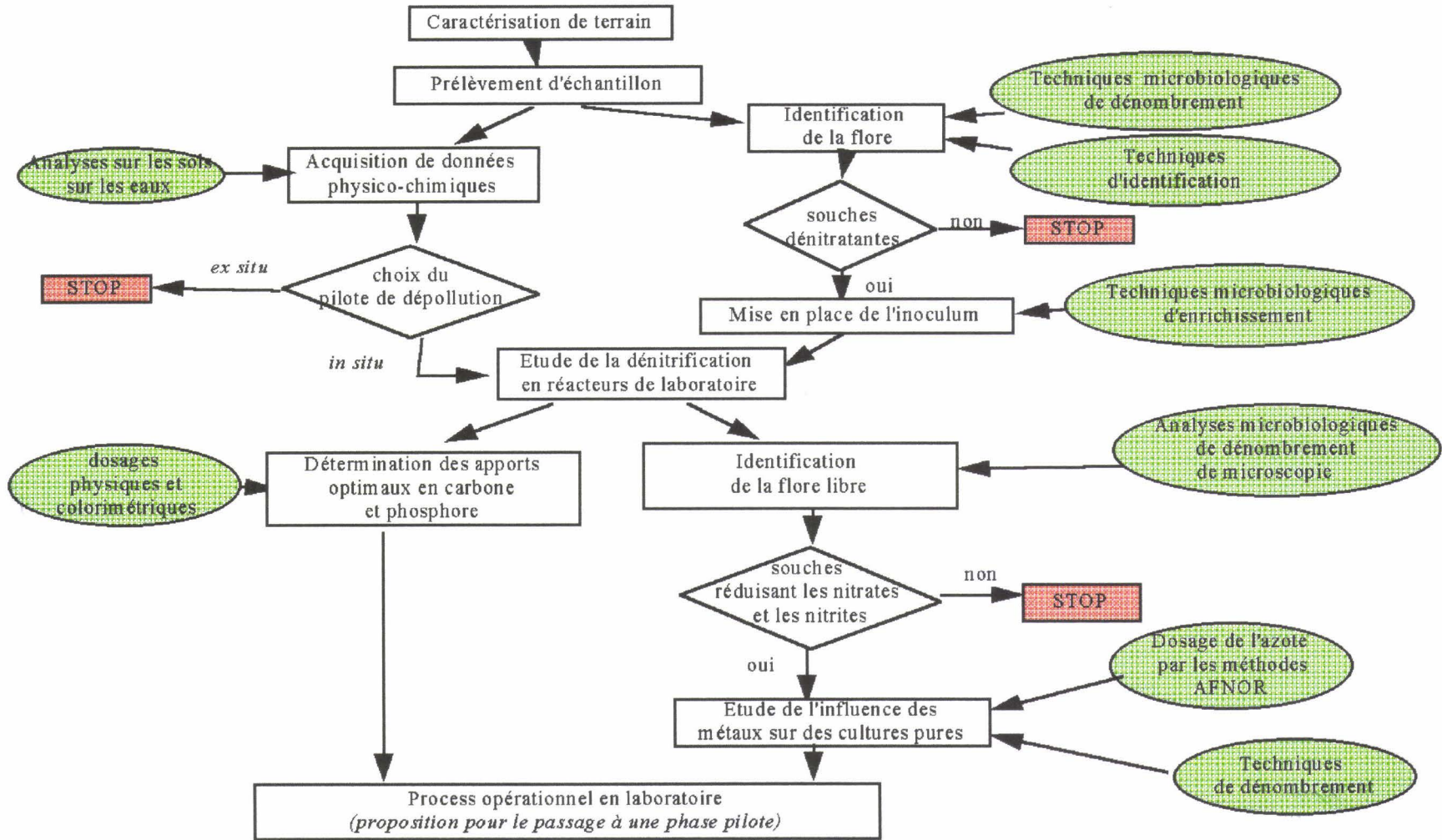
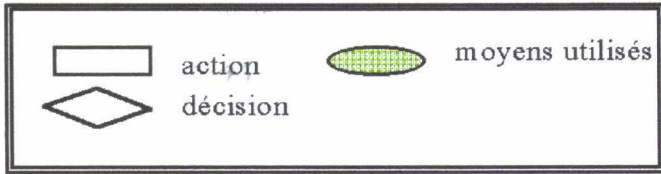


Figure 11 - Flowsheet d'expérimentation



Les milieux liquides utilisés pour les cinétiques de dénitrification par les souches pures sont réalisés à partir du milieu de base (pH 7,2) :

phosphate disodique	3,58 g/l
phosphate monopotassique	0,98 g/l
sulfate de magnésium	0,03 g/l
éthanol	0,40 g/l

Différentes quantités en fer, cuivre, cobalt, molybdène et/ou nitrates sont éventuellement ajoutées au milieu de base pour atteindre des concentrations de 0 à 0,2 mg/l de fer, 0 à 1 mg/l de cuivre, 0 à 50 µg/l de cobalt et molybdène et/ou 0 à 1000 mg N-NO₃⁻/l.

1.1.3. Préparation des milieux de culture liquides

Les différents composants sont dilués dans l'eau distillée portée à ébullition pendant cinq minutes sous agitation. Après refroidissement du milieu sous barbotage d'azote (N₂ 100%), un agent réducteur (Na₂S) est introduit en chambre anaérobie. Le pH est ajusté à 7,2 avec H₂SO₄ ou NaOH. Le milieu est alors réparti en flacons de 250 ml ou en tubes à essai hermétiquement fermés puis stérilisés par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes. L'éthanol stérile est introduit dans les différents récipients après refroidissement du milieu.

1.2. Dénombrement

1.2.1. Réalisation des prélèvements

Les prélèvements dans les réacteurs sont réalisés avec des pipettes stériles aux différents lieux prévus à cet effet (☛. §5.1.).

Lors des cultures en flacons, les prélèvements sont effectués manuellement à l'aide d'une seringue stérile après stérilisation à l'alcool du bouchon.

1.2.2. Sur milieu gélosé

Le dénombrement des micro-organismes hétérotrophes est fait sur boîte de Pétri contenant des milieux gélosés. Pour la composition du PCA se reporter au paragraphe 1.1.1. Huit dilutions sont réalisées. Les boîtes de Pétri contenant le milieu nitraté sont placées en jarres

d'anaérobiose Gaspales. Après incubation des boîtes à 30°C pendant 48 heures, les colonies de bactéries sont dénombrées. Le milieu gélosé à l'extrait de malt (Annexe 3) permet la recherche et le dénombrement des levures et moisissures après incubation à 30°C.

D'autres milieux plus sélectifs sont utilisés :

✓ **Le milieu lactosé 2-3-5 triphényl tétrazolium (TTC)** (Annexe 3) permet le dénombrement des coliformes totaux à 30°C et des coliformes dits "fécaux" à 44°C.

✓ **Le milieu Chapman-mannité** (Annexe 3) est utilisé pour l'isolement des Staphylocoques. Le pouvoir inhibiteur du chlorure de sodium permet d'ensemencer abondamment les boîtes de Pétri. L'incubation est réalisée à 37°C.

✓ **La gélose lactosée biliée au cristal violet et au rouge neutre (VRBL)** (Annexe 3) est utilisée pour le dénombrement de certaines entérobactéries (*Escherischia coli*, *Citrobacter*, *Klesbiella*, *Enterobacter*,...). Elle inhibe la croissance des bactéries à Gram positif et pratiquement celle des autres bactéries à Gram négatif. Le dénombrement se réalise en profondeur après incubation à 30°C pendant 24 heures.

Le dénombrement des micro-organismes chemiolithoautotrophes est réalisé sur milieu minéral H₃ gélosé (Annexe 3)(Malik, 1988). Ce milieu possède un fort pouvoir tampon et a été développé pour un large spectre de micro-organismes.

1.2.3. Par mesure de l'absorbance à 600 nm

La croissance est suivie par l'évolution de la densité optique (DO) à 600 nm dans des cuves plastiques de 1cm de trajet optique avec un spectrophotomètre KONTRON UVIKON 940. La densité optique est rapportée au nombre de bactéries grâce à une droite d'étalonnage. Le suivi de la croissance microbienne par mesure de la longueur d'onde est une méthode de détection rapide qui est préférée au dénombrement par étalement sur boîtes de Pétri lorsque la fréquence des prélèvements est élevée. Néanmoins, nous avons gardé en mémoire la limite de cette méthode qui ne permet pas de différencier les cellules vivantes des mortes.

1.3. Identification

Chaque colonie de morphologie différente est isolée sur milieu gélosé PCA+glucose et incubée 48 heures à 30°C. Sur chaque isolement, des tests d'identification sont simultanément réalisés.

✓ **Coloration de Gram.** Chaque colonie est observée sous objectif à immersion.

✓ **Recherche de la cytochrome oxydase.** Il s'agit d'une enzyme appartenant à la chaîne respiratoire. Dans un tube contenant 1 ml d'eau physiologique, on introduit la colonie à caractériser. On apporte ensuite quelques gouttes d'une solution diluée d'oxalate de diméthyl p-phénylamine. Une coloration rose à violette apparaît lorsque le réactif est oxydé.

✓ **Recherche de la catalase.** Cette enzyme respiratoire est particulièrement importante pour certains germes car elle empêche l'accumulation d'H₂O₂ qui est létale. Sa présence est détectée par le dépôt, directement sur la colonie de gouttes d'eau oxygénée à 30 % (v/v). Une réaction positive se traduit par la formation de bulles d'oxygènes.

✓ **Milieu Kligler-Hajna** (Annexe 3). Ce milieu permet la mise en évidence de bactéries fermentant le lactose, le glucose, produisant du gaz. La production particulière de H₂S se traduit par un noircissement du milieu dans la zone joignant le culot à la pointe. On ensemence le culot par pique et la surface par strie. L'incubation est réalisée pendant 48 heures à 30°C. La fermentation du glucose se traduit par un jaunissement du milieu dans la masse et la fermentation du lactose est mise en évidence en surface par l'apparition d'une couleur jaune.

✓ **La gélose nutritive molle** (Annexe 3) est un milieu nutritif qui convient à la culture des germes ne présentant pas d'exigences particulières. On régénère la gélose en la faisant fondre au bain-marie puis en la faisant reprendre en masse sous l'eau froide en culot. L'ensemencement est réalisé par pique centrale dans le culot. Les tubes sont incubés 24 heures à 30°C. Du fait de la faible teneur en gélose du milieu, les bactéries peuvent s'y déplacer :

- * les *bactéries mobiles* troublent le milieu,
- * les *bactéries immobiles* persistent près de la pique centrale.

Les bactéries aérobies strictes ne cultivant pas dans la profondeur, leur mobilité ne peut être lue.

✓ **Le milieu mannitol-mobilité-nitrates** (Annexe 3) est utilisé pour la différenciation des entérobactéries. Il permet de lire les caractères suivants :

* *la fermentation du mannitol*. Les bactéries mannitol + acidifient le milieu qui vire au jaune. L'acidification produite par les bactéries aérobies strictes est en général insuffisante pour permettre le virage de l'indicateur du fait de l'importance du pouvoir tampon du milieu.

* *la mobilité*,

* *la réduction des nitrates et la production de gaz*. La présence de nitrates permet la recherche d'une nitrate réductase en ajoutant les réactifs habituels de Griess pour la mise en évidence des nitrites.

✓ **La gélose viande-levure 15‰** (Annexe 3) est utilisée pour l'isolement des bactéries anaérobies en surface et pour l'étude de leur pouvoir hémolytique.

✓ **La gélose viande-foie 6‰** (Annexe 3) est un milieu semi-solide permettant la recherche du mode respiratoire des bactéries. Il est régénéré par ébullition afin d'éliminer les gaz dissous puisensemencé par piqure lorsque la température est proche de 45°C. Après incubation à 30°C, l'examen des tubes permet de préciser le mode respiratoire des micro-organismes :

* *aérobie strict* : le micro-organisme se développe uniquement à la surface du tube,

* *anaérobie strict* : le micro-organisme se développe uniquement dans le fond du tube,

* *aéro-anaérobie* : le micro-organisme se développe dans tout le tube.

✓ **Galerie API 20E et 20NE**. Ces galeries d'identification sont utilisées pour les bacilles gram négatif ne fermentant pas le glucose (20NE) et les Entérobactéries (20E) selon les instructions du fabricant.

1.4. Préparation des cultures

Une préculture des souches isolées est préalablement réalisée dans les mêmes conditions d'incubation afin d'obtenir une concentration bactérienne suffisante et permettre l'induction des systèmes enzymatiques nécessaires. La préculture en phase exponentielle de croissance est alors centrifugée à 5000 g pendant 10 minutes et seul le culot est récupéré. Celui-ci est ensuite remis en suspension dans le milieu liquide adéquate jusqu'à ce qu'une densité optique à 600 nm proche de 0,1, correspondant à environ $8 \cdot 10^7$ UFC/ml, soit obtenue. Après ensemencement, la culture se poursuit jusqu'à épuisement des nutriments du milieu, les conditions extérieures de

température étant maintenues constantes à 20°C. Au terme de chaque expérience, la pureté des cultures microbiennes est contrôlée par isolement sur milieu gélosé (composition ➤ §1.1.).

2. TECHNIQUES MICROSCOPIQUES

2.1. Contrôle de la pureté des souches

La pureté des différentes colonies isolées est contrôlée par l'observation en microscopie optique. La colonie est placée dans une goutte d'eau distillée stérile entre lame et lamelle. L'observation est effectuée à l'objectif X100 sous immersion et permet également de mettre en évidence la mobilité des souches isolées.

2.2. Observations en microscopie électronique

Les biofilms étudiés proviennent des réacteurs (➤ §4.1). Ils sont prélevés à la surface des morceaux de craie et des particules détachées des supports, entraînées dans la phase liquide des réacteurs, et sur lesquels des bactéries se sont développées.

2.2.1. Préparation des échantillons pour la microscopie électronique à balayage

Les granules sont préfixés à la glutaraldehyde 0,5% en tampon cacodylate 0,1 M pH 7,2 pendant 30 minutes. Après fixation à la glutaraldehyde 5% pendant deux heures, ils sont rincés 5 fois pendant 30 minutes par du tampon cacodylate. Les granules sont ensuite post-fixés par une solution à 2% de tétraoxyde d'osmium en tampon cacodylate pendant 2 heures. Ils sont ensuite rincés 5 fois par du tampon cacodylate, puis traités par une solution de thiocarbohydrazide (TCH) 1% pendant 20 minutes. Les granules sont ensuite rincés à l'eau distillée par périodes de 10 minutes. Une seconde post-fixation à l'osmium (1%) en eau distillée est effectuée pendant 2 heures suivie de 6 lavages à l'eau. Le traitement au TCH 1% est répété suivi de 6 lavages à l'eau. Les granules sont ensuite déshydratés par bains successifs dans de l'éthanol à 50, 60, 75, 90 et 100% puis placés dans la chambre d'un appareil point critique Balzers. Après échange avec le

dioxyde de carbone liquide, la chambre est réchauffée lentement et ramenée à un vide partiel. Les granules sont récupérés et collés sur support.

Avant toute analyse, les échantillons sont métallisés en surface par dépôt sous vide d'une couche d'or d'une centaine d'angströms d'épaisseur. Cette couche a pour but d'éviter la création de charges superficielles qui déplaceraient l'impact électronique à la surface des échantillons.

2.2.2. Préparation des coupes pour la microscopie électronique à transmission

Les échantillons sont fixés selon la méthode de Ryter et Kellenberger (1958) par le tétraoxyde d'osmium (OsO_4) 1%, puis par l'acétate d'uranyl 1% dans le tampon Michaelis pH 6, à température ambiante, durant 1 heure et 12 heures respectivement. La déshydratation se fait dans l'éthanol 70, 96 et 100% puis dans l'oxyde de propylène également en concentrations croissantes. L'inclusion est réalisée dans l'épon (Luft, 1961). Si la friabilité des échantillons gêne les opérations, il est possible de procéder à une inclusion préalable dans la gélose, 2% d'agar. On traite ensuite des portions gélifiées de 1 à 2 mm³ découpées sur une lame de verre. Les coupes sont réalisées à l'aide d'un ultramicrotome Sorval "Porter-Blum" et récupérées sur des grilles à carreaux nus en cuivre ou en or. Elles sont ensuite contrastées par le citrate de plomb (Reynolds, 1963) et l'acide périodique-thiosemicarbazide-protéinate d'argent (Thiery, 1967). Cette méthode permet de mettre en évidence les polysaccharides.

La concentration en éléments chimiques des échantillons est déterminée grâce à la microanalyse par Spectrométrie d'Emission de Rayons X. Lorsqu'un faisceau d'électrons traverse l'échantillon, il peut interagir avec les atomes qui le constituent. Si cette interaction se traduit par l'expulsion d'un électron des couches profondes, les électrons de ces atomes sont alors dans un état excité. L'énergie libérée par le retour des électrons dans un état fondamental est dégagée sous forme de rayonnements secondaires caractéristiques des éléments constituant le matériau.

2.2.3. Matériels utilisés

En microscopie à balayage, toutes les observations sont effectuées sur un microscope électronique à balayage "JEOL JSM" à 25 KeV. En microscopie à transmission, les coupes sont observées au microscope électronique "JEOL. 200 CX" à 80kV.

3. ACQUISITIONS DE DONNEES DE TERRAIN

3.1. Analyses physico-chimiques

Un réseau de surveillance piézométrique a été mis en place sur le site en 1989. Il comprend 16 piézomètres captant la formation crayeuse dans les environs immédiats de la plateforme industrielle (figure 12).

Ces points ont été nivelés par rapport à un point de repère près de Béthune en dehors de la zone affectée par les affaissements miniers. Ils ont été nettoyés et équipés afin de permettre des prélèvements d'eau représentatifs de la nappe de la craie.

3.1.1. Sur les sols

Quatre sondages carottés ont réalisés à proximité des piézomètres 12, 15, 16 et 75. Sur chaque sondage, trois échantillons représentatifs de sols sont prélevés à des profondeurs différentes grâce à une foreuse à la tarière soigneusement nettoyée entre chaque prélèvement. Les recherches portent sur :

- ◆ l'analyse multiélémentaire, avec mesure de la perte de masse à 40°C et de la perte de poids à 450°C, des éléments majeur (analyse par fluorescence X) et en traces (analyse par spectrométrie d'émission à plasma d'argon) de constitution de la matrice (35 éléments).
- ◆ l'analyse des anions majeurs (sulfates, chlorures, carbonates, ammonium, azote Kjeldhal, soufre total) par méthode chimique,
- ◆ la détermination de la teneur en sodium
- ◆ la détermination de la teneur en carbone organique total (COT) par extraction directe à partir du solide,
- ◆ la détermination de la teneur en eau.

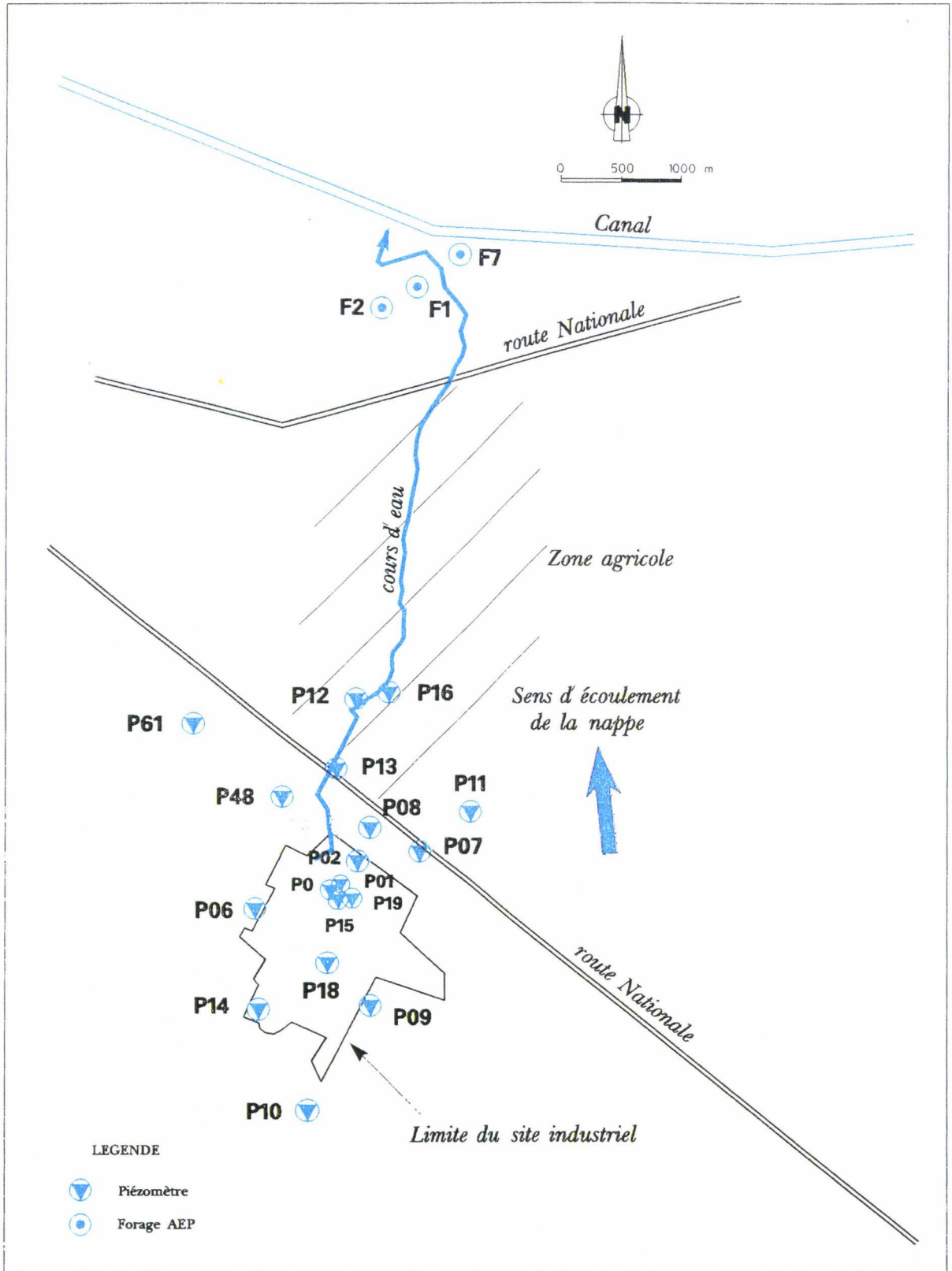


Figure 12 - Carte piézométrique de la nappe à l'aval proche des bassins de décantation en 1990

Lors de l'analyse par fluorescence X, l'échantillon, mis sous forme de poudre ou fondu en perle de verre, est irradié par un tube de rayon X. Le rayonnement de fluorescence émis par l'échantillon est décomposé en rayonnements spécifiques des différents éléments et mesurés à l'aide de compteurs spécifiques. La comparaison avec des courbes d'étalonnage permet d'obtenir la concentration des éléments. Lors de l'analyse par ICP, l'échantillon mis en solution par une fusion est nébulisé dans un plasma d'argon à 600-8000°C. Les différents éléments excités, émettent un rayonnement caractéristique qui est décomposé en ses différentes longueurs d'onde dans un spectromètre et mesuré à l'aide de photomultiplicateurs. La comparaison de la mesure de lumière à des courbes d'étalonnage permet l'obtention de valeurs en concentrations.

3.1.2. Sur les eaux

Des échantillons d'eau de la nappe de la craie sont réalisés sur l'ensemble du réseau piézométrique et des forages de surveillance. Les ouvrages sont nettoyés par purge de l'eau stagnante qui, si elle n'est pas éliminée, perturbe la représentativité de l'échantillon. En effet, cette eau stagnante a souvent une température, un pH et un potentiel rédox différents de celle de l'eau de la formation (Lallemand-Barrès, 1993). Le volume de purge est fixé à trois le volume de l'eau stagnante du puits, soit une durée de pompage de 20 minutes avec la pompe électrique immergée utilisée. Les échantillons, prélevés en plaçant la pompe environ 4 mètres au-dessous du niveau de la nappe, sont représentatifs de la qualité de la nappe dans l'ensemble du piézomètre. Lors du prélèvement, différents paramètres sont mesurés directement sur le terrain après collecte des échantillons :

- ◆ le pH,
- ◆ la conductivité,
- ◆ la teneur en oxygène dissous,
- ◆ le potentiel rédox,
- ◆ la température.

Les ouvrages situés dans, ou à proximité, du panache de pollution font l'objet des analyses prévues par le décret n°91-257 du 7 mars 1991 (Annexe 8, tableau 2). Pour ces analyses

(détaillées ci-dessous), les échantillons sont stabilisés (abaissement du pH, protection contre la lumière) jusqu'à l'analyse de façon à ralentir voire inhiber les différents processus chimiques ou biologiques. Les échantillons sont par ailleurs conservés dans une glacière à 4°C avant l'analyse.

Les méthodes analytiques utilisées sont le plus souvent celles homologuées par l'Agence Française de Normalisation (AFNOR, 1990). Elles sont présentées dans l'ordre choisi dans le tableau 2 de l'Annexe 8. Pour chaque analyse, la norme de référence est indiquée ainsi que le principe général que celle-ci décrit (noté entre "guillemets").

✓ *la couleur* (NF T90-034) est déterminé par "comparaison visuelle de la coloration de l'échantillon avec celle de témoins de coloration." Les résultats sont exprimés en unités de coloration Hazen. Une unité correspondant à "la coloration d'une solution contenant 1 mg de platine par litre sous forme d'acide chloroplatinique, en présence de 2 mg de chlorure de cobalt (II) par litre".

✓ *la turbidité* (NF T90-033) est mesurée par "comparaison de la lumière diffusée et de la lumière transmise par l'échantillon d'eau et par une gamme étalon constituée de solution de formazine".

✓ *le CO₂ équilibrant* (NF T90-011) est dosé après avoir recueilli l'eau "sur une quantité d'hydroxyde de sodium légèrement supérieure à celle qui est nécessaire pour neutraliser l'anhydride carbonique libre. L'hydroxyde de sodium en excès est ensuite dosé, en présence de phénolphthaléine par une solution titrée d'acide chlorhydrique".

✓ *l'oxydabilité* (NF T90-050) de l'eau est déterminée après "chauffage de l'échantillon en présence d'une quantité connue de permanganate de potassium et d'acide sulfurique pendant 10 minutes".

✓ *le Carbone Organique Total* (NF T90-102) est dosé après "oxydation du carbone en dioxyde de carbone".

✓ *l'azote ammoniacal* (NF T 90-015) est dosé après "entraînement à la vapeur en milieu alcalin de l'ammoniaque libre par acidimétrie de l'ammoniaque recueilli.

- ✓ *l'ion fluorure* (NF T90-004) est dosé "par mesure dans l'échantillon analysé de la différence de potentiel entre une électrode sélective de l'ion fluorure et une électrode de référence, à un pH compris entre 5 et 8 et à température et force ionique totale du milieu constantes",
- ✓ *les ions sodium et potassium* (NF T90-019) sont "atomisés dans la flamme d'un spectrophotomètre d'émission de flamme". Les concentrations sont déterminées "aux longueurs d'onde de 589 nm pour le sodium et 766,5 nm pour le potassium",
- ✓ *le phosphore total* (NF T90-023) forme "en milieu acide un complexe avec le molybdate d'ammonium et le tartrate double d'antimoine et de potassium" qui est "réduit par l'acide sorbique en un complexe coloré" et dont l'absorbance est mesurée au spectromètre à 700nm.
- ✓ *les ions métalliques cuivre et zinc* (NF T90-112) sont dosés par spectrométrie d'absorption atomique dans la flamme,
- ✓ *les ions cobalt et nickel* (NF T90-119) sont dosés par mesure de l'absorbance à une longueur d'onde spécifique après injection dans le four d'un spectromètre d'absorption atomique équipé d'une source d'atomisation électrothermique.
- ✓ *les détergents anioniques* (NF T90-039) sont dosés après la "formation en milieu alcalin de sel coloré avec le bleu de méthylène". Ce sel est extrait par le chloroforme et la densité optique est mesurée à 650 nm.
- ✓ *les hydrocarbures totaux* (NF T90-114) sont extraits par le tétrachlorure de carbone et séparés des autres matières organiques par chromatographie sur colonne.
- ✓ *la somme des Hydrocarbures Polycycliques aromatiques* est calculée après dosage de 6 HPA (NF T90-115)
- ✓ *les ions nitrates et nitrites, les sulfates, les chlorures, la silice, la dureté totale, l'azote Kjeldhal* sont mesurés par colorimétrie sur auto analyseur,
- ✓ *les ions calcium, magnésium, aluminium, fer, manganèse, bore et vanadium* sont dosés par spectrométrie d'émission atomique (ICP).

3.2. Analyses microbiologiques

Des analyses microbiologiques sont mises en place afin de révéler la présence de micro-organismes dans la nappe de la craie et dans les formations géologiques sus-jacentes. La prise

d'échantillons nécessite des conditions de prélèvement et de conditionnement (dans des flacons stériles) spécifiques afin de préserver l'intégrité des échantillons et de limiter la contamination externe. Au cours des analyses réalisées en anaérobiose à 30°C, les milieux gélosés sont utilisés pour déterminer deux types de flore de façon indirecte : la flore totale fermentant le glucose anaérobie stricte ou facultative et la flore dite "dénitrifiante".

4. ESSAIS DE DENITRIFICATION AU LABORATOIRE

4.1. Réacteurs de dénitrification à biofilms fixés

4.1.1. Réacteurs à flux ascendant ("upflow") avec alimentation en glucose

Les deux réacteurs mis en place sont des parallélépipèdes verticaux fabriqués en résine de polyester et se somposent de trois compartiments (Annexe 5, planche 1) :

- ◆ Un compartiment central garni avec des morceaux de roches concassées (diamètre de 2 à 3 cm). Il constitue le lieu privilégié de la dénitrification. Chacune de ses faces est percée sur sa partie inférieure d'ouvertures permettant l'alimentation en flux ascendant de l'eau nitratée,
- ◆ Un compartiment d'entrée recevant l'eau nitratée et permettant son passage dans le compartiment central,
- ◆ Un compartiment de sortie servant à l'évacuation de l'effluent par surverse.

Les caractéristiques des réacteurs sont :

longueur :	53 cm
largeur :	43 cm
hauteur :	50 cm
capacité totale :	80 l
capacité utile :	35 l
points de prélèvements :	1 en surface (☛ Annexe 5, planche 1)

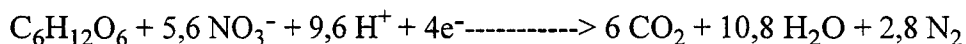
Le choix des supports minéraux (disposés dans le compartiment central) repose sur deux critères : la porosité, qui doit être suffisante pour permettre la fixation d'un grand nombre de

bactéries, et le faible coût, pour permettre une utilisation à grande échelle. Nous avons ainsi sélectionné deux roches, chacune remplissant un réacteur :

- ◆ la pouzzolane, roche d'origine volcanique, qui sert de référence dans cette étude grâce à sa très bonne porosité et au bon attachement bactérien qu'elle permet,
- ◆ la craie, qui est la principale roche mère de la Région Nord - Pas de Calais et est donc disponible en grande quantité.

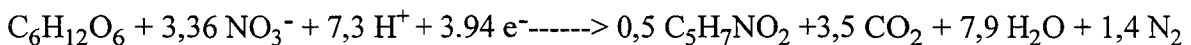
Pour mener des études parallèles, et ainsi comparer les différentes cinétiques de dénitrification, une même source de carbone est utilisée pour les deux réacteurs : le glucose. Il présente l'avantage de constituer une source de carbone de bonne disponibilité pour les micro-organismes. Deux équations liant la consommation en glucose à la réduction des nitrates sont habituellement utilisées : l'une s'applique à la croissance bactérienne lors du démarrage des réacteurs, l'autre à la dénitrification à l'équilibre.

a/ en absence de croissance microbienne (équation 1)



soit un apport de 0,52 g de glucose/g de nitrates à éliminer

b/ avec une croissance bactérienne (équation 2)



soit un apport de 0,94 g de glucose/g de nitrates à éliminer

Le phosphore est un élément constitutif de la biomasse, suivant des proportions de 1 à 2,5 % de la matière sèche (Carberry et Tenney, 1973 ; Ohtake *et al.*, 1988). La synthèse de biomasse associée à la réduction de 1 g de nitrates nécessite la consommation de 4,4 mg P/l. Le phosphore est ajouté à l'eau d'alimentation sous la forme de sels potassiques (KH_2PO_4).

L'ensemencement des réacteurs se fait par arrosage des supports minéraux avec un litre d'enrichissement (☛ §1.1.2.) pour les bactéries dénitrifiantes (10^8 U.F.C./ml). Après absorption du milieu par la roche, l'alimentation en eau polluée et en solution glucosée débute à un débit

total de 4 ml/min., soit un temps de séjour hydraulique équivalent à 6 jours. Le rapport des débits eau polluée/solution glucosée est maintenu égal à 3.

Un dénombrement de la flore présente dans la phase aqueuse libre est réalisé lors du démarrage. Un dosage des différentes formes minérales azotées (NO_3^- , NO_2^- et NH_4^+), des phosphates (PO_4^{2-}) et de la demande chimique en oxygène (DCO) est réalisé sur les échantillons après filtration (à 0,22 μm). Le pH est contrôlé. Le principe de dosage et les méthodes opératoires sont tirés du manuel d'utilisation du spectrophotomètre HACH DR/2000 (Annexe 6). Ces techniques reposent sur la réalisation de complexe coloré à partir de 25 ml d'échantillon filtré en présence de réactifs spécifiques mis au point par la Société Hach. Toutes les mesures sont réalisées avec une pipette automatique (précision +/- 0,001 ml à 20°C) et comparées à une gamme étalon préalablement réalisée pour chaque dosage. Le pH est mesuré à l'aide d'un pH-mètre à électrodes au KCl-AgCl, étalonné entre 7 et 10 (précision +/-0,01).

4.1.2. Réacteurs à flux horizontal avec alimentation en éthanol

Les quatre réacteurs mis en place sont des parallélépipèdes horizontaux permettant un déplacement latéral de l'eau (Annexes 5, planche 2). Ils sont réalisés en polyester stratifié et recouverts de gel pour limiter les phénomènes d'adhésion des films sur la paroi. Des morceaux de craie concassée de 2 à 3 cm de diamètre sont disposés à l'intérieur pour permettre la fixation des micro-organismes.

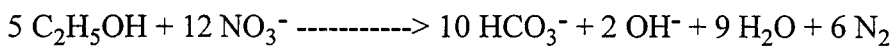
◆ Les caractéristiques des réacteurs sont :

longueur :	250 cm
section carrée :	10 cm
capacité totale :	25 l
capacité utile :	18 l
points de prélèvements :	en surface à 50, 100 et 200 cm après le point d'alimentation

L'alimentation des réacteurs en eau polluée provenant du site et en nutriments est effectuée à débits connus grâce à des pompes péristaltiques. Elle est réalisée dans les premiers centimètres à environ 5 cm sous la surface. Le débit total est fixé à 2,5 ml/min, ce qui correspond à un temps de séjour hydraulique (TSH) de 0,5m/jour.

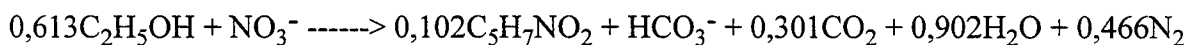
Le choix du substrat carboné s'est porté sur l'éthanol, moins onéreux que le glucose. L'éthanol reste un substrat cher et un surdosage peut entraîner une concentration résiduelle en carbone élevée. Il est donc essentiel d'ajuster son apport à la concentration en nitrates à éliminer, et ce grâce aux équations stoechiométriques liant l'apport en éthanol à la dénitrification hétérotrophe (Hamsch et Werner, 1989) :

a/ en absence de croissance bactérienne (équilibre) (équation 3)



soit un apport de 0.31 g d'éthanol/g de nitrates à éliminer

b/ avec une croissance bactérienne (période de démarrage) (équation 4)



soit un apport de 0,45 g d'éthanol/g de nitrates à éliminer.

Un inoculum constitué de sept souches supposées dénitrifiantes, isolées dans l'eau souterraine à traiter et non identifiées, est introduit lors du démarrage des réacteurs. La concentration en colonies dénombrées dans cet inoculum était de 10^6 U.F.C./ml. Les analyses physico-chimiques et microbiologiques réalisées sont identiques à celles mises en place sur les réacteurs ("up-flow").

4.2. Suivis des cinétiques de dénitrification

Dix ml des échantillons, prélevés à des fréquences variables, sont centrifugés à 5000g pendant 5 minutes à une température de 4°C. Le dosage des formes minérales de l'azote est alors effectué sur la phase liquide surnageante dépourvue de bactéries. Le dosage des nitrates, nitrites et ammoniacque est réalisé selon les normes AFNOR NF T90-045, NF T90-013 et NF T90-015 (Normes de référence pour l'analyse des eaux destinées à la consommation humaine (Arrêté du 20 février 1990)) (Annexe 7). La fréquence des dosages, initialement fixée à 4 heures, est modulée en fonction des résultats obtenus.

4.3. Exploitation des résultats

L'exploitation des résultats sur tableur conventionnel (Microsoft EXCEL) permet le traçage des graphiques correspond aux différentes informations rassemblées lors des prélèvements. Lorsque les données sont exprimées en fonction du temps, le graphique xy est utilisé. Les histogrammes en trois dimensions sont employés pour visualiser l'influence combinée de deux paramètres.

L'utilisation du logiciel STATITCF de l'Institut Technique des Céréales et des Fourrages, adapté au traitement statistique des données, permet de définir un modèle mathématique liant une valeur à expliquer à une valeur explicative. Il est utilisé pour déterminer le taux de croissance maximal des différentes souches bactériennes à partir d'une portion seulement du graphique.

5. ANALYSES BIOCHIMIQUES PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

5.1. Préparation des échantillons

Le système d'identification choisi repose sur une analyse qualitative de la composition des acides gras des micro-organismes. Les cellules modifient la composition de leurs acides gras pour maintenir la fluidité de la membrane lorsque les conditions environnementales changent. Il devient alors essentiel de contrôler la durée et la température d'incubation des cellules afin de pouvoir comparer la composition des acides gras avec une collection.

5.1.1. Conditions de croissance des cellules

La composition des acides gras est particulièrement stable lorsque les cellules se trouvent en fin de phase exponentielle de croissance. Ainsi, les conditions standards pour les bactéries sont définies pour une température de $28 \pm 1^\circ\text{C}$ et une période d'incubation de 24 ± 2 heures en aérobiose. Dans le cas des bactéries présentant une croissance lente, la durée d'incubation est fixée à 48 heures.

Le milieu solide utilisé est le Trypcase-soja (Biomérieux) contenant par litre :

bio-trypcase	17 g
bio-soyase	3 g
chlorure de sodium	5 g
phosphate bidpotassique	2,5 g
glucose	2,5 g
pH 7,3	

La croissance de colonie bactérienne est réalisée par repiquage en stries de façon à obtenir des colonies isolées et s'assurer ainsi de la pureté de la culture

5.1.2. Composition de réactifs

Quatre réactifs sont nécessaires à la préparation des échantillons ; chacun correspondant à une étape à savoir la saponification, l'estérification, l'extraction et le lavage. Ils sont préparés en flacon en verre brun et peuvent être stockés pendant un mois à température ambiante.

Leurs compositions sont détaillées ci-dessous.

réactif de saponification		réactif de méthylation	
hydroxyde de sodium	45 g	acide chlorydrique 6N	325ml
méthanol	150ml	méthanol	275ml
eau distillée	150ml		

réactif d'extraction		base de lavage	
hexane	200ml	hydroxyde de sodium 10.8g	
méthyl-ter-butyl-ether	200ml	eau distillée	900ml

5.1.3. Préparation des échantillons

La préparation des échantillons pour l'analyse de leurs acides gras membranaires comporte cinq étapes :

- *une étape de centrifugation*. Environ 40 mg de poids sec de colonies isolées sur milieu gélosé sont mis en suspension dans 1 ml d'eau distillée stérile dans un tube. Le mélange est centrifugé pendant 20 minutes à 4000 g et à 4°C. Le surnageant est alors évacué.
- *une étape de saponification* pour libérer les acides gras des lipides cellulaires par lyse de la bactérie. La base forte renfermant du méthanol combinée à un choc thermique entraîne la mort des cellules par lyse et les acides gras sont alors séparés des lipides cellulaires et convertis en leurs sels de sodium. Pour cette saponification, 1 ml de réactif est ajouté au culot cellulaire. Après homogénéisation, la suspension est portée à 100±1°C pendant 5 minutes puis placée dans de la glace pendant 30 minutes.
- *une étape de méthylation* aboutissant à la formation de méthyl esters d'acides gras. Ceux-ci augmentent la volatilité des acides gras pour l'analyse chromatographique. 2 ml de réactif de méthylation sont introduits dans le tube puis le milieu est homogénéisé. Le tube est mis au bain-marie pendant 10±1 minutes à 80°C et refroidi rapidement dans de la glace.
- *une étape d'extraction* visant à transférer le méthyl esters des acides gras de la phase aqueuse vers une phase organique grâce à une extraction liquide-liquide. 1,25 ml du réactif d'extraction est introduit dans le tube refroidi et le contact entre les deux phases est réalisé par agitation manuelle douce pendant 10 minutes. La phase aqueuse est ensuite éliminée.
- la dernière étape consiste à *laver la phase organique* avec 3 ml de la base de lavage (§5.1.2.) pendant 5 minutes. Les acides gras libres et les réactifs résiduels se trouvent alors dans la phase aqueuse inférieure. La phase supérieure est transférée dans un flacon stérile qui est serti.

5.2. Mise en évidence de la composition des acides gras membranaires

5.2.1. Matériel utilisé et injection des échantillons

Quelques microlitres de l'échantillon contenant les acides gras à analyser sont injectés en amont de la colonne chromatographique (Hewlett-Packard, modèle 5890, série II)(Annexe 4, figure 1). Au niveau de l'injecteur, l'échantillon est vaporisé puis entraîné par une phase de gaz

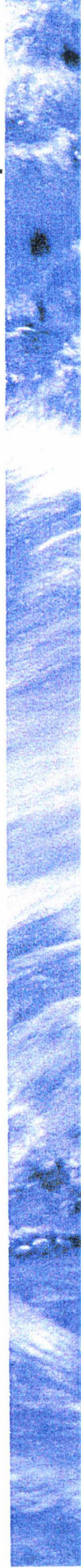
vecteur (l'hydrogène) qui constitue la phase mobile du système. Le gaz contenant l'échantillon vaporisé traverse ensuite la colonne capillaire qui renferme la phase dite stationnaire greffée sur ses parois. A mesure que les constituants de l'échantillon sont entraînés le long de la colonne, ceux qui présentent une affinité importante pour la phase stationnaire vont être ralentis alors que ceux qui n'ont pas ou peu d'affinité sont évacués vers l'extrémité de la colonne. En règle générale, les composés sont élués par degré de volatilité décroissante ou par poids moléculaire croissant.

A son extrémité, la colonne est reliée à un détecteur à ionisation de flamme(FID) qui va permettre la quantification des constituants séparés au niveau de la colonne. Le principe de ce détecteur est basé sur les propriétés de combustion des substances isolées à l'intérieur d'une flamme d'hydrogène brûlant dans un flux d'air ce qui provoque l'émission d'électrons et la production d'un courant électrique qui peut alors être mesuré et enregistré. La limite de détection du détecteur FID est de l'ordre de 1 µg/ml.

5.2.2. Traitement des données

L'identification des composés recherchés s'effectue par la mesure du temps de rétention des différents constituants du mélange. Le temps de rétention représente le temps écoulé entre l'injection de l'échantillon et la sortie du constituant. C'est une valeur qui dépend uniquement des conditions chromatographiques (température de l'injecteur (250°C), débit de gaz (55 ml/min.),...) d'où l'importance de réaliser un échantillonnage de substances de concentration connue avant chaque test (Annexe 4, figure 2). La quantification des constituants est réalisée en comparant la surface du pic obtenue pour l'échantillon avec celle enregistrée lors de l'injection de l'échantillon de référence. l'identification est réalisée grâce à une table de composés tirée du système d'identification microbiologique (Microbial Identification System software package, Microbial ID, Inc., Newark, Del.). Les quantités de chaque pic sont exprimées en pourcentage de la surface totale.

3EME PARTIE : RESULTATS ET DISCUSSION



1. INVESTIGATIONS SUR LE SITE

L'évaluation de la contamination d'un site pollué est le résultat d'une démarche qui commence par la collecte et l'exploitation de l'information existante, se poursuit par des investigations sur place, l'analyse du danger potentiel, et se termine par l'étude des solutions de traitement les plus adaptées au cas et la mise en place du procédé retenu (Lecomte, 1995).

1.1. Etat du site

Le site concerné est situé à l'aval d'une plate-forme chimique dans un contexte minier où le sous-sol présente une pollution diffuse en azote et en hydrocarbures. Un cours d'eau passe à proximité du site et draine ou alimente la nappe selon les endroits. Sur ce site, cinq bassins de décantation collectent l'ensemble des eaux usées en provenance de la plate-forme industrielle, à savoir les eaux pluviales, les eaux de lavage des sols et aires de chargement, les eaux usées des appareils de fabrication, de lavage des gaz et des bâtiments (hormis celles issues des sanitaires, lavabos et restaurant) et les condensats recyclables (figure 13). Ces bassins de décantation sont creusés dans des assises crayeuses pratiquement affleurantes sous un recouvrement limoneux ou de remblais de moins d'un mètre d'épaisseur au droit de la plate-forme. Cette formation crayeuse constitue le principal réservoir d'eau souterraine de la Région Nord-Pas de Calais. Pendant plus de 40 ans, les eaux décantées s'infiltraient dans la nappe sous-jacente via les bassins de décantation. La masse d'azote, principalement sous forme ammoniacale, injectée chaque année a été estimée à 1400 tonnes, entraînant une pollution diffuse de la nappe sur plusieurs kilomètres en aval du site. En décembre 1989, une infiltration massive des effluents, depuis les bassins vers la nappe, a provoqué une hausse importante de la pollution azotée sur un temps court créant un front de pollution. Suite à une demande de la D.R.I.R.E., les bassins ont été étanchés en 1990 stoppant ainsi toute pollution de la nappe. Cependant, les déversements des eaux provenant de la station d'épuration communale dans le cours d'eau se poursuivent à ce jour.

Une étude antérieure (Darmendrail et Pernel, 1991), réalisée grâce à des financements de la société concernée, du Ministère de l'Environnement (titre VI-protection des eaux souterraines) et du Ministère de l'Industrie (Crédits Service Public/BRGM), a permis de mettre en évidence une importante contamination, de type azotée, de l'aquifère crayeux.

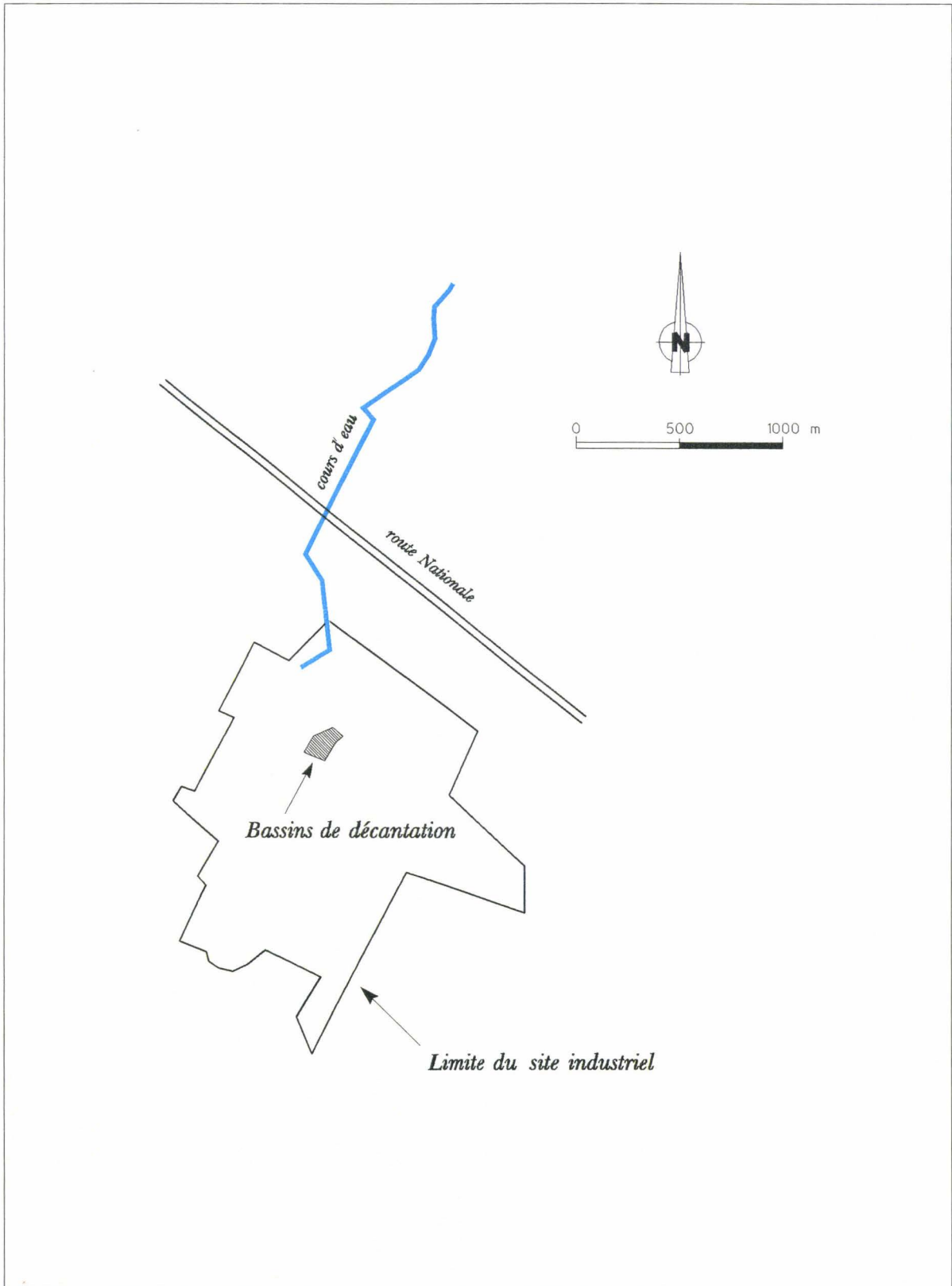


Figure 13 - Localisation de la zone du site industriel et des bassins de décantation

L'azote est essentiellement retrouvé sous sa forme "nitrates" (à l'aval hydraulique du site, cette concentration atteint 1 500 mg NO₃⁻/l). Des analyses de type C3, C4a et C5¹ (Annexe 8, tableau 2) ont été effectuées sur des échantillons d'eau prélevés dans les ouvrages les plus caractéristiques. Elles ont porté sur les éléments et composés chimiques suivants : cations et anions majeurs, paramètres toxiques et indésirables, hydrocarbures polycycliques aromatiques, pesticides organophosphatés et chlorés, herbicides azotés, haloformes apparentés. Hormis la présence en quantités importantes d'azote, les résultats de ces analyses ont montré la présence de chlorures, de sulfates, de potassium, d'arsenic (55 µg/l), de détergents ioniques (0,36 mg/l), d'hydrocarbures polycycliques aromatiques (HPA, 0,69 µg/l) ainsi que de pesticides et herbicides. La mise en évidence des HPA laisse supposer une contamination résiduelle de l'environnement par les anciennes activités industrielles de la zone d'étude. L'extension latérale de cette pollution ne pourra être précisée que par des analyses complémentaires d'eau prélevée sur les ouvrages de contrôle situés à l'aval hydraulique. Son extension longitudinale atteint plusieurs kilomètres en aval.

Après étanchéification des bassins de décantation, on pouvait remarquer, sur tous les piézomètres proches des bassins et situés à l'aval hydraulique, une diminution très nette de la concentration en substances azotées après étanchéification des bassins (Bouexière, 1993). Par contre, ceux situés à plus d'un kilomètre du site voyaient leurs teneurs augmenter petit à petit (vitesse faible de déplacement des pollutions de la nappe). Les bassins ayant été étanchés, une des sources de pollution azotée de la zone d'étude a été éliminée. Toutefois, des relargages des substances azotées stockées sous les bassins dans la zone de battement de la nappe se produisent lors des remontées de la nappe augmentant périodiquement la teneur en azote de l'aquifère, et ce tant que le stock ne sera pas épuisé.

¹ Programmes d'analyses d'échantillons réalisés grâce aux normes homologuées en relation avec les exigences de qualité des eaux (décret n°91-257 du 7 mars 1991)

1.2. Suivi de la pollution azotée après 1993

La phase d'acquisitions complémentaires de données physico-chimiques et microbiologiques entreprise en 1993 permet de parfaire l'état de connaissance du milieu dans la zone d'étude. Cette phase constitue une première étape pour permettre l'élaboration d'un projet d'expérimentation en vue de la réalisation d'un pilote de dénitrification *in situ* dans la nappe de la craie. Pour effectuer ce suivi, il a été nécessaire de compléter le réseau d'observation par la réalisation d'un nouveau piézomètre de contrôle (P75) dans la zone d'étude (figure 14). Ce piézomètre est placé à mi-distance entre les bassins de décantation (P15, P01) et le piézomètre P12 où les concentrations en nitrates apparaissent "anormalement" faibles. La réalisation de sondages carottés avec prise d'échantillons intacts sur 5 mètres de profondeur pour analyses physico-chimiques et microbiologiques a été effectuée ainsi que des prélèvements d'échantillons d'eaux de la nappe de la craie et du cours d'eau.

Nous limiterons les résultats présentés aux aspects les plus caractéristiques de la pollution présente.

L'appréciation du degré de pollution liée à l'activité du site nécessite le choix d'un état de référence "naturel" de la nappe, suffisamment éloigné, et en amont, de la zone d'infiltration des bassins. La connaissance de l'historique de la pollution azotée du site nous a conduit à choisir le piézomètre P14 comme référentiel. Le piézomètre P14 se trouve en effet en amont hydraulique des bassins de décantation dans l'axe Nord Nord-Ouest/Sud Sud-Est d'écoulement de la nappe.

1.2.1. Analyses physico-chimiques

Les principaux résultats obtenus sur les sols et les eaux sont présentés tableau 5. L'ensemble des résultats est repris en Annexe 8, tableaux 3 et 4.

Ils mettent en évidence :

- ✓ une concentration élevée en nitrates (109 mg NO_3^-/l dans P14) en amont du site industriel (Tableau 5, figure 15),

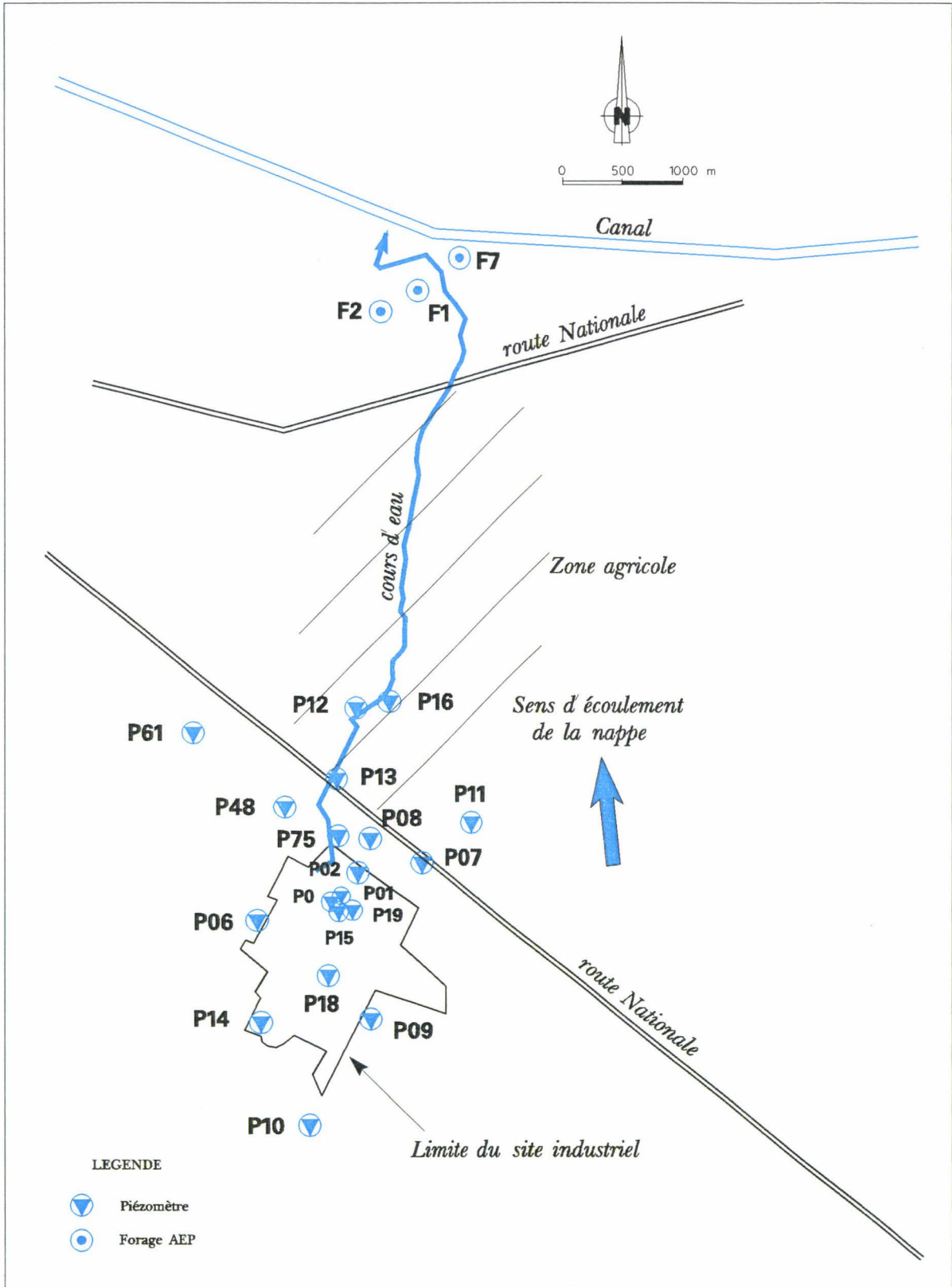


Figure 14 - Carte piézométrique de la nappe à l'aval proche des bassins de décantation en octobre 1993

	P14*	P00	P01	P02	P08	P09	P12	P13	P15	P16	P18	P19	P48	P75
pH	7.05	7.04	6.61	6.81	8.08	6.53	6.97	6.97	6.79	6.64	7.12	6.60	7.09	6.66
T(°C)	12	16.6	17.4	12.9	11.2	12.5	13.4	12.4	18.3	15.8	13.1	14.4	12.5	17
NO ₃ ⁻ (mg/l)	109	556	1870	528	146	0.4	0.6	48.9	1590	1027	59.8	784	99	929
NO ₂ ⁻ (mg/l)	<0.05	<0.05	0.05	0.09	1.49	<0.05	<0.05	<0.05	0.05	0.47	<0.05	0.12	<0.05	0.65
NH ₄ ⁺ (mg/l)	<0.05	115	265	25	<0.05	2.1	23.3	1	350	124	<0.05	26.6	3.35	130
COT (mg/l)	1.7	2.5	3	2.5	2.2	8.4	3.2	2.9	3.5	3.9	4.3	2.5	2.6	4.2
HPA (µg/l)	<0.005	0.057	0.038	<0.005	<0.005	0.02	0.034	<0.005	0.27	0.017	0.016	0.009	0.01	0.425

Tableau 5 - Analyses physico-chimiques réalisées sur la nappe de la craie (octobre 1993) (Institut Pasteur de Lille)

[* : piézomètre situé en amont hydraulique de la source principale de pollution azotée, servant de témoin]

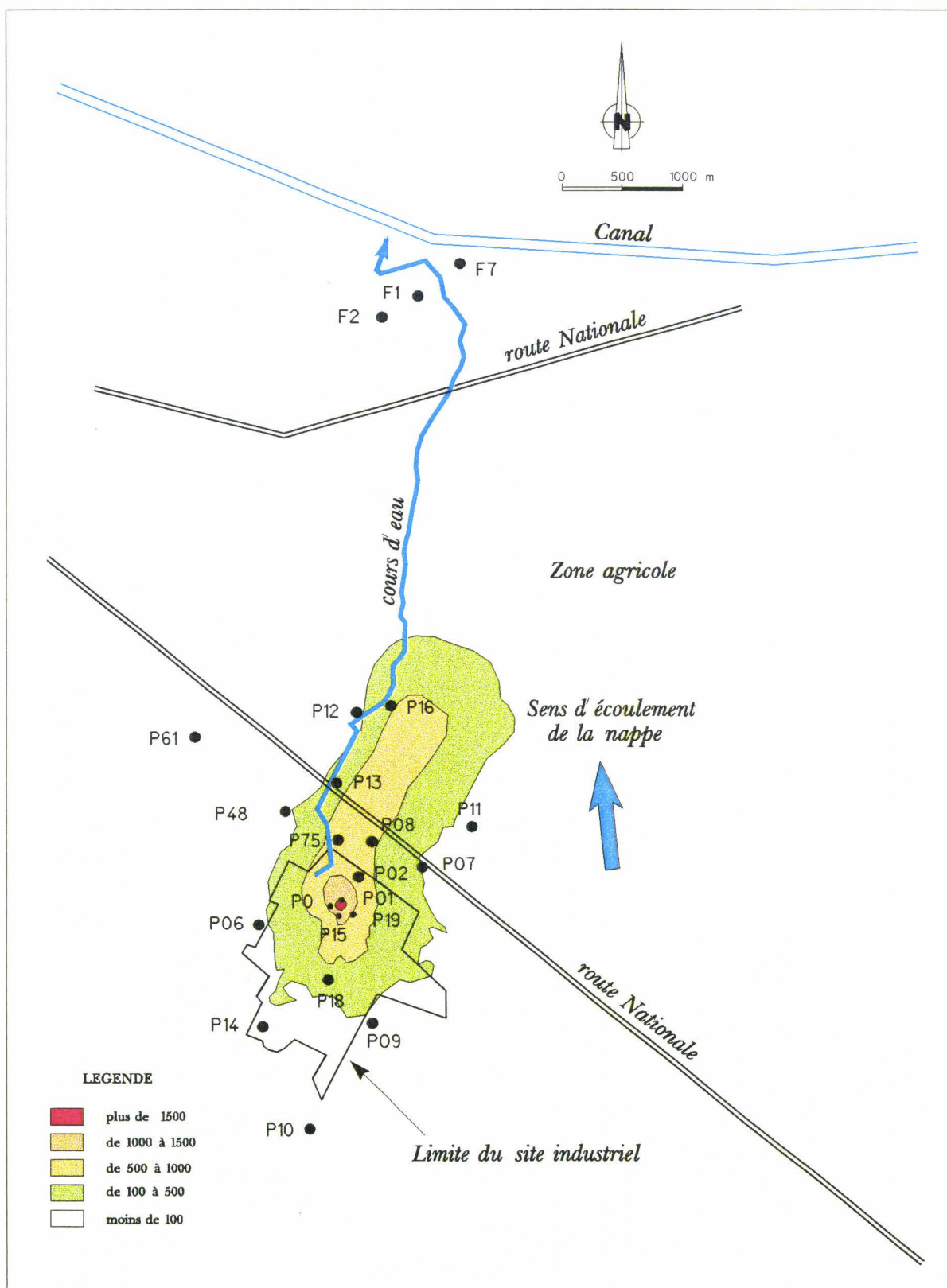


Figure 15 - Carte des isoconcentrations en nitrates (mg/l) (état de la nappe en novembre 1993) (modélisation réalisée grâce au logiciel SESAME, BRGM)

✓ des concentrations en nitrates oscillant, dans le panache de pollution, entre 150 mg NO₃⁻/l en aval hydraulique de la plate-forme industrielle (P08) et 1870 mg/l pour les ouvrages les plus pollués (P01) (figure 15),

✓ de faibles concentrations en azote, sous toutes ses formes, ainsi qu'en Carbone Organique Total (COT) dans la formation crayeuse (analyses des matériaux solides du sous-sol, cf Annexe 8, tableau 4)

✓ une température de l'eau anormalement élevée (moyenne : 14,24°C, écart-type : 2,23), indiquant un gradient thermique se développant depuis les bassins de la plate-forme (18,3°C dans P15) sur plusieurs kilomètres (15,8°C dans P16)(figure 16). Ce paramètre constitue un bon traceur de la pollution issue de la plate-forme industrielle (coefficient de corrélation entre la température et l'ammoniaque égal à 0,91) car les eaux de process s'infiltreraient dans la nappe à une température proche de 40°C au droit du site. Il paraît probable, au vu de ces résultats, qu'il existe toujours une pollution au droit de la plate-forme,

✓ un pH proche de la neutralité dans la zone d'étude (Annexe 8, tableau 3),

✓ des teneurs en nitrites, forme instable de l'azote en nappe libre, variant entre 0,05 et 1,49 mg/l (figure 17). Les concentrations relativement élevées peuvent s'expliquer soit par une nitrification ou une dénitrification s'arrêtant au stade NO₂⁻, soit par une pollution parasite. En effet, certains piézomètres (P12, P16, P75, P48, P13) sont situés en zone agricole. Les nitrites peuvent provenir de l'oxydation de l'ammoniaque des engrais azotés dans les couches superficielles du sol et entraînés dans la nappe par l'eau infiltrée.

✓ une forme ammoniacale, sous laquelle se trouve la majeure partie de l'azote des effluents rejetés par la plate-forme industrielle, uniquement présente dans le panache de pollution (figure 18).

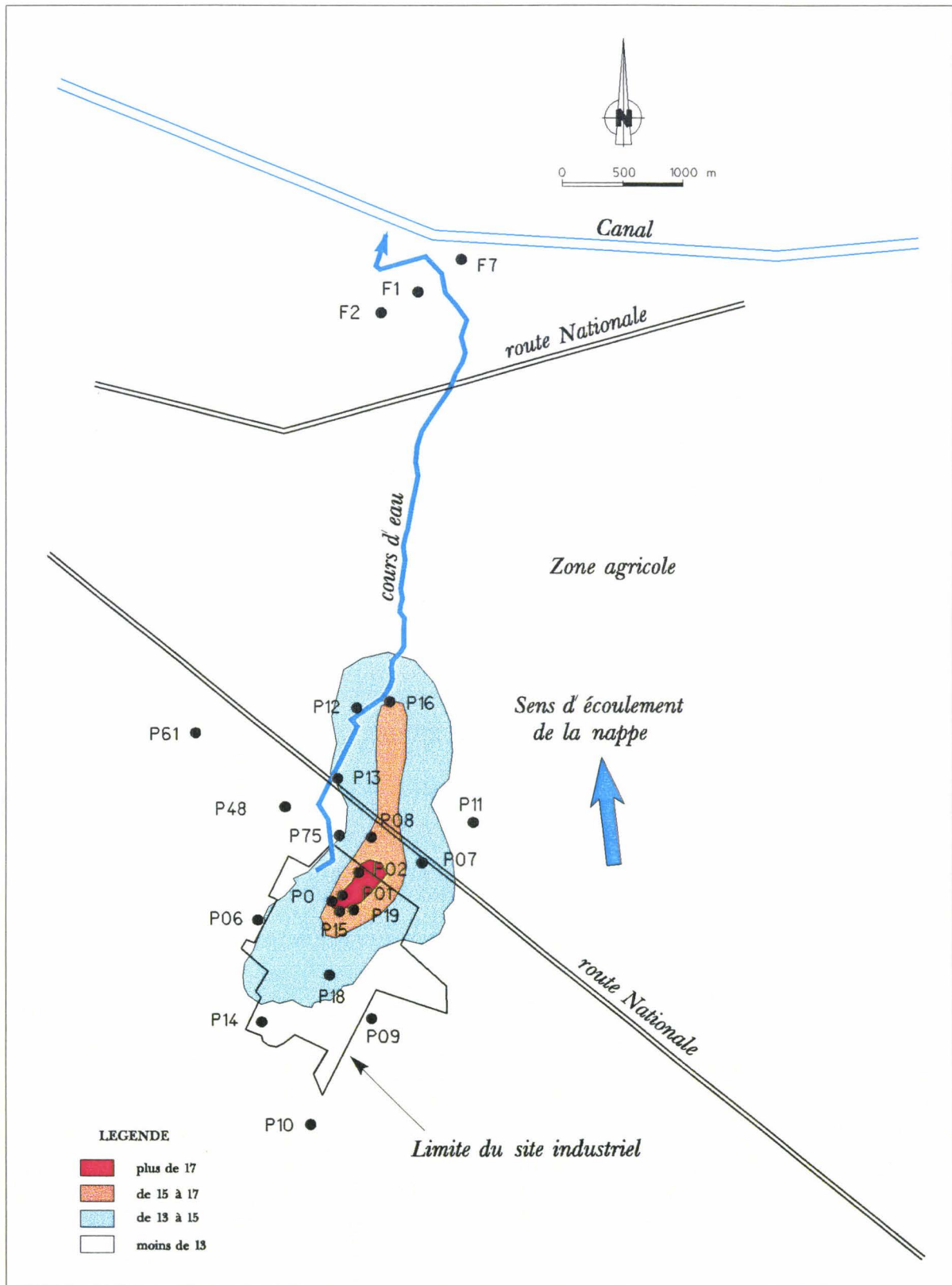


Figure 16 - Répartition de la température (°C) dans la nappe de la craie (état de novembre 1993)
(modélisation réalisée grâce au logiciel SESAME, BRGM)

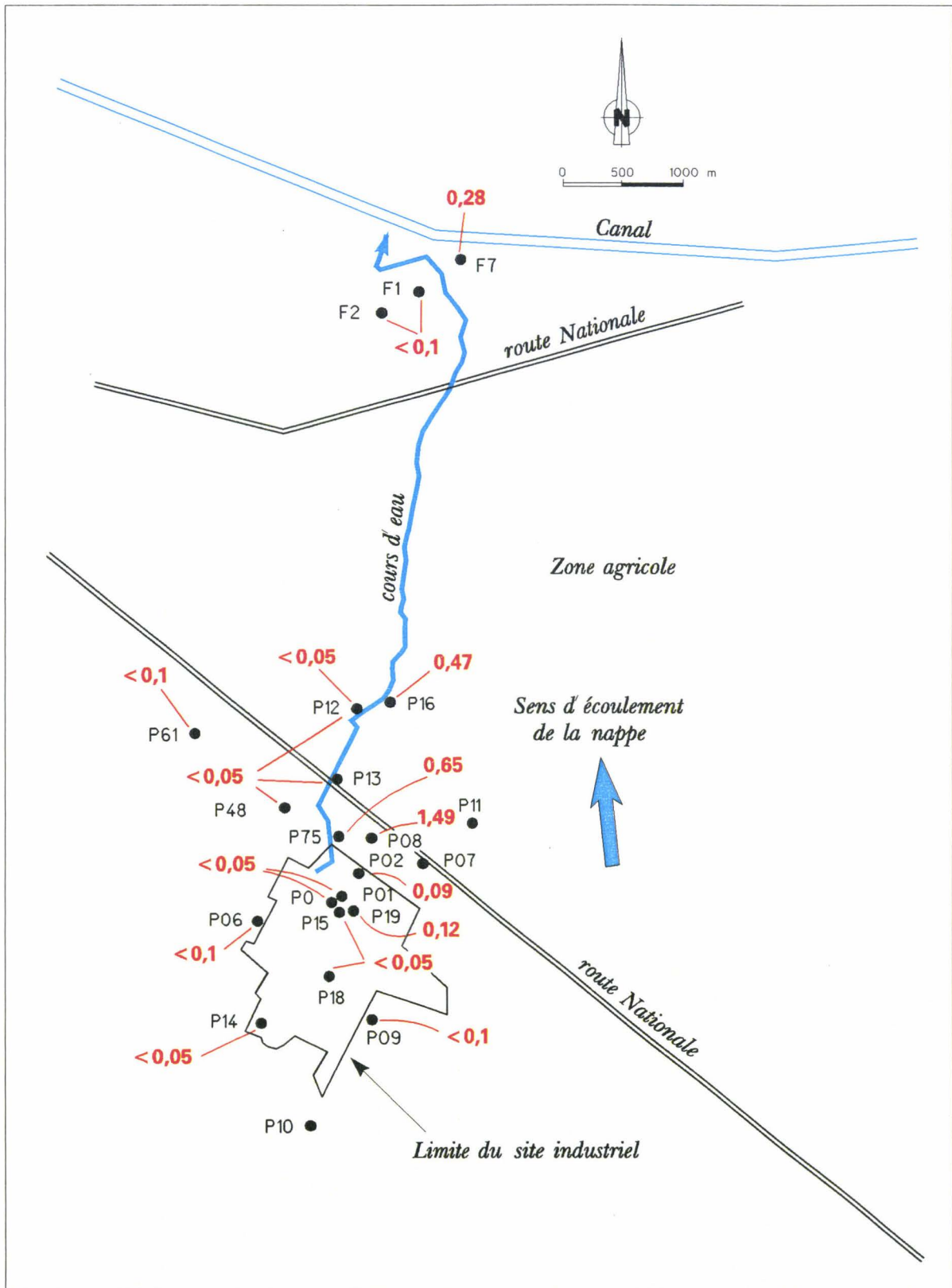


Figure 17 - Carte de répartition des concentrations en nitrites (mg/l) dans la nappe de la craie (état de novembre 1993)

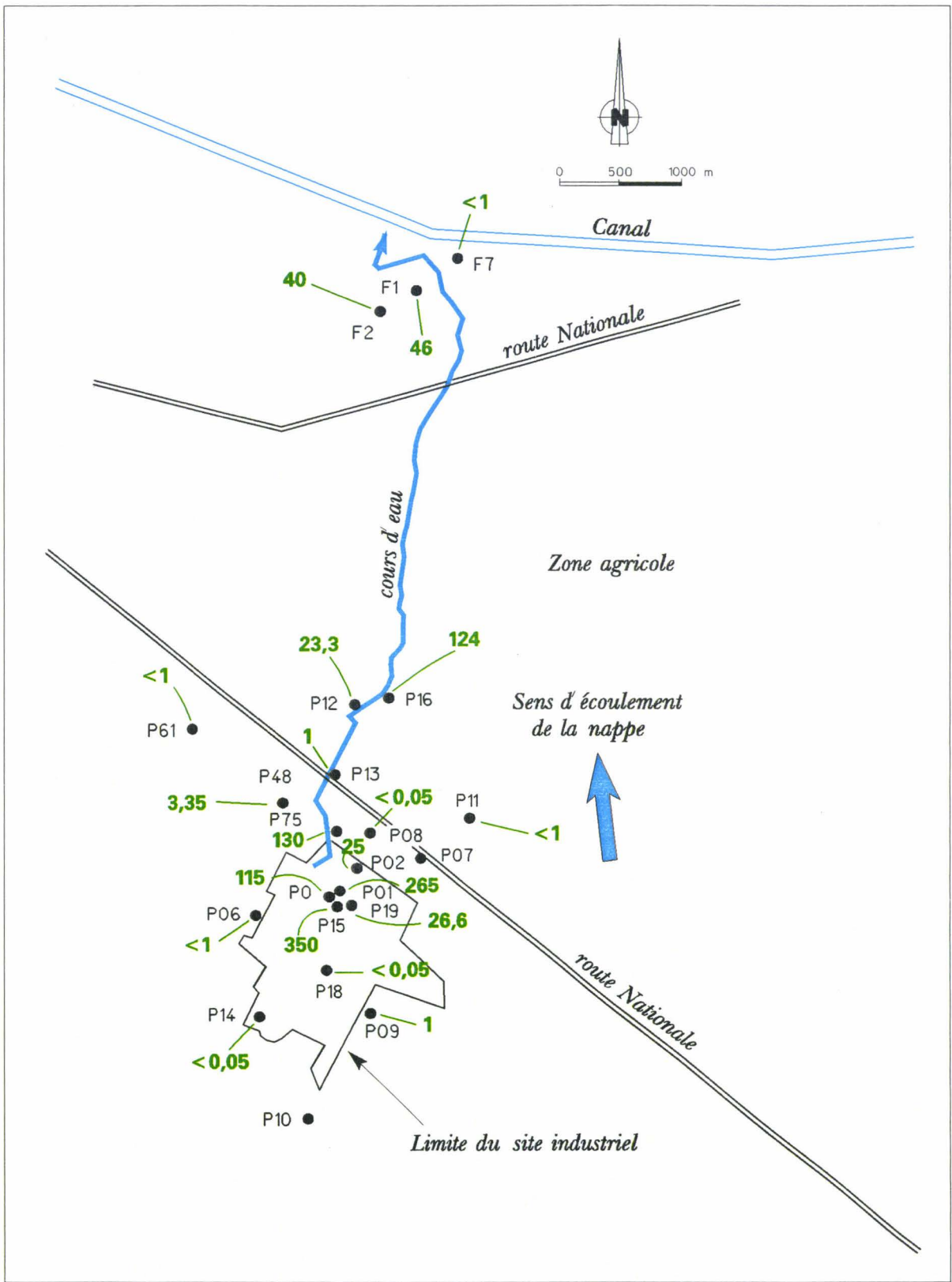


Figure 18 - Carte de répartition des concentrations en ions ammonium (mg/l) dans la nappe de la craie (état de novembre 1993)

1.2.2. Analyses microbiologiques

En ce qui concerne la qualité microbiologique des eaux et des formations sous-jacentes, les résultats obtenus montrent la présence d'une flore hétérotrophe dénitrifiante capable de se développer dans la nappe et les sols¹. D'une manière générale, on estime que la flore viable et cultivable représente 30% de la flore réellement présente. Dans les formations géologiques, les résultats obtenus montrent que le nombre d'Unités Formant Colonies (UFC) diminue lorsque la profondeur augmente (tableau 6 & Annexe 8, figures 1, 2, 3, 4). Ce phénomène est mis en évidence à la fois pour la flore totale et la flore "dénitrifiante". Au droit du piézomètre P15, proche de la source de pollution, la flore dénitrifiante apparaît dominante sur la majorité des échantillons.

piézomètre	profondeur du prélèvement (m)	dénombrement en UFC x 10 ² /g nature du milieu gélosé		log UFC
		PCA+glc	PCA+glc+NO ₃ ⁻	/g
P15	2,1	190	460	2.7
	2,6	230	190	2.36
	3,1	76	170	1.88
	3,5	19	240	1.28
P75	2	0	0	-
	3	52	63	1.72
	4	190	26	2.27
	4,8	26	23	1.41
P12	1	1500	1500	3.18
	2	130	540	2.73
	2,8	72	25	1.86
	3,1	58	72	1.76
	4	0,7	1,1	-0.15
P16	1,5	3400	3500	3.53
	1,65	840	440	2.92
	2,5	84	140	1.92
	3,5	12	40	1.08
	3,8	16	81	1.20

Tableau 6: Analyses microbiologiques effectuées sur les échantillons de sol (octobre 1993) [les cases grisées indiquent les prélèvements de sol réalisés dans la nappe] [PCA, Plate Count Agar - glc, glucose - NO₃⁻, ion nitrate - UFC, Unité Formant Colonie]

¹ Comparativement, Reasoner et Geldreich (1985) ont dénombré, sur milieu PCA, 210 UFC/ml dans l'eau destinée à la consommation humaine après 48 heures d'incubation.

Au niveau des piézomètres P12, P16 et P75, les dénombrements suggèrent qu'il s'agit essentiellement d'une flore fermentative anaérobie stricte ou anaérobie facultative. Sur les échantillons prélevés dans les formations supérieures des piézomètres P12 et P16, le nombre plus important de micro-organismes dénombrés est la résultante de l'apport de nutriments (notamment en carbone et phosphates) par lessivage des sols agricoles superficiels (→ Annexe 8, tableau 4).

Le passage dans la zone saturée entraîne une baisse rapide du nombre de colonies dénombrées. Selon les analyses physico-chimiques réalisées sur les eaux, deux explications sont possibles :

- ✓ le caractère nocif de l'eau liée à la présence de polluants secondaires inhibiteurs tels que les cyanures (106 µg/l dans P16), les hydrocarbures (0,27 et 0,425 µg/l respectivement dans P15 et P75)(→ Annexe 8, tableau 3), ou d'autres non analysés,
- ✓ l'absence de substrat carboné facilement assimilable par les micro-organismes.

Dans l'eau, les premières observations montrent un niveau d'activité bactériologique faible proche de celui observé dans le piézomètre de référence (P14) (tableau 7).

numéro du piézomètre	teneur en nitrates (mg/l)	numération en UFC X 10 ² /ml		log UFC /ml
		PCA+glc	PCA+glc+NO ₃ ⁻	PCA+glc
P14*	89	1	4,7	0
P15	1570	320	1,1	2.51
P01	1885	2,83	3,16	0.45
P02	580	1,6	5,1	0.2
P75	895	37	25	1.57
P08	128	3,2	5,6	0.51
P12	2	11	1,4	1.04
P16	955	5,2	7,8	0.72

Tableau 7 - Analyses microbiologiques effectuées sur les échantillons d'eau (octobre 1993)

* piézomètre, situé en amont hydraulique de la source principale de pollution azotée, servant de témoin [PCA, Plate Count Agar - glc, glucose - NO₃⁻, ion nitrate - UFC, Unité Formant Colonie].

Seuls les piézomètres P15 proche de la source de pollution, et P75 proche du cours d'eau, présentent des concentrations microbiologiques plus élevées. A l'exception de ces deux piézomètres, il semble donc que la concentration en nitrates de l'eau ne constitue pas le facteur limitant la croissance microbienne. Par contre, les conditions physico-chimiques, ou encore un pH éloigné de la neutralité, peuvent exercer une influence néfaste sur les micro-organismes. Dans le cas présent, les valeurs de température et de pH ne constituent pas des paramètres limitant la croissance bactérienne. Le principal facteur limitant de la croissance microbienne est l'absence de substrat carboné utilisable par les micro-organismes hétérotrophes. En effet, la présence d'une flore "totale" plus importante au droit des piézomètres P15 et P75, est corrélée avec la présence d'une source de carbone importante en ces points (Hydrocarbures Polycycliques Aromatiques dans le premier cas et matières organiques d'origine domestique dans le second cas). Néanmoins, sur l'ensemble des prélèvements réalisés, la croissance bactérienne sur milieu gélosé n'est observée qu'après 48 heures (à 20 et 37°C), en réponse aux propriétés contraignantes et défavorables du milieu souterrain. Dans des milieux où la pression environnementale est forte (faible concentration en nutriments,...), les souches sélectionnées ne sont que très rarement celles présentant les temps de doublement les plus courts (Yanagita, 1990).

Des analyses microbiologiques plus complètes sont réalisées sur le piézomètre (P01) afin de caractériser la flore viable et cultivable rencontrée dans la nappe près de la source de pollution. Aucune entérobactérie d'origine "fécale" n'est dénombrée sur le milieu T.T.C. à 41°C, ce qui valide le fait que les bassins de décantation ne collectent pas les eaux domestiques usées. La flore dénombrée est constituée, dans sa grande majorité, de colonies bactériennes. Les levures et moisissures représentent moins de 0,01% de la flore observée en aérobiose (figure 19).

La flore bactérienne apparaît n'être constituée que d'un nombre limité de colonies morphologiquement différentes que l'on observe aussi bien en aérobiose (PCA+glc) qu'en anaérobiose (PCA+glc+NO₃⁻). L'observation à l'oeil nu des boîtes de Pétri a permis d'isoler neuf types de colonies bactériennes différents. Des tests de caractérisation rapide ont alors été effectués sur chaque type. Ils mettent en évidence (tableau 8) :

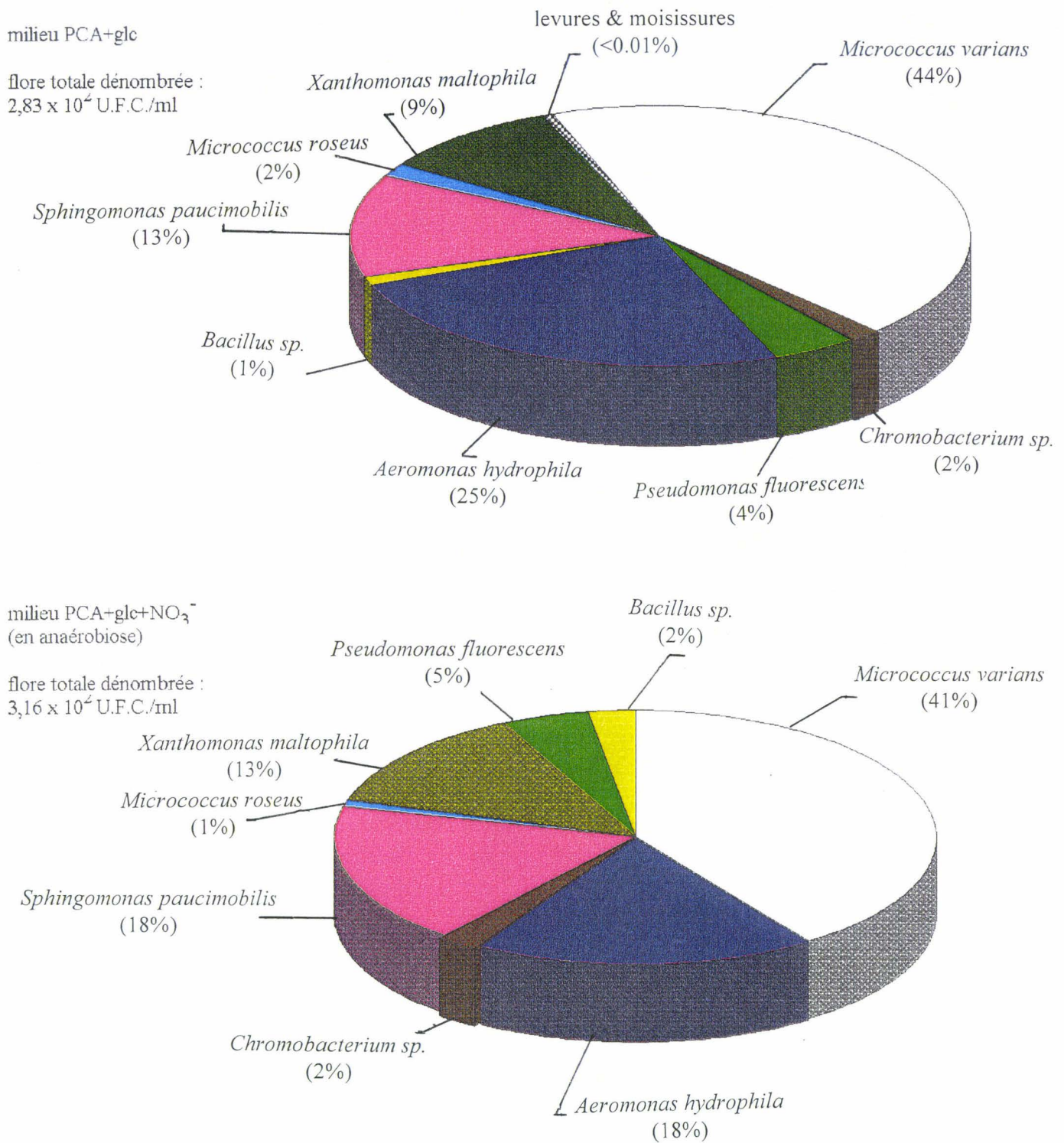


Figure 19 - Répartition des différents micro-organismes viables et cultivables dénombrés au niveau du piézomètre P01 (octobre 1993)

colonie isolée	forme bactérie	Gram	oxydase	Kligler			type respiratoire	catalase	Mannitol-Mobilité-nitrates				profil API 20NE	identification
				glucose	lactose	gaz			mannitol	mobilité	NO ₃ en NO ₂	NO ₃ en N ₂		
ronde blanche	coque	+	-	+	-	-	aéro strict	+	-	-	+	-		<i>Micrococcus varians</i>
ronde translucide	bacille	-	+	+	-	+	aéro-ana		+	+	+	-	7530014	<i>Aeromonas hydrophila</i>
jaune	bacille	-	+	-	-	-	aéro strict	+	-		-	+	1461204	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>
blanche envahissante	coque	+	-				aéro strict				+	-		<i>Micrococcus roseus</i>
ronde beige	bacille	-	-	-	-	-	aéro strict	-	-	+	-	-	1472341	<i>Xanthomonas maltophilia</i>
beige	bacille	-	+	-	-	-	aéro strict	+	-	+	+	-	5142555	<i>Chromobacterium sp.</i>
moisissure beige														<i>Moisissures</i>
ronde rose			+	-	-	-	aéro strict	+	-		+	-		<i>Levures</i>
irrégulière blanche	bacille en chaîne	+	-	+	-	-	aéro-ana	+	-	+	+	-		<i>Bacillus sp.</i>
beige	bacille	-	+	-	-	-	aéro strict	+	-	+	-	+	1147455	<i>Pseudomonas fluorescens</i>

Tableau 8 - Caractérisation des flores dénombrées dans la nappe au droit du piézomètre P01 (octobre 1993)

- l'absence de bactéries anaérobies strictes,
- un nombre élevé de colonies gram positives (48%),
- la mobilité de la majorité des souches rencontrées,
- l'utilisation des nitrates comme accepteurs d'électrons en absence d'oxygène par 98% des souches dénombrées. Au sein de cette population, 62% des colonies ne réalisent que l'étape de dénitratisation et 38% réduisent successivement les nitrates puis les nitrites.

Comme déjà mentionné, la dénitrification est due très souvent à l'action successive de souches de bactéries hétérotrophes qui, en conditions limitantes en oxygène, réduisent d'abord les nitrates en nitrites, puis en gaz. L'étape de dénitratisation est l'étape la plus productrice d'énergie. Il apparaît en conséquence logique que les bactéries dénitratantes soient les plus nombreuses dans les conditions physico-chimiques de la nappe (présence de nitrates, oxygène et carbone limitants). Par ailleurs, une partie de l'azote nitrique peut être utilisée à la synthèse de bactéries jouant un rôle épurateur autre que l'élimination des nitrates.

Les tests biochimiques, éventuellement complétés par l'étude des profils API 20 NE, ont permis de déterminer de façon présomptive le genre voire l'espèce des souches bactériennes rencontrées : *Micrococcus varians*, *Micrococcus roseus*, *Aeromonas hydrophila*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Xanthomonas maltophilia*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus sp.* et *Chromobacterium sp.*.

Parmi ces micro-organismes, *Aeromonas sp.* a été particulièrement étudiée en raison des maladies gastriques qu'elle est susceptible de provoquer (Golik *et al.*, 1990). Sa présence est observée aussi bien dans les eaux usées (Boussaid *et al.*, 1991) que dans les eaux souterraines (Kerstens *et al.*, 1995). Au vu des résultats publiés par Kerstens *et al.* (1996), la densité de *Aeromonas hydrophila* (~50 UFC/ml), rencontrée dans la nappe de la craie au droit du piézomètre P01, est très fortement supérieure à celle habituellement mise en évidence dans les eaux naturelles (~0.01 UFC/ml). Une des explications possibles pourrait être la grande capacité d'adaptation de cette souche à un environnement où la concentration en azote constitue le principal paramètre sélectif.

1.3. Conclusions

1.3.1. Possibilités de traitement applicable à la nappe de la craie

Lorsqu'il y a contamination des eaux souterraines, plusieurs méthodes peuvent être mises en oeuvre pour en limiter l'extension et pour entreprendre les travaux de dépollution. Mais sauf exception, ces procédés ne permettent pas la réhabilitation complète de la nappe (Académie des Sciences, 1991) ; on ne retrouve pas les "teneurs originelles".

Le problème le plus important souligné par cette étude est constitué par les très fortes concentrations en nitrates (dépassant en certains points 1500 mg NO₃⁻/l), dix fois supérieures aux concentrations (50 - 150 mg NO₃⁻/l) rencontrées lors des expériences de traitement *in situ* déjà réalisées (Collin *et al.*, 1984 ; Boussaid *et al.*, 1985 ; Braester et Martinell, 1988 ; Mercado *et al.*, 1988). Dans le cas présent, le choix du procédé de dénitrification doit répondre à plusieurs exigences (Ouvrage collectif, 1990) :

- ✓ élimination des nitrates sans accumulation de nitrites, ni d'ammoniaque,
- ✓ augmentation faible de la biomasse microbienne au cours du déroulement de la dénitrification pour éviter le colmatage des ouvrages,
- ✓ stabilisation du procédé et des rendements pendant de longues périodes de fonctionnement.

Nous nous sommes intéressés aux procédés biologiques d'épuration, mais il apparaît évident que l'on pourrait envisager d'autres solutions utilisant les procédés de traitement physico-chimiques (résines échangeuses d'ions par exemple). Les procédés physico-chimiques nous sont en effet apparus moins adaptés au problème propre du site notamment en raison de la maintenance lourde qu'ils nécessitent. Les installations de dépollution biologique peuvent être regroupées en deux classes :

- ✓ **Le piège hydraulique.** La création de cônes de dépression par pompage dans la nappe, suivie d'un traitement en surface, reste la technique la plus mise en place en France. Compte tenu de l'importante fracturation de la craie dans la zone d'étude, la mise en place d'un piège hydraulique efficace suppose le prélèvement d'environ 3 600m³/jour à traiter dans une

installation de surface (Darmendrail et Pernel, 1991). Le traitement en surface de l'eau prélevée doit, par ailleurs, être complété par la diminution des apports en azote dans le cours d'eau. de telles conclusions résultent de la réalisation d'un modèle de transfert, basé sur l'état réel en 1991, mis en évidence lors des différentes campagnes d'analyses dans le secteur d'étude, et simulant une pollution chronique d'une durée de 30 ans)(figure 20). Selon le modèle, les concentrations en nitrates dans les ouvrages les plus pollués (à savoir, à proximité des bassins) ne diminueraient de façon sensible qu'après 5 à 10 ans de traitement (Bouexière *et al.*, 1994). Les concentrations résiduelles dues à la pollution issue de la plateforme industrielle seraient alors inférieures à 500 mg/l.

✓ **la stimulation des phénomènes de dénitrification biologique pour accélérer la décontamination de l'aquifère crayeux.** L'absence de substrat carboné et, par conséquent, le faible nombre de micro-organismes dénombrés (inférieur à 10^4 U.F.C./ml) dans les sols et la nappe ne permettent pas d'envisager une réduction biologique spontanée de la totalité des nitrates présents dans la nappe. L'addition d'une source de carbone organique permettrait la stimulation de la dénitrification mais les effets de ce processus ne seraient ressentis qu'après plusieurs semaines ; cette durée étant nécessaire à l'augmentation de la biomasse. L'apport d'un inoculum permettra de faciliter le démarrage de la dénitrification.

1.3.2. Perspectives de traitement du site

Au vu des concentrations en nitrates à traiter, notre choix s'est orienté vers une dépollution *in situ* utilisant les capacités dénitrifiantes de la flore présente dans la nappe et les formations géologiques sus-jacentes. Ce choix repose sur le coût inférieur de cette solution et une meilleure intégration dans l'environnement du site.

Comme cela a été souligné ci-dessus, il sera nécessaire de mettre en place un inoculum. Celui-ci peut contenir des micro-organismes exogènes connus pour leur bonne capacité à dénitrifier.

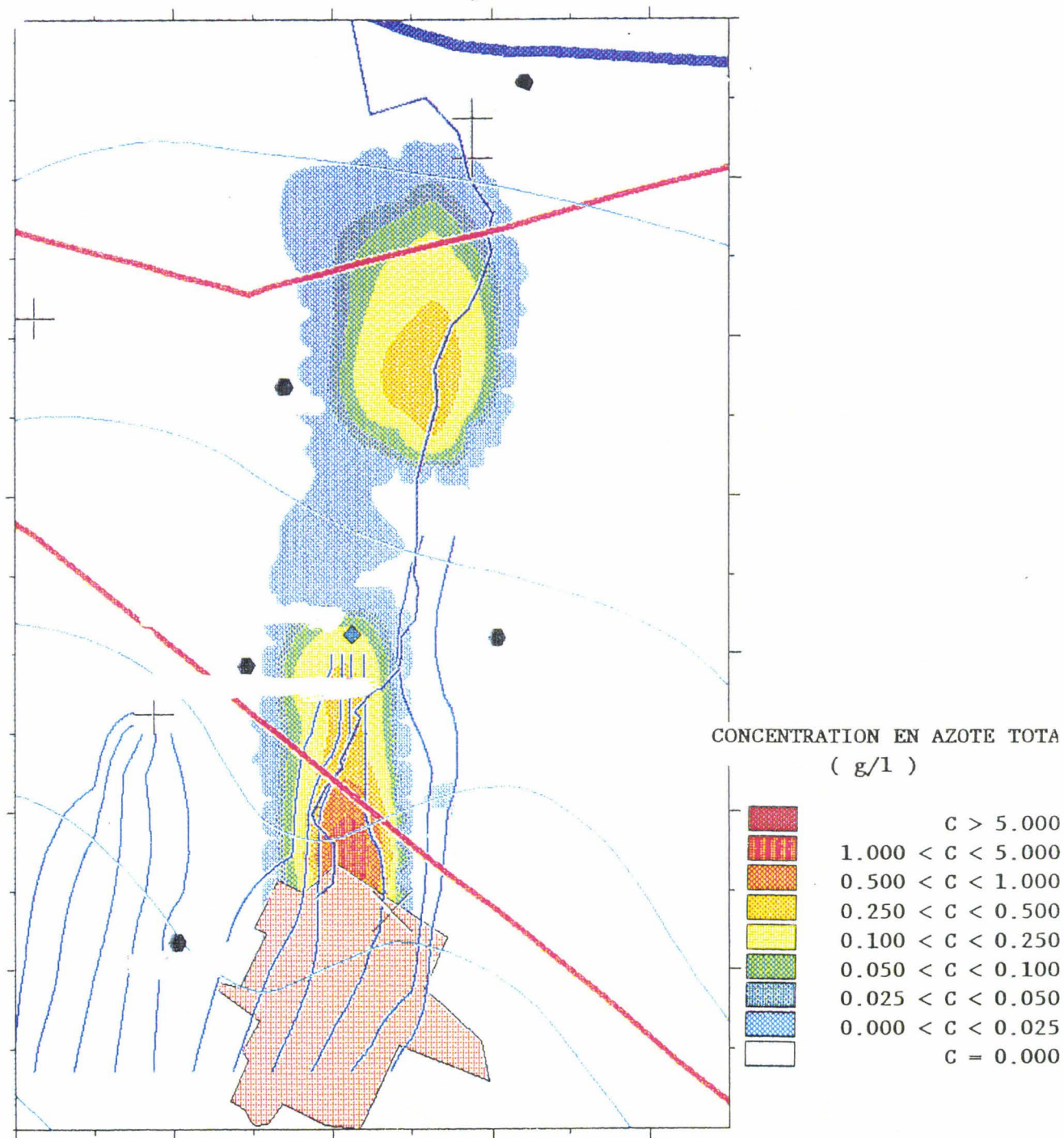


Figure 20 - Carte reconstituant la pollution chronique de la nappe après 30 ans d'activité industrielle et 11,5 ans après la pollution accidentelle avec une diminution des rejets à 100 tonnes par an et 10 ans après la mise en fonction d'un puits de dépollution pompant en continu $150\text{m}^3/\text{h}$ (logiciel SESAME, BRGM)

L'introduction de micro-organismes modifiés dénitrifiants dans un environnement compétitif non stérile nécessite qu'ils soient capables de survivre en nombre suffisant et gardent la capacité d'exprimer le phénotype catabolique désiré. Malheureusement, un déclin général des micro-organismes exogènes introduits a déjà été observé (Bamault et Sylvestre, 1993). Cette constatation est à l'origine du regain d'intérêt pour l'écologie microbienne et l'étude des activités métaboliques de la flore indigène. L'inoculum peut également être constitué de micro-organismes indigènes multipliés *ex situ*. Les dénombrements de la flore microbienne de la nappe ont mis en évidence la présence de micro-organismes hétérotrophes n'utilisant pas les nitrates dans un environnement fortement pollué par les nitrates. L'équilibre nutritionnel naturel établi souligne l'intérêt d'utiliser un écosystème indigène constitué à la fois de micro-organismes dénitrifiants et non-dénitrifiants lors de la mise en place d'une unité de dénitrification afin de respecter l'équilibre microbien

Dans le procédé de dépollution *in situ* choisi, la porosité de la craie, roche-mère de la région d'investigation, va jouer un rôle important car plus elle sera élevée, plus la masse de bactéries fixées par unité de volume sera importante et par conséquent, plus la charge volumique traitée pourra être élevée. Dans la zone d'étude, la porosité de la craie est importante (15%) et le caractère pulvérulent de ce matériau engendre un risque de colmatage du support par la biomasse et le gaz produits au cours de la dénitrification. Si des lavages périodiques des supports sont possibles en réacteurs *ex situ*, le colmatage reste le premier paramètre susceptible de provoquer une baisse de l'efficacité de l'installation *in situ*, voire son arrêt complet.

Afin de mieux connaître et comprendre les paramètres qui gouvernent la dénitrification de fortes teneurs en nitrates, les expériences mises en oeuvre dans la suite du travail seront consacrées à :

- ✓ des essais de dénitrification en réacteurs de laboratoire, dans les conditions hydrauliques et physico-chimiques de la nappe de la craie, afin de mieux comprendre la dénitrification à forte teneur en azote, puis de déterminer les apports optimaux en nutriments,
- ✓ l'étude morphologique et physiologique des souches dénitrifiantes rencontrées lors des essais en réacteurs.

2. ESSAIS DE DENITRIFICATION

Afin de permettre l'adsorption de la microflore telle qu'elle se réalise dans une aquifère, nous avons étudié la dénitrification en réacteurs à biofilms fixés sur des supports minéraux. Ces réacteurs sont très efficaces pour la dénitrification car ils permettent :

- ✓ un temps de séjour hydraulique (TSH) suffisant pour un rendement important de la réaction. En effet, le piège biologique créé au sein de biofilms permet d'augmenter le temps de contact entre les micro-organismes et l'eau, et crée des zones d'anaérobiose (Gonçalves *et al.*, 1994).
- ✓ la diminution des risques de lessivage puisque la biomasse est fixée sur un support, permettant de faire face à des variations de débit (Ryhiner *et al.*, 1994).
- ✓ la diminution des volumes des réacteurs (Jansen *et al.*, 1994).

Les principaux inconvénients sont les risques de colmatage et l'apparition à moyen terme de passages préférentiels de l'eau (Liessens *et al.*, 1988).

2.1. Déroulement des expériences

2.1.1. Les réacteurs up-flow (verticaux)

Le travail réalisé avec les réacteurs up-flow est une étude comparative des capacités de réduction des nitrates de deux réacteurs à biofilms fixés.

Théoriquement pour les genres de supports utilisés (craie ou pouzzolane), le nombre de bactéries fixées est de 10^8 U.F.C./ cm^3 de réacteur. Dans le cas d'un volume utile de 35 litres, la masse supposée de 3,5 g de bactéries permet théoriquement la réduction de 1120 mg NO_3^- soit 32 g $\text{NO}_3^-/\text{m}^3 \cdot \text{jour}$ [équation (1)² liant la réduction des nitrates à la consommation de glucose (4.1.1.)]. Ceci correspond à la masse maximale théorique de nitrates que peut réduire la biomasse bactérienne fixée dans un réacteur. Au sein des réacteurs up-flow, la montée en charge est

$$^2\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 5,6 \text{NO}_3^- + 9,6 \text{H}^+ + 4\text{e}^- \longrightarrow 6 \text{CO}_2 + 10,8 \text{H}_2\text{O} + 2,8 \text{N}_2$$

réalisée de façon progressive afin de ne pas provoquer une intoxication des micro-organismes en raison des concentrations très importantes en nitrates et en ammoniacque. Cette période de démarrage permet l'augmentation progressive de la charge volumique en nitrates jusqu'à sa valeur maximale, tout en maintenant un temps de séjour relativement court de l'eau dans les réacteurs. L'alimentation en eau polluée par les nitrates se fait à une concentration en nitrates telle que la charge volumique soit égale au 1/10ème de la charge volumique maximale théorique (environ $3 \text{ g NO}_3^-/\text{m}^3 \cdot \text{jour}$).

Sur la période de 0 à 10 jours, le temps de séjour est fixé arbitrairement à 6 jours (figure 21). Le faible débit total favorise la fixation et le développement des micro-organismes sur les supports minéraux. Le temps de séjour hydraulique (TSH) est ensuite abaissé à 3 jours (période $jo+10$ à $jo+13$) puis à 1,5 jours (période $jo+13$ à $jo+24$). Sur ces périodes, la charge volumique en nitrates se trouve ainsi multiplier par deux. L'augmentation du débit total qui en résulte permet d'accroître dans la même proportion le débit de glucose et de faciliter la répartition du substrat carboné dans les réacteurs.

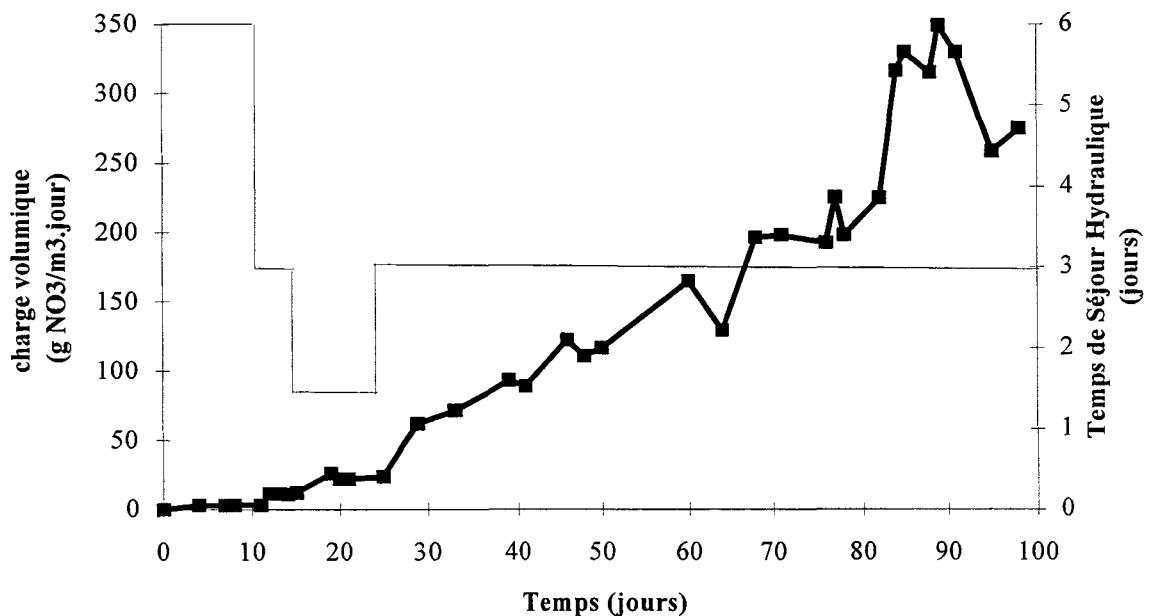


Figure 21 - Augmentation de la charge volumique en nitrates(■) et variation du temps de séjour hydraulique (-) dans les réacteurs up-flow

En raison des fluctuations importantes des rendements azotés qu'engendre ce faible temps de séjour hydraulique (1,5 jours), nous avons préféré fixé le TSH final à 3 jours. L'accroissement de la charge volumique est alors réalisé par une augmentation de la concentration en nitrates dans l'eau d'alimentation. Dans la pratique, l'eau de nappe utilisée est de moins en moins diluée jusqu'à l'utilisation de l'eau de nappe pure contenant environ 1 200 mg NO₃⁻/l. Les fluctuations des concentrations en nitrates dans l'eau de nappe, liées aux périodes de pompage dans la nappe, se répercutent normalement sur la charge volumique.

2.1.2. Les réacteurs horizontaux

L'objectif de l'étude en réacteurs horizontaux est de se placer dans des conditions très proches de celle de la nappe à traiter (TSH, concentrations en nitrates et en polluants secondaires).

Quatre réacteurs (R1 à R4) ont été utilisés en parallèle pendant cinq périodes de temps spécifiques (tableau 9)

période/apport	R1	R2	R3	R4
jo à jo+36	éthanol faible	éthanol faible phosphates	éthanol fort	éthanol fort phosphates
jo+37 à jo+43	aucun	aucun	aucun	aucun
jo+44 à jo+90	éthanol faible	éthanol faible phosphates	éthanol fort	éthanol fort phosphates
jo+91 à jo+145	éthanol faible Fer, Cuivre, Cobalt Molybdène	éthanol faible phosphates Fer, Cuivre, Cobalt Molybdène	éthanol fort Fer, Cuivre, Cobalt, Molybdène	éthanol fort phosphates Fer, Cuivre, Cobalt Molybdène
jo+146 à jo+190	aucun	aucun	aucun	aucun

Tableau 9 : Déroulement des essais de dénitrification en réacteurs horizontaux [éthanol faible (0,31 g éthanol/g NO₃⁻), éthanol fort (0,45 g éthanol/g NO₃⁻), [PO₄³⁻]^{(1)*} < 4,4 mg/l, [fer]^{*} = 200 µg/l, [cuivre]^{*} = 1 mg/l, [cobalt]^{*} = 50 µg/l, [molybdène]^{*} = 50 µg/l]

(1) * : les concentrations en éléments métalliques appliquées à l'entrée des réacteurs sont égales aux valeurs maximales admissibles imposées par la législation en matière d'alimentation en eau potable. Pour le cobalt et le molybdène (pas de CMA), la concentration a été fixée identique à celle du manganèse et du magnésium (50 µg/l).

- ◆ **période 1 : de jo à jo+36**, période correspondant à la phase de stabilisation des réacteurs. Un apport en éthanol, à différentes concentrations, et éventuellement en phosphates, est réalisé. Cette période a pour objectif principal de mettre en évidence l'influence des différents apports sur la vitesse de mise en place de la dénitrification,
- ◆ **période 2 : de jo+37 à jo+43**, où l'apport a été stoppé de façon à voir l'incidence sur la dénitrification d'une carence nutritive (éventuellement provoquée par un incident technique),
- ◆ **période 3 : de jo+44 à jo+90**, période de reprise de l'alimentation en éthanol avec ou sans phosphates aux concentrations définies lors de l'étape 1. Cette phase permet de déterminer les concentrations limites que l'on peut atteindre dans nos conditions expérimentales,
- ◆ **période 4 : de jo+ 91 à jo+145** : l'apport de nutriments est complété par l'ajout de 4 métaux impliqués dans les enzymes de la dénitrification (fer, cuivre, cobalt, molybdène). Le nickel, déjà présent dans la nappe n'a pas été rajouté,
- ◆ **période 5 : de jo+146 à jo+ 190** : Tout apport externe est supprimé. En effet, il apparaît difficilement envisageable de poursuivre infiniment des apports en substrats lors de la mise en place du pilote *in situ*. Cette période a donc pour objectif de suivre l'évolution du système après retour aux conditions physico-chimiques naturelles de la nappe de la craie.

2.2. Influence du substrat carboné et des phosphates sur la dénitrification

2.2.1. Sur la réduction des nitrates et des nitrites

a/ les réacteurs up-flow

La période de démarrage est écourtée grâce à une large inoculation des réacteurs. Au sein du réacteur "Pouzzolane", le rendement de dénitrification augmente très rapidement (figure 22). Parallèlement, on observe un retard du démarrage apparent de la dénitrification dans le réacteur "Craie", dû à un relargage des nitrates d'origine agricole et stockés dans la roche. Cependant, ceci n'a pas été vérifié par un dosage des nitrates adsorbés sur la roche. Puis, le rendement de dénitrification augmente rapidement. Au sein des deux réacteurs, l'efficacité de la dénitrification diminue périodiquement lors de chaque modification de la charge volumique. A chaque changement de débit ou de charge, l'équilibre du système est rompu. Un certain temps (de 2 à 7 jours) correspondant à une nouvelle croissance cellulaire est alors nécessaire pour obtenir un

nouveau régime permanent. De plus, d'importantes chutes de rendement, particulièrement dans le réacteur "Pouzzolane" sont observées ; elles sont dues à la rupture de l'alimentation en glucose par colmatage des tuyaux en raison de la prolifération de bactéries hétérotrophes et l'agglomération de poussières de roches favorisées par le faible débit.

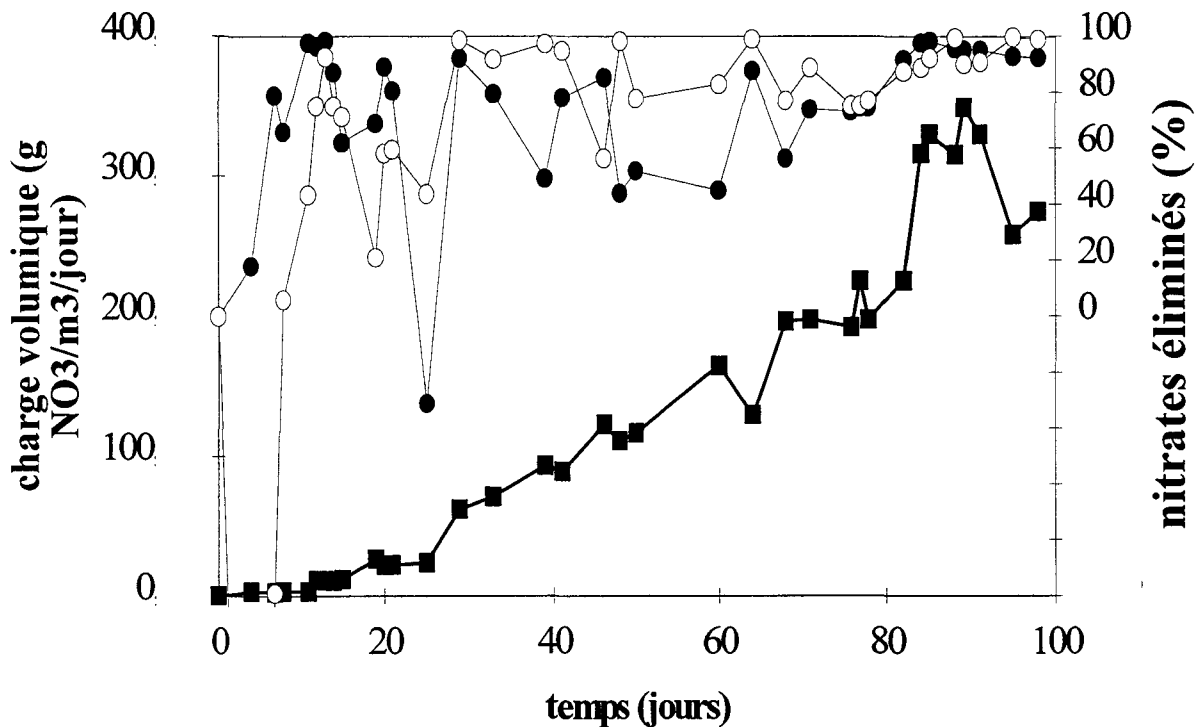


Figure 22 : Evolution du pourcentage de nitrates éliminés en fonction de la charge appliquée et de la nature du support (■ : charge volumique en nitrates ; ● : réacteur pouzzolane ; ○ : réacteur craie).

Après adaptation de la flore aux nouvelles conditions, les rendements de réduction des nitrates se stabilisent entre 90 et 99 %, ce qui correspond à une concentration résiduelle inférieure à 100 mg NO_3^- dans l'effluent. Au terme de l'expérimentation (jo+98), la charge volumique atteinte est égale à 285 g $\text{NO}_3^-/\text{m}^3\cdot\text{jour}$. Elle est très supérieure à la valeur théorique de 32 g $\text{NO}_3^-/\text{m}^3\cdot\text{jour}$. Une explication possible réside dans le fait que nous n'avons pris en considération, lors de l'estimation de la charge volumique, que la flore fixée sur la roche. Or on observe la présence de floes bactériens en suspension et d'une flore libre dénitrifiante présente en grande quantité dans les réacteurs (§2.5). De plus, leur adaptation rapide à une nouvelle

augmentation de la charge laisse supposer une croissance rapide de la flore dénitrifiante (environ 24 heures).

Les nitrites résultant de la réduction des nitrates ont été dosés dans le compartiment d'entrée du réacteur et dans l'effluent, en début et en fin d'expérience, c'est à dire durant la période de montée en charge des nitrates et lors de l'application de la charge maximale. Au sein du réacteur-craie, il apparaît que les nitrites s'accumulent de façon importante dans le compartiment d'entrée puis sont partiellement éliminés dans l'effluent (figure 23).

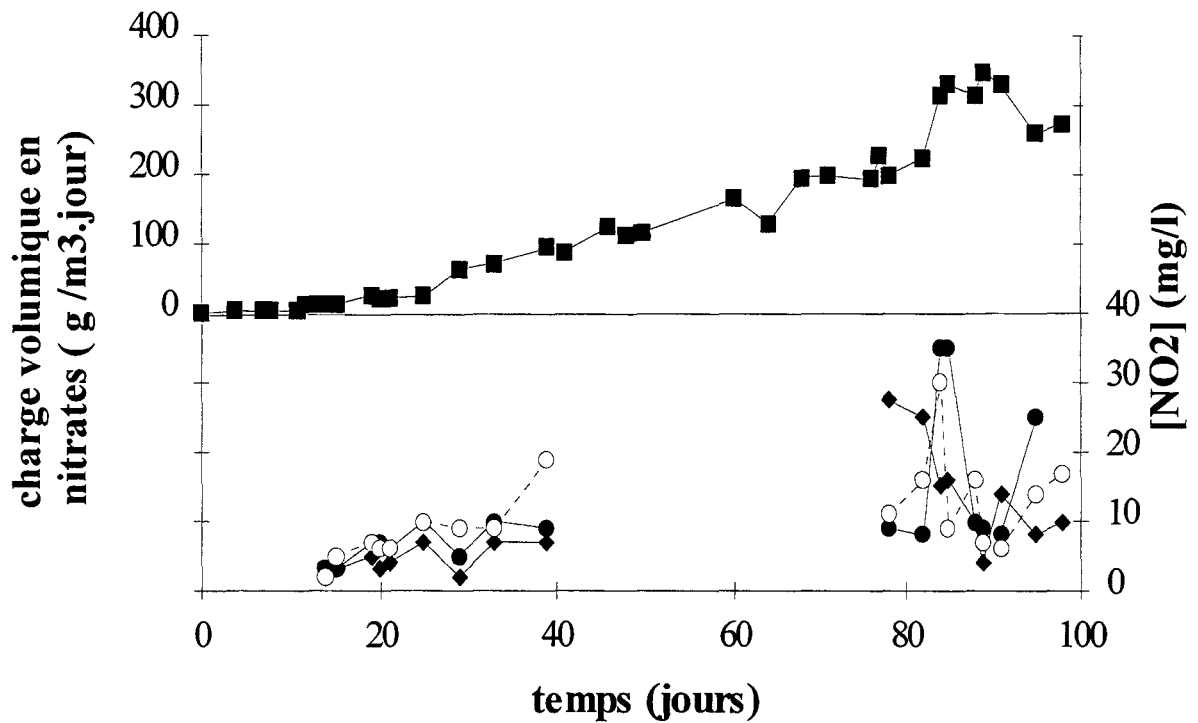


Figure 23 : Evolution des concentrations en nitrites en fonction de la charge appliquée dans le réacteur-craie [charge volumique en nitrates (■) ; influent (○) ; compartiment d'entrée (●) ; effluent (◆)].

On peut donc en conclure que la réduction des nitrates débute dès l'introduction de l'eau polluée dans les réacteurs grâce à des bactéries non fixées sur la roche.

Le phénomène inverse est observé dans le réacteur-pouzzolane où, à forte charge volumique en nitrates, la concentration en nitrites apparaît plus élevée dans l'effluent que dans le compartiment d'entrée (figure 24).

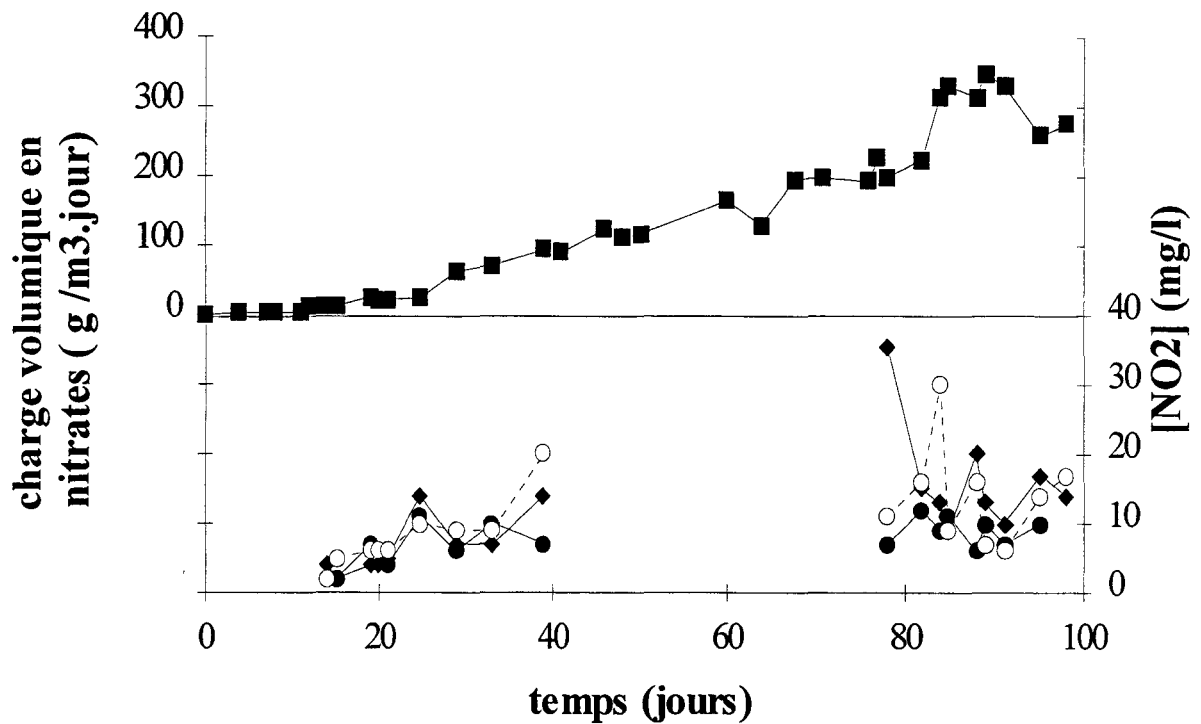


Figure 24 : Evolution du pourcentage de nitrites relargués en fonction de la charge appliquée dans le réacteur pouzzolane [charge volumique en nitrates (■) ; influent (○) ; compartiment d'entrée (●) ; effluent (◆)].

Dans les deux configurations étudiées, dès que l'on dépasse une charge volumique de 200 mg $\text{NO}_3^-/\text{m}^3\text{jour}$, l'apparition de nitrites dans les effluents confirme le fait que la dénitrification constitue l'étape limitante de la dénitrification.

b/ les réacteurs horizontaux

Même après une inoculation microbienne, une période d'adaptation traduite par une faible élimination de l'azote est nécessaire (Figure 25).

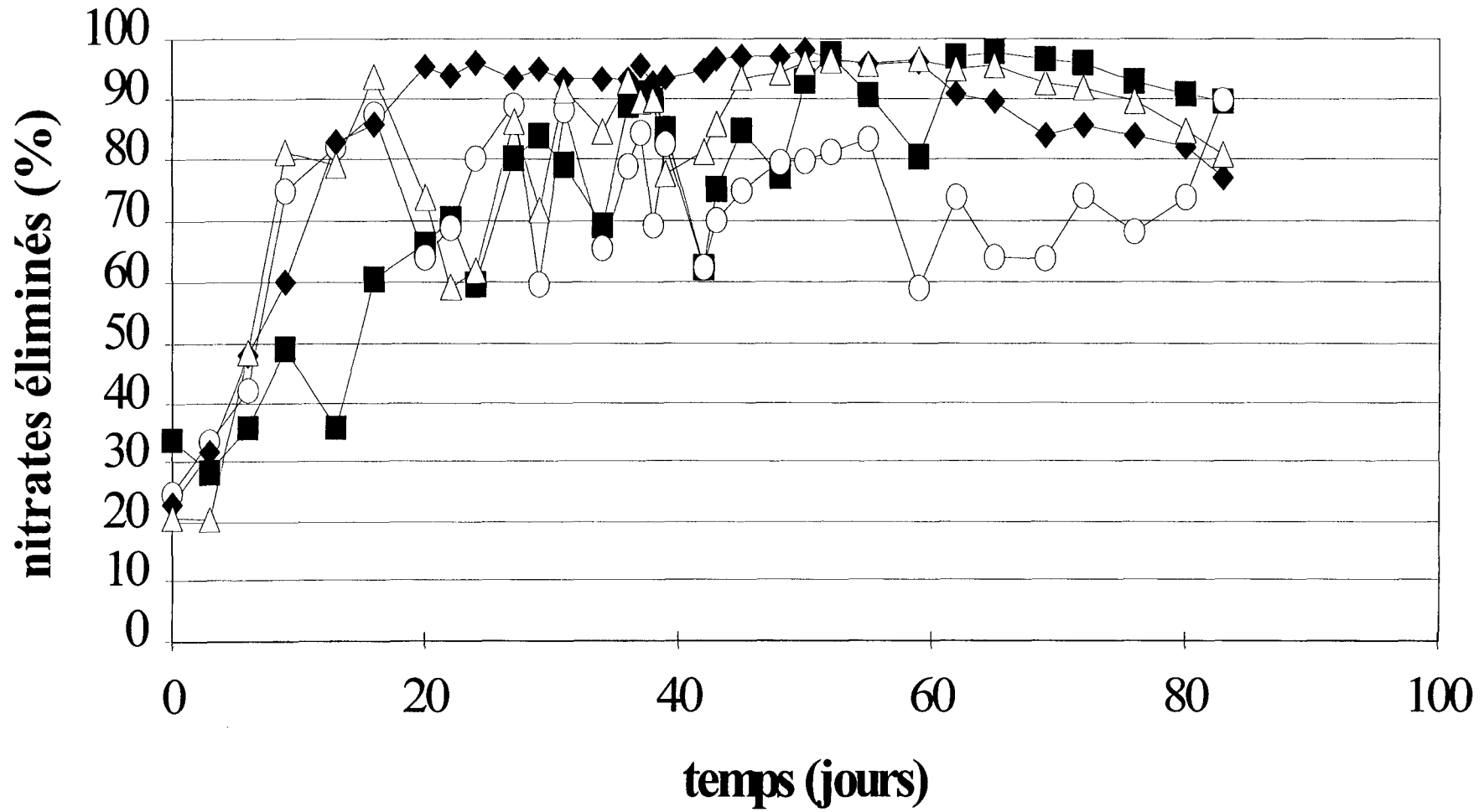


Figure 25 : Evolution du pourcentage de nitrates éliminés en fonction du temps et des apports réalisés [éthanol faible (■), éthanol faible+PO₄³⁻ (◆); éthanol fort (○); éthanol fort+ PO₄³⁻ (◁)]

Le pourcentage d'élimination des nitrates dépend très largement de l'apport de phosphates lors de cette période. Ainsi, avec une "complémentation" phosphorée, la période de démarrage est réduite à 10 jours (R₂ et R₄) alors que 20 jours sont nécessaires à l'obtention de l'équilibre sans apport phosphoré (R₁). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Hiscock *et al.* (1991), bien que l'apport en phosphates optimal (5 mg PO₄³⁻/l) apparaît, dans nos conditions, très supérieur à celui proposé par Hiscock *et al.* (0,2-0,4 mg/l).

Après cette période de démarrage, la dénitrification se met en place rapidement. Cependant, les charges volumiques en nitrates éliminées se stabilisent à 2,5 kg NO₃ /m³.jour (soit 80 à 95 % d'élimination) après 50 jours de fonctionnement des réacteurs à l'exception du réacteur R3 où l'éthanol est apporté en fortes concentrations (0,45 g/g de nitrates à éliminer) sans ajout de phosphore. Les rendements obtenus avec un faible apport d'éthanol (0,31 g/g de nitrates à éliminer) sans phosphore externe (réacteur R1) semble indiquer la présence d'une flore adaptée avec une affinité spécifique pour les phosphates très importante (un K_s très faible), et/ou la dissolution du phosphore contenu dans la craie lors des variations du pH (→ § 2.2.5.).

Type de réacteur	nature du support	substrat carboné	charge volumique kg NO ₃ /m ³ .jour	références
lit fixé	craie	éthanol	5.28	Delarminat <i>et al.</i> (1990)
lit fixé	polyuréthane	méthanol	7.17	Liessens <i>et al.</i> (1989)
lit fixé	craie	acide acétique	1.76	Richard (1989)
lit fluidisé	sable	méthanol	9.34	Liessens <i>et al.</i> (1991)
lit fluidisé	plastique	acide acétique	36.5	Lazarova <i>et al.</i> (1994)

Tableau 10⁽³⁾ - Exemples de performances obtenues avec des procédés de dénitrification biologique hétérotrophe

Dans nos conditions, la présence du support crayeux entraîne une assimilation microbienne et une précipitation physico-chimique, qui se caractérise par une succession de

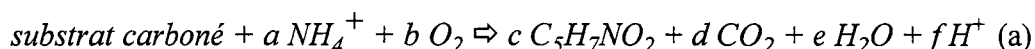
³Le tableau 10 présente les charges volumiques obtenues par d'autres équipes (pour mémoire)

phases d'élimination et de relargage de phosphates. Ceci est lié à l'équilibre existant entre les ions Ca^{2+} et PO_4^{3-} établi par Robertson *et al.* (1989). Lors de la période d'adaptation, on constate une augmentation très importante de la concentration en nitrites dans les effluents (figure 26). Ce relargage de nitrites dans la phase liquide caractérise la différence qu'il existe dans les vitesses de mise en place de la dénitrification, d'une part, et de la dénitrification, d'autre part.

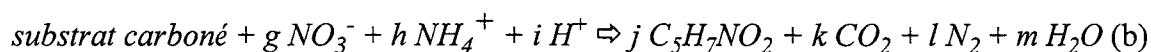
L'addition d'éthanol à une forte concentration (0,45 g/g de nitrates à éliminer) permet de réduire significativement cette accumulation (200-250 mg/l (réacteurs 3 et 4) contre 300-350 mg NO_2^- /l sans apport phosphoré (réacteurs 1 et 2)). Après quatre semaines de fonctionnement, la concentration en nitrites se stabilise à 50 mg/l dans tous les réacteurs.

2.2.2. Sur l'élimination de l'ammoniaque

L'ammoniaque constitue la forme azotée préférentielle d'assimilation pour les micro-organismes et selon la concentration en oxygène du milieu, la synthèse microbienne s'effectuera avec ou sans couplage à la dénitrification. Deux réactions sont possibles. En présence d'oxygène moléculaire, la production de cellules bactériennes, ou autres micro-organismes, conduit à la réduction complète du milieu.



En absence d'oxygène moléculaire, la synthèse microbienne est couplée à la réduction des nitrates qui fournit aux cellules l'oxygène qui leur est nécessaire.



Selon la réaction (fonction des caractéristiques du milieu) qui va se dérouler dans les réacteurs, lors de la synthèse bactérienne, il y a production ou consommation de protons, donc acidification ou alcalinisation du milieu.

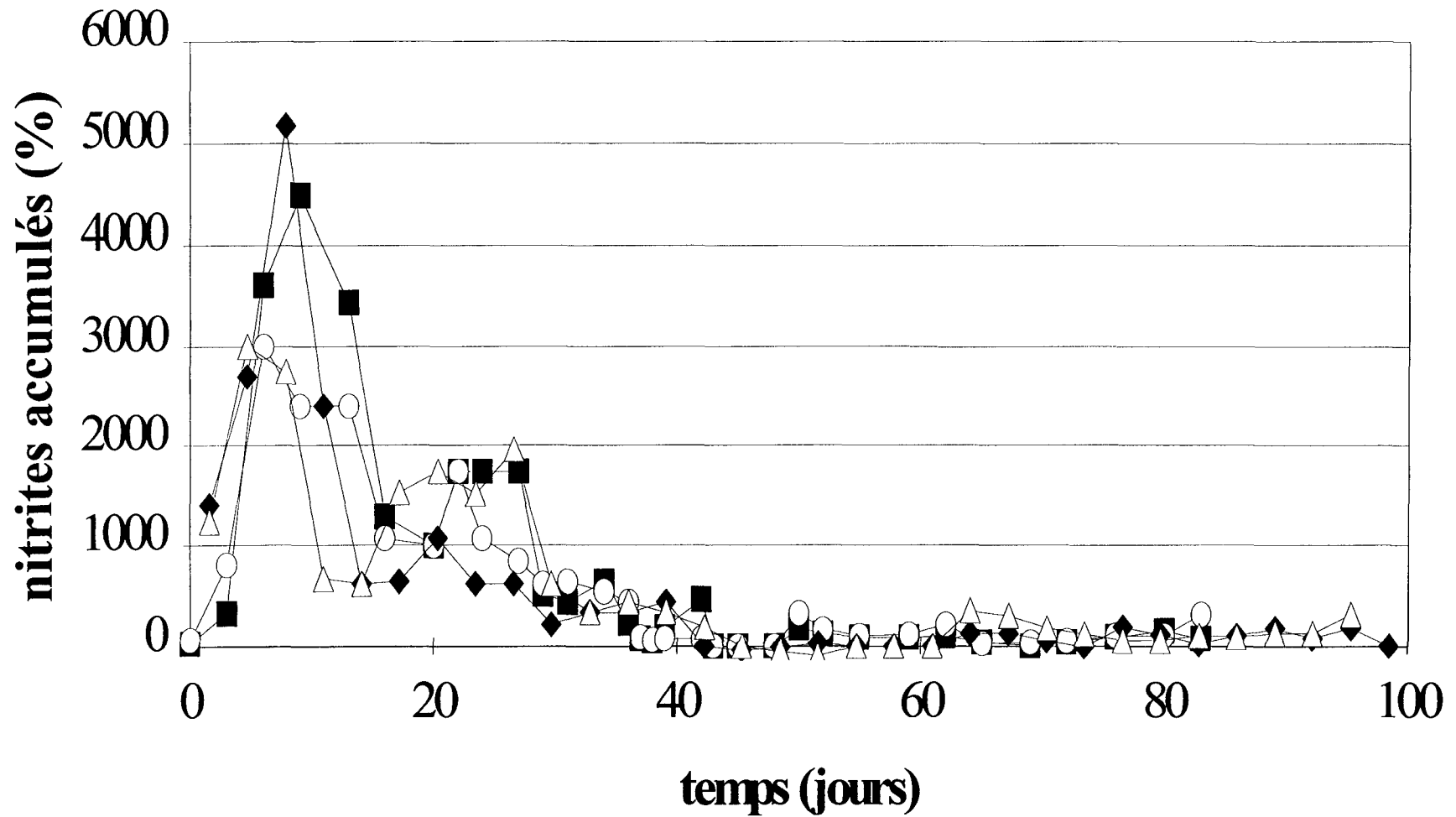


Figure 26 : Evolution du pourcentage de nitrites relargués en fonction du temps et des apports réalisés [éthanol faible (■), éthanol faible+PO₄³⁻ (◆); éthanol fort (○); éthanol fort+PO₄³⁻ (◁)]

a/ les réacteurs up-flow

Lors du démarrage des réacteurs, et par conséquent sous de faibles charges volumiques en nitrates et en ammoniacque, on note un relargage important d'ions ammonium dans les effluents (figure 27), probablement provoqué par la mise en solution d'ions fixés sur les supports minéraux.

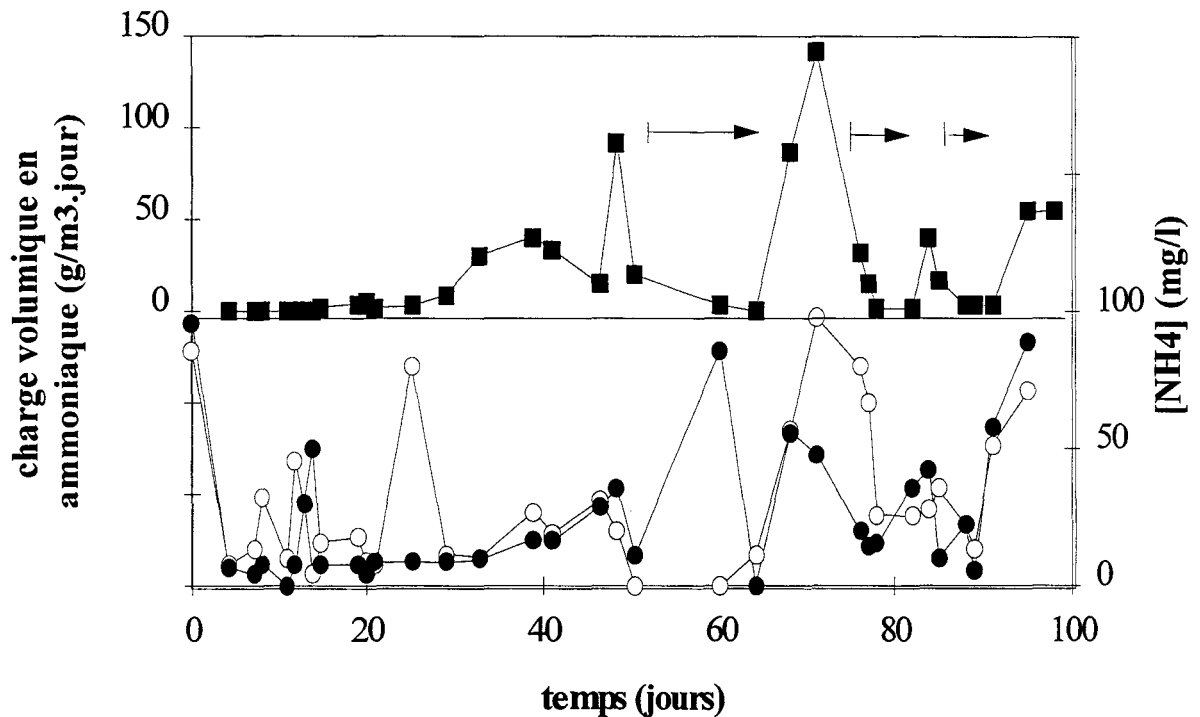


Figure 27 : Evolution de la concentration en ions ammonium dans l'effluent en fonction de la charge appliquée et de la nature du support minéral [charge volumique en ammoniacque (■) ; réacteur-puzzolane (●) ; réacteur-craie (○)].

Par la suite, on relève une assimilation de l'ammoniacque (environ 35%) en relation avec la production de la biomasse. Il apparaît ainsi que chaque augmentation de la charge en nitrates (j_0+62 , j_0+66 , j_0+77 , j_0+83) se traduit par une synthèse bactérienne plus importante et donc une consommation importante de l'ammoniacque présent. On relèvera également des modifications de la charge en ammoniacque liée à l'utilisation d'eau distillée additonnée de nitrate de potassium lors des périodes où nous ne disposons plus d'eau de la nappe. Ces périodes (j_0+50 à j_0+65 , j_0+76 à j_0+82 et j_0+85 à j_0+92) sont indiquées sur la figure 27 par la présence d'une flèche.

b/ les réacteurs horizontaux

Lors du démarrage, on remarque une élimination de l'ammoniaque (35-45%) liée à la croissance bactérienne (figure 28). La présence d'ammoniaque en concentration suffisante constitue ici un avantage certain dans la mesure où des eaux très chargées en nitrates nécessitent toujours une complémentation ammoniacale pour faire face aux exigences de croissance des micro-organismes (Neytzell et De Wilde, 1977).

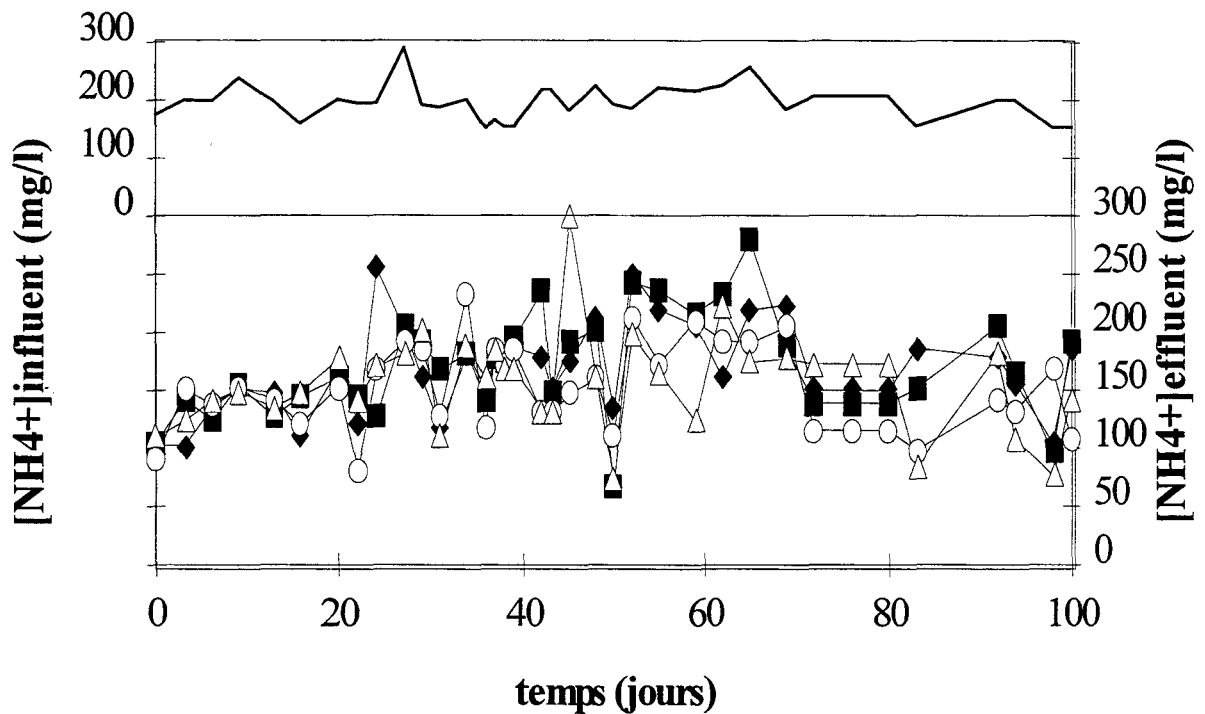


Figure 28 : Evolution de la concentration en ions ammonium dans les effluents en fonction du temps et des apports réalisés [influent (-) ; éthanol faible (■) ; éthanol faible/PO₄³⁻(◆) ; éthanol fort (○) ; éthanol fort/ PO₄³⁻ (<)]

Contrairement à ce que Adams et *al.* (1970) ont pu observer en présence de teneurs en ammoniaque très importantes, celui-ci ne constitue pas, dans notre cas, un facteur limitant la dénitrification. Dans nos conditions anoxiques, la synthèse bactérienne, et donc l'assimilation d'ammoniaque, peut être ou non couplée à la dénitrification en fonction du rapport carbone/nitrates. En présence d'un excès de substrat carboné, la fermentation se met en place

entraînant une production d'acides organiques, la synthèse de biomasse et donc une augmentation de l'assimilation de l'ammoniaque. Par contre, un apport trop faible en carbone organique s'avère insuffisant pour assurer à la fois la réduction des nitrates et la synthèse de biomasse. Cela génère une diminution de la consommation d'ammoniaque et un relargage d'ammoniaque par lyse cellulaire, la dénitrification se déroulant à partir du substrat présent. Ces phénomènes peuvent expliquer les variations d'assimilation observées sur la durée des essais. Après une période de synthèse microbienne active, l'ammoniaque n'est presque plus éliminée (10%), il est alors la principale forme minérale azotée rejetée dans les effluents.

Même après stabilisation du système, les concentrations résiduelles en ammoniaque (190 mg/l) et nitrites (60 mg/l) restent trop importantes pour envisager la mise en place d'un tel procédé sur le terrain. De plus, les concentrations en nitrates dans les effluents augmentent après une période de fonctionnement de 60 jours, indiquant une diminution de l'activité microbienne probablement liée à une déficience en micro-éléments.

2.2.3. Sur l'assimilation des phosphates

a/ les réacteurs up-flow

La concentration en phosphates est maintenue à des valeurs telles que cet ion ne soit pas un facteur limitant le métabolisme bactérien et donc la dénitrification. La présence des nitrates dans le milieu inhibe l'élimination des phosphates par voie biologique (Rabinowitz, 1985). Ceci pourrait expliquer la chute importante des rendements d'assimilation de phosphates observés après chaque augmentation de la charge en nitrates. Dans les deux réacteurs, la dénitrification est optimale lorsque la concentration en phosphates, dans l'eau d'alimentation, est supérieure à 10 mg $\text{PO}_4^{3-}/\text{l}$. Dans le réacteur-pouzzolane, l'assimilation des phosphates est plus importante aux fortes charges volumiques en nitrates (+5,36 mg $\text{PO}_4^{3-}/\text{l}$) qu'aux faibles charges (+4,67 mg $\text{PO}_4^{3-}/\text{l}$). Le phénomène inverse est observé au sein du réacteur-craie. Des phosphates sont relargués (-2,16 mg $\text{PO}_4^{3-}/\text{l}$) à forte charge volumique en nitrates mais éliminés de façon importante (+6,18 mg $\text{PO}_4^{3-}/\text{l}$) à plus faible charge. Durant le fonctionnement des réacteurs, l'assimilation des

phosphates apparaît supérieure lorsque le support est constitué par de la pouzzolane (+4,97 mg PO₄³⁻/l) que lorsqu'il est de nature crayeuse (+2,53 mg PO₄³⁻/l).

b/ les réacteurs horizontaux

L'apport de phosphates diminue la période de démarrage lorsque l'apport en éthanol ne répond qu'à la seule dénitrification (0,31g/g de nitrates à éliminer). En présence de substrat carboné en concentration plus élevée (0,45g/g de nitrates à éliminer), aucune influence positive n'est constatée. Au contraire, l'addition de phosphates entraîne souvent la présence de souches d'*Acinetobacter*, impliquées dans l'élimination biologique des phosphates mais seulement capables de réaliser la dénitrification. Ceci peut expliquer les plus fortes concentrations en nitrites résiduels relevées (respectivement égales à 63 et 71 mg NO₂⁻/l) dans les réacteurs 2 et 4 alimentés en éthanol et phosphates, comparativement à celles obtenues dans les réacteurs 1 et 3 (50 et 56 mg/l) alimentés seulement en éthanol.

Des fluctuations hebdomadaires importantes rendent difficile l'interprétation du rôle des phosphates. Leur élimination peut être mise en relation avec l'assimilation microbienne mais aussi leur précipitation, en présence d'éléments tels que le fer, le sodium ou le potassium, et leur adsorption sur la craie ou les biofilms bactériens. Ces réserves, dont l'importance est très difficile à évaluer, sont susceptibles d'être remobilisées dans des conditions et des proportions encore mal connues. Cette remobilisation pourrait être à l'origine des relargages observés.

2.2.4. Sur l'élimination du carbone organique

a/ les réacteurs up-flow

Pendant toute la phase de démarrage et de montée en charge des réacteurs, nous avons utilisé l'équation (1)^{*(1)} liant la consommation en glucose à la réduction des nitrates (1,04 g de glucose/g de nitrates à éliminer). Aucune optimisation de cette consommation n'est recherchée au

* (1) C₆H₁₂O₆ + 5,6 NO₃⁻ + 9,6 H⁺ + 4e⁻-----> 6 CO₂ + 10,8 H₂O + 2,8 N₂

cours de cette période afin de permettre un développement maximal de la biomasse. Après 2 mois de fonctionnement, en raison des faibles pourcentages d'utilisation (60%) du substrat carboné, nous avons décidé de réduire les apports en glucose jusqu'à atteindre des rendements d'élimination de la DCO soluble proches de 0,90. En effet, il est nécessaire d'optimiser à terme l'apport en carbone organique, coût principal du fonctionnement de l'installation. Ceci a également pour conséquence de mettre en compétition la flore hétérotrophe avec les bactéries dénitrifiantes autotrophes à croissance plus lente.

L'adaptation des apports en glucose (1g glucose = 1 g DCO), pour l'obtention d'un fort rendement de dénitratation, montre l'existence d'un rapport optimal dans l'influent proche de 1 g DCO/g NO_3^- , soit un apport en glucose supérieur à 1 g/g de nitrates à éliminer (figure 29). Cet apport optimal est très proche de celui déterminé grâce à l'équation (2)*⁽²⁾ liant la consommation en glucose à la réduction de nitrates associée à une synthèse microbienne.

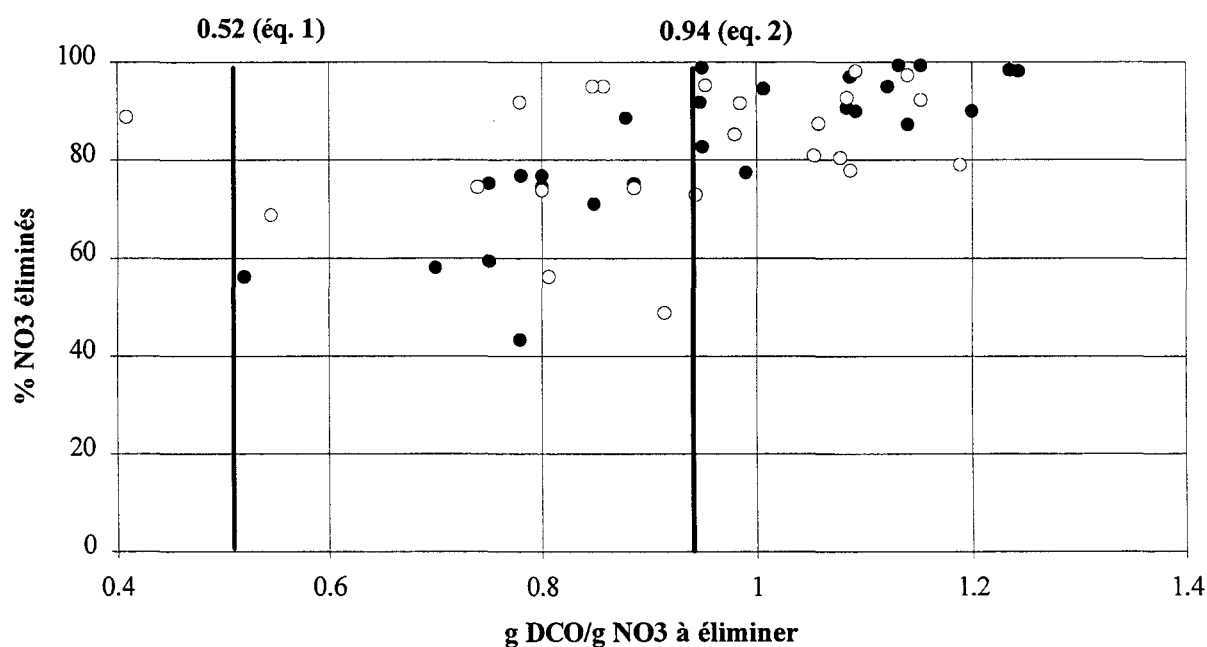


Figure 29 - Influence de l'apport en glucose (rapport g DCO/g NO_3^-) sur le taux de dénitratation [réacteur-pouzzolane (●) ; réacteur-craie (○)]
[stoéchiométrie théorique d'après l'équation (1) : 0.52 g DCO/g NO_3^- ; d'après l'équation (2) : 0.94 g DCO/g NO_3^-]⁴

* (2) $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 3,36 \text{NO}_3^- + 7,3 \text{H}^+ + 3,94 \text{e}^- \rightarrow 0,5 \text{C}_5\text{H}_7\text{NO}_2 + 3,5 \text{CO}_2 + 7,9 \text{H}_2\text{O} + 1,4 \text{N}_2$
⁴Rappel : 1 g glucose = 1g DCO

L'analyse en parallèle de la DCO soluble (85 % d'élimination en moyenne) et de la DCO totale (75 % d'élimination en moyenne), c'est-à-dire de la DCO soluble et la biomasse non retenue par le filtre, indique que les micro-organismes constituent l'essentiel de la demande chimique en oxygène totale de l'effluent (près de 90%). Le renouvellement de la biomasse dans les réacteurs se traduit par une évacuation, dans les effluents, des cellules bactériennes "mortes". La biomasse évacuée dans l'effluent peut ainsi être estimée à 30 mg/l. Ce turn-over bactérien permet de faire face à l'élimination des bactéries non fixées qui sont évacuées dans les effluents sans entraîner de diminution de l'efficacité de la dénitrification.

b/ les réacteurs horizontaux

L'apport en carbone, exprimé en Demande Chimique en oxygène (DCO) influence l'élimination des nitrates (figure 30).

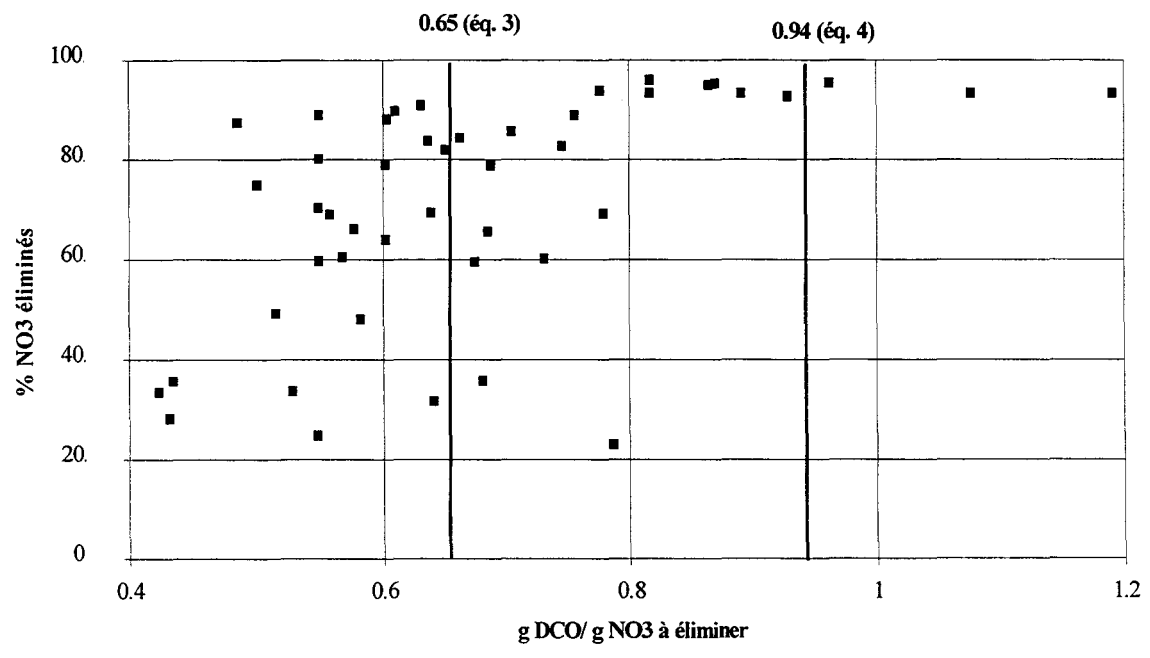


Figure 30 - Influence de l'apport en éthanol (rapport g DCO/g NO₃⁻) sur le taux de dénitrification (résultats présentés pour l'ensemble des réacteurs)
 [stoéchiométrie théorique d'après l'équation (3) : 0.65 g DCO/g NO₃⁻ ;
 d'après l'équation (4) : 0.94 g DCO/g NO₃⁻]⁵

⁵ ég. (3) $5 C_2H_5OH + 12 NO_3^- \text{ -----} > 10 HCO_3^- + 2 OH^- + 9 H_2O + 6 N_2$

Pour un rapport initial g DCO apporté/ g NO₃ à éliminer supérieur à 0,85 (soit 0,41g éthanol/ g nitrates à éliminer), on obtient un très bon pourcentage de dénitratisation qui décroît parallèlement à la diminution du rapport.

L'apport optimal de 0,41g éthanol/ g nitrates à éliminer, déterminé graphiquement, est très proche de celui calculé par Mycielski *et al.* (1983) selon la formule :

$$C_e = 2,00 N_1 + 1,28 N_2$$

(avec C_e : concentration en éthanol en g/l ; N₁ : concentration en nitrates en g N-NO₃⁻/l ; N₂ : concentration en nitrites en g N-NO₂⁻/l).

Il se classe entre ceux publiés pour des stations d'épuration : 0,7 g éthanol/g NO₃⁻ pour une efficacité de 72% selon Richard (1989) et 0,27 g éthanol/g NO₃⁻ (74% des nitrates sont alors éliminés) selon Rogalla *et al.* (1990). D'autres substrats carbonés (glucose et méthanol), comme source de carbone et d'énergie, donnent des valeurs semblables du rapport g DCO/g NO₃ (Shimizu *et al.*, 1978a, 1978b ; McCarty *et al.*, 1989). Contrairement aux observations de Rabinowitz (1985) et Bortone *et al.* (1992), nous n'avons pas relevé, dans nos réacteurs, de corrélation négative entre l'apport de substrat carboné et l'élimination des phosphates. Au contraire, l'apport de phosphates améliore l'élimination de la DCO notamment après un Temps de Séjour Hydraulique (TSH) de 1 jour (prélèvement à 50 cm en aval de l'alimentation des réacteurs) : 63 et 59% respectivement pour R₂ et R₄ contre 17 et 15% pour R₁ et R₃. Dans le cas où il n'y a pas de "complémentation" en phosphates (R₁ et R₃), l'élimination majeure du carbone organique est plus tardive : TSH entre 1 et 2 jours. Enfin, dans la mesure où les nitrates sont, dans leur grande majorité, éliminés dès le premier jour de TSH, le carbone consommé, au-delà, n'est pas utilisé pour la dénitratisation mais pour d'autres fonctions métaboliques dont l'une pourrait être la dénitrification.

L'apport optimal de 0,8 à 1 g DCO/g NO₃⁻ dans l'influent se révèle, lors des deux séries d'expériences, indépendant de la nature du substrat carboné. De plus, aucun acide gras volatil (AGV⁶) n'est détecté lors de l'analyse des effluents en chromatographie phase gazeuse. Le

éq. (4) $0,613C_2H_5OH + NO_3^- \rightarrow 0,102C_5H_7NO_2 + HCO_3^- + 0,301CO_2 + 0,902H_2O + 0,466N_2$

Rappel : 1 g d'éthanol = 2.09 g DCO

⁶acide iso-butyrique, acide iso-valérique, acide valérique, acide propionique, acide lactique.

carbone éventuellement détecté au cours des analyses en routine provient donc de la biomasse microbienne présente dans le filtrat.

2.2.5. Sur la variation du pH

a/ les réacteurs up-flow

Au cours du contrôle de pH lors du premier jour de fonctionnement des réacteurs, on relève un pH plus alcalin dans les effluents que dans l'eau d'alimentation (figure 31). Cette observation est à mettre en relation avec la présence vraisemblable d'ions adsorbés sur les supports minéraux qui sont relargués dans la phase liquide. Les faibles acidifications des effluents, constatées lors de la première semaine, correspondraient, dans cette hypothèse, à la baisse progressive de ce relargage. On note cependant que le pH des effluents reste supérieur à celui contrôlé dans l'eau d'alimentation sur cette période. Ceci est en accord avec les équations stoechiométriques (1) et (2) (§ 4.1.1) qui mettent en évidence la consommation de protons lors de la réduction des nitrates en présence de glucose.

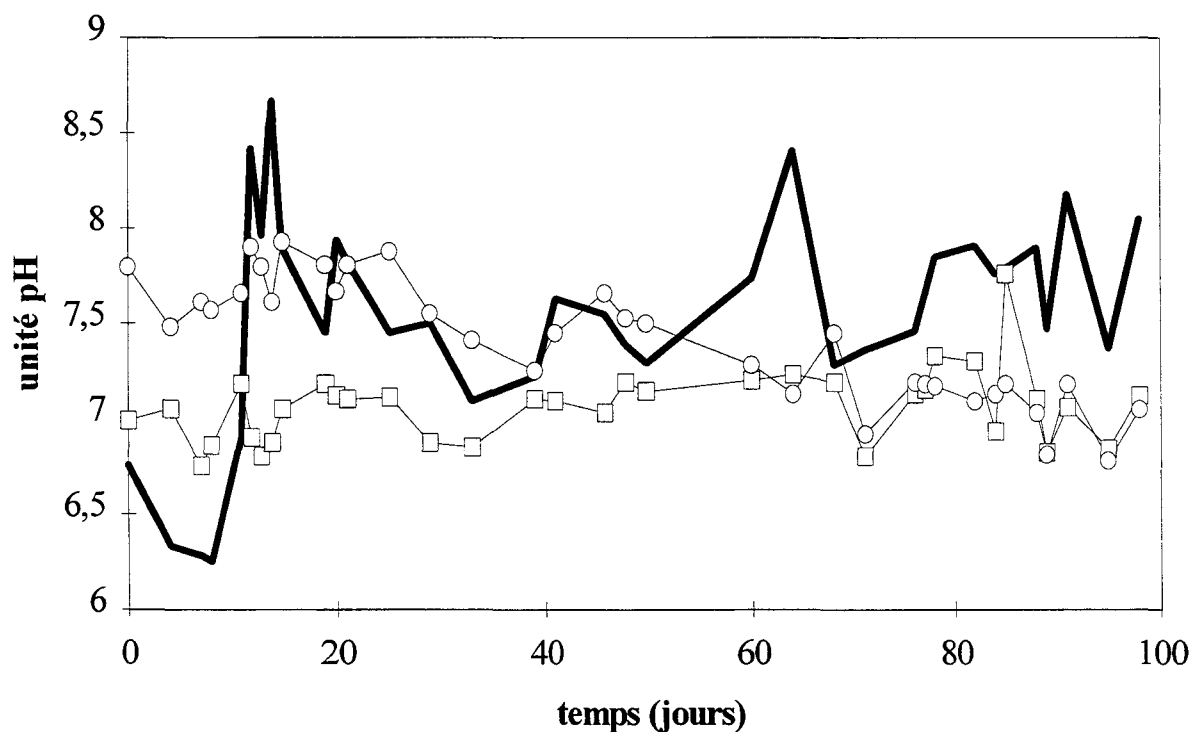


Figure 31 - Evolution du pH des effluents des réacteurs [influent (—) ; réacteur-pouzzolane (□) ; réacteur-craie (○)].

Afin de maintenir le pH de l'eau d'alimentation aux valeurs optimales pour les bactéries dénitrifiantes (entre 7,5 et 8,5), on ajoute du chlorure de sodium à l'eau d'alimentation à partir du 10ème jour. Dès lors, on constate que le pH des effluents est presque toujours inférieur à celui de l'influent. La différence de 0,5 à 1 unité pH entre l'effluent du réacteur-craie et celui du réacteur-pouzzolane, observée lors des premières semaines, diminue au cours de la période d'expérimentation pour devenir quasiment nulle.

Toute augmentation de la charge volumique au-dessus de 100 mg NO₃⁻/m³.jour se traduit par une baisse du pH plus ou moins marquée selon que l'on se situe dans le réacteur-pouzzolane ou le réacteur-craie. Le fonctionnement correct de la dénitrification nécessiterait donc l'augmentation temporaire du pH de l'eau d'alimentation lors de chaque montée en charge. Selon les équations de la dénitrification, la baisse de pH peut être attribuée à l'assimilation de l'ammoniaque par les bactéries. Ces acidifications correspondraient à des périodes de synthèse bactérienne, en présence d'oxygène moléculaire provenant de l'importante interface air-eau. Le pH constitue donc, au-delà de son rôle d'indicateur de la bonne mise en route de la dénitrification, un paramètre essentiel dans le pilotage d'une installation de longue durée.

b/ les réacteurs horizontaux

Lors de la dénitrification en présence d'éthanol, il y a réduction des formes minérales azotées et donc alcalinisation du milieu*. Dans nos réacteurs, le pH des effluents diminue dans un premier temps (relargage d'ions adsorbés sur le support crayeux, assimilation importante d'ammoniaque ?), puis augmente de une unité pH indiquant la mise en place de la dénitrification (figure 32). Par la suite, la craie joue son rôle tampon et le pH se stabilise à des valeurs proches du pH de l'eau d'alimentation (6,9-7,1).

* (3) $5 \text{ C}_2\text{H}_5\text{OH} + 12 \text{ NO}_3^- \text{ -----} \rightarrow 10 \text{ HCO}_3^- + 2 \text{ OH}^- + 9 \text{ H}_2\text{O} + 6 \text{ N}_2$

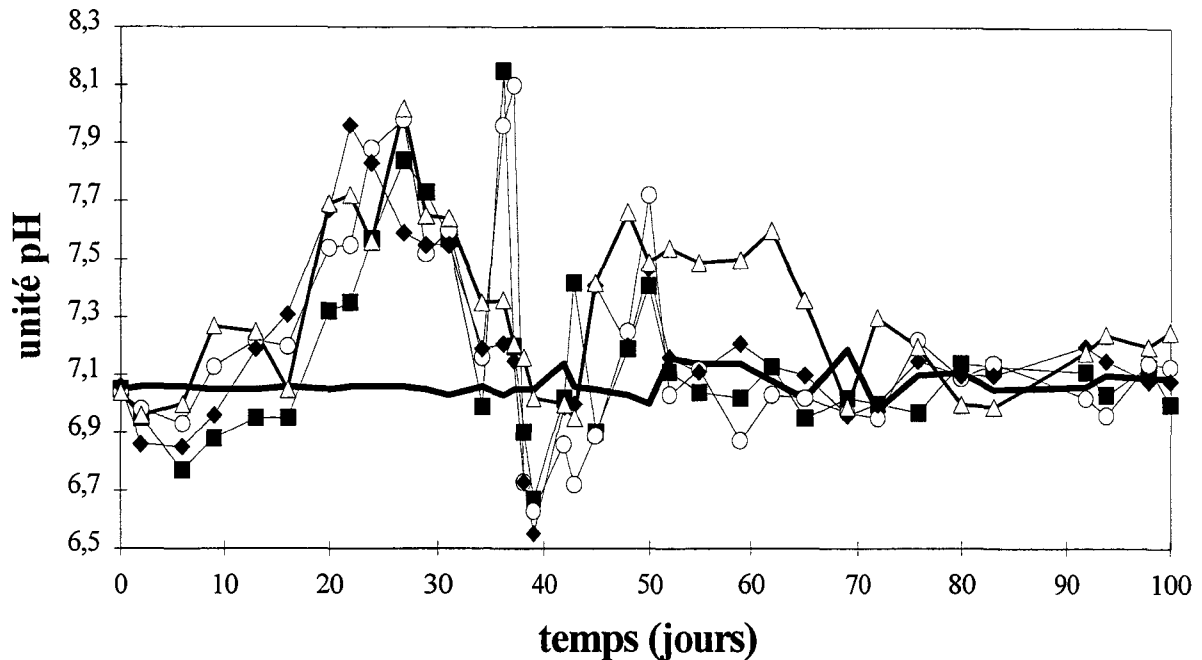


Figure 32 - Evolution du pH dans les réacteurs [influent (—) ; éthanol faible (■), éthanol faible+PO₄³⁻ (●); éthanol fort (○); éthanol fort+PO₄³⁻ (◁)]

2.3. Problème posé par l'accumulation des nitrites

L'accumulation des nitrites, produit intermédiaire de la dénitrification, constitue le problème le plus dangereux pour la santé humaine. Cette accumulation a été observée à la fois dans les bioréacteurs à biofilms fixés et dans des cultures bactériennes hétérotrophes (Vossoughi *et al.*, 1982 ; Chalupa, 1985 ; Wilderer *et al.*, 1987 ; Lazarova *et al.*, 1994) ou autotrophes (Kruithof *et al.*, 1985 ; Kurt *et al.*, 1987 ; Dries *et al.*, 1988). La nitrite réductase (NiR) constitue donc l'enzyme-clé de la dénitrification car elle catalyse la réduction des nitrites en monoxyde d'azote (Zennara *et al.*, 1993) et ainsi le départ irréversible d'azote sous forme gazeuse (Abraham *et al.*, 1993).

Les principaux facteurs responsables d'une inhibition partielle ou totale de l'activité de la NiR sont bien connus :

- ✓ présence d'oxygène (Krul et Veeningen, 1977)

- ✓ baisse du pH (Beccari *et al.*, 1983) à des valeurs très inférieures de l'optimum (pH optimum =8,5) pour la réduction des nitrites (Timmermans et Van Haute, 1983),
- ✓ nature des souches présentes (Lazarova *et al.*, 1994) : la prolifération des souches anaérobies facultatives capables de réduire les nitrates en nitrites défavorise les souches dénitrifiantes "vraies" (Germonpré *et al.*, 1991).

Dans notre étude, la fixation des micro-organismes sur un support crayeux permet la création de zones d'anoxie au sein du biofilm, et la craie tamponne le milieu. De plus, nous avons choisi un inoculum, constitué de souches indigènes, de préférence à une souche unique non adaptée aux conditions physico-chimiques de la nappe. Enfin, les expériences de Blaszczyk (1993) ont montré que l'accumulation de nitrites dans le milieu est très fortement dépendante de la composition du milieu de culture et notamment de sa teneur en oligo-éléments et vitamines. Dans les bactéries dénitrifiantes, les transporteurs d'électrons et les oxydo-réductases utilisent certains métaux comme co-facteurs. Les plus connus sont le fer, le cuivre et le molybdène (figure 33); le cobalt intervenant dans les chaînes respiratoires.

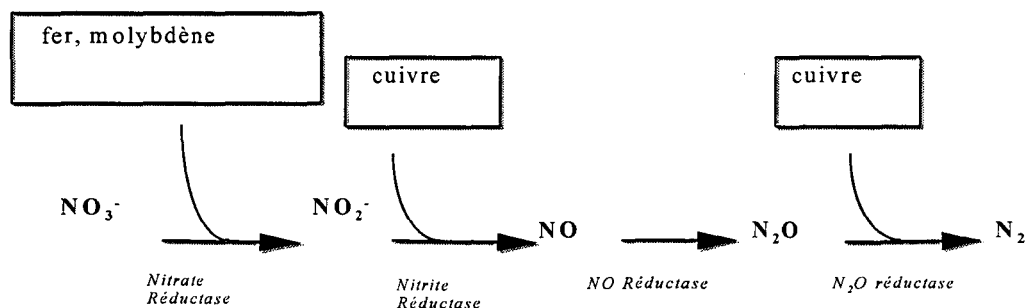


Figure 33 - Principaux sites d'action des métaux couplés aux enzymes de la dénitrification

Or, les analyses de l'eau de la nappe et de la craie utilisées (Annexe 9, tableau 1) montrent de très faibles quantités de cuivre, cobalt, molybdène et fer probablement insuffisantes pour faire face aux besoins des micro-organismes lors de la dénitrification, même dans la mesure où elles pourraient être remobilisées. Nous avons donc étudié l'effet de l'apport de ces métaux sur la dénitrification.

2.4. Influence des métaux sur la dénitrification

L'influence des métaux sur la réduction des nitrites est étudiée à l'aide des réacteurs horizontaux après 100 jours de fonctionnement. Afin de réduire les concentrations en nitrites des effluents, les métaux impliqués dans la dénitrification sont ajoutés aux apports déjà réalisés (tableau 7). Toutefois, afin de ne pas dépasser dans les effluents les limites maximales admissibles dans les eaux destinées à la consommation humaine, ces éléments métalliques sont introduits aux concentrations fixées par la Législation : 1 mg cuivre/l, 200 µg fer/l, 50 µg/l de cobalt et de Molybdène. L'analyse des effluents, après 55 jours de fonctionnement dans ces conditions, révèle des concentrations en nitrates et nitrites égales à 10 mg NO₃⁻/l et 0,05 mg NO₂⁻/l (Annexe 9, tableau 2) et donc inférieures aux valeurs maximales légales admissibles, et réduites respectivement de 40 et 75% (Figure 34).

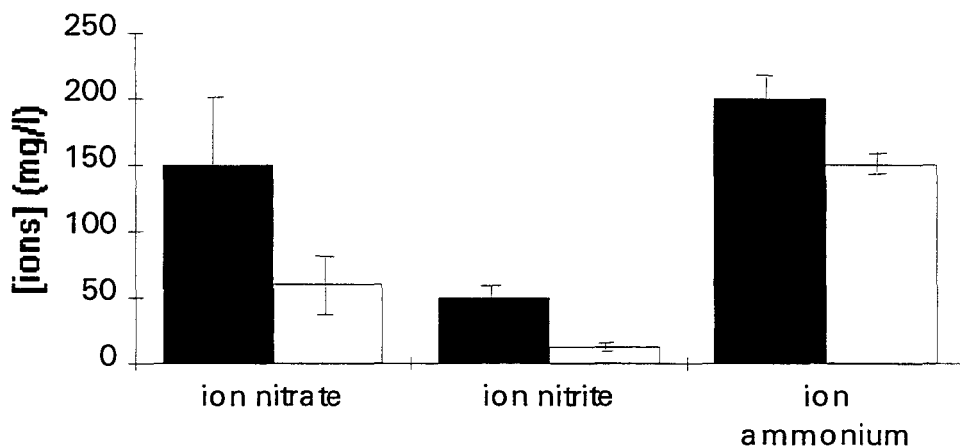
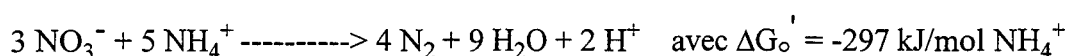


Figure 34 - Influence de la complémentation métallique sur l'élimination des formes minérales azotées (concentrations résiduelles dans les effluents avant (■) et après (□) l'addition de métaux) [N.B. : les concentrations indiquées sont celles relevées aux laboratoire par le dosage colorimétrique HACH]

Parallèlement, l'élimination de l'ammoniaque est stimulée (20%). Ces améliorations sont obtenues après une période d'adaptation de la flore aux nouvelles conditions environnementales qui se traduit par une hausse temporaire des concentrations en nitrites dans les effluents. Un autre aspect intéressant induit par la complémentation métallique est la stabilisation des résultats obtenus sur les différents réacteurs. En effet, on observe que l'écart - type, entre les périodes 3 et 4 (respectivement avant et après addition des métaux), sur les concentrations résiduelles en

nitrate passe de 116,2 à 56,7, de 5,9 à 2,2 pour les nitrites et de 16,5 à 9,9 pour les ions ammonium. L'élimination de l'ammoniaque ne s'explique pas simplement par une assimilation microbienne car la flore dénombrée n'augmente pas en présence de métaux mais tend plutôt à diminuer. L'explication la plus vraisemblable serait la nitrification aérobie induisant la production de nitrites et de nitrates. Cependant, leurs concentrations diminuent ici également. De plus, la nitrification nécessite un apport important en oxygène, ce qui est en désaccord avec la nature anaérobie du milieu. Le déficit en ions ammonium semble donc résulter de leur utilisation comme donneur d'électrons inorganique lors de la dénitrification. Cette hypothèse, avancée par Mulder *et al.* (1995) et Van de Graaf *et al.* (1991, 1990) se traduit par l'équation :



D'après cette équation, la réduction des nitrates en présence d'ions ammonium comme donneurs d'électrons entraîne une baisse du pH. La craie possédant un fort pouvoir tampon, aucune variation significative de ce paramètre n'a été observée lors des essais en réacteurs. Il n'est donc pas possible de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse.

Le dosage des métaux résiduels montre que seule la concentration en fer est ponctuellement supérieure à celle imposée par la Législation (Annexe 9, tableau 3). Lors de l'analyse des effluents par chromatographie gazeuse, on ne détecte pas d'acide gras volatil ou d'éthanol résiduel (Annexe 9, tableau 2). L'origine du carbone organique restant dans les effluents apparaît alors probablement liée à la biomasse en suspension non retenue après filtration (0,22 µm).

2.5. Développement de la microflore

Dans le cas des réacteurs up-flow, l'inoculum est constitué de bactéries issues d'une parcelle agricole recevant des engrais azotés : genres *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Enterobacter*... Par contre, les réacteurs horizontaux sont inoculés avec des bactéries choisies

parmi les souches indigènes de la nappe polluée, pour leur aptitude à croître sur milieu gélosé nitraté : *Bacillus*, *Pseudomonas*, ...

a/ les réacteurs up-flow

Les performances atteintes par ces réacteurs sont très supérieures à celle déterminée par l'équation stoechiométrique (1). Ils sont capables d'éliminer 285 g NO₃⁻/m³.jour au lieu de 32 g NO₃⁻/m³.jour théoriquement. Ceci laisse supposer l'existence d'une flore non fixée sur la roche en plus de la flore constituant les biofilms. Afin de caractériser cette flore bactérienne libre, trois dénombrements sont effectués pour chaque réacteur sur différents milieux (tableau 10).

jour	milieu PCA+glc	milieu PCA+glc+NO ₃	milieu lactosé TTC (37°C)	milieu lactosé TTC (43°C)	milieu Chapman- mannité
<i>réacteur-pouzzolane</i>					
j ₀	2,85. 10 ⁷	2,85. 10 ⁷	N.D.	N.D.	N.D.
j ₀ +86	N.D.	N.D.	1,83 10 ³	0/0,1 ml	0/0,1 ml
j ₀ +98	4,4. 10 ⁶	4,56. 10 ⁶	N.D.	N.D.	N.D.
<i>réacteur-craie</i>					
j ₀	2,85. 10 ⁷	2,85. 10 ⁷	N.D.	N.D.	N.D.
j ₀ +86	N.D.	N.D.	2,87. 10 ³	0/0,1 ml	0/0,1 ml
j ₀ +98	3,21. 10 ⁷	2,03. 10 ⁷	N.D.	N.D.	N.D.

Tableau 11 - Dénombrement de la flore libre totale dans les réacteurs up-flow (résultats exprimés en U.F.C./ml à l'exception des résultats sur milieu lactosé et Chapman-mannité (U.F.C./0,1ml)) [PCA; plate count agar ; glc, glucose ; NO₃, nitrates ; ND, non déterminé ; TTC, milieu lactosé 2-3-5 triphényl tétrazolium]

Le milieu PCA+glc permet le dénombrement de la flore dite "totale" regroupant la flore aérobie stricte ou facultative alors que le milieu PCA+glc+NO₃⁻ placé en anaérobiose autorise la

croissance des bactéries anaérobies strictes, des bactéries fermentant le glucose et celles réduisant les nitrates en absence d'oxygène.

Lors de l'ensemencement des réacteurs (j_0), le même nombre de colonies croît sur ces deux milieux car les bactéries ayant servi à la mise en place de l'inoculum ont été sélectionnées pour leur aptitude à se développer en présence de nitrates et de glucose en atmosphère non renouvelée.

Pour contrôler l'inocuité de la flore se développant dans les réacteurs, des dénombrements sur des milieux sélectifs ont été réalisés : sur milieu lactosé au triphényl tétrazolium pour les coliformes totaux à 30°C et fécaux à 43°C et sur milieu "Chapman-Mannité" pour les staphylocoques. Lors de ces analyses, aucune bactérie dite "pathogène" n'a été mise en évidence. Des bactéries coliformes ont été dénombrées mais celles-ci ne représentent qu'un pourcentage très faible de la flore totale (<0.001%).

Après 3 mois de fonctionnement (j_0+98), alors que la charge volumique en nitrates a été multipliée par un coefficient de 100, la flore libre dénombrée (3,1 à 4,4 $\cdot 10^7$ U.F.C./ml) apparaît quantitativement peu modifiée (contre 2,85 $\cdot 10^7$ U.F.C./ml à j_0). On constate que les flores sur PCA+glc en aérobiose et PCA+glc+NO₃⁻ incubées en anaérobiose restent numériquement très proches. Dans un environnement où la pression (substrat carboné, concentration en azote) est aussi forte, on peut avancer l'hypothèse que les bactéries réduisant les nitrates présentes dans les réacteurs, et en conséquence capables de croître sur milieu nitraté en anaérobiose, sont dans leur très grande majorité aérobies. Après 98 jours de fonctionnement des réacteurs en continu (j_0+98), on note une uniformisation de la flore libre cultivée se caractérisant par la prédominance très nette d'un type de colonies. La morphologie unique de ces colonies se caractérise sur les milieux gélosés par une couleur beige et une forme ronde d'un diamètre inférieur à 0,5 mm. Ces colonies représentent respectivement 84 et 100% de la flore dénombrée dans la phase liquide des réacteurs "Pouzzolane" et "Craie".

Des tests biochimiques rapides montrent que cette souche est capable de réduire les nitrates en nitrites, de fermenter le glucose et donc susceptible de produire des acides gras volatils (AGV). En produisant des AGV, les bactéries fermentatives provoquent une acidification du milieu qui peut expliquer la baisse de pH observée dans les effluents. Grâce au système API

(Analytical Profil Index), la bactérie dominante de la phase libre a été identifiée à *Klebsiella oxytoca*. Cette souche, fermentant le glucose, réduit les nitrates mais n'effectue pas la dénitrification. Les nitrites relargués dans la phase liquide servent alors d'accepteurs d'électrons pour les bactéries fixées et/ou sont éliminés dans les effluents.

b/ les réacteurs horizontaux

L'éthanol constitue un substrat potentiel pour le développement d'une flore hétérotrophe complexe avec une vitesse de croissance rapide. Dans tous les réacteurs, à l'interface air/eau, un biofilm se développe renfermant de nombreux micro-organismes filamenteux et autres organismes communément observés dans les eaux usées. Les biofilms se développent également sur les morceaux de craie (☛ §2.1.6) et des "flocs" sont présents dans les interstices.

L'évolution qualitative et/ou quantitative de la population microbienne est souvent interprétée comme indicateur de stress ou de modification du milieu (Wardle, 1992), notamment lors de changements quantitatifs ou qualitatifs du substrat carboné (Powlson *et al.*, 1987). La flore totale a donc été dénombrée dans la phase liquide aux trois distances de prélèvement prévues (Figure 35). L'apport de l'inoculum, lors du démarrage, permet d'accroître la population bactérienne de 10^3 à 10^8 U.F.C./ml . Cette concentration est en accord avec celle obtenue par Blaszczyk (1993) dans des conditions de fixation et de substrat carboné identiques. La période de croissance bactérienne (9 semaines) est plus longue que la période d'adaptation pour l'élimination des nitrates (3 semaines). Ce phénomène, déjà observé par Werber et Corseuil (1994), indique que la croissance microbienne dans les réacteurs est moins rapide que l'adaptation des systèmes enzymatiques aux conditions du milieu.

L'évolution quantitative des populations bactériennes dénitrifiantes et hétérotrophes est semblable. Elles présentent d'abord une croissance très rapide lors du démarrage (3 semaines) suivie d'une croissance plus lente (Figure 35). Ces deux phases sont en relation avec l'adaptation de la flore. A 0,5 mètre de l'apport des nutriments, elle réagit plus rapidement aux modifications chimiques du milieu. A cette distance, l'apport du substrat organique entraîne une croissance microbienne rapide.

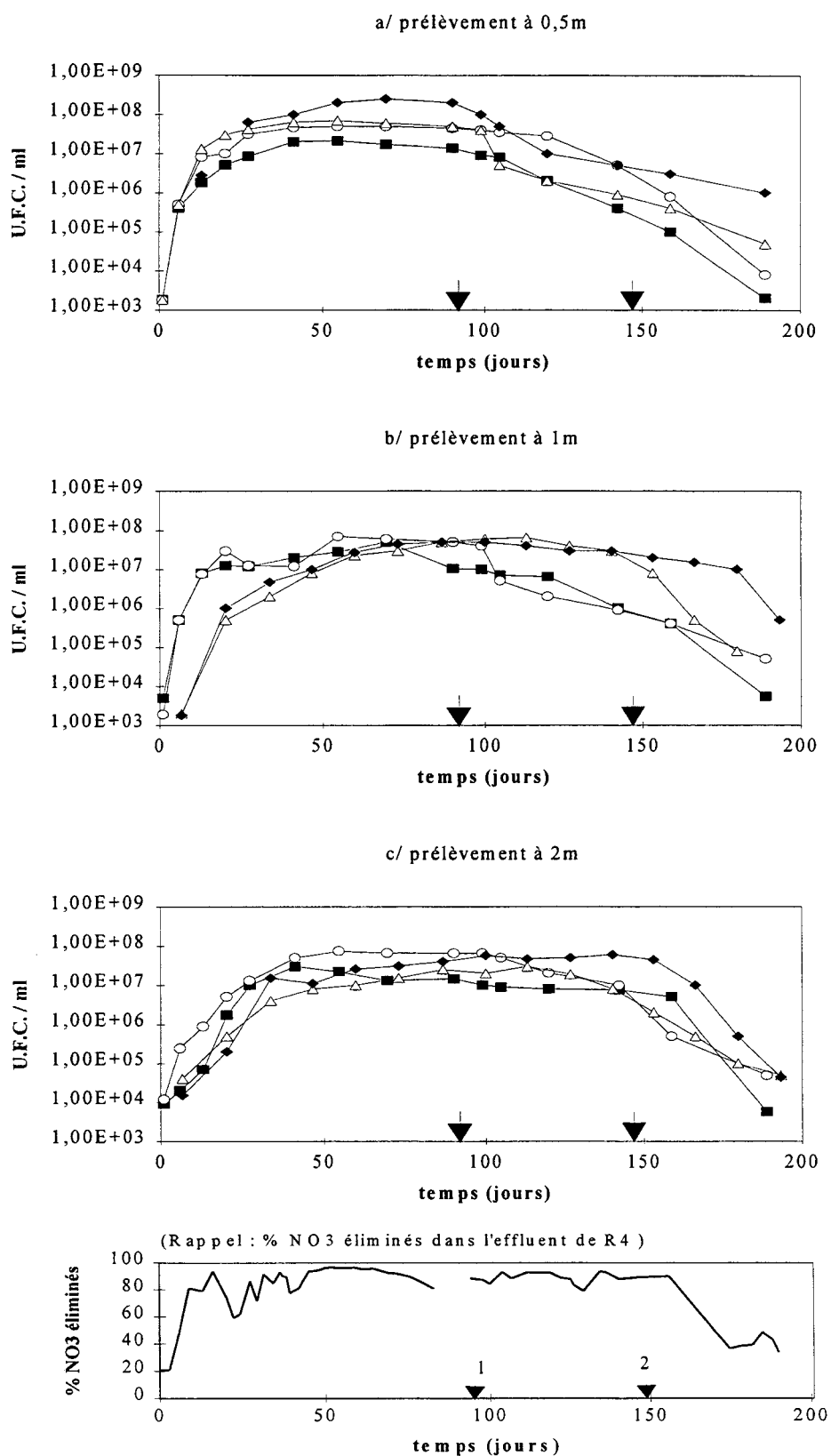


Figure 35 - Evolution de la flore libre totale dans les réacteurs en fonction de la distance de prélèvement [éthanol faible(■), éthanol faible+PO₄³⁻(●); éthanol fort(○); éthanol fort+PO₄³⁻(◊)] [(1) ajout des métaux ; (2) arrêt des apports nutritifs]

Lors des apports en métaux après 91 jours de fonctionnement (j_{0+91}), la modification du milieu provoque des arrêts de la prolifération microbienne qui sont plus marqués à 0,5 mètre qu'à 1 et 2 mètres. Cette diminution de la flore libre (de 10^8 à 10^6 U.F.C./ml) est probablement due à la toxicité de ces métaux (notamment du cuivre et du molybdène (☛ §3.3.3.)) sur les souches ne possédant pas les enzymes complexées à ces métaux. L'addition d'éléments métalliques entraîne donc vraisemblablement une plus grande spécificité de la flore vis à vis de la pollution à traiter. La très bonne performance des réacteurs horizontaux, en présence de métaux, apparaît donc davantage liée à l'activité biologique importante des souches dénitrifiantes qu'à la forte concentration en biomasse.

De la même façon, après l'arrêt définitif des apports en nutriments (j_{0+145}), la concentration bactérienne dans les eaux chute tout d'abord à 0,5 mètres puis à 1 et 2 mètres. En absence d'éthanol résiduel ou d'acide gras volatil, la biomasse présente dans les réacteurs se développe en utilisant les cellules mortes et des polyphosphates stockés (☛ § 2.1.6). Après retour aux conditions physico-chimiques de la nappe, le nombre de micro-organismes libres se stabilise autour de 10^3 à 10^4 U.F.C./ml, soit à une valeur légèrement supérieure à celle relevée dans la nappe lors de la phase d'acquisitions de données (☛ §1.2.).

Les micro-organismes isolés sont capables de croître sur milieu gélosé nitraté en anaérobie lorsque du glucose ou de l'éthanol sont ajoutés. Certaines souches ne peuvent être cultivées que sur un milieu gélosé glucosé avec ou sans nitrates ; elles peuvent donc être classées comme des micro-organismes fermentatifs stricts non dénitrifiants. Dans les réacteurs, leur croissance est rendue possible par l'accumulation de biomasse en excès et la production des métabolites secondaires. Parmi les souches dominantes, on trouve également des espèces qui réduisent les nitrates en nitrites ou effectuent la dénitrification totale. L'équilibre atteint, les *Pseudomonas sp.* constituent le genre dominant rencontré dans les effluents.

2.6. Observation des biofilms

L'observation au cours du temps des morceaux de roche montre la formation d'une couche de bactéries; leur multiplication et enfin la formation d'un biofilm atteignant plusieurs microns d'épaisseur. Cette couche se développe principalement sur les faces de la roche qui ne sont pas en contact direct avec le flux d'arrivée d'eau (face supérieure pour les réacteurs upflow et face tournée vers la sortie pour les réacteurs horizontaux). Ces faces sont en effet les plus protégées face aux turbulences. Les observations sont réalisées sur les biofilms issus des réacteurs horizontaux.

* *En microscopie électronique à balayage*¹ (planche 1)

L'observation en microscopie électronique à balayage est réalisée sur des biofilms prélevés à j_0+60 (photos (notées P₁ à 5) et j_0+150 (photos 6 et 7).

Les biofilms de 60 jours se présentent sous la forme d'une structure dense (P₁) présentant, à plus fort grossissement, des agglomérats de bactéries pédonculées (P₂) et des bacilles incurvés en chaînettes (P₄). Les agglomérats microbiens sont entourés de cristaux automorphes. On relève la présence de coccolithes (*Coccolithus Emiliana huxleyi*), corpuscules calcaires fossiles très structurés (P₃), généralement rencontrés dans les milieux marins, et de rares diatomées (P₅). Après 150 jours de fonctionnement des réacteurs, l'ensemble du biofilm apparaît emprisonné dans le réseau polysaccharidique du glycocalyx (P₆). Les individualités disparaissent dans la matrice. Les formes coccoïdales (diamètre inférieur à 2 μm), aspect dominant déjà observé par Krieg (1984) et Terasaki (1972) chez des vieilles cultures, ainsi que les batonnets droits prédominent (P₇).

* *En microscopie électronique à transmission* (planche 2)

En raison de la nature rocheuse du support, il n'est pas possible d'observer l'interface avec le biofilm. Toutefois, nous avons retrouvé les mêmes types de cellules microbiennes et d'organisations spatiales dans tous les échantillons, c'est-à-dire des colonies mixtes et des micro-colonies.

¹ Observations effectuées avec l'aide de J. BRETON (BRGM, Direction de la Recherche)

Photos 1 et 6 - Vues d'ensemble des biofilms (X 500)

Photos 2 et 7 - Agrandissements d'une portion de la photo 1 (photo 2) ou de la photo 6 (photo 7)
(X 6500)

Photo 3 - Corpuscule calcaire (X 9000)

Photo 4 - Agrandissement d'une partie de la photo 1 (X 8000). La flèche indique la présence
d'aggrégats calcaires)

Photo 5 - Diatomée (X 12000)

Planche 1 - Observation des films mixtes de dénitrification en microscopie électronique à balayage. Les échantillons sont préparés selon la méthode à la glutaraldéhyde et tétraoxyde d'osmium (Ryter et Kellenberger, 1958) (Les barres représentent 10 μ m pour les photos 1 et 6, et 1 μ m pour les autres)

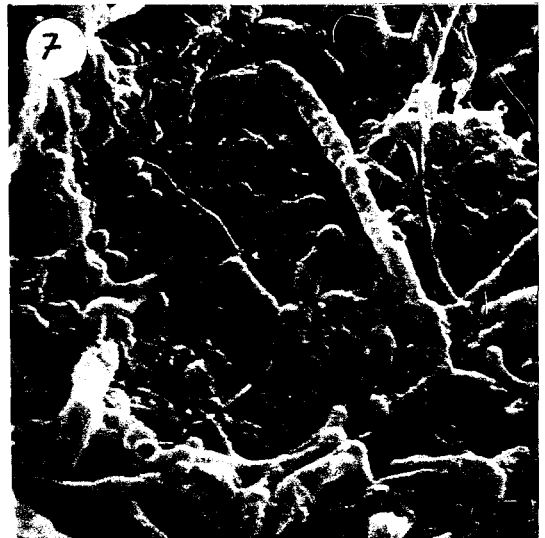
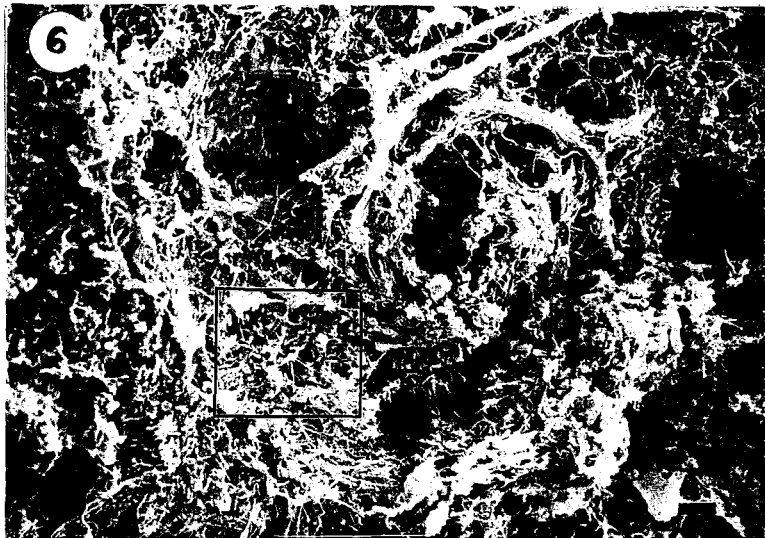
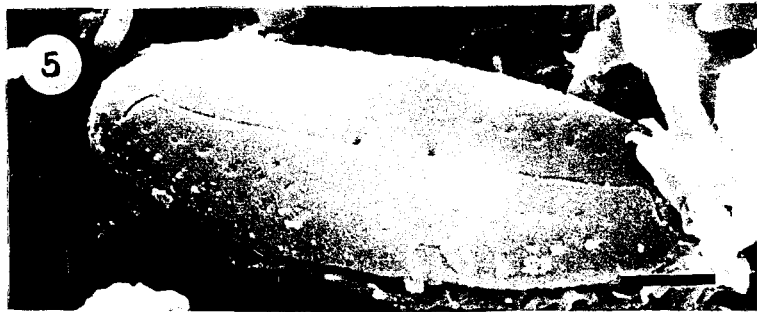
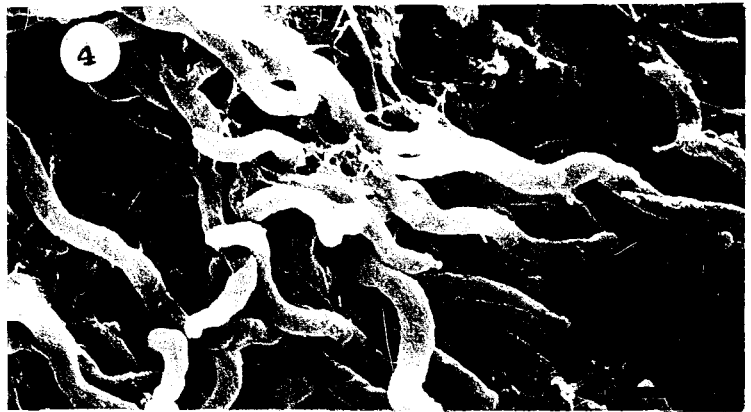
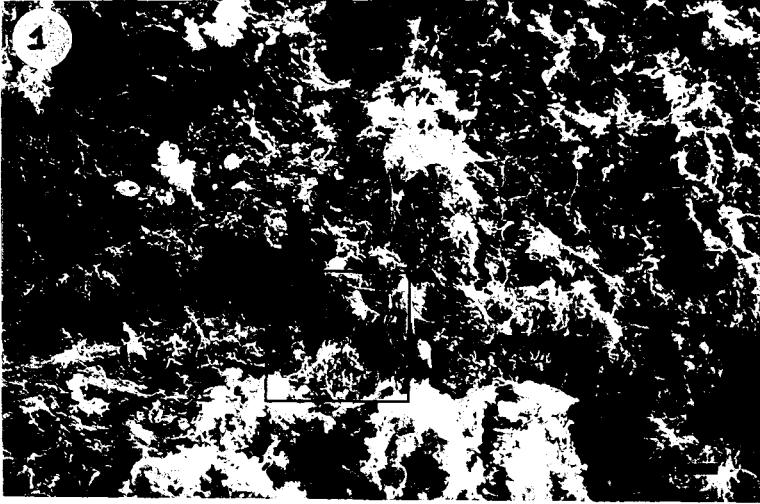


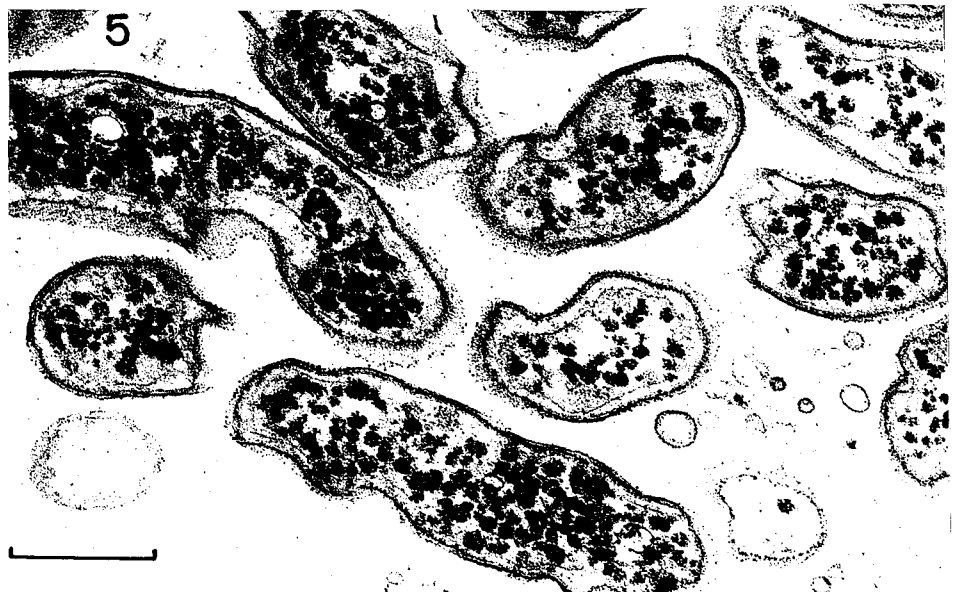
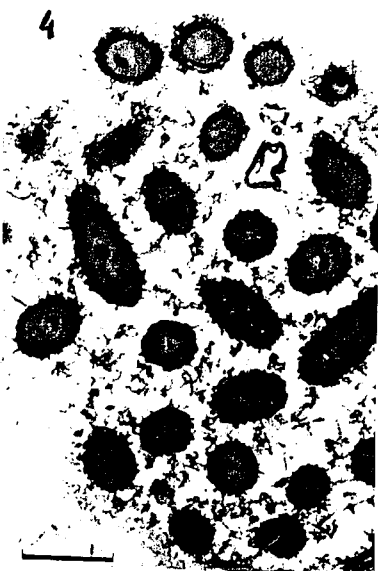
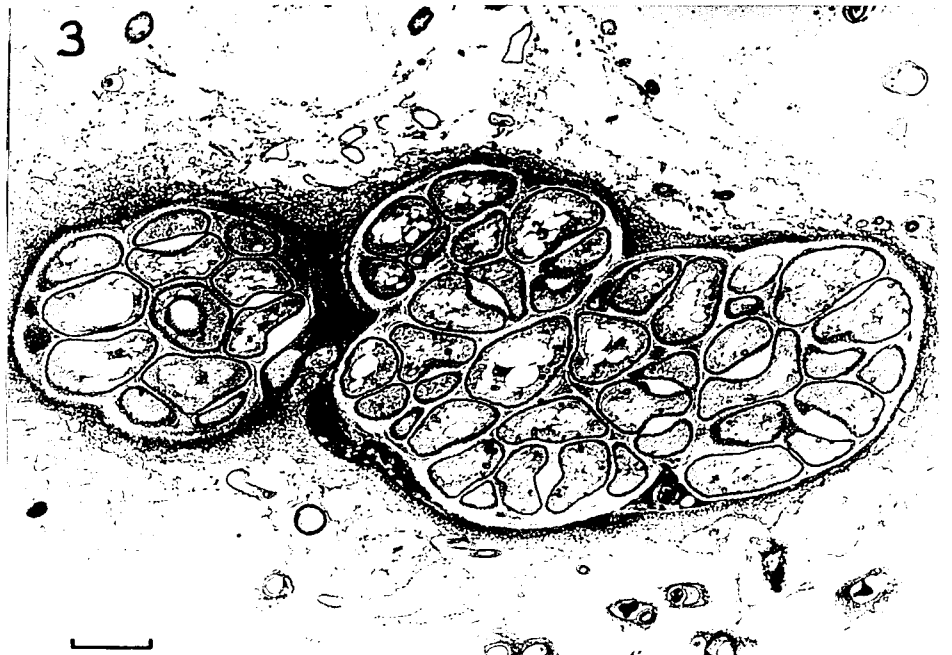
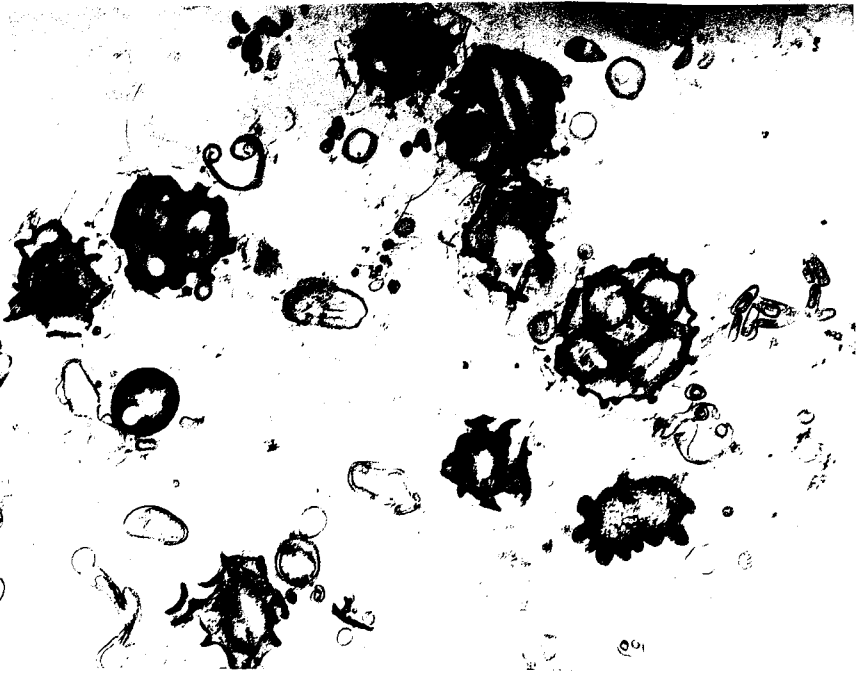
Photo 1 - Biofilm mixte

Photo 2 - Aggrandissement d'une partie de la photo 1 (la flèche indique la présence probable de virus)

Photos 3 et 4 - Microcolonies constituées de cellules bactériennes à Gram négatif entourées par une gangue plus ou moins dense aux électrons et à structure fibrillaire vers la périphérie

Photo 5 - Mise en évidence des polyosides intracytoplasmiques par la réaction de Thiéry. La durée d'action du TCH est d'environ 30 minutes

Planche 2 - Observation des microcolonies bactériennes en microscopie électronique à transmission. Les échantillons sont contrastés selon la méthode de Reynolds (photos 1 à 4) ou de Thiéry (photo 5)



Les ensembles mixtes sont constitués de divers micro-organismes répartis à priori de façon non structurée. De très nombreuses cellules présentent des structures déformées et on observe également en grande quantité des résidus membranaires plus ou moins enroulés (photo P₁). Ils peuvent résulter d'artefacts de préparation des échantillons. Les bactéries à Gram négatif sont facilement reconnaissables par leurs enveloppes cellulaires caractéristiques de ces bactéries. Les biofilms comprennent également des cellules eucaryotes. On retrouve au sein des co-cultures mixtes des morphologies bactériennes inhabituelles, très comparables à celles décrites par Bystricky (1970). Les bacilles (1,2 X 0,5 µm) portent à leur périphérie des granules de 0,1 µm de diamètre, régulièrement rangés pour former une structure apparemment hélicoïdale (P₂). Des virus, caractérisés par la symétrie cubique de leur capsid, sont présents. Il n'est pas exclu que ceux-ci trouvent, dans l'eau, la possibilité de se multiplier et contribuent à la clarification de l'eau en lysant les micro-organismes saprophytes (Paoletti, 1983).

Les micro-colonies renferment des cellules de morphologies identiques (P₃, P₄) et sont enrobées dans une capsule commune, ou glycocalyx, constituée de polysaccharides extracellulaires abondants. Cette gangue homogène devient fibrillaire en périphérie. La méthode de contraste de Thiéry permet de distinguer deux types de micro-colonies :

- ✓ d'une part, les micro-colonies comportant un fort dépôt d'argent, en particulier dans les interstices entre les bactéries indiquant la présence de polysaccharides extracellulaires (P₃) qui peuvent protéger les cellules de leur environnement immédiat,
- ✓ d'autre part, des micro-colonies qui sont presque totalement dépourvues d'exopolysaccharides. Toutefois, des polysides intracytoplasmiques (inclusions de glycogène ?) peuvent être mis en évidence. Dans un premier temps, des exopolysaccharides de faible poids moléculaire sont synthétisés et excrétés en réponse à la présence d'un support minéral (P₅) (Allison et Sutherland, 1987). Par la suite, des polymères de haut poids moléculaire sont formés lorsque la colonie se stabilise. La production de ces exo-polysaccharides par différentes bactéries entraîne la formation d'une gangue dont les caractéristiques de géification et de viscosité sont

hétérogènes. Ceci explique l'observation de zones plus ou moins denses aux électrons.

L'action d'un micro-organisme dénitrifiant ne peut être significative que dans la mesure où il demeure assez longtemps dans sa niche écologique. La colonisation du support résulte de la multiplication des cellules, qui engendre des micro-colonies et forme des polymères extracellulaires en quantité importante. Les interactions entre les micro-organismes des biofilms restent peu connus bien que ceux-ci soient étudiés depuis plus de 60 ans (Zobell, 1943). De plus, la plupart des travaux réalisés dans ce domaine concernent des biofilms monomicrobiens rendant ainsi difficile l'explication du rôle de

la complémentarité métabolique entre des populations. Le rôle de la matrice polysaccharidique est primordial pour l'efficacité du biofilm, par la création d'une micro-zone au sein de laquelle la dispersion et la dilution des molécules sont limitées. Cette zone agit comme un piège concentrant les nutriments. Ellwood *et al.* (1982) avancent l'hypothèse que les protons relargués au cours du métabolisme diffusent lentement au sein des biofilms, augmentent ainsi le gradient de pH et influencent donc la production d'ATP. Dans nos réacteurs à flux continu, le système dynamique transporte l'eau et les micro-organismes par une combinaison de mécanismes passifs et actifs. La sécrétion de la couche mucoïdale de surface revêt donc un aspect fondamental en augmentant les capacités d'adhésion des cellules sur les supports.

Les définitions du biofilm (McFeters *et al.*, 1984 ; Allison *et Sutherland*, 1987 ; Characklis, 1989) ne prennent pas en compte les changements physiologiques, qui apparaissent chez les micro-organismes, dès que l'adhésion est réalisée. Cette fixation est-elle la cause d'une modification d'activité ou sa conséquence ? On considère que c'est parce qu'elles sont fixées que les bactéries deviennent plus actives. Les biofilms de dénitrification observés sont métaboliquement actifs. Outre la division cellulaire, on observe une variation de taille des cellules et la présence d'une large quantité de matériel de réserve. Ces inclusions cytoplasmiques de PHB et la nature souvent extensive de la glycocalyx sont autant d'indicateurs d'un métabolisme carboné intensif.

Les méthodes de dénombrement des micro-organismes dans les biofilms sont très approximatives. Aussi, l'étude de la flore libre apporte quelques indications quant à la quantité et la qualité des bactéries présentes dans les biofilms. Les cellules bactériennes, présentes dans la phase libre, sont généralement des "cellules-filles" beaucoup plus hydrophiles que leurs "cellules-mères" retenues dans le biofilm (Marshall, 1992 ; Carpentier et Cerf, 1993). La composition bactériologique des effluents de nos réacteurs peut donc être considérée comme un indicateur de la diversité microbienne des biofilms (Liessens et al., 1993).

2.7. Conclusion

Les expériences menées en réacteurs de laboratoire ont permis de déterminer les avantages et les limites de chaque type de réacteur, en relation avec la mise en place future d'un pilote de dénitrification *in situ* (tableau 12).

réacteurs	avantages	limites
à flux ascendant ("up-flow")	<ul style="list-style-type: none"> ✓ très bonne réduction des nitrates à forte charge (>90%) ✓ bonne répartition du substrat carboné ✓ pouvoir tampon de la craie 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ mauvaise simulation du déplacement de la nappe ✓ fortes concentrations en nitrites et ammoniacque dans les effluents
à flux horizontal	<ul style="list-style-type: none"> ✓ très bonne élimination des nitrates (~ 90%) ✓ simulation proche des conditions rencontrées sur le site ✓ pouvoir tampon de la craie 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ mauvaise estimation des risques liés au colmatage en raison d'une porosité supérieure à celle de la nappe ✓ accumulation de nitrites et ammoniacque en sortie

Tableau 12 - Avantages et limites liés à la conception des réacteurs de laboratoire

L'addition d'une source de carbone organique, et éventuellement de phosphates, permet de réduire de façon importante la quantité de nitrates dans l'eau. Cependant, à fortes charges en nitrates, un déséquilibre apparaît et entraîne un relargage de nitrites dans les effluents. En effet, c'est au-dessous d'une concentration-seuil en nitrates (fixée à 600 mg NO₃⁻/l par Martin (1979),

à 880 mg/l par George et Antoine (1982) ou à 960 mg/l par Vossoughi (1981)) que la dénitrification est plus rapide que la dénitratisation. Dans nos conditions de travail, les micro-organismes sont soumis à des concentrations en nitrates telles que tout déséquilibre nutritif entraîne un dysfonctionnement métabolique, caractérisé par l'apparition de nitrites. De plus, la carence en métaux couplés aux enzymes catalysant la dénitrification (Fer, cuivre, cobalt, molybdène) diminue les rendements d'élimination des nitrates (40 %), des nitrites (75 %) et de l'ammoniaque (20 %) lorsque les charges volumiques azotées sont élevées. Toutefois, l'addition de fer et de cuivre peut également réduire chimiquement les nitrates en milieu alcalin.

Par ailleurs, en ce qui concerne la dénitrification biologique *in situ*, la température constituera un paramètre de biodégradation en influençant la vitesse de réduction, l'adaptation des souches inoculées et l'équilibre entre les composantes de la population bactérienne. A la température moyenne de 15°C de la nappe, dans les zones fortement polluées (☛ figure 11), la mise en place de la dénitrification peut être estimée graphiquement à 17 jours (☛ figure 9) ($\text{vitesse}_{(15^\circ\text{C})}/\text{vitesse}_{(20^\circ\text{C})} \sim 1,7$) si des phosphates et de l'éthanol sont apportés en quantité satisfaisante.

3. DENITRIFICATION DE HAUTES TENEURS EN NITRATES PAR DES SOUCHES PURES

En vue de mettre en place un inoculum adapté destiné au réacteur *in situ*, nous avons étudié la dénitrification en milieu agité des souches dominantes isolées lors des expériences précédentes et l'influence quantitative des apports métalliques sur la dénitrification.

3.1. Description des souches étudiées

3.1.1. Sélection des souches

Sept types de colonies ont été sélectionnés parmi la flore libre des réacteurs horizontaux pour leur aptitude à croître sur un milieu gélosé nitraté. Les colonies sont translucides, blanches,

crèmes ou jaunes, convexes ou plates. Leur périphérie peut être plus claire. Leur taille varie entre 0,5 et 5 mm. La réalisation des tests rapides de caractérisation primaire et des galeries API 20NE (☛ §1.3.) a permis d'identifier six souches (Tableau 13) : *Alcaligenes denitrificans*, *A. faecalis*, *Pseudomonas stutzeri*, *P. vesicularis* et *Flavobacterium breve*. Une souche (H) ne peut être identifiée de façon satisfaisante.

Après plusieurs mois de conservation des souches à -20°C et à +3°C, seuls *Alcaligenes denitrificans* et la souche H restent viables et capables de réduire les nitrates.

3.1.2. la souche H et *Alcaligenes denitrificans*

* **la souche H.** Isolées sur gélose nitrée, en anaérobiose, les colonies rosées ont ensuite perdu leur pigmentation après plusieurs repiquages et apparaissent beiges. Les bactéries sont des bacilles à Gram négatif de petite taille, faiblement mobiles. La culture sur milieu nutritif ordinaire est abondante en 24 heures. Oxydase et catalase sont positives. Le type respiratoire est aérobie strict. Les nitrates sont réduits en azote. Outre, les caractères relevés précédemment (tableau 13), l'étude du métabolisme carboné (tableau 14) indique que la souche H ne pousse qu'en présence d'un faible nombre de composés carbonés comme seule source de carbone et d'énergie. Ces résultats ne permettant pas de préciser l'identité de cette souche parmi les bacilles à Gram négatif non fermentatifs, nous avons utilisé d'autres techniques. L'analyse des acides gras membranaires de la souche H en chromatographie phase gazeuse (CPG)¹ (figure 33) montre l'abondance des acides gras 16:0, 16:1, 18:0, 18:1 (89,28 % de la surface totale) avec une prédominance des acides gras à 18 atomes de carbone insaturés (70,77% des acides gras extraits). Ces acides gras, souvent les plus abondants présents dans les profils, sont connus pour être les principaux constituants de la membrane interne des bactéries à Gram négatif (Ratledge et Wilkinson, 1988).

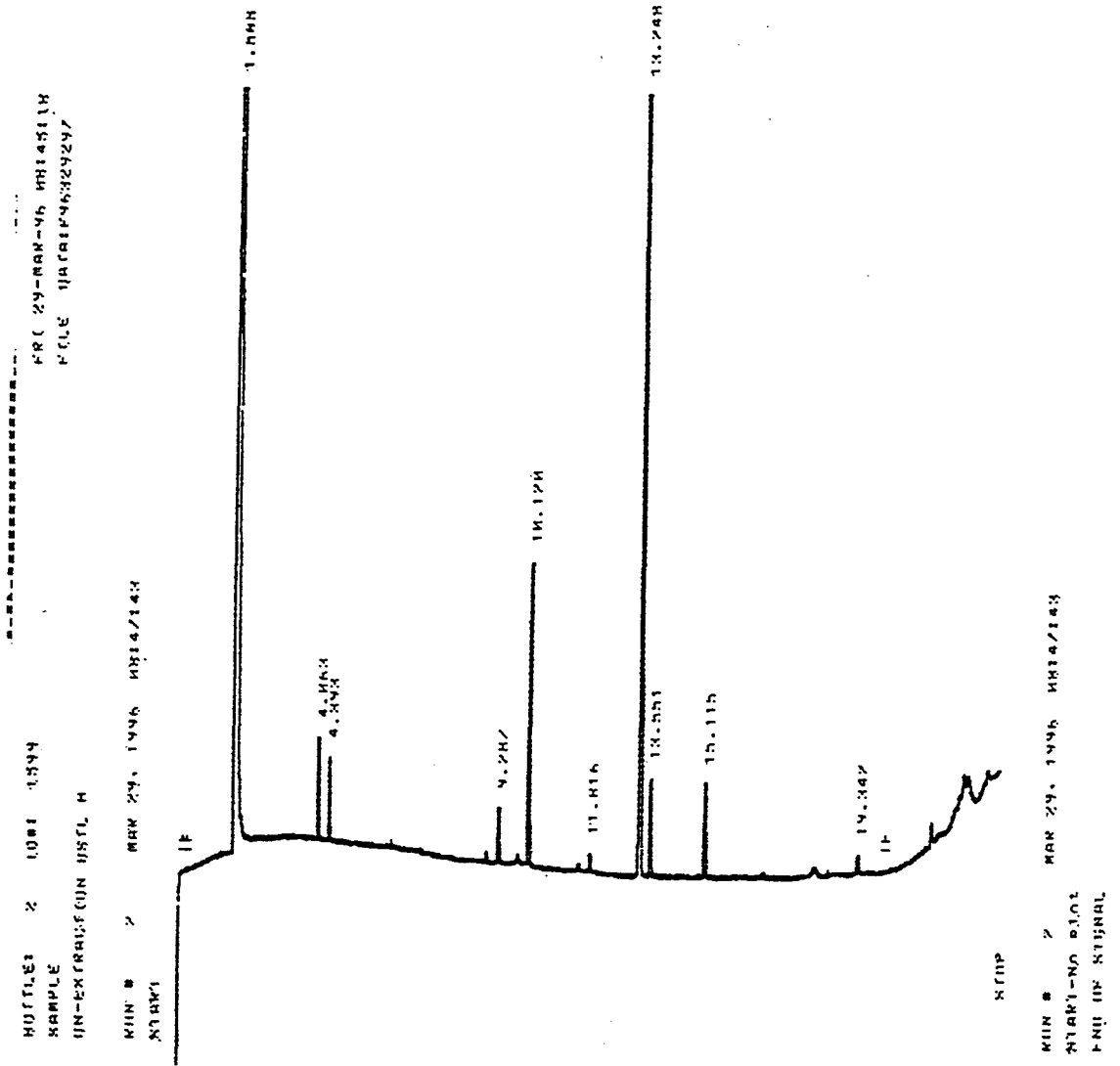
¹ Ces analyses ont été réalisées au sein du SERHMA de l'Institut Pasteur de Lille par Mesdemoiselles Rudnik et Majchrzak.

Description de la souche	forme	coloration de Gram	test oxydase	mobilité	type respiratoire	Kligler	Profils API 20NE	Identification
jaune - brun	bacille	négatif	positif	immobile	aérobie strict	Lactose négatif glucose négatif H ₂ S négatif gaz négatif	24 heures 0041205 48 heures 0041205	<i>Flavobacterium breve</i> (20,8%)
brun - orangé	bacille	négatif	positif	mobile	aérobie strict	Lactose négatif glucose négatif H ₂ S négatif gaz négatif	24 heures 0000455 48 heures 0000457	<i>Alcaligenes faecalis</i> (90,3%)
grisâtre	bacille	négatif	positif	mobile	aérobie strict	Lactose négatif glucose négatif H ₂ S négatif gaz négatif	24 heures 1040255 48 heures 1040255	<i>Pseudomonas stutzeri</i> (99,2%)
non pigmentée	bacille	négatif	positif	mobile	aérobie strict	Lactose négatif glucose négatif H ₂ S négatif gaz négatif	24 heures 0400004 48 heures 0404204	<i>Pseudomonas vesicularis</i> (97,5%)
crème	bacille	négatif	positif	mobile	aérobie strict	Lactose négatif glucose négatif H ₂ S négatif gaz négatif	24 heures 1000455 48 heures 1000457	<i>Alcaligenes denitrificans</i> (40 %)
crème-rosé	bacille	négatif	positif	mobile	aérobie strict	Lactose négatif glucose négatif H ₂ S négatif gaz négatif	24 heures 1005566 48 heures 1005566	identification non satisfaisante

Tableau 13 - Caractérisation de la flore libre des réacteurs horizontaux

source de carbone	croissance bactérienne		source de carbone	croissance bactérienne		source de carbone	croissance bactérienne	
	oui	non		oui	non		oui	non
érythriol		X	α methyl-D-glucoside		X	mélibiose		X
D-xylose		X	β methyl-D-mannoside		X	saccharose		X
glycérol		X	cellobiose		X	inuline		X
D-arabinose		X	dulcitol		X	D-raffinose		X
L-arabinose	X		inositol	X		amidon		X
adonitol	X		L-sorbose		X	glycogène		X
ribose		X	lactose		X	xylitol	X	
D-mannose		X	maltose		X	D-fucose	X	
D-fructose	X		mannitol	X		L-fucose		X
2 céto-gluconate		X	citrate		X	trehalose		X
galactose	X		N acétyl glucosamine		X	D-arabitol	X	
B Methyl-xyloside		X	rhamnose		X	L-arabitol	X	
D-glucose		X	sorbitol	X		gluconate		X

Tableau 14 - Etude du métabolisme carboné de la souche *H*



ID: 1599 Un-Extraction USTL H Date of run: 29-MAR-95 08:47:43
 Bottle: 2 SAMPLE [AEROBE]

RT	Area	Br/Nt	Respon	ECL	Name	X	Comment 1	Comment 2
1.608	351845376	0.032	...	7.034	SOLVENT PEAK	...	< min rt	
4.073	3256	0.032	1.047	11.429	10:0 30H	3.03	ECL deviates	0.006
4.404	2768	0.033	1.033	11.805	unknown 11.798	2.55	ECL deviates	0.007
9.298	2784	0.046	0.964	15.490	Sum In Feature 3	2.39	ECL deviates	0.000 14:0 30H/16:1 ISO I
10.129	14072	0.044	0.960	16.001	16:0	12.03	ECL deviates	0.001 Reference -0.004
11.829	1000	0.050	0.956	17.000	17:0	0.85	ECL deviates	0.000 Reference -0.005
13.258	83368	0.047	0.954	17.823	Sum In Feature 7	70.77	ECL deviates	0.001 18:1 w7c/w9t/w12t
13.562	4816	0.048	0.953	17.998	18:0	4.09	ECL deviates	-0.002 Reference -0.006
15.125	5872	0.050	0.950	18.901	19:0 CYCLO wbc	4.29	ECL deviates	0.001 Reference -0.003
19.355	960	0.053	...	21.369	> max rt	
*****	2784	SUMMED FEATURE 3	2.39	12:0 BLUE 7	unknown 10.928
*****	16:1 ISO I/14:0 30H	14:0 30H/16:1 ISO I
*****	83368	SUMMED FEATURE 7	70.77	18:1 w7c/w9t/w12t	18:1 w9c/w12t/w7c
*****	18:1 w12t/w9t/w7c	

Solvent	Br	Total Area	Named Area	% Named	Total Amt	Nbr Ref	ECL Deviation	Ref ECL Shift
351845376		117136	117136	100.00	112336	4	0.003	0.005

ISBR [Rev 3.00]	Methylobacterium	0.165 (48h, Pseudomonas mesophilica)
	M. mesophilicum*	0.165 (48h, Pseudomonas mesophilica)
	Glucobacter	0.151
	G. asaii*	0.151
	Phyllobacterium	0.101

Figure 36- Chromatographe en phase gazeuse des acides gras membranaires de la souche *H*

L'étude en microscopie électronique a confirmé la présence de petits bacilles dont les enveloppes sont caractéristiques des bactéries à Gram négatif (Planche 3, P₁, P₂). Mais surtout, on remarque la présence de structures similaires aux "cysts" formés par *Azotobacter sp.* ("*Azotobacter-type cyst*") (P₁ et P₂) et observées par Whittenbury *et al.* chez les bactéries méthylophiles (1970). Ces structures apparaissent à un pôle de la cellule bactérienne (P₁). On voit clairement sur la photo 2 la continuité de la membrane externe entre le corps bactérien et le "cyst". Sur la photo 1, certaines cellules semblant posséder une enveloppe lamellaire pourraient être ces "cysts" libres. Ces formes de survie, qui pourraient être la conséquence de l'absence d'oxygène dans le milieu de croissance (Whittenbury *et al.*, 1970), sont caractéristiques de la famille des *Methylococcaceae* (Whittenbury et Krieg, 1984). Toutefois, la taxonomie et la nomenclature peu précises de ces bactéries rendent difficiles l'affiliation certaine de cette souche à une espèce (Jenkins *et al.*, 1897).

Nos connaissances actuelles de la souche *H* limitent notre diagnostic à la présomption de *Methylobacterium sp.* (Holt *et al.*, 1994). Par ailleurs, la réduction des nitrates en azote gazeux est une propriété métabolique qui semble différencier la souche *H* des souches actuellement rattachées au genre *Methylobacterium*. Pour ces raisons, nous garderons la lettre *H* pour définir cette souche lors des expériences ultérieures.

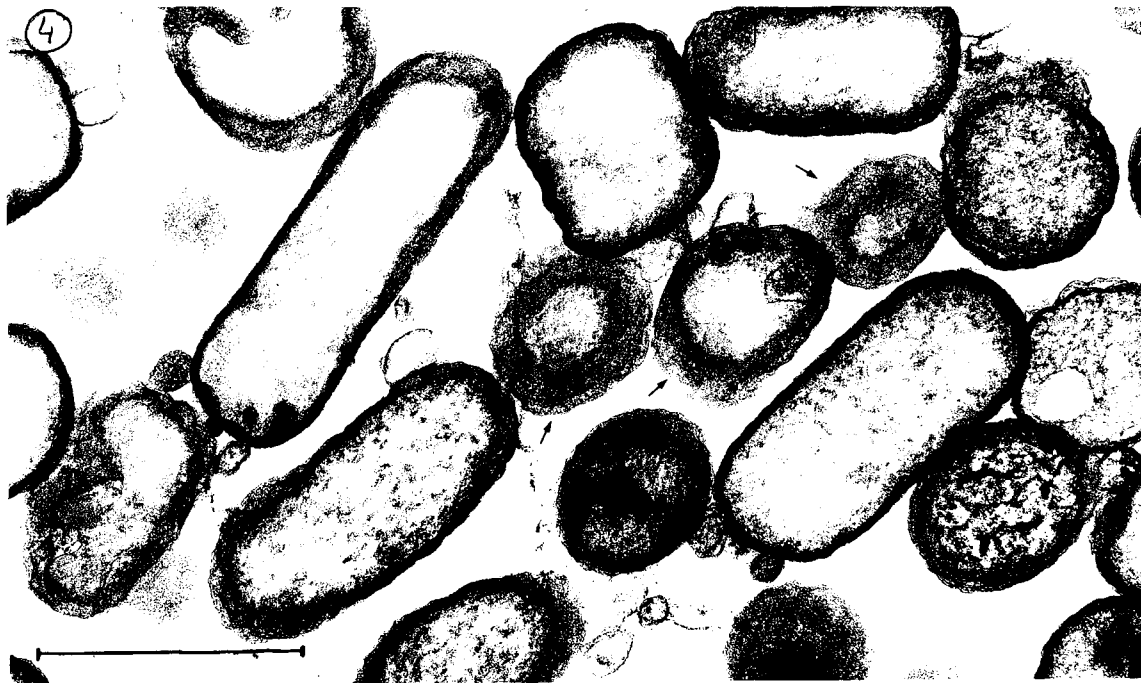
* *Alcaligenes denitrificans*. Cette souche a été bien identifiée grâce aux méthodes classiques de bactériologie (tableau 13). L'observation en microscopie électronique à transmission d'*Alcaligenes denitrificans* (Planche 3, P₃₋₄) révèle des cellules de petite taille (0,4-2,7 µm X 0,4-0,5 µm). Des polysaccharides sont présents à la surface des cellules sous la forme de pelotes qui peuvent résulter des traitements de fixation et de déshydratation des échantillons. La photo 4 met en évidence l'existence des réserves intracellulaires assimilables à des polyhydroxybutyrates ou des polyphosphates.

Photo 1 - Vue générale de la souche *H*. (la flèche indique la présence probable de "cysts" libres possédant une enveloppe lamellaire)

Photo 2 - Mise en évidence de la continuité de la membrane externe entre la forme végétative de la souche *H* et le "cyst".

Photos 3 et 4 - *Alcaligenes denitrificans*. (la flèche indique la présence de polysaccharides agglomérés par les traitement de fixation).

Planche 3 - Observation de la souche *H* et d'*Alcaligenes denitrificans* en microscopie électronique à transmission. Les échantillons sont préparés selon la méthode de Ryter et Kellenberger. (1958) [les barres représentent 1 μ m (P_{1,3,4}) ou 0,1 μ m (P₂)]



3.2. Accumulation de nitrites

Cette étude préliminaire analyse le comportement de *Alcaligenes denitrificans* et de la souche *H* en cultures pures en présence de différentes concentrations en nitrates. Elle a pour objectif de :

- ✓ déterminer la quantité d'azote éventuellement accumulée sous forme de nitrites dans le milieu lors de la dénitrification lorsque les conditions de croissance et l'apport en éthanol ne constituent pas des paramètres limitants,
- ✓ confirmer l'influence positive des métaux sur l'élimination des nitrites, observée dans les réacteurs.

L'ensemble des résultats présentés porte sur deux séries de mesures dans les mêmes conditions. Les valeurs indiquées correspondent aux moyennes arithmétiques. On peut ainsi constater que la présence de nitrites dans le milieu n'est détectée dans le milieu que pour des concentrations en nitrates initialement présentes supérieures à 50 mg N-NO₃⁻/l pour *Alcaligenes denitrificans* et 1 mg N-NO₃⁻/l pour la souche *H* (Figure 37).

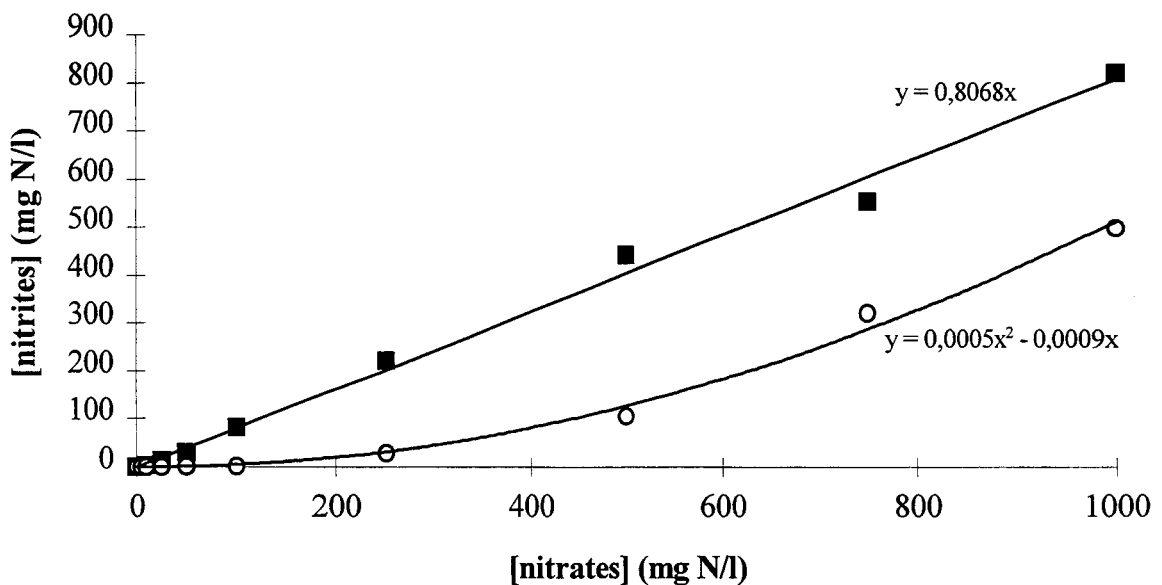


Figure 37 - Corrélation entre la quantité initiale de nitrates et la quantité de nitrites accumulés chez *Alcaligenes denitrificans* (○) et la souche *H* (■)[les courbes de tendance sont obtenues à l'aide du logiciel Excell 5]

Ces résultats sont à rapprocher de la limite de détection des nitrites par la méthode utilisée (NFT 90-013), à savoir 0,01 mg N-NO₂⁻/l. Il existe donc une concentration limite en nitrates au-dessus de laquelle les souches étudiées ne sont plus capables de réduire les nitrites produits, en l'absence d'une complémentation métallique adaptée, et vont donc les accumuler temporairement dans le milieu avant de les réduire. Ce phénomène d'accumulation temporaire a également été observé chez *Pseudomonas stutzeri* (Blaszczyk, 1992), *Alcaligenes eutrophus* (Sann *et al.*, 1994) et *Paracoccus denitrificans* (Blaszczyk, 1993).

Pour *Alcaligenes denitrificans*, la quantité de nitrites accumulés augmente avec la concentration en nitrates lorsque celle-ci est supérieure à 100 mg N-NO₃⁻/l. Cette constatation permet d'assimiler le relargage des nitrites dans le milieu à une fonction polynomiale de second degré dans laquelle la concentration en nitrites est la variable à expliquer et la concentration en nitrates la variable explicative.

$$[\text{N-NO}_2]_{(\text{H, mg/l})} = 0,0005 [\text{N-NO}_3]_{(\text{mg/l})}^2 - 0,00009 [\text{N-NO}_3]_{(\text{mg/l})} \quad (r^2=0,994)$$

Pour la souche *H.*, la quantité de nitrites accumulés varie de façon linéaire avec la concentration en nitrates présente dans le milieu.

$$[\text{N-NO}_2]_{(\text{H, mg/l})} = 0,8068 [\text{N-NO}_3]_{(\text{mg/l})} \quad (r^2=0,9939)$$

Pour les deux souches, les modèles choisis satisfont implicitement à la contrainte :

$$[\text{N-NO}_2^-]=0 \text{ si } [\text{N-NO}_3^-]=0.$$

3.3. Influence des métaux sur la dénitrification

Les cultures sont réalisées en fioles en présence de 1 g N-NO₃/l dans un milieu additionné ou non des métaux impliqués dans la dénitrification. Les courbes de croissance bactérienne [mesures de la densité optique à 600nm (DO₆₀₀)] et de dosage des nitrates et nitrites sont rapportées dans les figures 38 et 39. Un important relargage transitoire de nitrites dans le milieu est observé en absence de complémentation métallique à des valeurs respectives de 500 et 785 mg NO₂⁻/l (soit respectivement pour *Alcaligenes denitrificans* et la souche *H* 50 et 78% de l'azote accumulé).

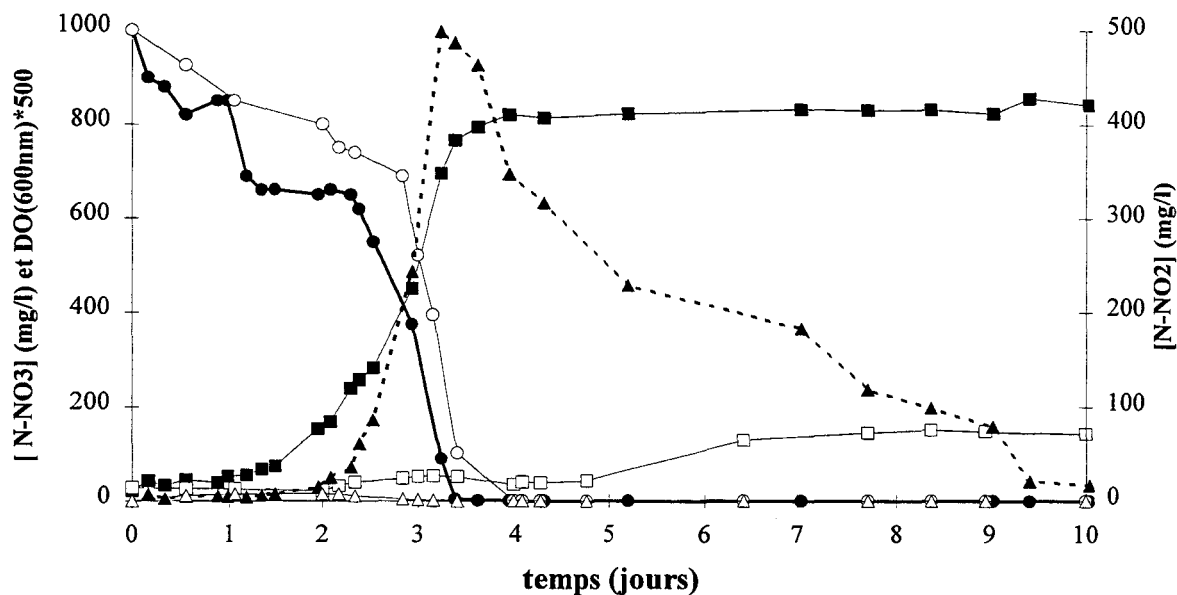


Figure 38 : Cinétiques de dénitrification d'*Alcaligenes denitrificans* sous agitation en anaérobiose et à 20°C [milieu nitrates : DO₆₀₀ (■), N-NO₃ (●), N-NO₂ (▲) ; milieu nitrates + métaux : DO₆₀₀ (□), N-NO₃ (○), N-NO₂ (▷)]

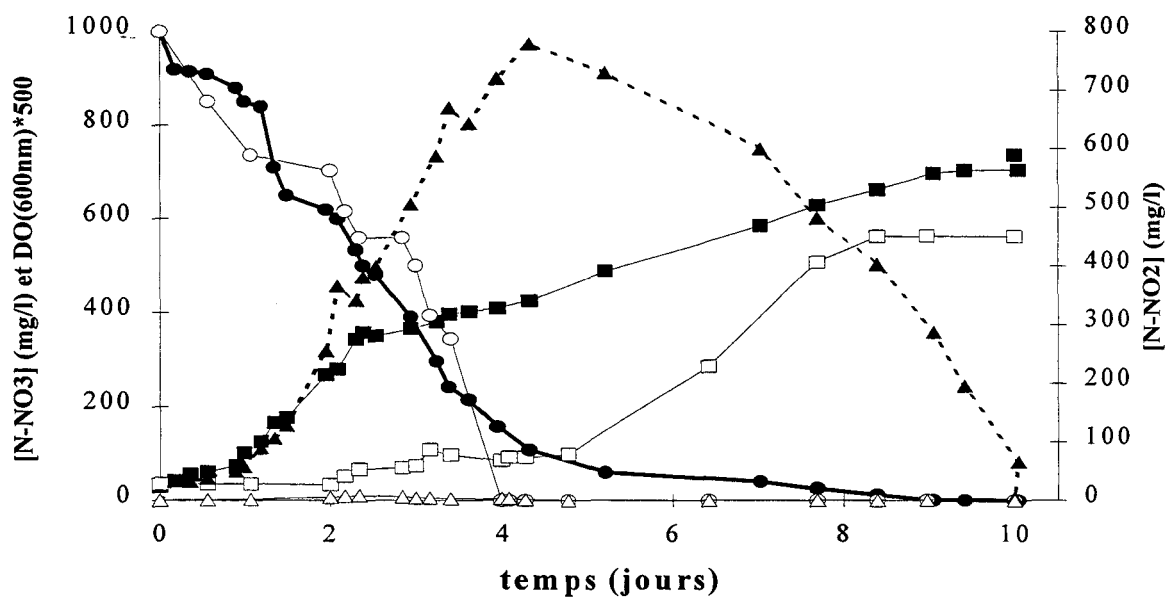


Figure 39 : Cinétiques de dénitrification de H sous agitation en anaérobiose et à 20°C [milieu nitrates : DO₆₀₀ (■), N-NO₃ (●), N-NO₂ (▲) ; milieu nitrates + métaux : DO₆₀₀ (□), N-NO₃ (○), N-NO₂ (▷)]

Ces résultats confirment ceux obtenus par d'autres auteurs (Blaszczyk *et al.*, 1980 ; Blaszczyk, 1992) et notamment par Kucera *et al.* (1986). La synthèse de la nitrite réductase débiterait après celle de la nitrate réductase avec pour conséquence l'accumulation de nitrites dans le milieu. On constate une différence des vitesses maximales calculées entre la dénitrification (30,5 et 10,5 mg N-NO₃⁻/h pour *Alcaligenes denitrificans* et la souche *H*) et la dénitrification (respectivement égales pour chaque souche à 14,7 et 1,61 mg N-NO₂⁻/h) dans nos conditions. Ces différentes vitesses sont calculées sur les plus fortes pentes des courbes.

Comme le souligne Ferguson (1994), il existe deux situations principales où la réduction des nitrates se déroule avant celle des nitrites même lorsque les deux réductases s'expriment (ce qui est ici le cas) :

- la capacité catalytique des systèmes de transport des électrons vers la nitrite réductase est faible,
- la constante d'affinité de l'ubiquinol est élevée.

Dans les deux cas, la plus grande partie du flux d'électrons provenant des deshydrogénases est orientée vers la nitrate réductase.

La complémentarité métallique permet de réduire l'accumulation des nitrites à une valeur inférieure à 10 mg/l pour les deux souches. Les vitesses de dénitrification et de dénitrification sont alors égales à 50 mg N-NO₃⁻/h et 49,84 mg N-NO₂⁻/h pour *Alcaligenes denitrificans*, et 31,25 mg N-NO₃⁻/h et 31,10 mg N-NO₂⁻/h pour la souche *H*. L'addition des métaux permet donc de stimuler les systèmes enzymatiques de la nitrate et de la nitrite réductase. Ces résultats sont en accord avec ceux de Blaszczyk (1992, 1993) et mettent l'accent sur l'importance de la stimulation, voire de l'induction, des systèmes enzymatiques lors de la dénitrification. L'accumulation de nitrites, chez les souches étudiées, apparaît due à la phase de latence pendant laquelle se met en place l'adaptation enzymatique aux nitrites. La durée de cette phase détermine le pourcentage d'azote accumulé sous forme de nitrites dans le milieu.

La croissance cellulaire ($\mu_{\max(A.\text{denit.})}=0,05\text{h}^{-1}$; $\mu_{\max(H)}=0,038\text{h}^{-1}$) présente une corrélation positive ($r^2=0,92$) avec l'élimination des nitrates, principale étape productrice d'énergie (Stouthamer et Bettenhausen, 1973). Plus précisément, pour la souche *H*, la synthèse microbienne s'effectue en deux phases selon la concentration de nitrites présents dans le milieu ;

la croissance se ralentit au-dessus de 300 mg N-NO₂⁻/l (μ égal à 0,007 h⁻¹). Toutefois, elle n'est jamais complètement inhibée.

En présence de métaux, la croissance bactérienne est inhibée tant que dure la dénitrification ($\mu_{\max(A.denit.)} < 0,01 \text{h}^{-1}$; $\mu_{\max(H)} = 0,02 \text{h}^{-1}$) et démarre ultérieurement, vraisemblablement par fermentation de l'éthanol résiduel. L'ATP produit lors de la réduction des nitrates est alors détourné de la synthèse cellulaire vers un autre métabolisme.

L'influence relative des différents éléments métalliques sur la dénitrification et notamment la dénitrification a ensuite été étudiée. Le plan mis en place est le suivant :

- étude de l'influence disjointe des métaux couplés à la nitrate réductase (fer, molybdène) et à la nitrite réductase (cuivre),
- détermination des concentrations seuils des différents métaux permettant d'obtenir le relargage minimal de nitrites,
- étude de l'influence synergique des métaux.

Les résultats montrent que l'addition du couple fer-molybdène et de cuivre dans le milieu nitraté entraîne des effets différents selon la souche bactérienne. Ainsi, *Alcaligenes denitrificans* présente une grande sensibilité à l'addition de fer-molybdène et de cuivre (Figure 40). Les concentrations en nitrites relarguées sont respectivement de 11,3 et 91,3 mg/l.

Par contre, la souche *H* réagit beaucoup plus à l'addition de cuivre (9,1 mg NO₂⁻ relargués/l) qu'à celle de fer-molybdène (587 mg NO₂⁻ relargués/l) (figure 41).

Ces observations montrent que la réduction des nitrites est réalisée par des nitrites réductases de nature différente. Il existe en effet deux sortes de nitrites réductases : des réductases contenant du cuivre et des réductases contenant des cytochromes c et d. La majorité des espèces possèdent l'une ou l'autre des réductases. Pour la souche *H*, les résultats obtenus permettent d'affirmer que la nitrite réductase est une enzyme à cuivre. Certaines espèces semblent posséder les deux enzymes (Pelmont, 1993). Ce qui est vraisemblablement le cas pour la souche d'*Alcaligenes denitrificans*. On sait en effet que les deux types de nitrites réductases existent chez le genre *Alcaligenes* (Shapleigh et Payne, 1985 ; Sann *et al.*, 1994).

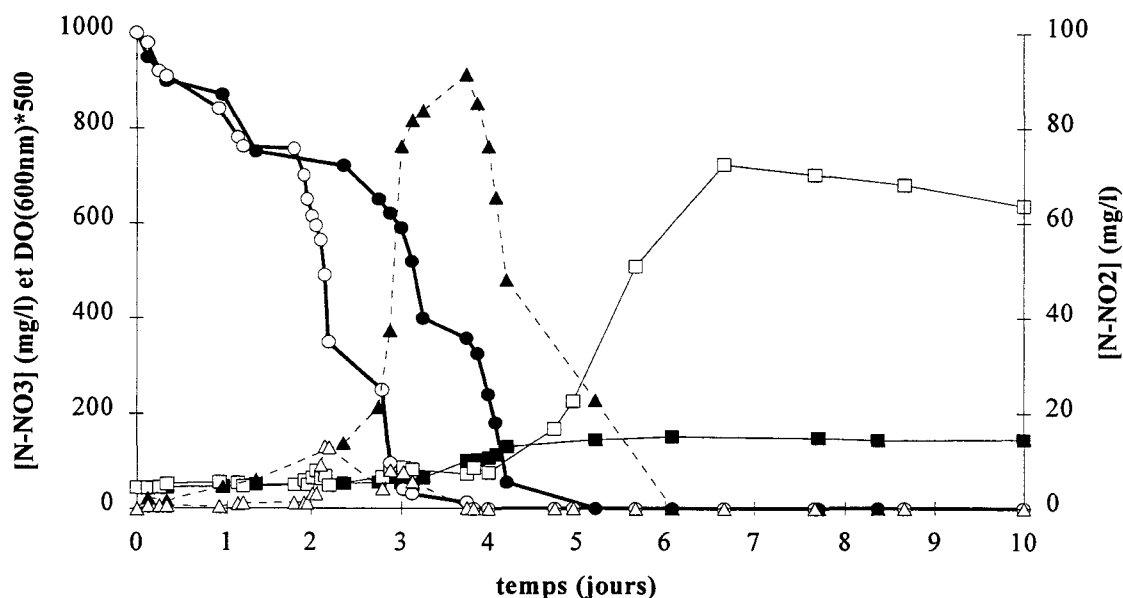


Figure 40 : Cinétiques de dénitrification de *Alcaligenes denitrificans* sous agitation, en anaérobiose et à 20°C en milieu nitraté complétement [avec du cuivre (1000µg/l) : DO₆₀₀ (■), N-NO₃ (●), N-NO₂ (▲) ; avec du fer (200 µg/l) et molybdène (50 µg/l) : DO₆₀₀ (□), N-NO₃ (○), N-NO₂ (▷)]

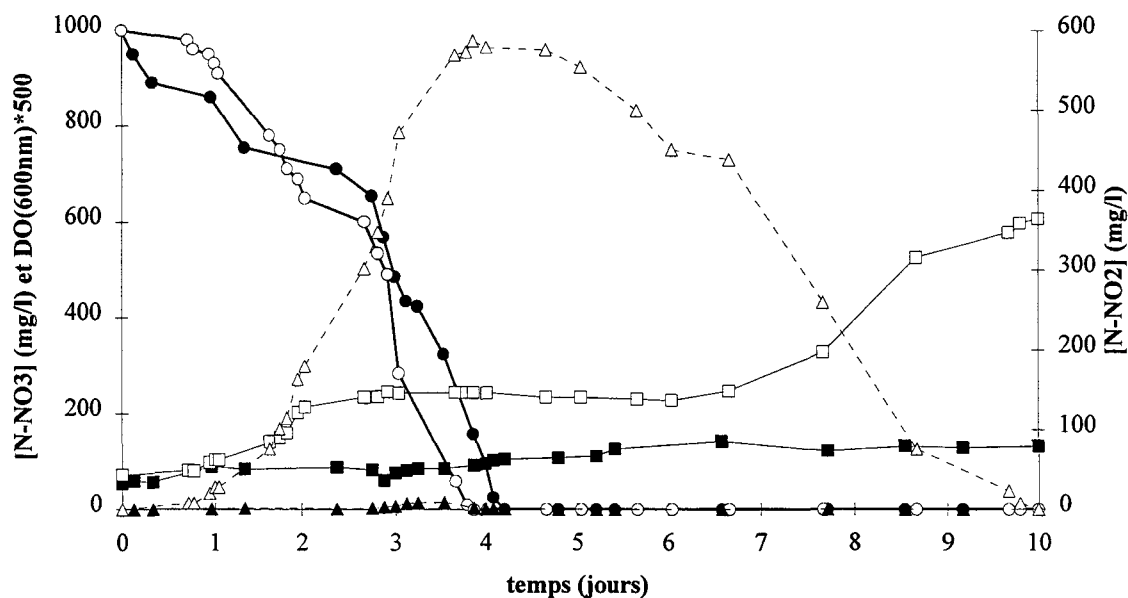


Figure 41 : Cinétiques de dénitrification de la souche *H* sous agitation, en anaérobiose et à 20°C en milieu nitraté complétement [avec du cuivre (1000µg/l) : DO₆₀₀ (■), N-NO₃ (●), N-NO₂ (▲) ; avec du fer (200 µg/l) et molybdène (50 µg/l) : DO₆₀₀ (□), N-NO₃ (○), N-NO₂ (▷)]

Cependant, en l'état actuel des connaissances, seul un type d'enzyme (couplé au fer ou au cuivre) a été isolé chez une souche donnée (Coyne *et al.*, 1989). L'addition d'inhibiteurs de la nitrite réductase à cuivre ou à hème pourrait permettre de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse. L'existence d'autres enzymes associées à du fer ou du cuivre (notamment la N₂O réductase) dans le processus de dénitrification est néanmoins susceptible de provoquer des interférences avec les résultats obtenus (Zumft *et al.*, 1992).

Bien qu'associés à la nitrate réductase, le fer et le molybdène n'entraînent pas de stimulation sensible de la réduction des nitrates. La comparaison des vitesses de dénitrification, en présence de fer et molybdène d'une part, et des quatre métaux d'autre part, (vitesses respectivement égales à 31,25 et 50 mg/l pour *Alcaligenes denitrificans* et 9,6 et 31,25 mg/l pour la souche *H*) montrent que l'accumulation dans le milieu des formes azotées de degré d'oxydation plus bas (NO₂⁻, NO, N₂O) limite la vitesse de dénitrification. La stimulation, principalement par le cuivre, des systèmes enzymatiques responsables de leur réduction ultérieure par l'addition de métaux permet de stimuler en même temps l'expression de la nitrate réductase.

L'ensemble des vitesses spécifiques relevées est repris dans le tableau 15.

milieux nitrates utilisés	<i>Alcaligenes denitrificans</i>				<i>H</i>			
	simple	+ 4 métaux	+ cuivre	+ Fe/Mo	simple	+ 4 métaux	+ cuivre	+ Fe/Mo
V _{N-NO₃} (mg/h)	30,5	50	24,57	31,25	10,5	31,25	26,64	9,6
V _{N-NO₂} (mg/h)	14,7	49,84	22,12	28,87	1,61	31,10	25,92	3,67
[N-NO ₂] _{max} (mg/l)	500	7,9	91,3	13,1	785	8,2	9,1	587
μ _{max} (h ⁻¹)	0,05	<0,01	0,03	0,04	0,038	0,022	0,009	0,018

Tableau 15 : Evolution des vitesses spécifiques et du taux de croissance à 20°C d'*Alcaligenes denitrificans* et de la souche *H* lors de la phase d'accumulation des nitrites en fonction de la composition du milieu (concentrations en métaux utilisées : 200 μg fer/l, 1 000 μg cuivre/l, 50 μg cobalt/l et 50 μg molybdène/l). Le calcul des taux de croissance a été réalisé après modélisation des courbes grâce au modèle de Gompertz.

Ces expériences permettent de préciser les concentrations minimales en fer ou en cuivre au-delà desquelles la concentration minimale en nitrites relargués n'est plus affectée de façon significative (tableaux 16 et 17). Elles sont respectivement de 10 et 50 µg/l pour *Alcaligenes denitrificans* et 50 et 100 µg/l pour la souche *H*. Ces concentrations sont très nettement inférieures à celles imposées par la Législation sur les eaux destinées à la consommation humaine (soit 1 000 µg cuivre/l et 200 µg fer/l) et pourront donc être utilisées pour le traitement *in situ* de la nappe.

Il apparaît que la croissance de la souche *H* est stimulée par l'addition de fer dans le milieu (tableau 16). De plus, la croissance de cette souche apparaît inversement proportionnelle à la concentration en nitrites accumulés dans le milieu. Ce phénomène n'est pas observé avec *Alcaligenes denitrificans*. La croissance d'*A. denitrificans* et de la souche *H* est fortement inhibée dès que la concentration en cuivre devient supérieure à 10 µg/l.

<i>Alcaligenes denitrificans</i>			souche <i>H</i>	
Fer en µg/l	Pourcentage d'azote nitreux accumulé	Absorbance maximale à 600nm	Pourcentage d'azote nitreux accumulé	Absorbance maximale à 600nm
0	49,91	0,528	79,13	0,485
5	29,16	0,617	92,83	0,493
10	19,02	0,678	94,35	0,631
24	17,50	0,679	92,63	0,605
30	15,22	0,758	86,80	0,534
50	5,84	0,798	77,61	0,352
60	7,25	0,722	71,98	0,388
78	9,12	0,815	69,76	0,401
100	5,12	0,852	62,45	0,402
200	12,17	0,891	63,59	0,412

Tableau 16 : Evolution des nitrites relargués et de la croissance au cours de la dénitrification chez *Alcaligenes denitrificans* et de la souche *H* en fonction de la concentration en fer dans le milieu de culture ($[N-NO_3]_{\text{initiale}} = 1 \text{ g/l}$)

	<i>Alcaligenes denitrificans</i>		souche <i>H</i>	
Cuivre en µg/l	Pourcentage d'azote nitreux accumulé	Absorbance maximale à 600nm	Pourcentage d'azote nitreux accumulé	Absorbance maximale à 600nm
0	49,95	0,528	79,13	0,485
1	32,02	0,614	63,91	0,555
2,5	23,13	0,626	75,33	0,546
5	20,00	0,723	60,41	0,538
10	12,26	0,575	46,26	0,326
20	17,35	0,516	25,85	0,329
30	15,60	0,479	22,86	0,250
40	11,41	0,432	7,64	0,226
50	10,65	0,353	3,29	0,185
100	12,93	0,251	3,71	0,198
250	11,46	0,215	3,80	0,178
500	9,13	0,153	3,04	0,161
1000	8,67	0,095	2,37	0,116

Tableau 17 : Evolution des nitrites relargués et de la croissance au cours de la dénitrification chez *Alcaligenes denitrificans* et de la souche *H* en fonction de la concentration en cuivre dans le milieu de culture ($[N-NO_3]_{\text{initiale}} = 1 \text{ g/l}$)

Quant au molybdène (résultats non présentés), il s'est révélé fortement toxique pour les deux souches car aucune croissance n'est constatée après 10 jours de culture.

3.4. Influences combinées du fer et du cuivre

Au cours des expériences précédentes, les concentrations en fer et en cuivre ont été fixées à 100 et/ou 50 µg/l. Or, on observe que l'addition simultanée de fer et de cuivre permet de réduire de moitié les quantités nécessaires de chacun de ces métaux pour une même réduction des nitrites accumulés (Figures 42 et 43). Ainsi, pour une accumulation maximale de 1 % de l'azote sous forme de nitrites, les concentrations en cuivre et en fer nécessaires sont respectivement de 25 µg/l et 10 µg/l pour *Alcaligenes denitrificans* (Figure 42) et 10 µg/l et 25 µg/l pour la souche *H* (figure 43). Pour les deux souches, le cuivre paraît donc indispensable au bon fonctionnement de la nitrite réductase.

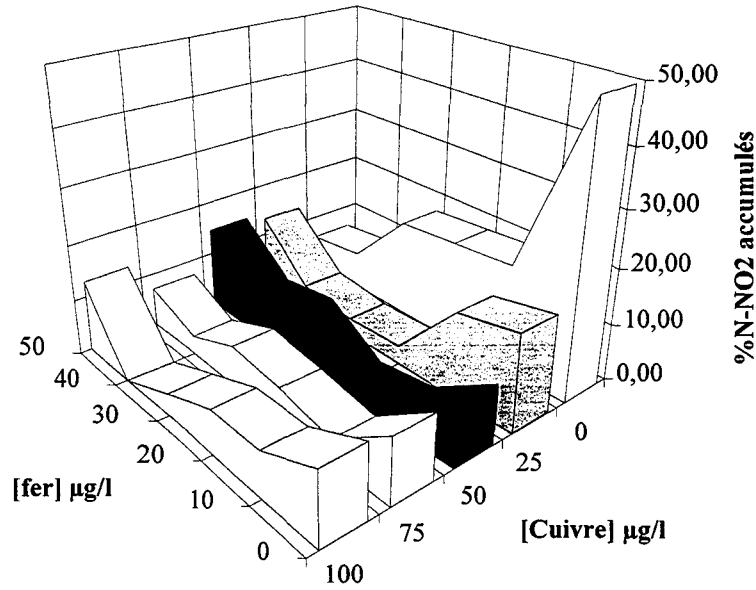


Figure 42 : Influence de l'addition simultanée de fer et de cuivre sur l'accumulation de nitrites lors de la dénitrification par *Alcaligenes denitrificans* à 20°C, en anaérobiose.

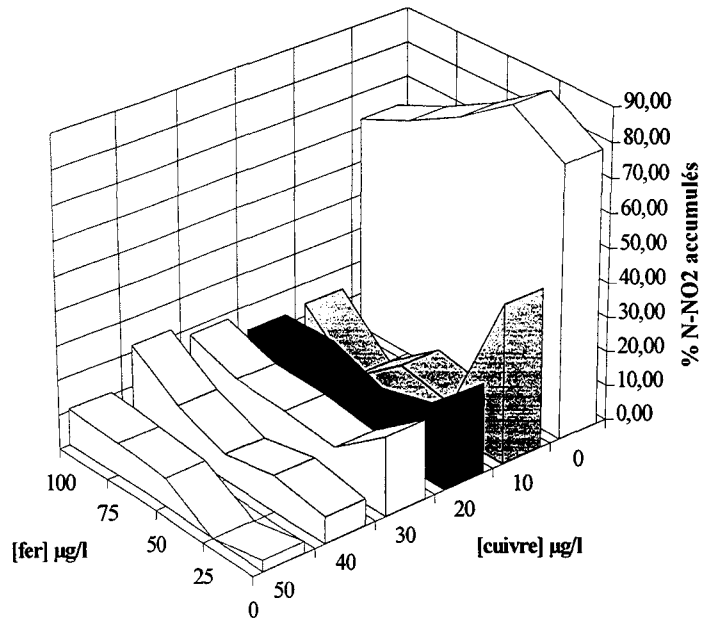


Figure 43 : Influence de l'addition simultanée de fer et de cuivre sur l'accumulation de nitrites lors de la dénitrification par la souche *H* à 20°C, en anaérobiose.

Dans l'ensemble des configurations envisagées, lorsque le cuivre est présent, l'addition de fer au-delà de 50 µg/l entraîne une augmentation des nitrites accumulés. Ce phénomène, déjà observé lors des expériences précédentes, est vraisemblablement lié à une stimulation de la nitrate réductase qui fonctionne plus vite que la nitrite réductase. L'apport de fer, en quantité trop importante, pourrait donc gêner l'action positive d'une addition de cuivre.

Le cuivre est un métal qui s'adsorbe facilement sur les carbonates. La complexation avec la matière organique est très forte. Par ailleurs en présence de fer et de manganèse, on observe la formation d'oxydes à des pH proches de la neutralité. Le pH joue un rôle majeur dans ces phénomènes d'adsorption et les faibles variations de pH, induites par le processus de dénitrification biologique, peuvent entraîner un relargage ou une adsorption massifs du métal (Figure 44). Pour les pH relevés dans la nappe (de 6.5 à 7.3), le cuivre peut se trouver sous forme complexée ou soluble. La hausse du pH accroît l'adsorption du cuivre et une diminution de 2 unités pH (de 8 à 6) décroît l'adsorption du cation de 100 à 0 % (Benjamin *et al.*, 1982). Le cuivre associé à de la matière organique ne pourra, quant à lui, être libéré que si les composés organiques sont détruits par les micro-organismes.

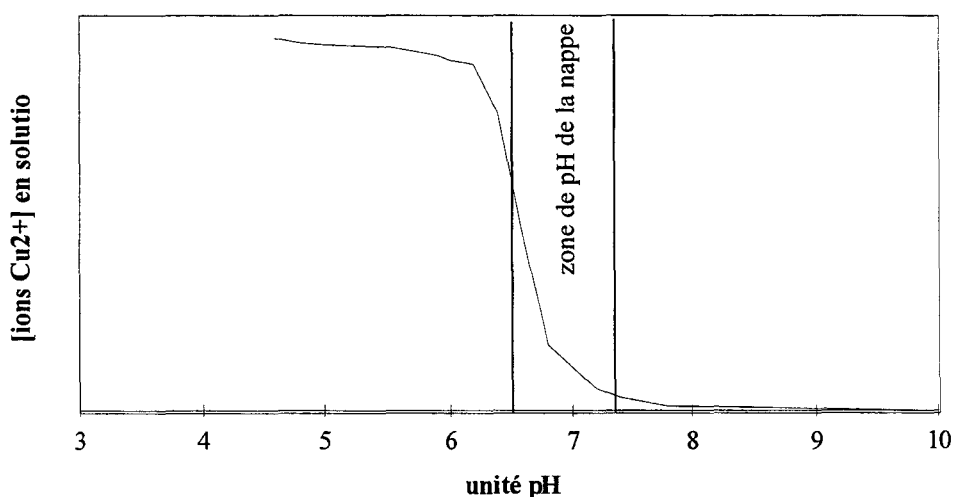


Figure 44 - Effet du pH sur la concentration en ions cuivre en solution (d'après Farrah et Pickering, 1976)

Les expériences réalisées avec des concentrations croissantes de cuivre ont montré l'inhibition partielle de la croissance bactérienne pour des teneurs en ce métal supérieures à 20

$\mu\text{g/l}$ (☛ tableau 16). La maîtrise du pH apparaît donc être un paramètre fondamental pour le déroulement de la dénitrification à moyen et long terme.

3.5. Influence de la co-culture

Quand deux, ou plusieurs, espèces vivent en association proche dans un écosystème, elles engendrent des interactions. Trois types de relations sont possibles : la symbiose, le commensalisme, la compétition. Les paramètres qui gouvernent ces relations sont très complexes et deux espèces microbiennes peuvent être en compétition pour une ressource et, en même temps, entretenir une relation commensale pour d'autres ressources (Slater, 1981). Quel que soit le type d'interactions mises en place, le but est toujours l'obtention maximale d'énergie et ainsi la survie de l'espèce. Lors de la dénitrification, la réduction des nitrates est l'étape la plus productrice d'énergie : il s'établit, donc entre les différentes espèces, une compétition pour cet accepteur d'électrons. Les cinétiques en cultures pures en absence de complémentarité métallique, ont mis en évidence un important relargage dans le milieu de nitrites toxiques entraînant un ralentissement de la croissance bactérienne. Par contre, dans les réacteurs à biofilms fixés, un équilibre s'établit entre les différentes souches de façon à maintenir le "pool" de nitrites proche de zéro dans le milieu. Afin d'étudier le comportement d'un système mixte vis à vis de la dénitrification, nous avons réalisé un mélange des deux souches, *Alcaligenes denitrificans* et la souche *H* en concentrations cellulaires égales dans le milieu de base contenant 1 g N-NO₃/l. La lettre "R" définira ensuite le rapport entre les colonies de *Alcaligenes denitrificans* et de la souche *H* dénombrées sur le milieu gélosé PCA. Lors de l'inoculation du milieu, ce rapport est donc égal à 1. Parallèlement aux dosages des nitrates et nitrites présents dans le milieu, la croissance globale est suivie par la mesure de la densité optique à 600nm et par le dénombrement différentiel des deux souches.

A partir de l'étude du déroulement de la dénitrification (figure 45), nous avons défini cinq phases principales entre l'inoculation ($t=0$) et le moment où l'élimination des nitrates et nitrites est complète ($t=10$ jours). Ces phases sont en relation avec la variation du rapport R des colonies dénombrées de *Alcaligenes denitrificans* et de la souche *H*.

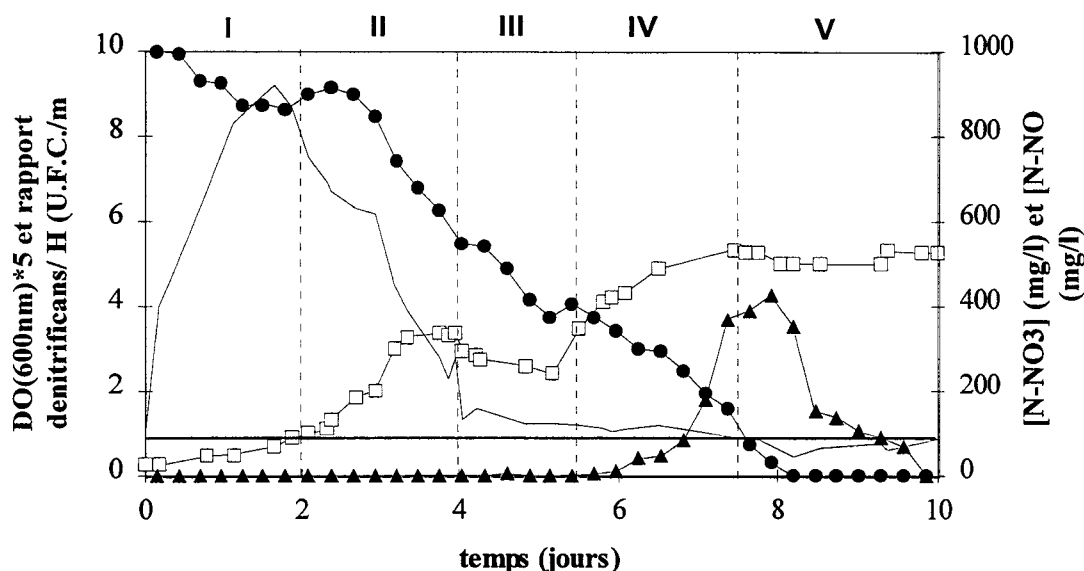


Figure 45 : Cinétiques de dénitrification de la co-culture *Alcaligenes denitrificans*/souche *H* sous agitation, en anaérobiose et à 20°C [DO₆₀₀ (□) ; Rapport U.F.C. (*Alcaligenes denitrificans*)/U.F.C. (souche *H*) (-); N-NO₃ (●), N-NO₂ (▲)]

La première période (I) correspond à la phase d'adaptation de la flore. Elle se caractérise par une croissance globale (DO_{600nm}) lente. Le dénombrement (R~9) indique un développement prédominant d'*Alcaligenes denitrificans*. Lors de cette période, l'élimination des nitrates reste faible (utilisation de l'azote pour la synthèse bactérienne), et il n'y a pas d'accumulation de nitrites.

La deuxième période (II), correspond à une phase de dénitrification active sans, toutefois, que des nitrites soient relargués dans le milieu. La mise en place de la réduction des nitrates apparaît concomitante au développement de la souche *H* (caractérisé par une baisse de R et une hausse de la DO). Puis vient la période (III) où la flore bactérienne tend vers un équilibre numérique entre les deux souches. Pendant cette phase de transition, la flore totale cesse d'augmenter indiquant une concurrence entre les souches pour le substrat carboné qui devient limitant. La dénitrification se ralentit. L'équilibre atteint, la synthèse bactérienne et la réduction des nitrates reprennent, et des nitrites s'accumulent progressivement dans le milieu (phase IV). La dernière phase (V) met en avant une inversion du rapport des colonies (R) : la souche *H*

devient largement dominante sur *Alcaligenes denitrificans* bien que son taux de croissance, en culture pure (☛ tableau 14), soit inférieur à celui d'*Alcaligenes denitrificans* et que, généralement, la souche ayant le taux de croissance le plus élevé prédomine quand le substrat carboné est limitant (Hanaki *et al.*, 1990). Cette période correspond à une phase d'accumulation massive des nitrites (410 mg N-NO₂⁻/l) suivie d'une dénitrification rapide. Les deux populations bactériennes tendent à l'équilibre.

L'étude comparative des vitesses maximales obtenues, avec celle des cultures pures, montre que la culture mixte de ces deux souches dénitrifiantes (figure 46) :

- ✓ ralentit la réduction des nitrates lorsqu'il y a compétition entre les deux souches pour le substrat carboné,
- ✓ entraîne une augmentation de la vitesse de dénitrification et permet ainsi de réduire l'apparition des nitrites dans le milieu de culture.

Le dénombrement indique qu'après adaptation les deux souches co-existent sans dominance numérique importante de l'une sur l'autre.

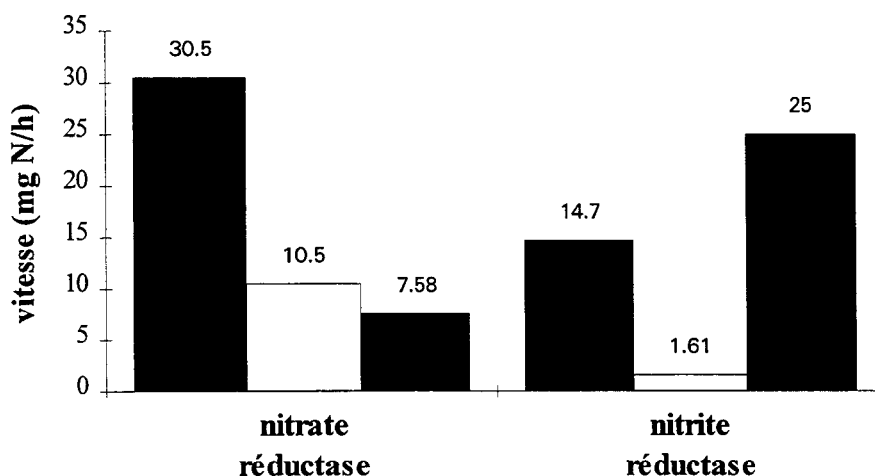
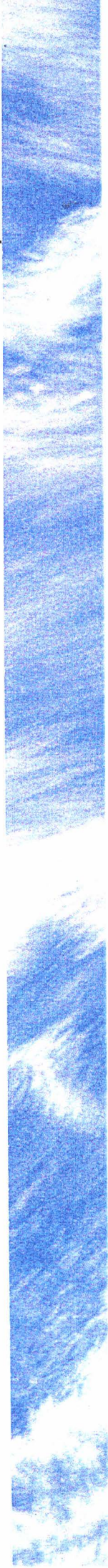


Figure 46 - Comparaison des vitesses de dénitrification et de dénitrification entre cultures pures et cultures mixtes en milieu nitraté de base [*Alcaligenes denitrificans* (■), souche H (□), co-culture(◻)]

La culture mixte d'*Alcaligenes denitrificans* et de la souche *H* apporte donc des modifications aux vitesses spécifiques de dénitrification (en baisse) et de dénitrification (en hausse) mais la conjonction de ces deux phénomènes ne modifie pas sensiblement l'efficacité globale de la dénitrification, surtout pour ce qui concerne la quantité de nitrites relargués transitoirement dans le milieu. Ceci peut être dû à la nature même des souches en présence : toutes deux métabolisent l'éthanol et effectuent la réduction totale des nitrates en gaz. Elles n'ont donc pas besoin l'une de l'autre et leur association n'apparaît pas utile dans le cadre d'un inoculum destiné à des expériences en réacteurs *ex situ* où la composition microbienne peut être contrôlée. Toutefois, dans le cadre de ce travail, ces souches seraient destinées à être inoculées dans un environnement naturellement carencé en carbone organique et contenant une microflore autochtone où elles ne sont pas dominantes (→ figure 16), et ce afin de faciliter la mise en place de la dénitrification. Par contre, elles sont dominantes lorsque les conditions de dénitrification deviennent optimales par l'ajout d'un substrat carboné et d'oligo-éléments en concentrations déterminées.

Il convient de rester prudent quant au devenir de ces souches dans l'aquifère car celui-ci renferme de nombreux polluants secondaires, adsorbés sur la matrice crayeuse, pouvant provoquer leur élimination. De plus, les rares expériences *in situ* (*sensu stricto*) (Tiedje *et al.*, 1989), visant à évaluer le devenir des micro-organismes injectés, ont montré que l'apport d'un inoculum permet de diminuer le temps de démarrage de l'installation mais qu'il est très difficile de réaliser à long terme la survie de cet inoculum. Des techniques de marquage moléculaire des bactéries introduites sont actuellement à l'étude (Thiem *et al.*, 1994) afin de confirmer, ou d'infirmier, les observations faites jusqu'à présent par comptage indirect.

CONCLUSIONS GENERALES



Les nitrates sont très solubles dans l'eau et leur présence dans les nappes phréatiques témoigne d'une pollution récente ou ancienne et souligne la vulnérabilité des nappes. En raison des risques potentiels que ces pollutions induisent pour la Santé Publique, les procédés qui tendent à les limiter, voire les supprimer, présentent un incontestable intérêt. Le but de ce travail de thèse était donc d'étudier la dénitrification biologique en vue de l'appliquer *in situ* à une nappe phréatique libre dont la pollution par des rejets azotés industriels est telle que tout autre traitement est techniquement et financièrement moins intéressant.

Dans une première partie, nous nous sommes attachés à la reconnaissance environnementale du site, au traitement des informations existantes et, lorsque cela s'est avéré nécessaire, à l'acquisition de données complémentaires. En effet, la phase préliminaire à une dépollution éventuelle consiste à définir le plus précisément possible l'état de pollution et un objectif de dépollution "raisonnable" permettant de revenir à la normalité. L'analyse des vitesses de déplacement de la nappe et des caractéristiques physico-chimiques de cet aquifère a mis en évidence une faible dispersion latérale (estimée à 200 mètres) de la pollution. Par contre, la dispersion longitudinale atteint plusieurs kilomètres dans le sens de l'écoulement de la nappe. Dans ce panache de pollution, où les concentrations en nitrates varient de 100 à plus de 1 500 mg NO₃⁻/l, les analyses microbiologiques mettent en évidence une faible population de micro-organismes dénitrifiants (10³ Unités Formant Colonies/ml d'eau prélevée) qui ne peut réduire sensiblement les teneurs en nitrates, à moyen terme, dans les conditions physico-chimiques naturelles, d'autant plus que la teneur en carbone organique total est quasiment nulle. La stimulation des phénomènes de dénitrification biologique nécessite donc l'apport d'un substrat carboné.

La deuxième partie de ce travail a consisté à concevoir et fabriquer des réacteurs permettant la simulation d'une dénitrification microbiologique naturelle afin d'en évaluer la faisabilité *in situ*. Un support minéral a permis la fixation de la flore comme dans l'aquifère. Ce procédé permet de limiter la taille des réacteurs et d'optimiser leur fonctionnement avec des densités bactériennes estimées à plus de 10⁸ U.F.C./ml. La craie a finalement été choisie principalement en raison de sa présence en tant qu'aquifère. Nous nous sommes ensuite attachés à l'étude des cinétiques d'élimination des nitrates en fonction des paramètres imposés

de la nappe à traiter : concentrations en azote nitrique et ammoniacal, alcalinité, température et polluants mineurs. Pour des concentrations en nitrates très importantes (supérieures à 1 g/l), la maîtrise des apports nutritifs est impérative afin d'éviter tout dysfonctionnement métabolique qui provoquerait l'accumulation massive de nitrites dans le milieu. Dans les conditions expérimentales, un inoculum constitué de souches autochtones a été utilisé. Une dénitrification biologique s'est rapidement développée avec un rendement optimal lorsque, pour les deux substrats carbonés essayés (glucose et éthanol), l'apport en carbone organique correspond à une demande chimique en oxygène (DCO)/g de nitrates à éliminer proche de 0,8 à 1. En dessous de ces valeurs, le substrat carboné représente un facteur limitant la réduction des nitrates. Par contre, au-delà de 1 g, la production d'ammoniac par assimilation de l'azote nitrique peut apparaître. Par ailleurs, le choix d'une source de carbone non fermentescible (éthanol) apparaît justifié car celle-ci est plus sélective qu'un substrat fermentescible (glucose) et que le seul but recherché est la dénitrification. L'apport de phosphates, à une concentration supérieure à 5 mg $\text{PO}_4^{3-}/\text{l}$, a permis la réduction de 20 à 10 jours du délai d'installation de la dénitrification. Après stabilisation, les apports en carbone et/ou phosphates ont permis une réduction très satisfaisante des nitrates (90-95%). Toutefois, les nitrites produits ne sont que partiellement réduits et les concentrations détectées dans les effluents (supérieures à 10 NO_2^-/l) restent inacceptables pour une dépollution *in situ*. Pour pallier à l'accumulation de nitrites, l'addition des métaux, à l'état de traces, couplés aux enzymes de la dénitrification (fer, 200 $\mu\text{g}/\text{l}$; cuivre, 1 mg/l ; cobalt, 50 $\mu\text{g}/\text{l}$ et molybdène, 50 $\mu\text{g}/\text{l}$) a permis d'améliorer les rendements de dénitrification de telle sorte que les concentrations résiduelles détectées (10 mg NO_3^-/l et 0,05 mg NO_2^-/l) sont inférieures aux concentrations maximales admissibles légalement (50 mg NO_3^-/l et 0,1 mg NO_2^-/l). Ces valeurs définissent les limites de qualité des eaux destinées à la consommation humaine selon le décret de 3 janvier 1989. Comme la nappe phréatique de la Craie constitue le principal réservoir d'eau destinée à la consommation humaine régionale, il était impératif d'obtenir des concentrations résiduelles en nitrates et nitrites après traitement inférieures à celles recommandées par la Législation pour les eaux souterraines potabilisables.

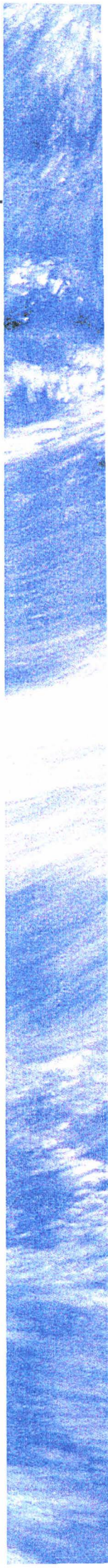
Parallèlement à l'élimination des nitrates, une microflore s'est installée dans les réacteurs. Sa composition a évolué au cours des expériences vers une simplification de l'écosystème. Les métaux ajoutés (fer, cuivre, cobalt et molybdène) sont toxiques vis à vis de la flore microbienne et ont entraîné une réduction de la population non fixée, de 10^8 à 10^6 U.F.C./ml, sans toutefois provoquer de baisse de l'efficacité des réacteurs. Néanmoins, afin de ne pas compromettre le développement de la population bactérienne dans un environnement naturel où les paramètres physiques sont difficilement contrôlables, la détermination des apports maximaux tolérés pour ces quatre métaux est essentielle.

La dernière partie du travail a consisté en une approche plus fondamentale du métabolisme de la dénitrification, en conditions carbonées (éthanol) non limitantes, chez deux souches isolées des réacteurs de laboratoire : *Alcaligenes denitrificans* et une souche notée H d'affiliation encore incertaine mais appartenant vraisemblablement au genre *Methylobacterium*. Ces souches ont été sélectionnées parmi la flore libre dominante des réacteurs à flux horizontal pour leur capacité à réduire successivement les nitrates et les nitrites ; elles pourraient servir d'inoculum dans un réacteur de traitement *in situ*. L'étude de la réduction des nitrates, à 20°C, a montré que la dénitrification constitue l'étape limitante de la dénitrification. En effet, au-delà d'une certaine concentration initiale en nitrates, des nitrites sont accumulés de façon transitoire dans le milieu avant d'être éliminés. Cette concentration dépend de la souche utilisée puisqu'elle est égale à 50 mg N-NO₃⁻/l pour *Alcaligenes denitrificans* et 1 mg N-NO₃⁻/l pour la souche H. Dans les deux cas, elle est très largement inférieure à celle de la nappe de la craie au droit du site (environ 340 mg N-NO₃⁻/l en octobre 1993), ce qui laisse présumer un relargage important de nitrites dans le milieu lors de l'expérimentation sur site. Toutefois, le métabolisme de ces souches apparaît bien adapté aux fortes teneurs en azote car la croissance n'est pas inhibée lorsqu'on passe de 0 à 1000 mg NO₃⁻/l. L'addition des métaux couplés aux enzymes de la dénitrification a permis de réduire la quantité de nitrites relargués dans le milieu de culture en augmentant la vitesse de dénitrification des deux souches, comme cela avait été observé lors des expériences en réacteurs. L'étude de l'implication de chacun des métaux dans ce mécanisme a montré que le fer et le cuivre jouent un rôle prépondérant dans le processus car l'addition de l'un ou de l'autre permet d'obtenir les

mêmes résultats que lorsque les quatre métaux (fer, cuivre, cobalt, molybdène) sont ajoutés simultanément. L'analyse des effets combinés de l'apport de concentrations de 0 à 100 µg/l en fer et en cuivre a montré qu'il est possible de réduire à 50 µg/l les concentrations à apporter en ces deux métaux et ainsi diminuer le coût de l'opération de dénitrification, tout en maintenant les nitrites accumulés dans le milieu à un faible niveau de concentration.

Au terme de ces expériences, il apparaît que l'élimination quasi-totale des nitrates (supérieure à 95 %) est possible dans les conditions du laboratoire. Les résultats obtenus lors de ces travaux de laboratoire font l'objet d'une expérimentation directe *in situ* à une échelle pilote.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



Abraham, Z.H.L., Lowe, D.J., et Smith, B.E. 1993. Purification and characterization of the dissimilatory nitrite reductase from *Alcaligenes dxylooxidans* sbsp. *xylooxydans* (N.C.I.M.B. 11015) : evidence for the presence of both type 1 and type 2 copper centers. *Biochem. J.* **295** : 587-593.

Académie des Sciences 1991. Pollution des nappes d'eau souterraines en France. Evaluation des connaissances et des impacts - Prospectives et recommandations. Rapport n°29, 183p.

Adams, G., Krenkel, et Bingham, 1970. *Conf. I.A.W.P.R.* 1, n°13.

AFNOR, 1975. Normes NF T90-015. Essais des Eaux - Dosage de l'azote ammoniacal, méthode spectrométrique au réactif de Nessler.

AFNOR, 1985. Normes NF T90-013 - ISO 6777. Essais des Eaux - Dosage des nitrites, méthode par spectrométrie d'absorption moléculaire.

AFNOR, 1989. Normes NF T90-045 - ISO 7840-3. Essais de Eaux - Dosage des nitrates, méthode spectrométrique avec l'acide sulfosalicylique.

AFNOR, 1990. Recueil des normes françaises - Eaux, Méthode d'essais - AFNOR (eds), Paris, 736 p.

Agence de l'Eau Artois-Picardie, et Chambre d'Agriculture, 1994. Azote et Agriculture de A à Z. 39p.

Allisson, D.G., et Sutherland, J.W. 1987. The role of exopolysaccharides in adhesion of fresh water bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **133** : 1319-1327.

Allowray, B.J., et Ayres, D.C. 1993. Chemical principles of environmental pollution. Blackie Academic & Professional (eds), 291 p.

Bamault, D., et Sylvestre, M. 1993. Factors affecting PCB degrading by an implanted strain in soil microcosms. *Can. J. Microbiol.* **39** : 594-602.

Barrenstein, A., Kramer U., et Obermann, P. 1986. Underground treatment of nitrate rich groundwater by infiltration with treated wastewater or methane-rich natural gaz. *DVGW - Schriftenreihe Wasser* **106** : 99-106.

Baumgärtner, M., et Conrad, R. 1992. Role of nitrate and nitrite for production and consumption of nitric oxide during denitrification in soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **101** : 59-65

Becarry, M., Passino, R., Ramadori, R., et Tandoi, V. 1983. Kinetic of dissimilatory nitrate and nitrite reductase in suspended growth culture. *J.W.P.C.F.* **55** : 58-63.

Bell, L.C., Richardson, D.J., et Fergusson, S.J. 1990. Periplasmic and membrane-bound respiratory nitrate reductases in *Thiosphaera pantotropha*. *FEBS Lett* **265** : 85-87.

- Benjamin, M.M., Hayes, K.F., et Leckie, J.O.** 1982. Removal of toxic metals from power-generation waste streams by adsorption and co-precipitation. *J. WPCF* **54** : 1472-1481.
- Bernard, D., et Bourel, E.** 1991. Les eaux souterraines : la nappe et ses protections. Stage de formation du monde associatif, 28 septembre - 19 octobre.
- Blaszczyk, M.** 1983. Effects of various sources of organic carbon and high nitrite and nitrate concentrations on the selection of denitrifying bacteria. II. Continuous cultures in packed bed reactors. *Acta Microbiol. Pol.* **32** : 65-71.
- Blaszczyk, M.** 1992. Comparaison of denitrification by *Paracoccus denitrificans*, *Pseudomonas stutzeri* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta Microbiol. Pol.* **41** : 203-210.
- Blaszczyk, M.** 1993. Effect of medium composition on the denitrification of nitrate by *Paracoccus denitrificans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59** : 3951-3953.
- Blaszczyk, M., Przytocka-Jusiak, M., Krustzewska, U., et Mycielski, R.** 1981. Denitrification of high concentrations concentrations of nitrites and nitrates in synthetic medium with different sources of organic carbon. I. Acetic acid. *Acta Microbiol. Pol.* **30** : 49-58.
- Böckle, R., Rohmann, U., et Wertz, A.** 1986. A process for restoring nitrate contaminated ground waters by means of heterotrophic denitrification in an activated carbon filter and aerobic post-treatment underground. *Aqua* **5** : 286-287.
- Bollag, J.M., Drzymala, S., et Kardos, L.** 1973. *Soil Sci.* **116** : 44-50.
- ✓ **Bonnefoy, V., et Demoss, J.A.** 1994. Nitrate reductases in *Escherichia coli*. *Antonie van Leeuwenhoek* **66** : 47-56.
- ✓ **Boogerd, F.C., Van Verseveld, H.W., et Stouthamer, A.H.** 1981. Respiration-driven proton translocation with nitrite and nitrous oxide in *Paracoccus denitrificans*. *Biochim. Biophys. Acta* **638** : 181-191.
- Bortone, G., Genelli, S., Rambaldi, A., et Tilche, A.** 1992. Nitrification, denitrification and biological phosphate removal in sequencing batch reactors treating piggery wastewater. *Wat. Sci. Tech.* **26** : 977-985.
- Bouexière, I.** 1993. Suivi de la pollution azotée autour du site de Mazingarbe (avril 1989 à août 1993). Note B.R.G.M. 93 NPC 117.
- Bouexière, I., Chevron, F., et Darmendrail, D.** 1994. Etude de faisabilité technique d'un traitement *in situ* d'une pollution par de l'azote en nappe libre. 1ère phase - Reconnaissances de terrain. Rapport BRGM - R 37960, 35p.
- Boussaid, A., Baleux, B., Hasani, L., et Lesne, J.** 1991. *Aeromonas* species in stabilization ponds in the arid region of Marrakesh, Morocco, and relation to fecal-pollution and climatic factors. *Microbiol. Ecol.* **21** : 11-20.

Boussaid, A., Landreau, A., Martin, G., et TALBO, H. 1985. Procédé de dénitrification des eaux souterraines. Expérimentation de Messac, Ille et Vilaine. Note B.R.G.M. - ISSN 543861 : 141-143.

Boussaid, F., Martin, G., Morvan, J., Collin, J.J., Landreau, A., et Talbo, H. 1988. Dénitrification *in situ* of groundwater with solid carbon matter. Environ. Technol. Lett. **9** : 803-816.

Bradley, P.M., et Chapelle, F.H. 1993. Arsenate inhibition of denitrification in nitrate contaminated sediments. Soil Biol. Biochem. **25** : 1459-1462.

Bradley, P.M., Aelion, C.M., et Vroblesky, D.A. 1992a. Influence of environmental factors on denitrification in sediment contaminated with JP-4 jet fuel. Groundwat. **30** : 843-848.

Bradley, P.M., Fernandez, M., Jr., et Chapelle, F.H. 1992b. Carbon limitation of denitrification rates in an anaerobic groundwater system. Environ. Sci. Technol. **26** : 2377-2381.

Braester, C., et Martinell, R. 1988. The Vyredox and Nitredox methods of *in situ* treatment of groundwater. Wat. Sci. Technol. **20** : 149-163.

Bremmer, J.M. 1986. Inhibition of nitrogen transformation in soil. *In* : Perspectives in microbial ecology - Proc. of the 4th international symposium, Ljubljana - 24-29 August 1986.

Burford, J.R., et Bremmer, J.M. 1975. Relations between the denitrification capacities of soils and total water soluble and readily decomposable soil organic matter. Soil. Biol. Biochem. **7** : 389-394.

Bystricky, V. 1970. Unusual micro-organisms from soil. Septième Congrès international de microscopie électronique de Grenoble, France.

Carberry, J.B., et Tenney, M.W. 1973. Luxury uptake of phosphate by activated sludge. J. Wat. Pollut. Control. Fed. **45** : 2444-2462.

Carpentier, B. et Cerf, O. 1993. Biofilms and their consequences with particular reference to hygiene in the food industry. J. Appl. Bact. **75** : 499-511.

Carr, G.J., Page, M.D., et Ferguson, S.J. 1989. The energy conserving nitric-oxide reductase system in *Paracoccus denitrificans*. Distinction from the nitrite reductase that catalysis synthesis of nitric oxide and evidence from trapping experiments for nitric oxides as free intermediate during denitrification. Eur. J. Biochem. **179** : 683-692.

Caulier, P., et Preaux, C. 1983. Recherches sur l'origine et le devenir des composés azotés détectés dans certains aquifères captifs. Rapport B.R.G.M. 83 NPC 38.

Chalupa, M. 1985. La dénitrification artificielle des eaux de nappe. *Conf. Nitrate dans les eaux*, 22-25 oct., Paris, 91-92.

Characklis, W.G. 1989. Microbial biofouling control. *In* : Biofilms. W.G. Characklis & K.C. Marshall (eds), Wiley Intersciences, New-York, p. 585-633.

✓ **Chaudry, G.R., et McGregor, C.H.** 1983. *Escherichia coli* nitrate reductase subunit A : its role as the catalytic site and evidence for its modification. *J. Bacteriol.* **154** : 387-394.

Clay, K.L., Murphy, R.C., et Watkins, W.D. 1975. Experimental methanol toxicity in the primate : analysis of metabolic acidosis. *Toxico. Appl. Pharmacol.* **34** : 49.

Collin, J.J., Landreau, A., Martin, J., et Talbo, H. 1984. Denitrification provoquée des eaux souterraines. Site expérimental de Messac (Ille et Vilaine). *Princ. Res. Sci. Tech. BRGM* : 195-197.

Communauté Urbaine de Dunkerque (C.U.D.D.) 1994. Livre blanc de l'environnement. Charte pour la qualité de l'environnement de la région Flandre-Dunkerque. *Cellules environnement* (eds), p. 7.

Coyne, M.S., Arunakumari, A., Averill, B.A., et Tiedge, J.M. 1989. Immunological identification and distribution of dissimilatory heme cd1 and nonheme copper nitrite reductases in denitrifying bacteria. *App. Environ. Microbiol.* **55** : 2924-2931.

Croll, B.T. 1985. Biological fluidized bed denitrification for potable water. *Advances in Water Engrg., Proc. of the Int. Symp., T.H.Y. Tebbut* (eds), London : 180-187.

Dahab, M.F., et Lee, P.Y. 1992. Nitrate reduction by *in-situ* bio-denitrification in groundwater. *Wat. Sci. Tech.* **26** : 1493-1502.

Daniel, R.M., Smith, I.M., Phillip, J.A.D., Ratclif, H.D., Drozd, J.W., et Bull, A.T. 1980. Anaerobic growth and denitrification by *Rhizobium japonicum* and other Rhizobia. *J. Gen. Microbiol.* **120** : 517-521.

Darmendrail, D., et Pernel, F. 1991. Site de Mazingarbe (62) - Etude de la pollution par l'azote et proposition des moyens de traitements. Rapport BRGM 33969 4S NPC 91 pour le Ministère de l'Environnement et le Ministère de l'Industrie et de la Recherche.

✓ **Davies, T.R.** 1973. Isolation of bacteria capable of utilizing methane as a hydrogen donor in the process of denitrification. *Wat. Res.* **7** : 575-579.

Dawson, R., et Murphy, K. 1972. The temperature dependency of biological denitrification. *Wat. Res.* **6** : 71-83.

✓ **Degremont,** 1989. Memento technique de l'eau. Technique et Documentation, Lavoisier (eds), Paris, 1459 p.

Delarminat, G., Deboves, J.J., et Cloret, D. 1990. L'eau, l'industrie, les nuisances **135** : 53-56.

Detay, M. 1991. Techniques modernes d'action sur les eaux souterraines - bilan et perspectives. XXI journées de l'Hydrauliques - Sophia Antipolis, 29-31 janvier 1991.

Dries, D., Liessens, J., Verstraete, W., Stevens, P., De Vost, P., et De Leyt, J. 1988. Nitrate removal from drinking water by means of hydrogenotrophic denitrifiers in a polyurethane carrier reactor. *Wat. Supply* **6** : 181-192.

Ellwood, D.C., Keewil, C.W., Brown, C.M., et Wardell, J.N. 1982. Surface associated growth. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **297** : 517-532.

Environnement Magazine 1995. Les chercheurs préparent le XXIème siècle. N°**1543**, 29 décembre : 58-68.

Eppler, D., et Eppler, A. 1988. A new method for the biological denitrification of groundwater. *Nat. Resour. Dev.* **27** : 96-102.

Erickson, L.E., Fan, L.T., Dhanan, S., et Tuitemwon, GP. 1990. Modeling , analysis, simulation and bioremediation of soil and water. *In* : Proceedings of conference on hazardous waste research. L.E. ERICKSON (eds), Kansas State Univ.- Manhattan, Kansas, p. 17-46.

Farrah, H., et Pickering, W.F. 1977. Influence of clay-solute interactions on aqueous heavy metal ion levels. *Wat. Air Soil Poll.* **8** : 189-197.

Ferguson, S.J. 1994. Denitrification and its control. *Antonie van Leewenhoek* **66** : 89-110.

Focht, D.D., et Chang, A.C. 1975. Nitrification and denitrification processes related wastewater treatment. *Adv. Appl. Microbiol.* **19** : 153-186.

Garland, P., Downie, J., et Haddock, B. 1975. Proton translocation and the respiratory nitrate reductase of *Escherichia coli*. *Biochem. J.* **152** : 547-559.

Gauntlett, R.B., et Craft, D.G. 1979. Biological removal of nitrate from river water. Rep. TR 98, Wat. Res. Center, Medmenham.

Gayle, B.P., Boardman, G.D., Sherrard, J.H., et Benoit, R.E. 1989. Biological denitrification of water. *J. Environ. Engin.* **115** : 930-943.

Gerber, A., Mostert, E.S., Winter, C.T., et De Villeirs, R.H. 1986. The effect of acetate and other short-chain carbon compounds on the kinetics of biological nutrient removal. *Wat. S.A.* **12** : 7-12.

Germon, J.C., et Henault, C. 1994. Quantifier la dénitrification et la production naturelle de N₂O dans les sols. Synthèse bibliographique. Rapport pour le Ministère de l'Environnement - Direction de la Recherche et des Affaires Economiques et Internationales, 34 p.

Germonpré, R. et al. 1991. Methylo-trophic and hydrogenotrophic denitrification at the Blankaart plant. Preprints IWSA work-shop inorganic nitrogen compounds and water supply, Hamburg, Germany, 27-29 novembre.

Germonpré, R. , Liessens, J., et Verstraete, W. 1991. Fluidised bed denitrification of drinking water with methanol - pilot plant experience. Int. Symp. Environ. Biotechnol., Oostende, Belgique, 22-25 avril.

Ginocchio, J. 1983. Process and apparatus for the biological denitrification of groundwater. Eur. Patent Appl. EP 86863 A1.

Godden, J.W., Turley, S., Teller, D.C., Adam, E.T., Liu, M.Y., Payne, W.J., et Legall, J. 1991. The 2.3 Anstrom X-ray structure of nitrite reductase from *Achromobacter cycloclastes*. Sci. 253 : 438-442.

Golik, I., Modai, D., Gluskin, I., Schechter, I., Cohen, N., et Eschchar, J. 1990. *Aeromonas* in adult diarrhea. J. Clinic Gastroent. 12 : 148-152.

Gonçalves, R.F., Le Grand, L., et Rogalla, F. 1994. Biological phosphorus uptake in submerged biofilters with nitrogen removal. Wat. Sci. Tech. 29 : 135-143.

Goretski, J., et Hollocher, T.C. 1990. The kinetic and isotopic competence of nitric oxide as an intermédiaire in denitrification. J. Biol. Chem. 265 : 889-895.

Grenn, M., Loewenthal, R.E., Schnitzer, M., et Tarre, S. 1994. Denitrification of drinking water - A bioenergetic evaluation. Wat. S.A. 20 : 223-230.

Hambusch, B., et Werner, P. 1989. Wom wasser 72 : 235-247.

Hamer, G. 19. The functioning of a microbial consortium for bioremediation. In : Annals New-York Academy of Sciences, p. 435-438.

Hammer, B. 1993. Les français et l'environnement : agoramétrie, sémiométrie, eurosociostyles. Grets, EDF-DER.

Hanaki, K., Wantawin, C., et Ohgati, S. 1990. Wat. Res. 24 : 289-296.

Hanaki, K., Hong, Z., et Matsuo, T. 1992. Production of nitrous oxide gas during denitrification of wastewater. Wat. Sci. Tech. 26 : 1027-1036.

Hebert, J., Machet, J.M., et Remy, J.C. 1981. Recherches sur la contamination des nappes par les nitrates. Etude de l'évolution dans le sous-sol et le substratum géologique d'un sol de grande culture. Rapport I.N.R.A. n° 74-26 pour le Ministère de l'Environnement.

Henze, M. 1989. Carbon sources for denitrification of wastewater. Seminar on nutrients removal from Municipal Wastewaters, 4-6 September 1989. Tampere University, Tampere, Finland.

Hill, M.J., Howksworth, G., et Tattersall, G. 1973. Bactéria, nitrosamins and cancer of the stomach. Br. J. Cancer. 28 : 562-567.

- Hiscock, K.M., Lloyd, J.W., et Lerner, D.N.** 1991. Review of natural and artificial denitrification of groundwater. *Wat. Res.* **9** : 1099-1111.
- Hochstein, L.I.** 1993. The membrane-bound enzymes of the *archaea*. In : The biochemistry of *Archeae*. Kates M. *et al.* (eds), Elsevier Science Publishers B.V., p. 277-323.
- Hochstein, L.I., et Tomlinson, G.A.** 1988. The enzymes associated with denitrification. *Ann. Rev. Microbiol.* **42** : 231-261.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., et Williams, S.T.** 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9e edition. Holt J.G. *et al.* (eds), Baltimore, USA, p. 87-90.
- Hoover, S.R., and Porgess, N.** 1952. Assimilation of dairy wastes by activated sludge. *Sew. Ind. Wastes* **24** : 306-312.
- Howard, K.W.F.** 1985. Denitrification in a major limestone aquifer. *J. Hydrol.* **76** : 265-280.
- I.f.e.n.** 1994. L'environnement en France. Edition 1994-1995. Dunod et I.f.e.n. (eds), Paris, 399p.
- Isaacs, S.H., et Henze, M.** 1995. Controlled carbon source addition to an alternating nitrification - denitrification wastewater treatment process including biological P removal. *Wat. Res.* **29** : 77-89.
- Jansen, J., la Cour, S.E., et Dahlgren-Laursen, K.** 1994. Carbon utilisation in denitrifying biofilters. *Wat. Sci. Tech.* **29** : 101-109.
- Jechlinger, G., Schöller, F., Seidelberger, F., et Zibuschka, F.** 1992. Denitrification *in-situ*. *Wat. Supply* **10** : 101-110.
- Jenkins, O., Byrom, D., et Jones, D.** 1987. *Methylophilus* : a new genus of methanol-utilizing bacteria. *Int. J. Syst. Bact.* **37** : 446-448.
- Jones, A.M., Hollocher, T.C., et Knowles, R.** 1992. Nitrous oxide reductase of *Flexibacter canadensis* : a unique membrane-bound enzyme. *FEMS Microbiol. Lett.* **92** : 205-210.
- Kern-Jerpensen, J.P., et Henze, M.** 1992. Biological phosphorus uptake under anoxic and aerobic conditions. *Wat. Res.* **27** : 617-624.
- Kerstens, I., Huys, G., Van Duffel, H., Vancanney, M., Kersters, K., et Verstraete, W.** 1996. Survival potential of *Aeromonas hydrophila* in freshwaters and nutrient poor waters in comparison with other bacteria. *J. Appl. Bact.* **80** : 266-276.
- Kerstens, I., Van Vooren, L., Huys, G., Janssen, P., Kersters, K., et Verstraete, W.** 1995. Influence of temperature and process technology on the occurrence of *Aeromonas* species and hygienic indicator organisms in drinking water production plants. *Microbiol. Ecol.* **30** : 203-218.

- Keyvan-Larijarni, H. et Tannenberg, A.M.** 1974. Methanol intoxication. *Arch. Int. Med.* **134** : 293.
- Knowles, R.** 1982. Denitrification. *Microbiol. Rev.* **46** : 43-70.
- Krieg, N.R.** 1984. Aerobic/microaerophilic, motile, helical/vibrioid gram-negative bacteria. *In* : Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol I. Krieg N.R. (eds), Baltimore, USA, p. 72-90.
- Kruithof, J.C., Van Paassen, J.A.M., Iijnen, W.A.U., Dierx, H.A.L., et Van Bennekon, C.A.** 1985. Experiences with nitrate removal in the eastern Netherlands. *Conf. Nitrate dans les eaux*, 22-25 oct., Paris, 88-90.
- Krul, J.M., et Veeningen, R.** 1977. The synthesis of the dissimilatory nitrate reductase under aerobic conditions in a number of denitrifying bacteria, isolated from activated sludge and drinking water. *Wat. Res.* **11** : 39-43.
- ✓ **Kucera, I.** 1992. Oscillations of nitric oxide concentration in the perturbed denitrification pathway of *Paracoccus denitrificans*. *Biochem. J.* **286** : 111-116.
- ✓ **Kucera, I., Dadak, V., et Dobry, R.** 1983. The distribution of redox equivalents in the anaerobic respiratory chain of *Paracoccus denitrificans*. *Eur. J. Biochem.* **130** : 359-364.
- Kucera, I., Matyasek, R., Dvorakova, J., et Dadak, V.** 1986. Anaerobic adaptation of *Paracoccus-denitrificans* : sequential formation of denitrification pathway and changes in activity of 5-aminolevulinate synthase and catalase. *Curr. Microbiol.* **13** : 107-110.
- Kurt, M., Dunn, I., et Bourne, J.R.** 1987. Biological denitrification of drinking water using autotrophic organisms with H₂ in a fluidized biofilm reactor. *Biotechnol. Bioengng* **29** : 493-501.
- Lallemand-Barres, A.** 1993. Guide pratique d'échantillonnage des eaux souterraines. Rapport BRGM R 37390 ENV-4S-93, 95 p.
- Lallemand-Barres, A., et Bonnin, H.** 1989. Depollution des sols et des nappes pollués par des composés organiques. Rapport B.R.G.M. 89 SGN 590 EEE pour le Ministère de l'Industrie et de l'Aménagement du territoire.
- Lauch, R.P., et Guter, G.A.** 1986. *J. Am. Wat. Works Assoc.* **78** : 83-88.
- Lazarova, V., Capdeville, B., et Nikolov, L.** 1994. Influence of seeding conditions on nitrite accumulation in a denitrifying fluidized bed reactor. *Wat. Res.* **28** : 1189-1197.
- Leblanc, C.** 1978. Thèse de Docteur Ingénieur, Rennes ENSCR, p. 84-85.
- Lecomte, P.** 1995. Les sites pollués - traitement des sols et des eaux souterraines. Lavoisier (eds), Paris, 198 p.

- Lehninger, A.L.** 1970. Glycolysis. *In* : Biochemistry. Worth, New York, p. 313-335.
- Lemoine, D., Jouenne, T. et Junter, G.A.** 1988. *Biotechnol. Lett.* **13** : 399-402.
- Leroy, J.B.** 1986. La pollution des eaux. Que sais-je n°983, Presses universitaires de France, 3ème édition corrigée, 128 p.
- Levy, G., et Toutain, F.** 1979. Aération et phénomènes d'oxydoréduction dans le sol. *In* : *Pedologie*, Duchaufour et Souchier. Masson (eds), tome 2, p. 313-323.
- Lind, A.M.** 1983. Nitrate reduction in the subsoil. *In* : *Denitrification in the nitrogen cycle*. H.L. Golterman (eds), New York, p. 145-156.
- Liessens, J., Germonpré, R., et Verstraete, W.** 1989. Comparative study of processes for the biological denitrification of drinking water. *Med. Fac. Landbouww., Rijksuniv., Gand, Belgique*, 54.
- Liessens, J., Germonpré, R., Kersters, I., Beernaert, S., et Verstraete, W.** 1993. Removing nitrate with a methylotrophic fluidized bed : microbiological water quality. *J. AWWA* **85** : 155-161
- Liessens, J., Germonpré, R., et Verstraete, W.** 1989. Comparative study of biological denitrification of drinking water. *Proc. Forum for appl. Biotechnol., Gent, Belgique*, 24 septembre.
- Luft, J.H.** 1961. Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **9** : 408-414.
- Malik, K.A.** 1988. A new freeze-drying method for the preservation of nitrogen-fixing and other fragile bacteria. *J. Microbiol.; Meth.* **8** : 259-271.
- Mariotti, A.** 1990. La dénitrification *in-situ* dans les eaux souterraines, processus naturels ou provoqués. Rapport de synthèse établi pour le groupe Azote du SRETIE - Ministère de l'Environnement - convention n°90386, 61 p.
- Marsh, J.M.** 1978. The hydrochemistry of some british aquifers with special reference to trace elements. Thèse de Doctorat de l'Université de Birmingham, Birmingham.
- Marshall, K.C.** 1992. Biofilms : an overview of bacterial adhesion, activity and control at surfaces. *Amer. Soc. Microbiol. News* **8** : 202-207.
- Martin, G.** 1979. Le problème de l'azote dans les eaux. *Technique & Documentation* (eds), Paris, 279p.
- Mateju, V., Cizinska, S., Krejci, J., et Janoch, T.** 1992. Biological water denitrification. A review. *Enz. Microbiol. Technol.* **14** : 170-183.

McCarty, P.L. 1971. Energetics and bacterial growth. *In* : Organic compounds in aquatic environments. Faust, S.D. and Hunter, J.V. (eds), Decker, New York.

McCarty, P.L. 1982. One hundred years of anaerobic treatment. *In* : Anaerobic digestion. Hughs, D.E., Stafford, D.A., Wheatley, B.I., Baader, W., Lettinga, G., Nyns, E.J., Verstraete, W. and Wentworth, R.L. (eds), Oxford, New York, p. 3-22.

McElhammon, W.S., et Mills, H.A. 1981a. Suppression of denitrification with nitrapyrin. *HortSci.* **16** : 530-531.

McElhammon, W.S., et Mills, H.A. 1981b. Inhibition of denitrification by nitrapyrin with field-grown sweet corn. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* **106** : 673-677.

McElhammon, W.S., Mills, H.A., et Bush, P.B. 1984. Simazine and atrazine - suppression of denitrification. *HortSci.* **19** : 218-219.

McEvan, A.G., Wetzstein, H.G., Meuer, O., Jackson, J.B., et Ferguson, S.J. 1987. The periplasmic nitrate reductase of *Rhodobacter capsulatus* ; purification, characterization and distinction from a single reductase for trimethylamine-N-oxide, dimethylsulphoxide and chlorate. *Arch. Microbiol.* **147** : 340-345.

McFeters, G.A., Bazin, M.J., Bryers, J.D., Caldwell, D.E., Characklis, W.G., Lund, D.B., Mirelman, D., Mitchell, R., Subert, R.H.W., Tanaka, T., et White, D.C. 1984. Biofilm development and its consequences : group report. *In* : Microbial adhesion and aggregation. K.C. Marshall (eds), Springer Verlag, New York, p. 109-124.

Mercado, A., Libhaber, M., et Soares, M.I.M. 1988. *In situ* biological groundwater denitrification : concepts and preliminary field tests. *Wat. Sci. Tech.* **20** : 197-203.

✓ **Michalski, W.P., et Nicholas, D.J.D.** 1984. The adaptation of *Rhodopseudomonas sphaeroides f. sp. denitrificans* for growth under denitrifying conditions. *J. Gen. Microbiol.* **147** : 340-345.

Mitsutoshi, N., Hayamisu, T., et Nishimura, N. 1984. Effects of oxygen concentration on the rates of denitrification and denitrification in the sediments of an eutrophic lake. *Wat. Res.* **8** : 213-219.

Moore, S.F., et Schroeder, E.D. 1970. An investigation of the effects of residence time on anaerobic bacterial denitrification. *Wat. Res.* **4** : 685.

✓ **Morpeth, F.F., et Boxer, D.H.** 1985. Kinetic analysis of respiratory nitrate reductase from *E. coli* K12. *Biochem.* **24** : 40-46.

✓ **Morris, J.T., Whiting, G.J., et Chapelle F.H.** 1988. Potential denitrification rates in deep sediments from southeastern coastal plain. *Environ. Sci. Technol.* **22** : 832-836.

Mulbarger, H.C. 1987. Nitrification and denitrification in activated sludge. *J. Wat. Pollut. Control. Fed.* **43** : 2059-2070.

Mulder, A., van de Graaf, A.A., Robertson, L.A., et Kuenen, J.G. 1985. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. FEMS Microbiol. Ecol. **16** : 177-184.

Mycielski, R., Blaszczyk, M., Jackowska, A., et Olkowska, H. 1983. Denitrification of high concentrations of nitrites and nitrates in synthetic medium with different sources of organic carbon. Acta Microbiol. Pol. **32** : 381-388.

Nelson, L.M., et Knowles, R. 1978. Effect of oxygen and nitrate on nitrogen fixation and denitrification by *Azospirillum brasilense* grown in continuous culture. Can. J. Microbiol. **24** : 1395-1403.

Neytzell, F., et DeWilde, G. 1977. Wat. S.A. **3** : 113-143.

Nicolazo, J.L. 1994. Les Agences de l'Eau. P. Johanet & fils (eds), Paris, 207 p.

Nishiyama, N., Suzuki, J., Kukimoto, M., Ohnuti, T., Horinouchi, S., et Beppu, T. 1993. Cloning and characterization of a nitrite reductase gene from *Alcaligenes faecalis* and its expression in *Escherichia coli*. J. Gen. Microbiol. **139** : 725-733.

Nitisovarut, S., et Yang, P.Y. 1992. Denitrification of nitrate-rich water using entrapped-mixed-microbial cells immobilization technique. Wat. Sci. Tech. **26** : 923-931.

Odegaard, H. 1994. Futures strategies for the removal of nitrogen in municipal wastewaters. : 110-115. --

Ohtake, H., Takahashi, K., Tsuzuki, Y. et Toda, K. 1988. Uptake and release of phosphate by a pure culture of *Acinetobacter calcoaceticus*. Wat. Res. **19** : 1587-1594.

Ouvrage collectif 1990. Le traitement des eaux et des déchets par des procédés biotechnologiques. Innovation 128. Centre de prospective et d'études. Ministère de la Recherche et de la Technologie, 273p.

Paoletti, A. 1983. Facteurs biologiques d'autoépuration des eaux de mer, points clairs et points obscurs d'une question discutée. Rev. Int. Ocean. Med. **18** : 33-68.

Park, Y., et Hegeman, G. 1984. The oxydation of carbon monoxide by bacteria. In : Microbial Chemoautotrophy, W.R. Strohl and O.H. Tuovinen (eds), Ohio State Univ. Press, Columbus, Ohio.

Payne, W.J. 1981. Chapter 10 : denitrification as a factor in soil science : general properties. In : Denitrification. John Wiley & Sons (eds), New york, p. 118-133.

Pelmont, J. 1993. Bactéries et Environnement - Adaptations physiologiques. Presses universitaires de Grenoble (eds), 899p.

Pfützner, J., et Schlegel, H.G. 1993. Denitrification by *Hydrogenomonas eutropha* Stamm H16. Arch. Microbiol. **90** : 199-211.

Powelson, D.S., Brookes, P.C., et Jenkinson, D.S. 1987. Measurement of soil biomass provides an early indication of changes in total soil organic matter due to straw incorporation. Soil Biol. Biochem. **19** : 159-164.

Rabinowitz, B. 1985. The role of specific substrates in excess biological phosphorus removal. Ph. D. Thesis, University of Columbia, Vancouver, British Columbia.

Ratledge, C., et Wilkinson, S.G. 1988. Microbial lipids, Vol. I, Academic press, London.

Reasoner, D.J., et Geldreich, E.E. 1985. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. Appl. Environ. Microbiol. **49** : 1-7.

Reynolds, E.S. 1963. The use of lead citrate of high pH as an electron-opaque stain in microscopy. J. Cell. Biol. **17** : 208-213.

Richard, Y., et Leprince, A. 1980. L'azote dans le traitement des eaux potables - les traitements biologiques. T.S.M. - L'eau **4** : 167-170.

Richard, Y.R. 1989. Operating experiences of full-scale biological and iron ex-change denitrification plants in France. J. Inst. Wat. Envir. Mgmt. **3** : 154-167.

Richardson, D.J., et Ferguson, S.J. 1992. The influence of carbon substrate on the activity of the periplasmic nitrate reductase in aerobically grown *Thiosphaera pantotropha*. Arch. Microbiol. **147** : 340-345.

Richardson, D.J., McEvan, A.G., Page, M.D., Jackson, J.B., et Ferguson, S.J. 1990. The identification of cytochromes involved in the transfer of electrons to periplasmic NO₃-reductase of *Rhodobacter capsulatus* and resolution of a soluble NO₃- reductase-cytochrome-c₅₅₂ redox complex. Eur. J. Biochem. **194** : 263-270.

Robertson, L.A., et Kuenen, J.G. 1984. Aerobic denitrification : a controversy revived. Arch. Microbiol. **139** : 351-354.

Robertson, L.A., Cornelisse, R., De Vos, P., Hadjioetomo, R., et Kuenen, J.G. 1989. Aerobic denitrification in various heterotrophic nitrifiers. Antonie Van Leeuwenhoek **56** : 289-299.

Robertson, L.A., et Kuenen, J.G. 1992. The effect of electron acceptor variations on the behavior of *Thiosphaera pantotropha* and *Paracoccus denitrificans* in pure and mixed cultures. FEMS Microbiol. Ecol. **86** : 221-228.

Rogalla, F., Ravarini P., De Larminat, G., et Coutelle, J. 1990. Large-scale biological nitrate and ammonia removal. J. Inst. Wat. Envir. Mgmt. **4** : 319-329.

Ryhiner, G., Sorensen, K., Birou, B., et Gros, H. 1994. Biofilms reactors configuration for advanced nutrient removal. *Wat. Sci. Tech.* **29** : 111-117.

Ryter, A., et Kellenberger, E. 1958. Etude en microscopie électronique de plasmas contenant l'acide désoxyribonucléique. *J. Nat. Forsch.* **13** : 597-607.

Sabaty, M. 1993. Régulation de la dénitrification chez *Rhodobacter sphaeroides f. sp. denitrificans* : synthèse protéique et transfert d'électrons. Thèse d'Université - Biologie cellulaire et microbiologie. Aix-Marseille II.

Sabaty, M., Gagnon, J., et Vermeglio, A. 1994. Induction by nitrate and nitrous oxide of cytoplasmic and periplasmic proteins in the photodenitrifier *Rhodobacter sphaeroides f. sp. denitrificans* in anaerobic or aerobic conditions. *Eur. J. Biochem.*, in press.

Sacks, L. E. et Barker, H. 1949. The influence of oxygen on nitrate and nitrite reduction. *J. Wat. Pollut. Contr. Fed.* **58** : 11-22.

Sann, R., Kostka, S., et Friedrich, B. 1994. A cytochrome cd₁-type nitrite reductase mediates the first step of denitrification in *Alcaligenes eutrophus*. *Arch. Microbiol.* **161** : 453-459.

Schwartzbrod, J., et Martin, G. 1985. Les micro-organismes, agents biogéochimiques. *In* : Point sur l'épuration et le traitement des effluents (eau-air). Lavoisier (eds), Paris, Vol. 2, p. 1-46.

Sears, J.H., Ferguson, S.T., Richardson, D.J., et Spiro, S. 1993. The identification of a periplasmic nitrate reductase in *Paracoccus denitrificans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **113** : 107-112.

Selenka, F., et Dressler, R. 1990. Microbiological and chemical investigations on a biological, autotrophic denitrification plant using hydrogen as an energy source. *Aqua.* **39** : 107-116.

Selenka, F., Hack, A., et Heuser, H.P. 1986. Bakteriologische Vorgänge bei der unterirdischen Aufbereitung von nitratreichen Grundwasser bei Zufuhr von aufbereitetem Abwasser oder Erdgas. *DVGW - Schriftenreihe Wasser* **106** : 117-130.

Shapleigh, J.M., et Payne, W.J. 1985. Differentiation of c, d₁ cytochromes and copper nitrite reductase in *Alcaligenes eutrophus* H16. *J. Bacteriol.* **175** : 5867-5876.

Shimizu, T., Furiki, T., Waki, T., et Ichikawa, K. 1978a. Metabolic characteristics of denitrification by *Paracoccus denitrificans*. *J. Ferm. Technol.* **56** : 207-213.

Shimizu, T., Sakamoto, Y., Waki, T., and Ichikawa, K. 1978b. Kinetic study of denitrification by *Paracoccus denitrificans*. *J. Ferm. Technol.* **56** : 214-223.

Siddiqui, R.A., Warnecke, U., Hengsberger, A., Schneider, B., Kostka, S., et Friedrich, B. 1993. Structure and function of a periplasmic nitrate reductase in *Alcaligenes eutrophus* H 16. *J. Bacteriol* **175** : 5867-5876.

Skerman, V.B.D., et McRae, I.C. 1957. The influence of oxygen availability on the degree of nitrate reduction by *Pseudomonas denitrificans*. *Can. J. Microbiol.* **3** : 505-530.

Slater, J.H. 1981. Mixed culture fermentations. J.M. Lynch & J.E. Hobbie (eds), Academic Press, New York, p. 1.

Snyder, S.W., et Hollocher, T.C. 1987. - Purification of some characteristics of nitrous oxide reductase from *Paracoccus denitrificans*. *J. Biol. Chem* **262** : 6515-6525.

Soares, M.I.M., Belkin, S., et Abeliovich, A. 1988. Biological groundwater denitrification : laboratory studies. *Wat. Sci. Technol.* **20** : 189-195.

Sorensen, J. 1987. Nitrate reduction in marine sediment : pathway and interaction with iron and sulfur cycling. *Geomicrobiol. J.* **5** : 401-421.

Steward, V. 1988. Nitrate respiration in relation to facultative metabolism in *Enterobacteria*. *Microbiol. Rev.* **52** : 190-232.

Stouthamer, A.H. 1990. Metabolic regulation including anaerobic metabolism in *Paracoccus denitrificans*. *J. Bioenerg. Biomemb.* **23** : 163-185.

Stouthamer, A.H. 1992. Metabolic pathways of *Paracoccus denitrificans* and closely related bacteria in relation to the phylogeny of procaryotes. *Antonie van Leeuwenhoek Int. J.* **61** : 1-33.

Stouthamer, A.H. 1988. Dissimilatory reduction of oxidized nitrogen compounds. In : *Biology of anaerobic microorganisms*. A.J. Zehnder (eds), New York, p. 245-303.

Stouthamer, A.H., et Bettenhausen, C.W. 1973. *Biochim. Biophys. Acta* **301** : 53-70.

Tam, N.F.Y., Wong, Y.S., et Leung, G. 1992. Significance of external carbon sources on simultaneous removal of nutrients from wastewater. *Wat. Sci. Technol.* **26** : 1047-1055.

Terasaki, Y. 1972. - Studies on the genus *Spirillum* Ehrenberg. I - Morphological physiological and biochemical characteristics of water *Spirilla*. *Bull. Suzugamine Women's Coll., Nat. Sci.* **6** : 1-146.

Thiem, S.M., Krumme, M.L., Smith, R.L., et Tiedje, J.M. 1994. Use of molecular techniques to evaluate the survival of a micro-organism injected into an aquifer. *Appl. Environ. Microbiol.* **60** : 1059-1067.

Thiery, J.P. 1967. Mise en évidence des polysaccharides sur coupe fine en microscopie électronique. *J. Microsc.* **67** : 987-1018.

Tiedje, J.M., Colwell, R.K., Grossman, Y.L., et al. 1989. The planned introduction of genetically engineered organisms : ecological considerations and recommendations. *Ecol.* **70** : 298-315.

✓ **Timkovitch, R., Dhesi, R., Martinkus, K.J., Robinson, K.J., et Rea, T.M.** 1982. - Isolation of *Paracoccus denitrificans* cytochrome cd₁ : comparative kinetics with others nitrite reductases. *Arch. Biochem. Biophys.* **125** : 47-58.

Timmermans, P., et Van Haute, A. 1983. Denitrification with methanol - Fundamental study of the growth and denitrification capacity of *Hyphomicrobium* sp. *Wat. Res.* **17** : 1249-1259.

Van de Graaf, A.A., de Bruijn, P., Robertson, L.A., Kuenen, J.G., et Mulder, A. 1991. Biological oxidation of ammonium under anoxic conditions : Anammox process. *Proc. Int. Symp. Environ. Technol. II.* H. Verachtert and W. Verstraete (eds), p. 667-670.

Van de Graaf, A.A., Mulder, A., Slijkhuis, H., Robertson, L.A., et Kuenen, J.G. 1990. Anoxic ammonium oxidation. *Proc. 5th Eur. Congress Biotechnol. I.* C. Christiansen, L. Munck and J. Villadsen (eds), p. 338-391.

Vossoughi, M., Laroche, M., Navarro, J.M., Faup, G., et Leprince, A. 1982. Continuous denitrification by immobilized cells. *Wat. Res.* **16** : 995-1002.

Walker, R. 1990. *Food Add. Contam.* **7** : 717-768.

Wardle, D.A. 1992. A comparative assessment of factors which influence microbial biomass carbon and nitrogen levels in soil. *Biol. Rev.* **67** : 321-358.

Warnecke-Eberz, U., et Friedrich, B. 1993. Three nitrate reductase activities in *Alcaligenes eutrophus*. *Arch. Microbiol.* **159** : 405-409.

Wentzell, M.C., Ekamz, G.A., et Marais, GvR. 1992. Processes and modelling of nitrification denitrification biological excess phosphorus removal systems - A review. *Wat. Sci. Technol.* **25** : 59-82.

Werber, W.J., Jr, et Corseuil, H.X. 1994. Inoculation of contaminated subsurface soils with enriched indigenous microbes to enhance bioremediation rates. *Wat. Res.* **28** : 1407-1414.

Whittenbury, R., Davies, S.L., et Davey, J.F. 1970. Exospores and cysts formed by methane-utilizing bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **61** : 219-226.

Whittenbury, R., et Krieg, N.R. 1984. Family IV. *Methylococcaceae*. *In* : Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. I. Krieg N.R. (eds), Baltimore, USA, p. 256-261.

Wilderer, P.A., Jones, W.L., et Dan, U. 1987. Competition in denitrification systems affecting reduction rate and accumulation of nitrite. *Wat. Res.* **21** : 239-245.

Wu, Q., Knowles, R., et Niven, D.F. 1994. O₂ regulation of denitrification in *Flexibacter canadensis*. Can. J. Microbiol. **40** : 916-921.

Yanagita, T. 1990. Interactions in the microbial community. In : Natural microbial communities. Springer-Verlag (eds), p. 261-273

Yull-Rhee, G., et Futts, G.W. 1978. Wastewater denitrification with one carbon compounds as energy source. J. Wat. Poll. Control. Fed. **50** : 2111-2119.

Zehnder, A.J.B., et Stumm, W. 1988. - Geochemistry and biogeochemistry of anaerobic habitats. In : Biology of anaerobic microorganisms. A.J. Zehnder (eds), New York, p. 1-36.

Zennara, E., Ciabatti, I., Cutruzolla, F., d'Alessandro, R., et Silvestrini, M.C. 1993. The nitrite reductase gene of *Pseudomonas aeruginosa* : effects of growth conditions on the expression and construction of a mutant by gene disruption. FEMS Microbiol. Lett. **109** : 243-250.

Zobell, C.E. 1943. The effect of solid surfaces upon bacterial activity. J. Bacteriol. **46** : 39-56.

✓ Zumft, W.G., Dreusch, A., Löchelt, S., Cuypers, H., Friedrich, B., et Schneider, B. 1992. Derived amino-sequences of the NosZ gene (respiratory N₂O reductase) from *Alcaligenes eutrophus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas stutzeri* reveal potential copper-binding residus. Eur. J. Biochem. **208** : 31-40.

Zumft, W.G., Gotzmann, D.J., et Kroneck, P.M.H. 1987. Type I, blue copper proteins constitute a respiratory nitrate-reducing system in *Pseudomonas aureofaciens*. Eur. J. Biochem. **168** : 301-307.

ANNEXES



**Dénitrification biologique d'une nappe phréatique
polluée par des composés azotés d'origine industrielle**

Liste des sigles

Annexe 1

LISTE DES SIGLES

ATP	adénosine triphosphate
B.R.G.M.	Bureau de Recherches Géologiques et Minières
C.M.A.	concentration maximale admissible (dimension : $M.L^{-3}$)
C.E.E.	Communauté Economique Européenne
Co	cobalt
Cu	cuiivre
CV	charge volumique (dimension : $M.T^{-1}.L^{-3}$)
D.C.O.	Demande Chimique en Oxygène (dimension : $M.L^{-3}$)
D.G.S.	Direction Générale de la Santé
D.I.R.E.N.	Direction Régionale de l'Environnement
D.J.A.	dose journalière admissible (dimension : T^{-1})
ΔG^o	variation de l'énergie libre dans les conditions standards
DL50	Dose statistique Létale pour 50% d'une population
DO ₆₀₀	Densité optique mesurée à 600 nm
D.R.I.R.E.	Direction Régionale de l'Industrie, de la Recherche et de l'Environnement
E.D.F.	Electricité de France
FAD	flavine adénosine dinucléotide
F.A.O.	Food Adversory Organization
Fe	fer
glc	glucose
H.P.A.	Hydrocarbures Polycycliques Aromatiques
Ifen	Institut français de l'environnement
j_0 ($j=0$)	1er jour d'expérimentation
k	constante d'affinité pour un substrat (dimension : $M.L^{-3}$)
Mo	molybdène
NaR	nitrate réductase
NF	norme française
$NH_4^+ / N-NH_4^+$	ion ammonium / azote ammoniacal
NiR	nitrite réductase
N_2	azote gazeux
NO	monoxyde d'azote
N_2O	dioxyde d'azote
$NO_2^- / N-NO_2^-$	nitrite / azote nitreux
$NO_3^- / N-NO_3^-$	nitrate / azote nitrique
O.M.S.	Organisation Mondiale de la Santé
PCA	plate count agar
PHB	polyhydroxybutyrate
P.I.B.	Produit intérieur brut
PO_4^{3-}	orthophosphates
r^2	coefficient de corrélation
TCH	thiocarbohydrazide
TSH	temps de séjour hydraulique (dimension : T)
μ	taux de croissance (dimension : T^{-1})
$v_{max(x)}$	vitesse maximale observée lors du métabolisme du composé x (dimension : $M.T^{-1}$)

**Dénitrification biologique d'une nappe phréatique
polluée par des composés azotés d'origine industrielle**

Etude bibliographique

Annexe 2

Pilotes de dénitrification *in situ*

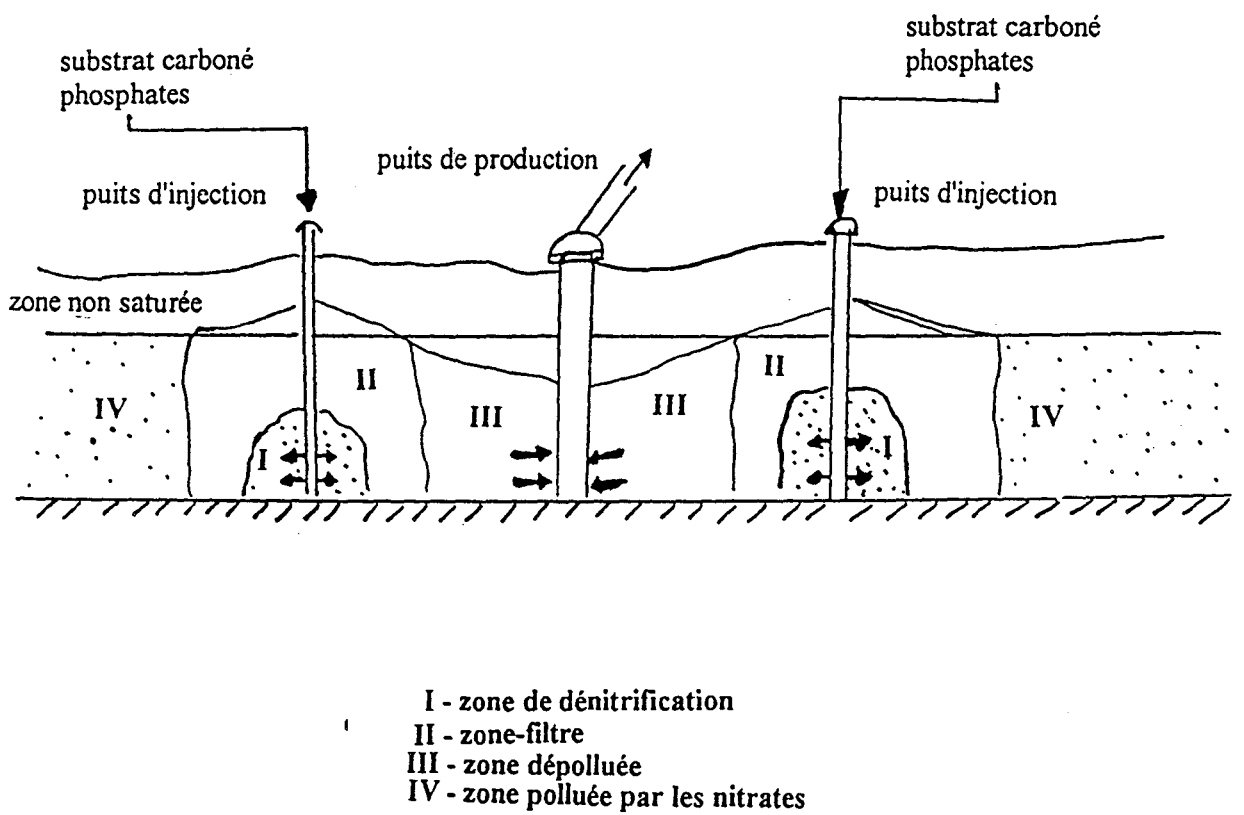


Figure 1 - Le système Daisy (d'après Mercado *et al.*, 1989)

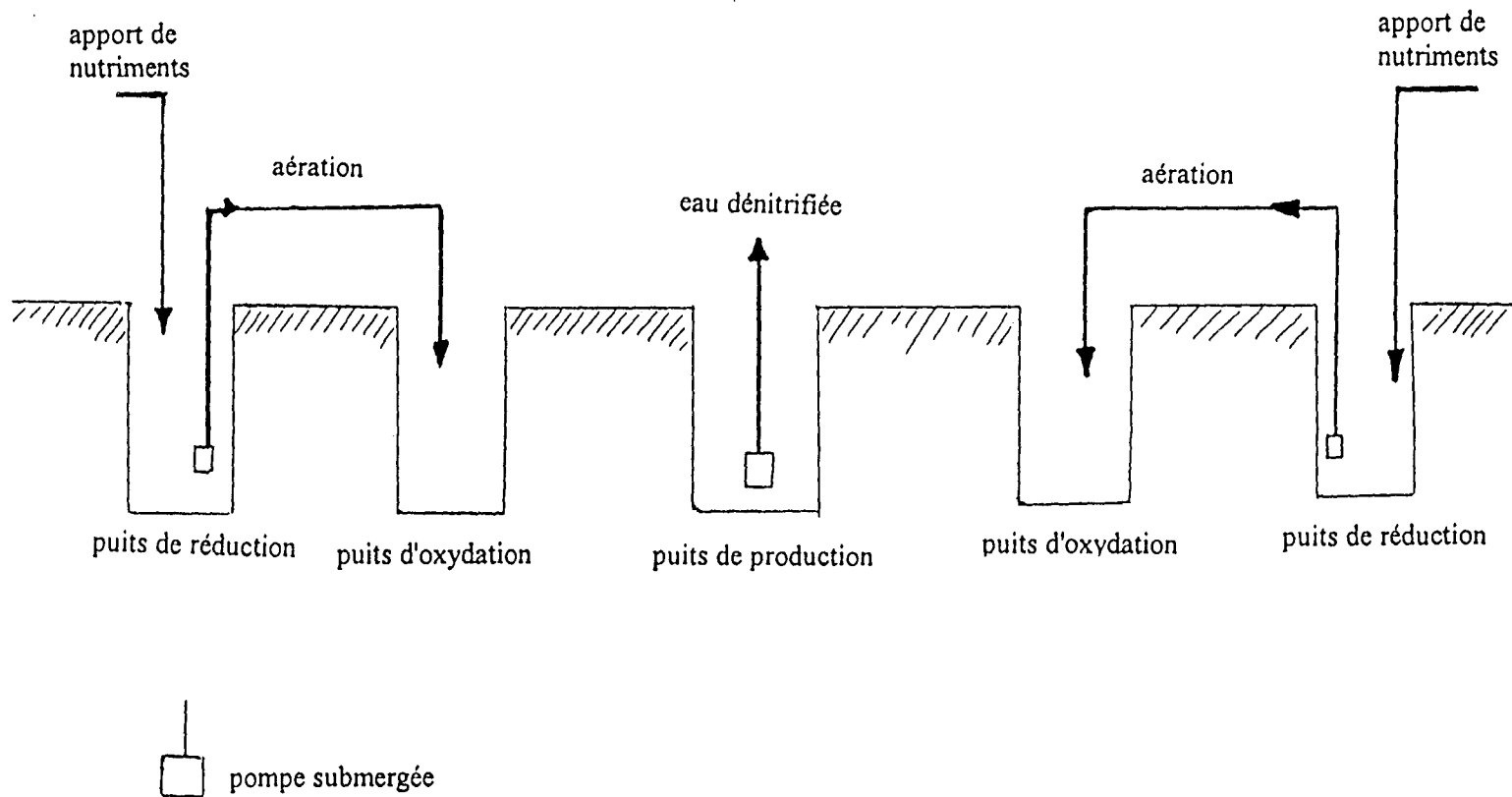


Figure 2 - Le système Nitredox (d'après Braester et Martinell, 1982)

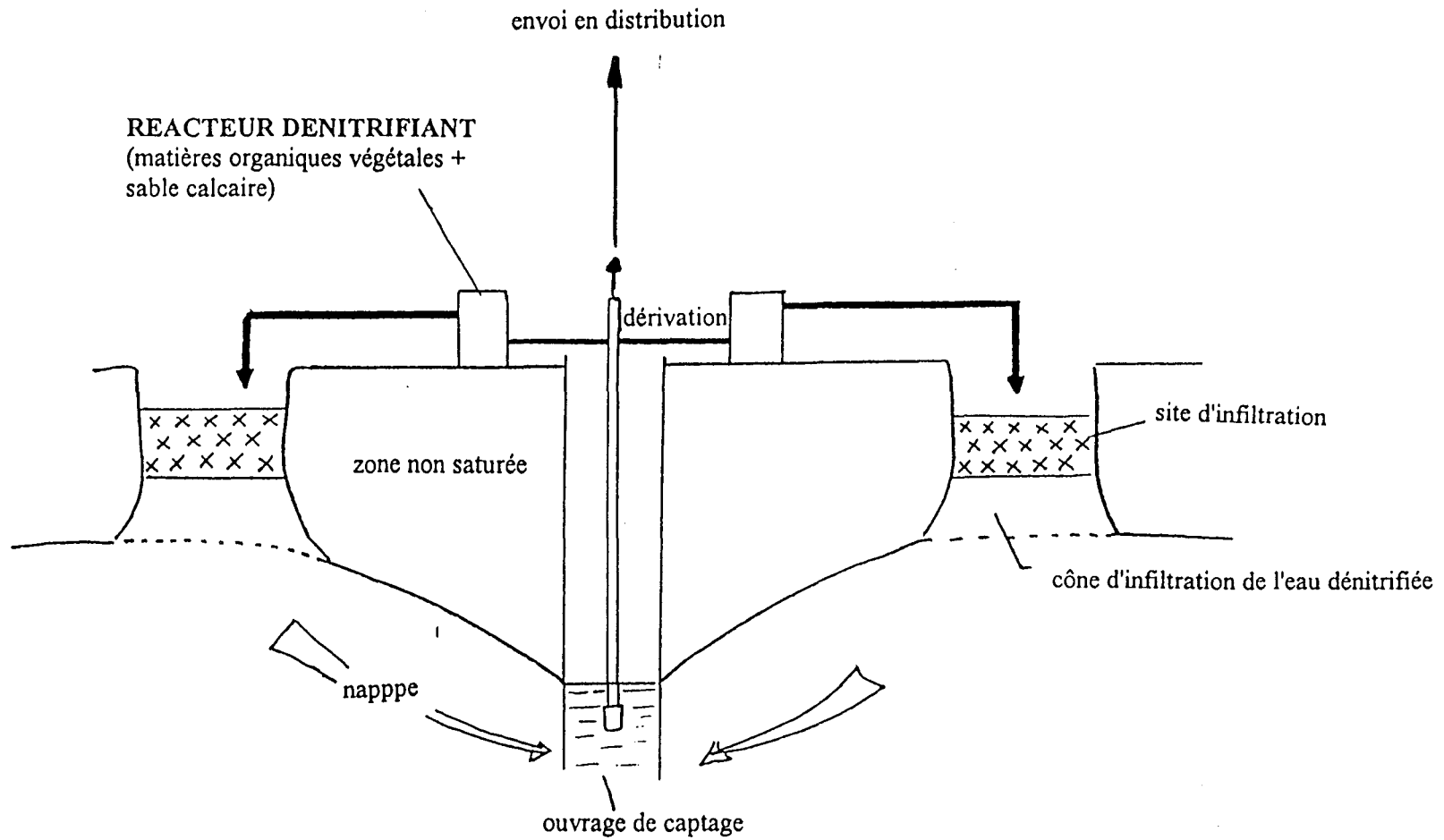


Figure 3 - Schéma de principe du procédé de dénitrification provoquée du site expérimental de Messac (d'après Collin *et al.*, 1984)

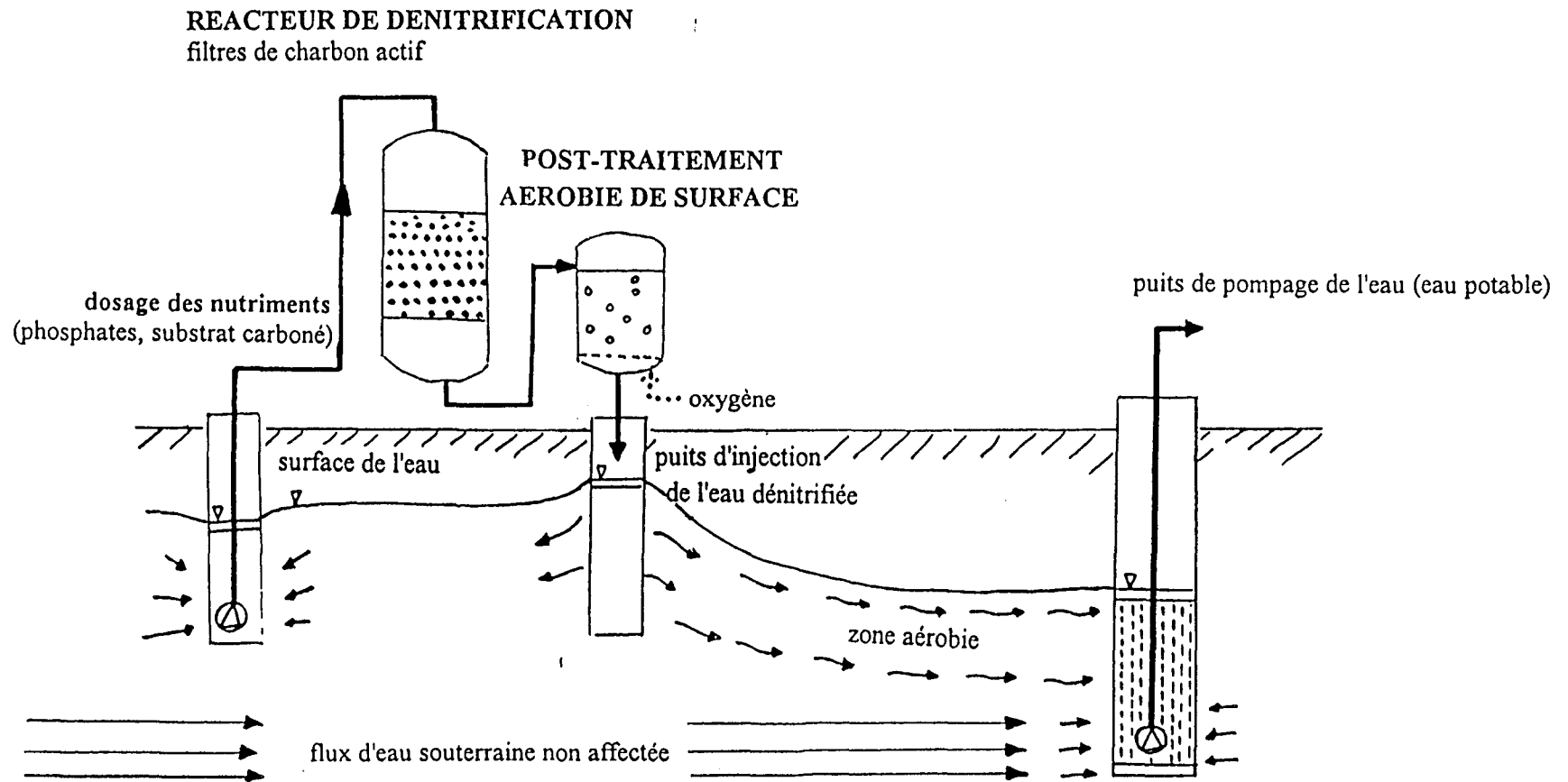


Figure 4 - Principe de restauration d'une nappe souterraine par dénitrification hétérotrophe sur des filtres de charbon actif (d'après Böckle *et al.*, 1984)

Dénitrification biologique d'une nappe phréatique polluée par des composés azotés d'origine industrielle

Matériels & méthodes

Annexe 3

Milieux de culture

Milieu lactosé TTC (pH 7,2)

peptone bactériologique	10 g/l
extrait de viande	5 g/l
lactose	20 g/l
bleu de bromothymol	0,05 g/l
agar	12,75 g/l
chlorure de 2-3-5 triphényltétrazolium	0,25 mg/l
tergitol 7	1 mg/l

Milieu Chapman-mannité (pH 7,4)

peptone bactériologique	10 g/l
extrait de viande	1 g/l
chlorure de sodium	75 g/l
männitol	10 g/l
rouge de phénol	0,025 g/l
agar	15 g/l

Milieu Kligler-Hajna (pH 7,5)

pastone	10 g/l
extrait de viande	3 g/l
extrait de levure	3 g/l
chlorure de sodium	5 g/l
chlorydrate de cystéine	0,3 g/l
glucose	2 g/l
agar	6 g/l
rouge de phénol	0,05 g/l
citrate ferrique	0,3 g/l

Gélose nutritive molle (pH 7,4)

peptone	5 g/l
extrait de viande	1 g/l
extrait de levure	2 g/l
chlorure de sodium	5 g/l
agar	8 g/l

Milieu mannitol-mobilité-nitrates (pH 8,1)

peptone	20 g/l
nitrate de potassium	2 g/l
mannitol	2 g/l
rouge de phénol 1%	4 ml/l
agar	4 g/l

Gélose viande-Levure (VL) 15‰ (pH 7,4)

peptone	10 g/l
extrait de viande	3 g/l
extrait de levure	6 g/l
chlorure de sodium	5 g/l
chlorhydrate de cystéine	0,3 g/l
glucose	2 g/l
agar	18 g/l

Gélose viande-foie (VF) à 6‰ (pH 7,5)

base viande-foie à 6‰	30 g/l
glucose	2 g/l
agar	6 g/l

Milieu gélosé à l'extrait de malt (pH 6)

extrait de malt	20 g/l
agar	20 g/l

Milieu minéral (H₃) (pH 6,8)

phosphate de potassium	2,3 g/l
phosphate disodique	2,9 g/l
chlorure d'ammonium	1 g/l
sulfate de magnésium	0,5 g/l
carbonate de sodium	0,5 g/l
chlorure de calcium	0,01 g/l
citrate d'ammonium de fer	0,05 g/l
solution d'éléments traces SL6	5 ml/l
agar	15 g/l

Solution SL6

sulfate de zinc	0,1 g/l
chlorure de manganèse	0,03 g/l
borate	0,3 g/l
chlorure de cobalt	0,2 g/l
chlorure de cuivre	0,01 g/l
chlorure de nickel	0,02 g/l
molybdate de sodium	0,03 g/l

Gélose lactosée biliée (V.R.B.L.) (pH 7,4)

peptone	7 g/l
extrait de levure	5 g/l
sels biliaires	1,5 g/l
lactose	10 g/l
chlorure de sodium	5 g/l
agar	11 g/l
rouge neutre	0,03 g/l
crystal violet	0,002 g/l

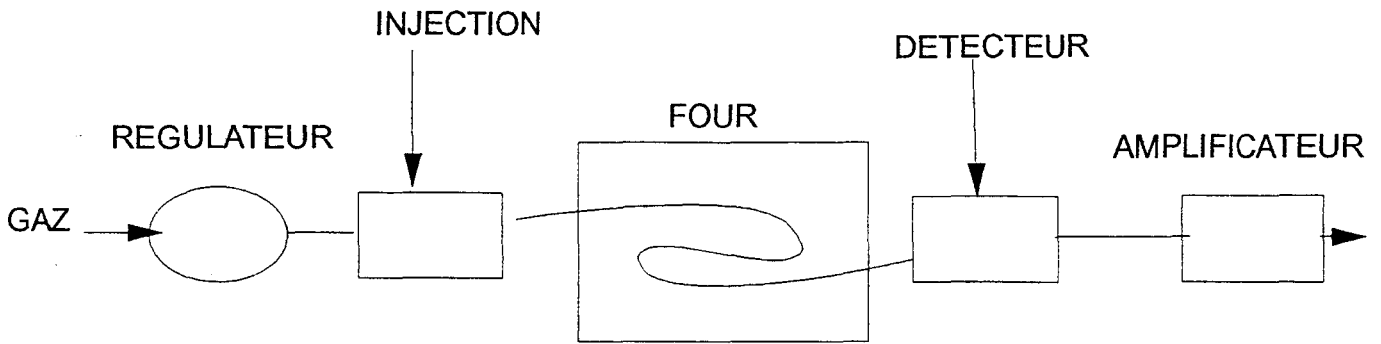
Dénitrification biologique d'une nappe phréatique polluée par des composés azotés d'origine industrielle

Matériels & méthodes

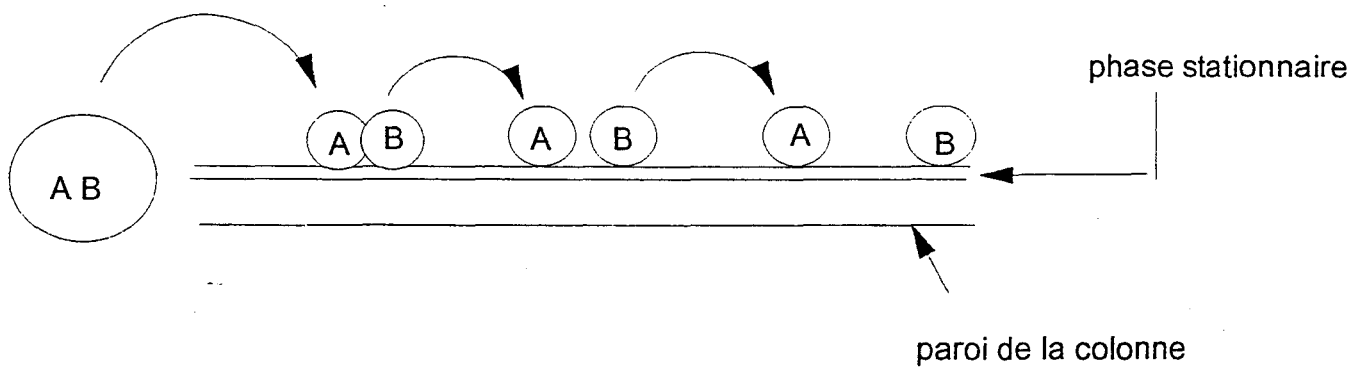
Annexe 4

Analyses biochimiques par chromatographie en phase gazeuse

a/ Schéma général de l'installation



b/ Principe de la séparation des constituants du mélange (d'après Allowray et Ayres, 1993)



c/ Représentation schématique d'un détecteur FID (d'après Allowray et Ayres, 1993)

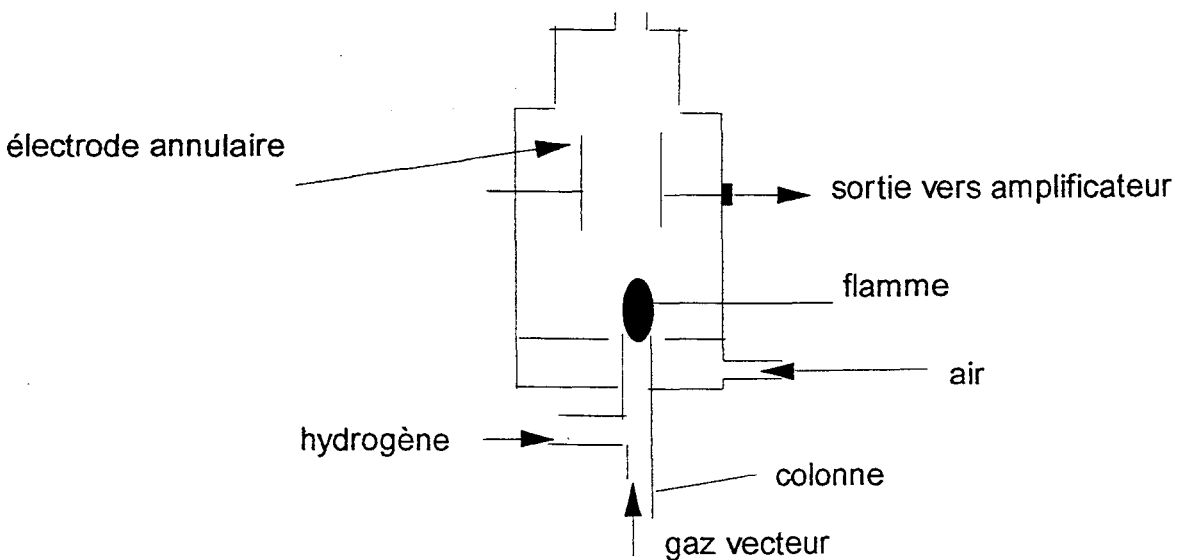
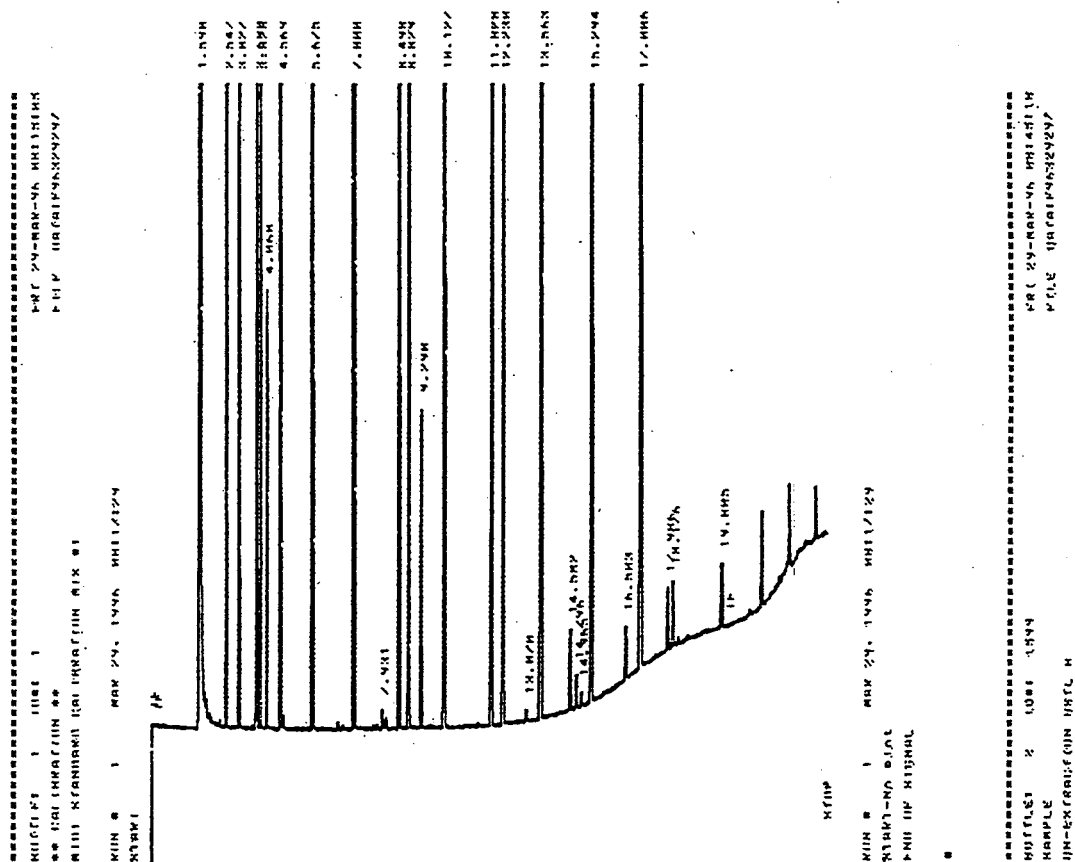


Figure 1 - Présentation de la colonne chromatographique



ID: 1 HELI STANDARD CALIBRATION MIX #1 Date of run: 29-NOV-96 06:12:29
 Bottle: 1 CALIBRATION (CALORAB)

RT	Area	Area% Respon	ECL	Name	Z	Comment 1	Comment 2
1.604	390734048	0.029	7.021	SOLVENT PEAK		< not rt	
2.556	73672	0.026	1.177	9.000	9:0	5.07	
3.037	156296	0.027	1.114	10.000	10:0	10.15	Peak match -0.0016
3.646	424	0.024		10.919			< not area
3.700	81904	0.029	1.064	11.000	11:0	5.10	Peak match -0.0023
3.836	33216	0.030	1.057	11.155	10:0 20H	2.06	Peak match 0.0036
4.070	16372	0.031	1.017	11.421	10:0 30H	1.02	Peak match 0.0006
4.579	16372	0.032	1.026	12.000	12:0	10.20	Peak match -0.0014
5.645	87328	0.035	0.999	13.000	13:0	5.11	Peak match 0.0011
7.610	174728	0.039	0.980	14.000	14:0	10.02	Peak match -0.0010
7.982	976	0.040		14.622			
8.588	89728	0.041	0.968	15.000	15:0	5.08	Peak match -0.0006
8.839	38448	0.042	0.966	15.203	14:0 20H	2.17	Peak match 0.0010
9.301	18272	0.044	0.964	15.487	Sum In Feature 3	1.03	Peak match 0.0023 14:0 30H/16:1 ISD I
10.136	101656	0.044	0.960	16.000	16:0	10.21	Peak match -0.0011
11.837	91312	0.046	0.956	17.000	17:0	5.11	Peak match -0.0011
12.241	39272	0.047	0.955	17.233	16:0 20H	2.20	Peak match 0.0023
13.083	744	0.048		17.719			
13.573	102448	0.046	0.953	18.000	18:0	10.18	Peak match -0.0014
14.591	5192	0.049		18.588			
14.885	2120	0.047		18.712			
14.976	928	0.050		18.811			
15.283	91328	0.047	0.950	19.000	19:0	5.00	Peak match 0.0012
16.531	3432	0.049		19.785			
17.817	103808	0.049	0.944	20.000	20:0	10.17	
17.957	4360	0.052		20.572			
18.185	6552	0.051		20.681			
19.816	5304	0.050		21.633			
*****	18272			SHIPPED FEATURE 3	1.03	12:0 BLOC ?	unknown 10.928
*****						16:1 ISD 1/14:0 30H	14:0 30H/16:1 ISD I

Solvent	Total Area	Named Area	% Named	Total Area	Max Ref	ECL	Deviation	Ref ECL	Shift
390734048	1723648	1709832	99.20	1708276	0				

6000 PEAK MATCHING - PEAK POSITION MATCHING ERROR (CMS) IS 0.0017.

Figure 2 - Chromatographe d'étalonnage en phase gazeuse

Dénitrification biologique d'une nappe phréatique polluée par des composés azotés d'origine industrielle

Matériels & méthodes

Annexe 5

Réacteurs de laboratoire

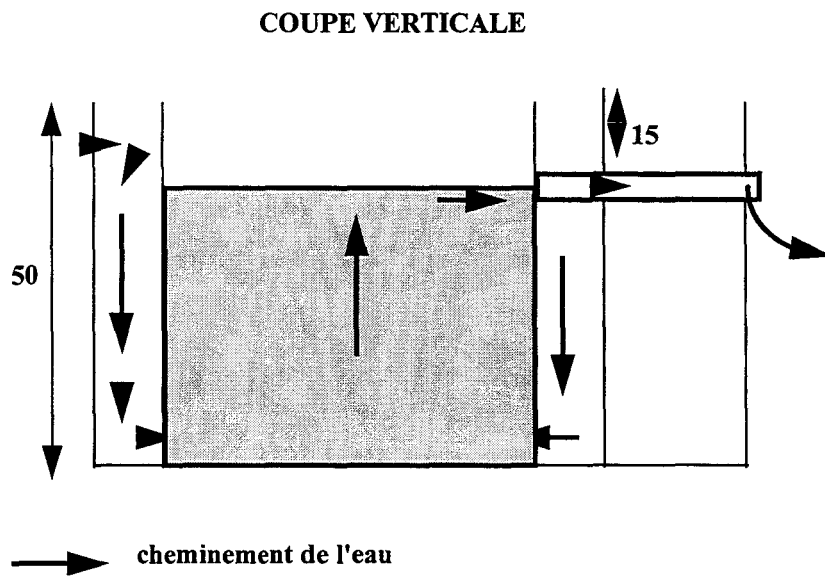
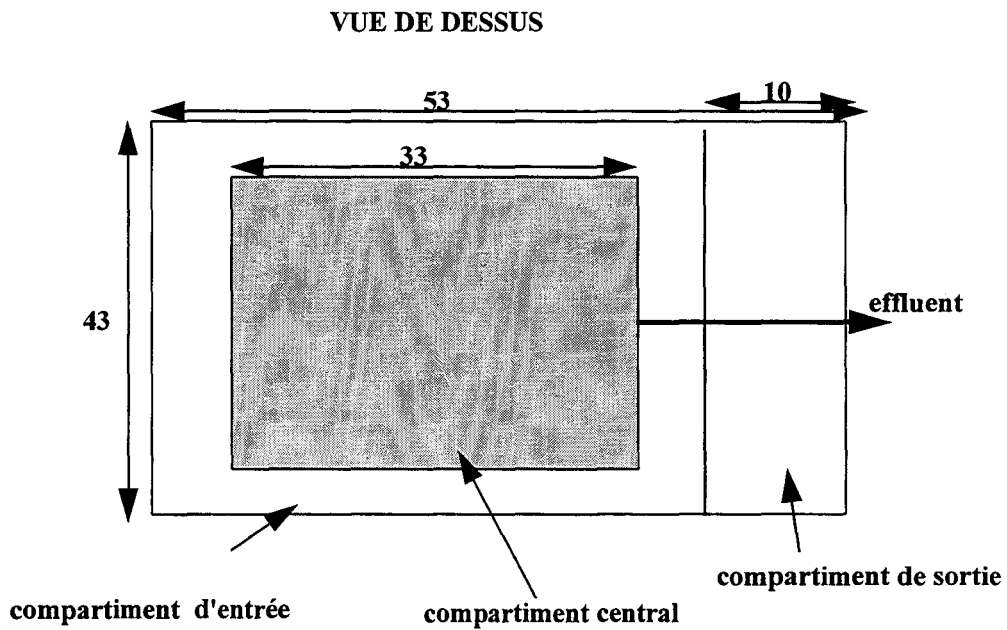
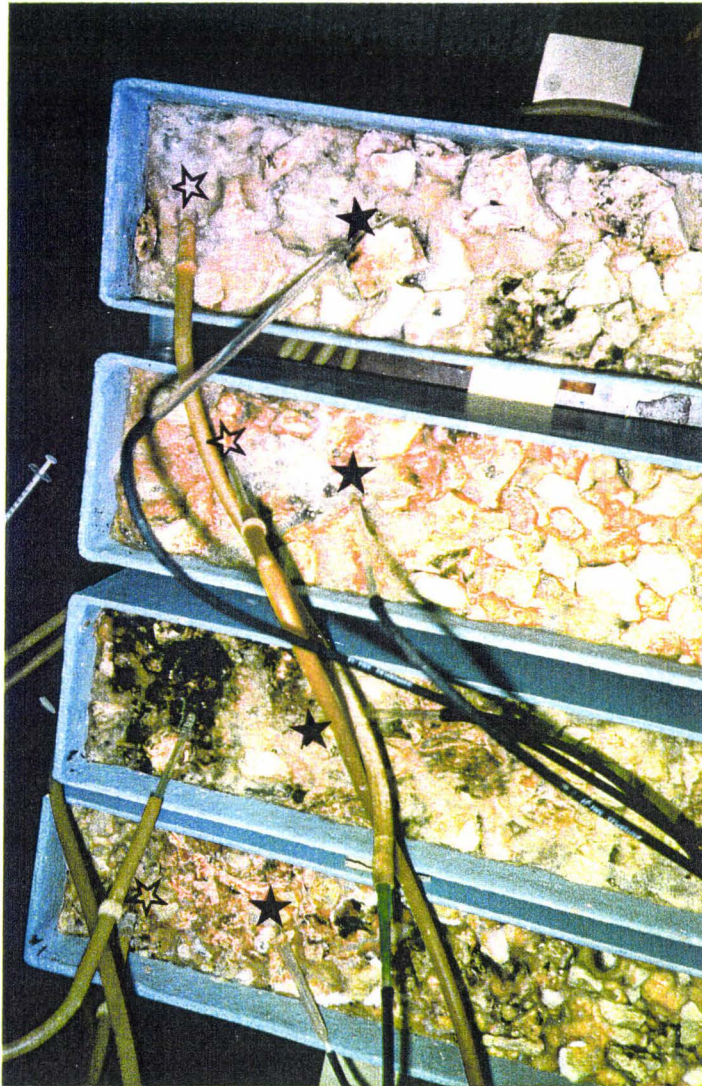


Planche 1 - Réacteurs up-flow de dénitrification à biofilms fixés



- ★ Point d'alimentation en nutriments
- ☆ Point d'alimentation en eau du site



Planche 2 - Réacteurs de dénitrification à biofilms fixés et à flux horizontal

Dénitrification biologique d'une nappe phréatique polluée par des composés azotés d'origine industrielle

Matériels & méthodes

Annexe 6

Méthodes d'analyses spectrophotométriques
HACH DR/2000

AZOTE AMMONIACAL (0 à 400 ppm N NH₃, 0 à 900 kg/ha ou 0 à 800 Lbs/Ac) Pour sol

Sur extrait aqueux

VERIFICATION DE L'EXACTITUDE

Vérifier l'exactitude de l'analyse avec une solution étalon d'azote ammoniacal à 1,0 mg/l proposée comme réactif optionnel. Utiliser 25 ml de cette solution étalon à la place de l'extrait dilué à l'étape 4. Elle doit donner une lecture de 138,8 ppm N NH₃, 310,9 kg/ha N NH₃ ou 277,6 lbs/Ac N NH₃.

PRECISION

Dans un seul laboratoire utilisant une solution étalon à 139 ppm N NH₃ (équivalent à 311 kg/ha ou 278 lbs/Ac) et deux lots représentatifs de réactifs avec le DR/2000, un opérateur unique a obtenu un écart-type de ± 1.4 ppm N NH₃ (équivalent à 3,1 kg/ha ou $\pm 2,8$ lbs/Ac).

PRINCIPE DE LA METHODE

Après addition du réactif Ammonia Nitrogen 1 pour complexer le calcium et le magnésium, le réactif de Nessler réagit avec l'ion ammonium présent dans l'échantillon et forme une coloration jaune proportionnelle à la concentration de l'azote ammoniacal.

DEMANDE CHIMIQUE EN OXYGENE (0 à 150 ; 0 à 1500 mg/l), suite

PRELEVEMENT ET STOCKAGE

Prélever les échantillons dans des flacons en verre. N'utiliser des flacons plastique qu'après avoir vérifié qu'ils sont exempts de contamination organique. Analyser les échantillons biologiquement actifs aussitôt que possible. Homogénéiser les échantillons contenant des solides pour obtenir des échantillons représentatifs. Les échantillons traités à l'acide sulfurique à pH 2 ou au-dessous (2 ml par litre) et réfrigérés à 4°C peuvent être stockés jusqu'à 28 jours. Corriger le résultat pour les ajouts de volumes ; voir Prélèvement et Stockage, Ajouts de volumes (Chapitre I) pour des informations complémentaires.

VERIFICATION DE L'EXACTITUDE

Vérifier l'exactitude de la gamme 0 à 150 mg/l au moyen de l'étalon à 300 mg/l ou à 1000 mg/l de DCO. Utiliser 2 ml de ces solutions comme échantillon. Le résultat devra être 300 ou 1000 mg/l respectivement ; Ou préparer un étalon à 500 mg/l en dissolvant 425 mg de phtalate acide de potassium anhydre (séché à 120°C pendant une nuit). Diluer à un litre avec de l'eau désionisée.

Vérifier la gamme 0 à 150 mg/l avec un étalon à 100 mg/l. Préparer cet étalon en dissolvant 85 mg du produit ci-dessus dans un litre d'eau désionisée. Utiliser 2 ml de cette solution comme échantillon. Le résultat devra être 100 mg/l DCO ; ou diluer 10 ml de la solution à 1000 mg/l de DCO à 100 ml pour produire une solution étalon à 100 mg/l.

PRECISION

Dans un seul laboratoire utilisant des solutions étalons à 100 mg/l et 500 mg/l de DCO et deux lots représentatifs de réactifs avec le DR/2000, un opérateur unique a obtenu un écart-type de $\pm 2,7$ mg/l et ± 18 mg/l de DCO respectivement pour les gammes 0 à 150 et 0 à 1500 mg/l.

INTERFERENCES

Les tubes DCO contiennent suffisamment de sulfate mercurique pour complexer jusqu'à 2000 mg/l de chlorure. Pour des concentrations plus élevées de chlorure, diluer l'échantillon, si possible.

BLANCS

Le blanc peut être utilisé plusieurs fois pour les mesures utilisant le même lot de tubes. Stocker le blanc à l'obscurité. Contrôler la décomposition en mesurant la couleur à la longueur d'onde appropriée (420 ou 620 nm). Régler le zéro de l'appareil en mode absorbance, en utilisant un tube contenant de l'eau désionisée et mesurer l'absorbance du blanc. Noter la valeur. Remplacer le blanc lorsque l'absorbance a changé d'environ 0,01 unités d'absorbance.

NITRATE, FORT (0 à 30,0 mg/l), suite

PRELEVEMENT ET STOCKAGE

Prélever les échantillons dans des flacons propres en verre ou en plastique.

Stocker à 4°C ou au-dessous si l'échantillon doit être analysé dans les 24 ou 48 heures. Réchauffer à la température ambiante avant d'effectuer l'analyse. Pour des temps de stockage plus longs, jusqu'à 14 jours, ajuster le pH à 2 ou au-dessous avec de l'acide sulfurique concentré pour analyse (environ 2 ml par litre). La réfrigération de l'échantillon reste nécessaire.

Avant l'analyse de l'échantillon préservé, le réchauffer à la température ambiante. Neutraliser l'échantillon avec la solution d'hydroxyde de sodium 5,0 N. Ne pas utiliser de dérivés du mercure comme conservateur. Corriger le résultat de l'analyse pour les ajouts de volumes ; voir Prélèvement et Stockage, Ajouts de Volumes (Chapitre I).

VERIFICATION DE L'EXACTITUDE

A) Casser le col d'une Voluette-étalon Nitrate, 500 mg/l N.

b) Au moyen de la pipette TenSette, ajouter respectivement 0,1 ml - 0,2 ml et 0,3 ml d'étalon à 3 échantillons de 25 ml. Mélanger soigneusement chaque échantillon. (Pour les ampoules AccuVac, utiliser des béchers de 50 ml).

c) Analyser chaque échantillon selon la technique ci-dessus. La concentration du nitrate doit augmenter de 2,0 mg/l pour chaque ajout de 0,1 ml d'étalon.

d) Si ces augmentations ne se produisent pas, voir Ajouts d'Étalons (Chapitre I) pour des informations complémentaires.

Utiliser la solution étalon de nitrate à 10,0 mg/l d'azote proposée en réactif optionnel pour vérifier l'exactitude de l'analyse. Cette solution peut aussi être préparée en diluant 1,00 ml de solution d'une Voluette-étalon Nitrate, 500 mg/l N dans une fiole jaugée de 50,0 ml avec de l'eau désionisée.

PRECISION

Dans un seul laboratoire utilisant une solution étalon à 20,0 mg/l d'azote (N) et deux lots représentatifs de réactifs avec le DR/2000, un opérateur unique a obtenu un écart-type de $\pm 0,8$ mg/l N.

En utilisant une solution étalon à 20,0 mg/l N et deux lots d'ampoules AccuVac avec le DR/2000, un opérateur unique a obtenu un écart-type de $\pm 1,0$ mg/l N.

INTERFERENCES

Compenser l'interférence du nitrite comme suit :

a) Ajouter de l'eau de brome à 30 g/l, goutte à goutte à l'échantillon à l'étape 4 jusqu'à coloration jaune persistante.

b) Ajouter une goutte de solution de phénol à 30 g/l pour détruire la couleur jaune.

c) Reprendre la technique à l'étape 4. Noter le résultat en nitrate + nitrite.

Les agents oxydants et réducteurs forts interfèrent. L'ion ferrique provoque une interférence positive et ne doit pas être présent. Les concentrations de chlorure au-dessus de 100 mg/l provoquent une interférence négative. La méthode peut être utilisée en présence de fortes concentrations de chlorure (par exemple l'eau de mer), mais un étalonnage doit être effectué en utilisant des étalons contenant la même concentration de chlorure. Voir Etalonnages créés par l'opérateur (Chapitre I) pour des informations complémentaires.

Les échantillons fortement tamponnés ou de pH extrême peuvent dépasser le pouvoir tampon des réactifs et nécessiter un prétraitement ; voir Interférences, pH (Chapitre I).

PRINCIPE DE LA METHODE

Le cadmium métallique réduit le nitrate présent dans l'échantillon en nitrite. Le nitrite réagit 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. L'ion nitrate peut aussi être déterminé directement en utilisant l'électrode sélective Nitrate (réf. n° 44560-71).

NITRITE, FORT (0 à 150 mg/l NO₂⁻)

Pour eau et eau résiduaire

Méthode au Sulfate ferreux*

PRELEVEMENT ET STOCKAGE

Prélever les échantillons dans des flacons propres en verre ou en plastique.

Les instructions suivantes de conservation sont nécessaires seulement si l'analyse immédiate n'est pas possible. Stocker à 4°C ou au-dessous si l'échantillon doit être analysé dans les 24 ou 48 heures. Réchauffer l'échantillon à la température ambiante avant d'effectuer l'analyse. Pour des temps de stockage plus longs, ajouter 4,0 ml de solution de chlorure mercurique par litre d'échantillon et mélanger. La réfrigération de l'échantillon reste nécessaire. Ne pas utiliser de conservateurs acides.

VERIFICATION DE L'EXACTITUDE

Dissoudre 0,150 g de nitrite de sodium récent et diluer à 100 ml avec de l'eau désionisée pour préparer une solution de nitrite à 100 mg/l (NO₂⁻). Préparer cette solution au moment de l'emploi.

PRECISION

Dans un seul laboratoire utilisant une solution étalon de nitrite à 100 mg/l et deux lots représentatifs de réactifs avec le DR/2000, un opérateur unique a obtenu un écart-type de ± 2,2 mg/l de nitrite.

INTERFERENCES

Cette méthode d'analyse ne mesure pas les nitrates et n'est pas applicable aux échantillons à base de glycols. Diluer les échantillons à base de glycols et suivre la technique pour le nitrite faible concentration (Programme mémorisé n° 371).

PRINCIPE DE LA METHODE

La méthode utilise le sulfate ferreux en milieu acide pour réduire le nitrite en oxyde nitreux. L'ion ferreux se combine avec l'oxyde nitreux pour former un complexe brun-verdâtre dont la coloration est proportionnelle au nitrite présent.

PHOSPHATE, ORTHO (0 à 2,50 mg/l PO_4^{3-}), suite

PRELEVEMENT ET STOCKAGE

Prélever les échantillons dans des flacons propres en verre ou en plastique qui ont été lavés à l'acide chlorhydrique au 1/2 et rincés à l'eau désionisée. Ne pas utiliser de détergents du commerce contenant des phosphates pour nettoyage de la verrerie utilisée dans cette analyse. Analyser les échantillons immédiatement après le prélèvement pour obtenir les résultats les plus fiables. Si une analyse rapide n'est pas possible, préserver les échantillons jusqu'à 24 heures en les stockant à 4°C ou au-dessous. Pour des temps de stockage plus longs, ajouter 4 ml de solution de chlorure mercurique par litre d'échantillon et mélanger. La réfrigération de l'échantillon reste nécessaire. L'utilisation de sels de mercure doit cependant être évitée en raison des dangers pour la santé et l'environnement. Les échantillons préservés avec le chlorure mercurique doivent avoir une concentration en chlorure de 50 mg/l ou plus pour éviter l'interférence du mercure dans l'analyse. Pour les échantillons contenant peu de chlorure, ajouter par exemple 5 ml de solution étalon de chlorure de sodium à 10.246 mg/l par litre d'échantillon.

VERIFICATION DE L'EXACTITUDE

- Casser le col d'une Voluette-étalon Phosphate, 50 mg/l PO_4 .
- Au moyen de la pipette TenSette, ajouter respectivement 0,1 ml - 0,2 ml et 0,3 ml d'étalon à 3 échantillons de 25 ml. Mélanger soigneusement chaque échantillon.
- Analyser chaque échantillon selon la technique ci-dessus. La concentration de phosphate doit augmenter de 0,2 mg/l pour chaque ajout de 0,1 ml d'étalon.
- Si ces augmentations ne se produisent pas, voir Ajouts d'Etalons (Chapitre I) pour des informations complémentaires.

INTERFERENCES

Les échantillons ayant une turbidité élevée peuvent donner des résultats non reproductibles. Certaines des particules en suspension peuvent se dissoudre à cause de l'acide contenu

dans le réactif utilisé. De plus, les résultats peuvent varier en raison de la désorption variable d'orthophosphate des particules. Pour les échantillons très troubles ou colorés, ajouter le contenu d'une gélule de réactif de prétraitement du phosphate à 25 ml d'échantillon. Mélanger. Utiliser cette préparation pour le réglage du zéro.

Le réactif PhosVer 3 doit être stocké dans un environnement frais et sec.

Les éléments suivants interfèrent lorsqu'ils sont présents à des concentrations dépassant celles indiquées ci-dessous :

Cuivre	10 mg/l
Fer	50 mg/l
Silice	50 mg/l
Silicate	10 mg/l

L'arséniate et l'hydrogène sulfuré interfèrent.

Les échantillons fortement tamponnés ou ayant un pH extrême peuvent dépasser le pouvoir tampon des réactifs et nécessiter un prétraitement de l'échantillon; voir Interférences, pH (Chapitre I).

PRECISION

Dans un seul laboratoire utilisant une solution étalon à 1,00 mg/l PO_4^{3-} et deux lots représentatifs de réactif avec le DR/2000, un opérateur unique a obtenu un écart-type de $\pm 0,01$ mg/l PO_4^{3-} .

Dans un seul laboratoire utilisant une solution étalon à 1,00 mg/l PO_4^{3-} et deux lots représentatifs d'ampoules AccuVac avec le DR/2000, un opérateur unique a obtenu un écart-type de $\pm 0,02$ mg/l PO_4^{3-} .

PRINCIPE DE LA METHODE

L'orthophosphate réagit avec le molybdate en milieu acide pour produire un complexe phosphomolybdate. L'acide ascorbique réduit le complexe, donnant une coloration intense de bleu de molybdène.

Dénitrification biologique d'une nappe phréatique polluée par des composés azotés d'origine industrielle

Matériels & méthodes

Annexe 7

Normes AFNOR pour le dosage
des formes minérales azotées

normalisation française

T 90-045

Juin 1989

ISO 7890-3

Essais des eaux

Dosage des nitrates

Méthode spectrométrique avec l'acide sulfosalicylique

E: Testing water — Determination of nitrate — Spectrometric method using sulfosalicylic acid

D: Wasserbeschaffenheit — Bestimmung von Nitrat — Spectrometrisches Verfahren mit Sulfosalizylsäure

Fascicule de documentation publié par l'afnor en juin 1989.

correspondance

Le présent fascicule de documentation reproduit intégralement la Norme internationale ISO 7890-3 : 1988.

analyse

Le présent fascicule de documentation s'adresse aux laboratoires ayant à doser des nitrates dans les eaux destinées à la consommation humaine et les eaux de surface sans être en mesure de mettre en œuvre la méthode automatique par spectrométrie d'absorption moléculaire qui fait l'objet de la norme NF T 90-010 et qui constitue la méthode de référence au plan français.

descripteurs

Thésaurus International Technique : essai des eaux, eau d'alimentation humaine, eau de surface, analyse chimique, dosage, nitrate, spectrométrie d'absorption moléculaire.

modifications

corrections

Qualité de l'eau — Dosage des nitrates —

Partie 3 :

Méthode spectrométrique avec l'acide sulfosalicylique

1 Domaine d'application

1.1 Substance dosée

La présente partie de l'ISO 7890 spécifie une méthode de dosage de l'ion nitrate dans les eaux.

1.2 Type d'échantillon

La présente méthode convient à des échantillons d'eaux brutes et d'eaux potables.

1.3 Étendue du dosage

Jusqu'à une concentration maximale en azote due aux nitrates, $\rho_N = 0,2$ mg/l, en utilisant une prise d'essai maximale de 25 ml. La gamme peut être étendue vers le haut par des prises d'essai inférieures.

1.4 Limite de détection¹⁾

Avec des cuves de 40 mm d'épaisseur et une prise d'essai de 25 ml, la limite de détection est comprise dans la gamme $\rho_N = 0,003$ à 0,013 mg/l.

1.5 Sensibilité¹⁾

Une concentration en azote due aux nitrates, $\rho_N = 0,2$ mg/l, fournit une absorbance d'environ 0,68 unité, en utilisant une prise d'essai de 25 ml dans des cuves de 40 mm d'épaisseur.

1.6 Interférences

On a pratiqué des essais sur un ensemble de substances souvent présentes dans les échantillons d'eau, afin de déterminer les interférences possibles avec la présente méthode. Des détails complets figurent dans l'annexe A. Les principaux agents d'interférence potentiels sont le chlorure, l'orthophosphate, le magnésium et le manganèse(II), comme l'indique l'annexe A.

D'autres essais montrent qu'avec cette méthode on peut admettre une couleur d'échantillon maximale de 150 mg/l Pt, à condition que la méthode de correction d'absorption de la prise d'essai décrite ci-dessous soit appliquée. (Voir 6.5.)

2 Principe

Mesurage spectrométrique du composé jaune issu de la réaction des nitrates avec l'acide sulfosalicylique (formé par addition à l'échantillon de salicylate de sodium et d'acide sulfurique après traitement à l'alcali.

En même temps que l'alcali, on ajoute du sel disodique de l'acide éthylènediamine-tétraacétique (Na_2EDTA) pour empêcher la précipitation des sels de calcium et de magnésium. L'adjonction d'azotate de sodium vise enfin à neutraliser l'interférence des nitrites.

3 Réactifs

Au cours de l'analyse, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue, et de l'eau distillée ou de l'eau de pureté équivalente.

¹⁾ Résultats d'un essai interlaboratoire effectué au Royaume-Uni et qui rassemblait quatre participants. La limite de détection a été prise égale à 4,65 fois l'écart-type du blanc au sein d'un lot.

3.1 Acide sulfurique, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 18 \text{ mol/l}$, $\rho = 1,84 \text{ g/ml}$.

AVERTISSEMENT — Lors de l'utilisation de ce réactif, il est indispensable de disposer d'une protection oculaire et de vêtements de protection.

3.2 Acide acétique cristallisable.
 $c(\text{CH}_3\text{COOH}) = 17 \text{ mol/l}$, $\rho = 1,05 \text{ g/ml}$.

AVERTISSEMENT — Lors de l'utilisation de ce réactif, il est indispensable de disposer d'une protection oculaire et de vêtements de protection.

3.3 Alkali, solution, $\rho_{\text{NaOH}} = 200 \text{ g/l}$,
 $\rho[(\text{CH}_2\text{-N}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{-COONa})_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}] = 50 \text{ g/l}$.

Dissoudre avec précaution $200 \pm 2 \text{ g}$ de pastilles d'hydroxyde de sodium dans environ 800 ml d'eau. Ajouter $50 \text{ g} \pm 0,5 \text{ g}$ de sel disodique de l'acide éthylènediamine-tétraacétique (Na_2EDTA) dihydraté $\{[(\text{CH}_2\text{-N}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{-COONa})_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}]\}$ et dissoudre. Laisser refroidir à la température ambiante et compléter à 1 litre avec de l'eau dans une éprouvette graduée. Conserver dans une bouteille en polyéthylène. Ce réactif est stable indéfiniment.

AVERTISSEMENT — Lors de l'utilisation de ce réactif, il est indispensable de disposer d'une protection oculaire et de vêtements de protection.

3.4 Azoture de sodium, solution, $\rho_{\text{NaN}_3} = 0,5 \text{ g/l}$.

Dissoudre avec précaution $0,05 \text{ g} \pm 0,005 \text{ g}$ d'azoture de sodium dans environ 90 ml d'eau puis compléter à 100 ml avec de l'eau dans une éprouvette graduée. Conserver dans une bouteille en verre. Ce réactif est stable indéfiniment.

AVERTISSEMENT — Ce réactif est très toxique; ne pas en avaler. Le contact du réactif solide et des acides libère un gaz très toxique.

NOTE — Une solution d'acide sulfurique, $\rho_{\text{NH}_4\text{SO}_3\text{H}} = 0,75 \text{ g/l}$, peut être également utilisée à la place de la solution d'azoture de sodium.

3.5 Salicylate de sodium, solution,
 $\rho_{\text{HO-C}_6\text{H}_4\text{-COONa}} = 10 \text{ g/l}$.

Dissoudre $1 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$ de salicylate de sodium ($\text{HO-C}_6\text{H}_4\text{-COONa}$) dans $100 \text{ ml} \pm 1 \text{ ml}$ d'eau. Conserver dans une bouteille en verre ou en polyéthylène. Préparer cette solution chaque jour au moment de l'emploi.

3.6 Nitrate, solution mère étalon, $\rho_{\text{N}} = 1\,000 \text{ mg/l}$.

Dissoudre $7,215 \text{ g} \pm 0,001 \text{ g}$ de nitrate de potassium (KNO_3), (préalablement séché à 105°C pendant au moins 2 h) dans environ 750 ml d'eau. Transférer quantitativement dans une fiole jaugée de 1 litre et compléter au volume avec de l'eau.

Conserver la solution dans une bouteille en verre pendant une durée ne dépassant pas 2 mois.

3.7 Nitrate, solution étalon, $\rho_{\text{N}} = 100 \text{ mg/l}$.

Transvaser à la pipette 50 ml de la solution mère (3.6) dans une fiole jaugée de 500 ml et compléter au volume étalon avec de l'eau.

Conserver cette solution dans une bouteille en verre pendant une durée ne dépassant pas 1 mois.

3.8 Nitrate, solution étalon d'essai, $\rho_{\text{N}} = 1 \text{ mg/l}$.

Dans une fiole jaugée de 500 ml , ajouter à la pipette 5 ml de la solution étalon de nitrate (3.7). Compléter au volume avec de l'eau. Préparer la solution au moment de l'emploi.

4 Appareillage

Matériel courant de laboratoire, et

4.1 Spectromètre, permettant d'effectuer des mesures à une longueur d'onde de 415 nm et équipé de cuves de 40 ou de 50 mm d'épaisseur.

4.2 Capsules d'évaporation, de faible volume (environ 50 ml). Si ces capsules sont neuves ou ne sont pas couramment utilisées, les rincer soigneusement à l'eau avant l'essai et suivre la procédure indiquée dans les deux premiers alinéas de 6.3.2 pour les nettoyer.

4.3 Bain d'eau bouillante, pouvant recevoir au moins six capsules d'évaporation (4.2).

4.4 Bain d'eau, thermostaté, pouvant maintenir une température de $25^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$.

5 Échantillonnage et échantillons

Les échantillons pour laboratoire doivent être prélevés dans des bouteilles en verre et doivent être analysés dès que possible après leur prélèvement. Le stockage des échantillons à une température comprise entre 2°C et 5°C peut permettre de conserver de nombreux types d'échantillons, mais il faut vérifier que c'est bien le cas pour chaque type d'échantillon.

6 Mode opératoire

AVERTISSEMENT — Ce mode opératoire suppose l'utilisation de solutions concentrées d'acide sulfurique, d'acide acétique, d'hydroxyde de sodium et d'azoture de sodium. Il est indispensable de disposer d'une protection oculaire et de vêtements de protection pour manipuler ces réactifs. Ces derniers ne doivent jamais être pipetés à la bouche.

6.1 Prise d'essai

Le volume maximum de la prise d'essai pouvant servir au dosage des nitrates jusqu'à $\rho_{\text{N}} = 0,2 \text{ mg/l}$ est de 25 ml . Utiliser des prises d'essai plus petites, le cas échéant, pour tenir

compte de concentrations plus élevées en nitrates. Avant de prélever la première prise d'essai, laisser décanter les échantillons pour laboratoire contenant des matières en suspension, les centrifuger ou les filtrer sur un papier filtre en fibres de verre lavé. Les échantillons présentant un pH supérieur à 8 doivent être neutralisés à l'acide acétique (3.2) avant le prélèvement de la prise d'essai.

6.2 Essai à blanc

Effectuer un essai à blanc, parallèlement au dosage, en utilisant 5,00 ml \pm 0,05 ml d'eau à la place de la prise d'essai. Soit A_b unités l'absorbance mesurée.

6.3 Étalonnage

6.3.1 Préparation de la série de solutions étalons

Dans une série de capsules d'évaporation propres (4.2), introduire à la burette, respectivement, 1; 2; 3; 4 et 5 ml de la solution étalon d'essai de nitrate (3.8) correspondant respectivement à des quantités de nitrate de $m(N) = 1; 2; 3; 4$ et 5 μg dans les capsules respectives.

6.3.2 Développement de la coloration

Ajouter 0,5 ml \pm 0,005 ml de solution d'azoture de sodium (3.4) et 0,2 ml \pm 0,002 ml d'acide acétique (3.2). Attendre au moins 5 min, puis faire évaporer le mélange à sec dans le bain d'eau bouillante (4.3). Ajouter ensuite 1 ml \pm 0,01 ml de solution de salicylate de sodium (3.5), homogénéiser et faire à nouveau évaporer à sec. Retirer la capsule du bain d'eau et laisser refroidir à la température ambiante.

Ajouter 1 ml \pm 0,01 ml d'acide sulfurique (3.1), puis dissoudre le résidu dans la capsule en agitant légèrement. Laisser le mélange reposer pendant environ 10 min. Ajouter alors 10 ml \pm 0,1 ml d'eau, puis 10 ml \pm 0,1 ml de la solution d'alcali (3.3).

Transvaser quantitativement le mélange dans une fiole jaugée de 25 ml, sans compléter au volume. Placer la fiole dans le bain d'eau (4.4) à 25 °C \pm 0,5 °C pendant 10 min \pm 2 min. Retirer la fiole et compléter au volume avec de l'eau.

6.3.3 Mesurages spectrométriques

Mesurer l'absorbance de la solution à 415 nm dans des cuves de 40 ou 50 mm d'épaisseur, par rapport à de l'eau dans la cuve de référence. Soit A_s unités l'absorbance mesurée.

NOTE – Les essais montrent que l'absorbance des solutions colorées demeure constante pendant au moins 24 h.

6.3.4 Établissement de la courbe d'étalonnage

Soustraire l'absorbance de l'essai à blanc des absorbances de chaque solution étalon et tracer la courbe d'étalonnage faisant apparaître l'absorbance en fonction de la masse de nitrate, $m(N)$, en microgrammes. Contrôler si la courbe est linéaire et passe par l'origine. Dans le cas contraire, répéter l'étalonnage.

6.4 Dosage

Introduire dans une petite capsule d'évaporation (4.2) la prise d'essai choisie (6.1) de volume V ml, tel que la prélèvement contienne une masse d'azote dû aux nitrates comprise entre $m(N) = 1 \mu\text{g}$ et 5 μg .

Poursuivre comme indiqué en 6.3.2 et 6.3.3.

6.5 Correction tenant compte de l'absorption de la prise d'essai

Si l'on sait, ou si l'on suppose, que l'absorption de la prise d'essai à la longueur d'onde d'analyse peut constituer une interférence (ce qui peut se produire avec des échantillons très colorés), effectuer les opérations prévues en 6.3.2 et 6.3.3 sur une seconde prise d'essai, en l'absence toutefois de solution de salicylate de sodium. Soit A_1 l'absorbance mesurée.

7 Expression des résultats

7.1 Calcul

Calculer l'absorbance due aux nitrates dans la prise d'essai, A à l'aide de l'équation

$$A_r = A_s - A_b$$

ou, si l'on a apporté une correction pour tenir compte de l'absorption de l'échantillon, à l'aide de l'équation

$$A_r = A_s - A_b - A_1$$

Dans les deux équations, A_s , A_b et A_1 correspondent respectivement à l'absorbance de l'échantillon, du blanc et à l'absorbance après correction (voir 6.2, 6.3.3 et 6.5).

Déduire de la courbe d'étalonnage (6.3.4) la masse de nitrate $m(N)$, exprimée en microgrammes, correspondant à la valeur A_r de l'absorbance.

La teneur en nitrate de l'échantillon, ρ_N , exprimée en milligrammes par litre, est donnée par la formule

$$\frac{m(N)}{V}$$

où V est le volume, en millilitres, de la prise d'essai.

Tableau 1 – Tableau de conversion

Nitrate	$c(\text{NO}_3^-)$	$\rho_{\text{NO}_3^-}$	ρ_N
	mmol/l	mg/l	mg/l
$c(\text{NO}_3^-) = 1 \text{ mmol/l}$	1	62	14,01
$\rho_{\text{NO}_3^-} = 1 \text{ mg/l}$	0,016 1	1	0,226
$\rho_N = 1 \text{ mg/l}$	0,071 4	4,427	1

Exemple :

$\rho_{\text{NO}_3^-} = 1 \text{ mg/l}$ correspond à $\rho_N = 0,226 \text{ mg/l}$.

Essais des eaux

Dosage des nitrites

Méthode par spectrométrie d'absorption moléculaire

E : Testing water — Determination of nitrite — Molecular absorption spectrometric method
D : Wasseruntersuchungen — Bestimmung des Nitrit-ions — Photometrisches Verfahren

Norme française homologuée par décision du Directeur Général de l'afnor le 5 octobre 1985 pour prendre effet le 5 novembre 1985.

Remplace la norme homologuée de même indice d'août 1975.

correspondance La présente norme française est équivalente avec quelques écarts techniques mineurs, avec la norme ISO 6777 (1984-08-01).

analyse La présente norme française s'adresse aux laboratoires ayant à doser les nitrites dans la plupart des types d'eau. Elle est susceptible de servir de base de référence dans la réglementation française relative à la qualité des eaux, notamment celles destinées à la consommation humaine.

descripteurs Thésaurus International Technique : essai des eaux, eau d'alimentation humaine, analyse chimique, dosage, nitrite, spectrométrie d'absorption moléculaire.

modifications Par rapport à la norme française homologuée de même indice d'août 1975, basée sur le même principe, augmentation du temps de réaction avant le mesurage spectrométrique, de 10 min à 30 min.

corrections

AVANT-PROPOS

La présente norme française résulte de la révision de la norme homologuée de même indice d'août 1975. Les modifications apportées à l'ancienne norme française NF T 90-013 portent essentiellement sur les points suivants :

- le temps de réaction du réactif de diazotation dans la prise d'essai a été porté d'au moins 10 min à au moins 30 min,
- la réalisation d'un essai à blanc et, si nécessaire, d'un essai de correction de la coloration de l'échantillon, ont été introduits dans la mode opératoire.

1 OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

La présente norme décrit une méthode de dosage des nitrites dans les eaux par spectrométrie d'absorption moléculaire.

Elle est applicable directement, à des échantillons d'eau dont la concentration en nitrites $c(\text{NO}_2^-)$ est inférieure ou égale à 1 mg/l.

Les échantillons de plus fortes concentrations doivent être dilués. La limite de détection de la méthode se situe aux environs de 0,001 mg/l de NO_2^- .

2 PRINCIPE

Diazotation de l' amino-4 benzènesulfonamide par les nitrites, à pH 1,9, en présence de dichlorure de N-(naphthyl-1) diamino-1,2 éthane.

Mesure, à une longueur d'onde voisine de 540 nm, de l'absorbance du complexe rose formé.

3 RÉACTIFS

Au cours de l'analyse, n'utiliser que des réactifs de qualité analytique reconnue et de l'eau récemment distillée ou de l'eau de pureté équivalente.

3.1 Acide orthophosphorique, $\rho = 1,70$ g/ml.

3.2 Acide orthophosphorique, solution à environ 1,5 mol/l.

Ajouter à l'aide d'une pipette 25 ml d'acide orthophosphorique (3.1) dans environ 150 ml d'eau. Homogénéiser et refroidir à température ambiante. Transférer la solution dans une fiole jaugée de 250 ml et compléter au volume avec de l'eau.

Conserver dans un flacon en verre inactinique.

- 3.3 Réactif de diazotation
 Mélanger dans un bécher 600 ml d'eau et 100 ml d'acide orthophosphorique (3.1). Ajouter 40,0 g \pm 0,5 g d'acido-4 benzène sulfonamide ($\text{NH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_3\text{NH}_2$). Laisser dissoudre puis ajouter 2,00 g \pm 0,02 g de dichlorure de N-(naphyl-1) dimino-1,2 éthane ($\text{C}_{10}\text{H}_7\text{NH} = \text{CH}_2 = \text{CH}_2 = \text{NH}_2 \cdot 2\text{HCl}$). Agiter jusqu'à dissolution complète. Transférer dans une fiole jaugée de 1 000 ml et compléter au volume avec de l'eau. Bien homogénéiser.
- Cette solution, conservée au réfrigérateur, est stable pendant 1 mois.
- 3.4 Solution étalon mère de nitrite c (NO_2^-) = 100 mg/l
 Dissoudre dans de l'eau 150 mg de nitrite de sodium, pesés à 0,1 mg près. Transférer dans une fiole jaugée de 1 000 ml et compléter au volume avec de l'eau.
 Conserver cette solution dans un flacon en verre inactif, au plus un mois, au réfrigérateur.
- 3.5 Solution étalon de nitrite c (NO_2^-) = 1 mg/l
 Prélever, à l'aide d'une pipette, 10 ml de la solution étalon mère (3.4), les introduire dans une fiole jaugée de 1 000 ml et compléter au volume avec de l'eau.
 Cette solution doit être préparée extemporanément.
- 4 APPAREILLAGE
 Toute la verrerie doit être soigneusement lavée avec une solution d'acide chlorhydrique à environ 2 mol/l et rincée abondamment à l'eau.
- Matériel courant de laboratoire et spectromètre, permettant des mesures à une longueur d'onde de 540 nm, équipé de cuves de longueur de parcours optique de 10 et/ou 40 mm.
- 5 ÉCHANTILLON
 Les échantillons doivent être refroidis à une température voisine de 5°C et analysés aussitôt que possible après le prélèvement.
- 6 MODE OPÉRATOIRE
 6.1 Prise d'essai
 Si l'échantillon contient moins de 1 mg par litre de NO_2^- , introduire 50 ml de l'échantillon dans une fiole jaugée de 50 ml.
 Si l'échantillon contient plus de 1 mg par litre de NO_2^- , diminuer la prise d'essai et ajuster à 50 ml avec de l'eau distillée.
- 6.2 Courbe d'étalonnage (valable pour des cuves de longueur de parcours optique de 10 mm)
 Introduire dans des fioles jaugées de 50 ml, respectivement :
 0 — 1 — 2 — 5 — 10 — 20 — 30 — 40 et 50 ml de la solution étalon (3.5). Compléter si nécessaire au volume avec de l'eau et homogénéiser.
- es solutions d'étalonnage ainsi préparées contiennent, respectivement 0 — 1 — 2 — 5 — 10 — 20 — 30 — 40 et 50 µg de NO_2^- .
- Dans chaque fiole, ajouter 1,0 ml de réactif de diazotation (3.3) et homogénéiser.
- Au moins 30 min après l'ajout du réactif, mesurer l'absorbance de la solution à la longueur d'onde correspondant à l'absorbance maximale (environ 540 nm) en utilisant l'eau comme liquide de référence.
- Soustraire l'absorbance du terme zéro des absorbances obtenues pour les autres solutions d'étalonnage et tracer une courbe d'absorbance en fonction de la masse en nitrite des solutions. La courbe doit être linéaire et passer par l'origine.
- 6.3 Dosage
 Ajouter à la prise d'essai (6.1), 1,0 ml du réactif de diazotation (3.3). Homogénéiser et laisser reposer.
- Au moins 30 min après l'ajout du réactif, mesurer l'absorbance de la solution à la longueur d'onde correspondant à l'absorbance maximale (environ 540 nm) dans une cuve de même longueur de parcours optique que celles utilisées pour l'étalonnage.
- Remarque : Le pH de la solution d'essai doit être de $1,9 \pm 0,1$ après l'ajout du réactif de diazotation. Si l'acidité de l'échantillon est très élevée et telle que le pH de la solution d'essai n'est pas de $1,9 \pm 0,1$, il convient d'opérer sur un volume de prise d'essai (6.1) inférieur à 50 ml et d'ajouter un excès d'acide orthophosphorique (3.2) avant de compléter à 50 ml afin d'obtenir le pH spécifié.
- 6.4 Essai à blanc
 Effectuer un essai à blanc en procédant comme décrit en 6.3 mais en remplaçant la prise d'essai par 50 ml d'eau.
- 6.5 Correction pour la couleur
 Si la coloration, de la prise d'essai est telle qu'elle est susceptible d'interférer lors de la mesure de l'absorbance, traiter une deuxième prise d'essai comme en 6.3 en remplaçant le réactif de diazotation (3.3) par 1,0 ml d'acide orthophosphorique (3.2).
- 7 EXPRESSION DES RÉSULTATS
 L'absorbance corrigée Ar de la solution d'essai est donnée par la formule :
- $$Ar = As - Ab$$
- où, si l'on a procédé à une correction pour la couleur :
- $$Ar = As - Ab - Ac$$
- où :
- As est l'absorbance de la solution d'essai (6.3).
 Ab est l'absorbance de la solution d'essai à blanc (6.4).
 Ac est l'absorbance de la solution préparée pour la correction de la couleur (6.5).
- Déduire de Ar, à partir de la courbe d'étalonnage (6.2), la masse correspondante de nitrite.

NORME FRANÇAISE HOMOLOGUÉE	ESSAIS DES EAUX	NF
	DOSAGE DE L'AZOTE AMMONIACAL	T 90-015
		Août 1975

FEMME - T.H. : (1) 778-13-28

AVANT-PROPOS

Les concentrations en azote ammoniacal dans les eaux sont très variables; il en est de même des besoins et des possibilités des laboratoires qui effectuent les analyses correspondantes. En outre, la nature et la concentration des éléments contenus dans l'eau et qui sont susceptibles de perturber le dosage, sont également très diverses. Ce dosage est donc justiciable de techniques différentes : trois d'entre elles sont décrites ci-après :

3^{ème} PARTIE

MÉTHODE SPECTROPHOTOMÉTRIQUE AU RÉACTIF DE NESSLER

1. OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

La présente partie a pour objet la description d'une méthode de dosage de l'azote ammoniacal dans les eaux, par mesure spectrophotométrique au réactif de Nessler.

Elle est applicable aux teneurs en azote ammoniacal, exprimées en NH_4 , supérieures à 0,1 mg/l.

Elle n'est pas applicable en présence d'amines aromatiques ou aliphatiques, de chloramines organiques, d'acétone, d'aldéhydes. Elle n'est pas applicable non plus aux eaux colorées, troubles ou chargées en matières organiques.

Cette méthode ne doit pas être considérée comme une méthode de référence à utiliser au laboratoire mais comme une technique pouvant être mise en œuvre sur le lieu de prélèvement dans le but d'obtenir une première information.

2. PRINCIPE

Addition à l'échantillon de tartrate double de sodium et de potassium qui a principalement pour rôle d'éviter la formation ultérieure d'un louche dû à l'interférence du calcium et du magnésium éventuellement présents.

Réaction, en présence d'hydroxyde de potassium ou de sodium, entre le réactif de Nessler et les ions NH_4 avec formation d'un composé de coloration variant du rouge orange au brun.

Mesure spectrophotométrique à une longueur d'onde voisine de 420 nm de la coloration obtenue.

3. RÉACTIFS

Au cours de l'analyse n'utiliser que de l'eau récemment déminéralisée sur résine cationique forte ou de l'eau de pureté équivalente dont la teneur en azote ammoniacal est négligeable.

3.1 Réactif de Nessler

Traiter une solution de 50 g d'iode de potassium dans 35 ml d'eau, par une solution saturée de chlorure de mercure II jusqu'à ce qu'un léger précipité subsiste. Ajouter ensuite 400 ml de solution d'hydroxyde de sodium 9 N. Diluer la solution à 1 000 ml en fiole jaugée. Laisser reposer et décanter.

3.2 Tartrate double de potassium et de sodium, solution concentrée.

Dissoudre 500 g de tartrate double de potassium et de sodium ($\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{K}_2\text{Na}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$) dans 1 000 ml d'eau chaude.

Après refroidissement, ajouter 50 ml de réactif de Nessler (3.1), laisser reposer deux jours et filtrer (les ions ammonium éventuellement présents dans l'eau ou dans les réactifs sont ainsi éliminés).

3.3 Azote ammoniacal, solution étalon à 10 mg de NH_4 par litre.

Dissoudre 297 mg de chlorure d'ammonium dans de l'eau et amener à 1 000 ml en fiole jaugée. Diluer au dixième la solution obtenue.

4. APPAREILLAGE

Matériel courant de laboratoire.

Spectrophotomètre (longueur d'onde : 420 nm).

Nettoyer très soigneusement la verrerie utilisée et, de préférence, réserver son usage au seul dosage de l'azote ammoniacal.

5. ÉCHANTILLON

Les échantillons destinés au laboratoire d'analyse doivent, aussitôt que possible après leur prélèvement, être refroidis à une température voisine de 5 °C.

L'analyse doit être effectuée aussitôt que possible après le prélèvement.

6. MODE OPÉRATOIRE

6.1 PRISE D'ESSAI :

Prélever 50 ml de l'échantillon si sa teneur en NH_4 est inférieure à 5 mg/l. Si ce n'est pas le cas, prélever un volume plus petit et ajuster à 50 ml avec de l'eau.

6.2 COURSE D'ÉTALONNAGE (pour un parcours optique de 10 mm)

Dans une série de fioles jaugées de 50 ml, introduire :

0 - 1 - 2 - 5 - 10 - 15 - 20 - 25 ml de solution étalon d'azote ammoniacal (3.3) correspondant à :
0 - 10 - 20 - 50 - 100 - 150 - 200 - 250 μg de NH_4 , soit, pour une prise d'essai de 50 ml à
0 - 0,2 - 0,4 - 1,0 - 2 - 3 - 4 - 8 mg de NH_4 par litre.

Prélever au volume avec de l'eau et ajouter 2,0 ml de la solution de tartrate (3.2). Mélanger. Ajouter 2,0 ml de réactif de Nessler (3.1) et mélanger à nouveau.

Attendre 10 min et effectuer les mesures spectrophotométriques à la longueur d'onde de 420 nm après avoir réglé l'appareil au zéro d'absorbance par rapport à l'eau.

Dénitrification biologique d'une nappe phréatique polluée par des composés azotés d'origine industrielle

Résultats & Discussion

Annexe 8

Qualité physico-chimique de la nappe de la craie
(novembre 1993)

GROUPES DE PARAMÈTRES	PARAMÈTRES	valeur guide	concentration maximale Admissible
		↓	↓
Paramètres organoleptiques.	Coloration (après filtration simple) mg/l (échelle Pt)	10	20
	Odeur (facteur de dilution à 25 °C)	3	
Paramètres physico-chimiques liés à la structure naturelle des eaux.	Conductivité µS/cm à 20 °C	1 000	
	Température (°C)	22	25
	pH (unités pH)	6,5-8,5	
	Chlorures (mg/l Cl)	200	
	Sulfates (mg/l SO ₄)	150	250
	Matières en suspension (mg/l)	25	
	Demande biochimique en oxygène (DBO ₅) à 20 °C sans nitrification (mg/l O ₂)	< 3	
	Demande chimique en oxygène (DCO) (mg/l O ₂)		
	Taux de saturation en oxygène dissous (% O ₂)	> 70	
Paramètres concernant les substances indésirables.	Nitrates (mg/l NO ₃)	25	50
	Ammoniaque (mg/l NH ₄)	0,05	
	Azote Kjeldhal (NO ₃) excepté (mg/l N)	1	
	Hydrocarbures dissous ou émulsionnés après extraction par éther de pétrole (mg/l)		0,05
	Phénols (indice phénol) para-nitraniline 4 aminoantipyrine (mg/l C ₆ H ₅ OH)		0,001
	Agents de surface réagissant au bleu de méthylène (mg/l lauryl-sulfate)	0,2	
	Substances extractibles au chloroforme (mg/l)	0,1	
	Fer dissous (mg/l Fe)	0,1	0,3
	Manganèse (mg/l Mn)	0,05	
	Cuivre (mg/l Cu)	0,02	0,05
	Zinc (mg/l Zn)	0,5	3

GROUPES DE PARAMÈTRES	PARAMÈTRES	valeur guide	concentration maximale admissible	
		↓	↓	
Paramètres concernant les substances indésirables.	Phosphore (mg/l P ₂ O ₅)	0,4		
	Fluor (mg/l F)	0,7-1	1,5	
	Bore (mg/l B)	1		
	Baryum (mg/l Ba)		0,1	
Paramètres concernant les substances toxiques.	Arsenic (µg/l As)	10	50	
	Cadmium (µg/l Cd)	1	5	
	Cyanures (µg/l CN)		50	
	Chrome total (µg/l Cr)		50	
	Plomb (µg/l Pb)		50	
	Mercure (µg/l Hg)	0,5	1	
	Sélénium (µg/l Se)		10	
	Hydrocarbures polycycliques aromatiques total 6 substances visées par décret du 3 janvier 1989 (µg/l)		0,2	
	Pesticides.	Total : parathion, HCH, dieldrine (µg/l) .		1
	Paramètres microbiologiques.	Coliformes totaux 37 °C (100 ml)	50	
Coliformes thermotolérants (100 ml)		20		
Streptocoques fécaux (100 ml)		20		
Salmonelles		Absence dans 5 000 ml		

Tableau 1 - Normes des eaux destinées à la consommation humaine

ANALYSE CHIMIQUE TYPE C3

<u>PARAMETRES ORGANOLEPTIQUES</u>		Normes françaises (Seuils et Unités)	
. Aspect		qualitatif	
. Couleur		NF T90-034	2 mg/l de Pt-Co
. Odeur-saveur (seuil de goût)		NF T90-035	0 à 25°C
. Odeur-saveur (seuil de goût)		NF T90-035	0 à 12°C
. Turbidité		NF T90-033	NTU

<u>PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES</u>		Normes françaises (Seuils et Unités)	
. Température	NF T90-100	°C	
. pH	NF T90-008		
. Conductivité	NF T90-031	0,5 µS/cm	
. Silice SiO ₂	NF T90-007*	0,5 mg/l	
. Résidu sec 180°C	NF T90-029	1 mg/l	
. Oxygène dissous	NF T90-106		0,5 mg/l
. CO ₂ libre	NF T90-011		< 1 mg/l
. Matières oxydables			
au KMnO ₄	NF T90-050		0,1 mg/l
. Chlore résiduel libre ..	NF T90-038		0,03 mg/l
. Chlore résiduel total ...	NF T90-038		0,03 mg/l

<u>BALANCE IONIQUE : ANIONS</u>	mg/l	<u>CATIONS</u>	mg/l		
. Chlorures Cl ⁻ ..	NF T90-014	2	. Calcium Ca ⁺⁺	NF T90-005**	1
. Sulfates SO ₄ ⁻ ..	NF T90-009*	2	. Magnésium Mg ⁺⁺ ..	NF T90-112**	0,05
. Nitrates NO ₃ ⁻ ..	NF T90-012*	0,5	. Sodium Na ⁺	NF T90-019	1
. Nitrites NO ₂ ⁻ ..	NF T90-013*	0,05	. Potassium K ⁺	NF T90-019	0,5
. Phosphore total P ₂ O ₅	NF T90-023	0,1	. Aluminium Al ⁺⁺⁺ ..	NF T90-119**	0,02
. Carbonates CO ₃ ⁻ ..	NF T90-036	0	. Ammonium NH ₄ ⁺ ..	NF T90-015	0,05
. Hydrogénocarbonates			. Fer Fe	NF T90-112**	0,02
HCO ₃ ⁻	NF T90-036*	5	. Manganèse Mn	NF T90-119**	0,02
. Fluor F ⁻	NF T90-004	0,05	. Cuivre Cu	NF T90-112	0,05
			. Zinc Zn	NF T90-112	0,05

* ou colorimétrie sur autoanalyseur
** ou spectrométrie d'émission atomique (ICP)

ANALYSE TYPE C4aPARAMETRES INDESIRABLES

	Normes françaises	(Seuils et Unités)
. Azote Kjeldhal	Minéralisation puis colorimétrie sur autoanalyseur	1 mg/l
. Hydrocarbures dissous (indice CH2)	NF T90-114	50 µg/l
. Indice Phénol	NF T90-109	10 µg/l
. Agents de surface (détergents anioniques)	NF T90-039	50 µg/l

ANALYSE COMPLEMENTAIRE C5

	Normes françaises	(Seuils et Unités)
. Dureté	NF T90-003*	0,5 °F
. Carbone Organique Total	NF T90-102	0,2 mg/l
. Cobalt	NF T90-119	5 µg/l
. Argent	NF T90-119	1 µg/l
. Béryllium	NF T90-119**	1 µg/l
. Nickel	NF T90-119	5 µg/l
. Antimoine	Abs. At. hydrures	5 µg/l
. Vanadium	NF T90-119**	10 µg/l

* ou colorimétrie sur auto-analyseur

** ou spectrométrie d'émission atomique (ICP)

Tableau 2 - Programmes d'analyses effectuées sur la nappe de la craie (Institut Pasteur de Lille)

N° Piézo		P18	P19	P20	P01	P02	P08	P09	P12	P13	P14	P15	P16	P48	P75
Date		03/11/1993	03/11/1993	03/11/1993	02/11/1993	03/11/1993	03/11/1993	08/11/1993	04/11/1993	08/11/1993	03/11/1993	02/11/1993	04/11/1993	03/11/1993	03/11/1993
Niveau d'eau	en m	8.76	9.14	7.28	7.9	10.52	12.79	15.38	2.18	4.64	9.47	7.85	3.45	3.5	5.71
Analyse Terrain															
pH	en pH	7.12	6.6	7.04	6.81	6.81	6.08	6.53	6.97	6.97	7.05	6.79	6.84	7.09	6.66
O2 dissout	en %	26%	24%	23%	16%	18%	29%	8%	11%	23%	31%	10%	18%	18%	31%
Rh	en mV	65	77	76	60	70	155	18	-155	114	127	190	94	181	134
Température	en °C	13.1	14.4	16.6	17.4	17.9	11.2	12.9	13.4	12.4	12	18.3	15.8	12.9	17
Conductivité	en µS/cm	764	2300	1920	3570	1730	810	1000	1120	480	798	3650	2760	780	2560
Conductivité 25°C	en µS/cm	988	2920	2310	4190	2240	1160	2120	1460	630	1069	3990	3380	1024	3040
Analyse Laboratoire															
Aspect		Legt jaune	Legt jaune	Jaune	Incolore	Legt jaune	Incolore	Dépôts	Jaune	Incolore	Limpide	Legt jaune	Jaune	Limpide	Jaune
Couleur	mg/l	15	7	7	20	7	10	2	20	15	5	2	15	7	<1
Turbidité	NTU	3.4	2.4	4.1	2	2.9	1.5	99	8.6	1.5	2.4	4.9	0.5	0.16	2
CO2 Equilibrant	mg/l	35	103	29	76	67	3	190	40	58	34	50	89	28	95
Oxydabilité	mgO2/l	5	3.4	4.8	3.7	2.9	2.3	6.1	3	2.6	1.4	5.5	7.1	1.6	6.7
Conductivité	µS/cm	923	2790	2040	4200	2150	1080	2040	1320	1069	973	4380	3000	1027	2880
Silice	mg/l	10.7	13.1	16.1	19	11.3	6.2	16.3	7	9.1	11.2	13.5	11	11	14.1
C.O.T.	mg/l	4.3	2.5	2.5	3	2.5	2.2	8.4	3.2	2.9	1.7	3.5	3.9	2.6	4.2
Dureté Totale	°F	43.3	114	56.8	127	82	22.7	125	60.2	46	42.2	106	114	44	97
Calcium	mg/l	159	410	199	465	304	82	320	208	164	152	384	400	155	340
Magnésium	mg/l	50	8.8	32.8	20.1	26.4	21.6	6.9	110	14.6	11.4	22.8	23	7.9	27.4
Sodium	mg/l	150	48.3	79.8	65.3	113	133	80.2	65.7	59.2	62.7	65.2	135	63.7	85.2
Potassium	mg/l	12	8	146	10.3	24.9	56.5	29.8	7.6	12	9.3	22.4	24.6	9.5	18.4
Ammonium	mg/l	0.5	<0.05	26.6	115	265	25	<0.05	2.1	23.3	1	<0.05	350	124	3.35
Aluminium total	mg/l	0.2	0.009	<0.005	<0.005	0.013	<0.005	0.016	0.14	<0.005	0.012	0.005	0.025	<0.005	<0.005
Somme Cations	meq/l	11	31.9	21.2	43.6	24.7	11.2	28.9	16.1	12	11.4	43.9	<0.005	35.3	11.6
Chlorures	mg/l	200	48	206	127	156	137	91	90	108	64	53	272	316	88
Sulfates	mg/l	250	160	360	195	168	300	240	700	350	150	140	248	248	132
Nitrates	mg/l	50	59.8	784	556	1870	528	146	0.4	0.6	48.9	109	1590	1027	99
Nitrites	mg/l	0.1	<0.05	0.12	<0.05	0.05	0.39	1.49	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	0.05	0.47	<0.05
P Total	mg P2O5/l	5	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0.9	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0.2	<0.1	0.1
Carbonates	mg/l	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
Bicarbonates	mg/l	312	364	254	300	335	91	671	321	362	304	283	354	312	378
Fluorures	mg/l	0.4	0.4	0.65	0.5	0.3	0.5	0.18	0.65	0.46	0.12	0.43	2.4	0.2	1.5
Somme Anions	meq/l	10.8	31.9	20.8	43	24.1	11.5	28.1	15.6	11.7	11.1	43.1	36.4	11.9	31.3
Cyanures	µg/l	50	<10	14	44	10	<10	10	30	<10	<10	12	106	10	600
Azote Kjeldahl	mg/l	1	1.5	21	90	225	19.5	<1	2.6	18.5	1.6	<1	270	97	2.8
Fer Total	mg/l	0.2	0.35	0.36	0.76	0.12	0.45	<0.02	2.7	0.96	0.24	0.4	0.43	0.03	<0.02
Manganèse	mg/l	0.05	0.02	0.04	<0.02	0.03	0.04	<0.02	0.09	0.15	0.07	<0.02	0.04	0.08	<0.02
Cuivre	mg/l	1	0.06	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02
Zinc	mg/l	5	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	0.07	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
Arsenic	µg/l	50	380	6	14	50	<5	<5	<5	10	<5	<5	8	130	<5
Bore	µg/l	210	236	305	306	300	188	216	238	264	295	300	338	272	300
Chrome Total	µg/l	50	50	70	30	55	30	110	<5	45	75	30	<5	<5	<5
Cobalt	µg/l	<5	11	8	<5	10	<5	6	<5	12	<5	20	17	<5	25
Nickel	µg/l	50	110	155	70	310	<5	360	7	160	150	160	20	<5	10
Antimoine	µg/l	10	<5	<5	<5	9	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
Vanadium	µg/l	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
Phénols	µg/l	0.5	10	40	<10	20	<10	13	<10	<10	10	<10	20	<10	10
Détergents anioniques	mg/l	<0.05	<0.05	<0.05	0.26	<0.05	<0.05	0.08	<0.05	<0.05	<0.05	0.21	0.2	<0.05	0.27
Hydrocarbures (CH2)	µg/l	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50
Somme des HPA détectés	µg/l	0.01	0.016	0.009	0.057	0.038	<0.005	<0.005	0.02	0.034	<0.005	0.27	0.017	0.01	0.425
Polychlorobiphényles	µg/l	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

Tableau 3- Analyses effectuées sur l'eau de la nappe

BRGM-ANALYSE
ETUDE M6557A -DE003177-

Annexe 8

Annexe 8

Ech. / N.	Ele.	SiO ₂	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	CaO	MgO	K ₂ O	MnO	TiO ₂	P ₂ O ₅	Li		
n°	UNIT	g/t	g/t	g/t	g/t	g/t	g/t	g/t	g/t	g/t	g/t	g/t	g/t
piézométre (profondeur)	BINF	10.	1.0	1.0	1.0	1.0	0.50	0.01	0.01	100.	10.	2.	10.
	BSUP	100.0	100.0	100.0	100.0	50.0	20.00	20.00	35.00	80000.	40000.	3500.	18000.
P16.A (3m)	0001	2.6	-1.0	-1.0	48.8	-1.0	-0.50	0.02	0.02	810.	-10.	-2.	46.
P16.B (4m)	0002	1.6	-1.0	-1.0	52.2	-1.0	-0.50	0.02	0.02	808.	-10.	-2.	46.
P16.C (5m)	0003	2.6	-1.0	-1.0	54.8	-1.0	-0.50	0.04	0.02	1384.	-10.	-2.	46.
P12.A (2m)	0004	47.0	5.2	1.4	26.2	-1.0	1.20	0.04	0.44	1124.	-10.	-2.	68.
P12.B (2,5m)	0005	31.8	3.2	-1.0	33.2	-1.0	0.80	0.04	0.26	1170.	-10.	-2.	60.
P12.C (3,2m)	0006	37.8	3.6	1.2	30.8	-1.0	1.00	0.04	0.32	1106.	-10.	-2.	62.
P75.A (4m)	0007	2.8	-1.0	-1.0	53.6	-1.0	-0.50	0.04	0.02	818.	-10.	-2.	46.
P75.B (4,5m)	0008	5.2	-1.0	-1.0	50.4	-1.0	-0.50	0.04	0.04	1084.	-10.	-2.	46.
P75.C (5m)	0009	2.2	-1.0	-1.0	54.0	-1.0	-0.50	0.04	0.02	970.	-10.	-2.	46.
P45.A (2m)	0010	1.8	-1.0	-1.0	51.2	-1.0	-0.50	0.02	0.02	964.	-10.	-2.	44.
P45.B (4m)	0011	2.2	-1.0	-1.0	52.8	-1.0	-0.50	0.02	0.02	2432.	-10.	-2.	46.
P45.C (5m)	0012	1.8	-1.0	-1.0	52.4	-1.0	-0.50	0.04	0.02	2096.	-10.	-2.	44.

Ech. / N.	Ele.	V	Cr	Co	Ni	Cu	Zn	As	Sr	Y	Nb	Mo	Ag
n°	UNIT	g/t	g/t	g/t	g/t	g/t	g/t	g/t	g/t	g/t	g/t	g/t	g/t
piézométre (profondeur)	BINF	10.	10.	5.	10.	5.	5.	20.	5.	20.	20.	5.	0.2
	BSUP	40000.	13000.	25000.	18000.	8000.	20000.	50000.	10000.	5000.	15000.	7500.	300.0
P16.A (3m)	0001	22.	-10.	-5.	-10.	-5.	18.	-20.	588.	-20.	-20.	8.	-0.2
P16.B (4m)	0002	22.	-10.	-5.	-10.	-5.	16.	-20.	660.	-20.	-20.	10.	0.2
P16.C (5m)	0003	20.	-10.	-5.	-10.	-5.	16.	-20.	666.	-20.	21.	10.	-0.2
P12.A (2m)	0004	48.	-10.	-5.	-10.	6.	38.	-20.	306.	-20.	-20.	12.	-0.2
P12.B (2,5m)	0005	34.	-10.	-5.	-10.	-5.	24.	-20.	394.	-20.	-20.	6.	-0.2
P12.C (3,2m)	0006	34.	-10.	-5.	-10.	12.	26.	-20.	380.	-20.	-20.	6.	-0.2
P75.A (4m)	0007	22.	-10.	-5.	-10.	-5.	18.	-20.	646.	-20.	-20.	8.	-0.2
P75.B (4,5m)	0008	22.	-10.	-5.	-10.	-5.	18.	-20.	604.	-20.	-20.	8.	-0.2
P75.C (5m)	0009	22.	-10.	-5.	-10.	-5.	18.	-20.	654.	-20.	32.	5.	-0.2
P45.A (2m)	0010	24.	-10.	-5.	-10.	6.	78.	-20.	670.	-20.	-20.	7.	-0.2
P45.B (4m)	0011	22.	-10.	-5.	-10.	-5.	20.	-20.	694.	-20.	27.	5.	-0.2
P45.C (5m)	0012	18.	-10.	-5.	-10.	-5.	14.	-20.	656.	-20.	38.	8.	-0.2

Ech. / N.	Ele.	Cd	Sn	Sb	Ba	La	Ce	W	Pb	Bi	Zr	PP	Na
n°	UNIT	g/t	g/t	g/t	g/t	g/t	g/t	g/t	g/t	g/t	g/t	g/t	g/t
piézométre (profondeur)	BINF	2.	10.	10.	10.	20.	10.	10.	10.	10.	20.	0.05	0.01
	BSUP	5000.	20000.	25000.	3500.	15000.	5500.	15000.	6000.	10000.	13000.	100.00	100.00
P16.A (3m)	0001	-2.	-10.	-10.	20.	30.	54.	-10.	-10.	-10.	292.	1.02	0.06
P16.B (4m)	0002	-2.	-10.	-10.	18.	36.	84.	-10.	-10.	-10.	292.	0.74	0.05
P16.C (5m)	0003	-2.	-10.	10.	22.	34.	66.	-10.	-10.	-10.	268.	1.02	0.05
P12.A (2m)	0004	-2.	-10.	-10.	194.	36.	102.	-10.	-10.	-10.	458.	2.02	0.44
P12.B (2,5m)	0005	-2.	-10.	-10.	118.	32.	78.	-10.	-10.	-10.	356.	1.52	0.30
P12.C (3,2m)	0006	-2.	-10.	-10.	140.	32.	74.	-10.	-10.	-10.	438.	1.08	0.35
P75.A (4m)	0007	-2.	-10.	-10.	22.	32.	54.	-10.	-10.	-10.	198.	0.84	0.05
P75.B (4,5m)	0008	-2.	-10.	-10.	30.	32.	62.	-10.	-10.	-10.	278.	0.89	0.09
P75.C (5m)	0009	-2.	-10.	-10.	22.	32.	68.	-10.	-10.	-10.	360.	0.95	0.07
P45.A (2m)	0010	-2.	-10.	10.	20.	34.	68.	-10.	-10.	-10.	314.	1.90	0.06
P45.B (4m)	0011	-2.	-10.	-10.	20.	34.	68.	-10.	-10.	-10.	228.	1.00	0.05
P45.C (5m)	0012	-2.	-10.	-10.	18.	32.	66.	-10.	-10.	-10.	582.	0.98	0.05

Ech. / N.	Ele.	SO ₄	Cl	CO ₃	NO ₃	NH ₄	Nt	St	C.or	H ₂ O-	PM
n°	UNIT	g/t	g/t	g/t	g/t	g/t	g/t	g/t	g/t	g/t	g/t
piézométre (profondeur)	BINF	0.05	0.01	0.10	0.01	0.01	0.01	0.01	0.05	0.05	0.05
	BSUP	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
P16.A (3m)	0001	-0.05	0.02	61.80	0.15	-0.01	-0.01	0.03	-0.05	23.00	22.90
P16.B (4m)	0002	-0.05	0.02	61.00	0.06	-0.01	0.01	0.04	-0.05	21.30	20.60
P16.C (5m)	0003	-0.05	-0.01	60.50	0.06	-0.01	-0.01	0.04	-0.05	26.40	21.50
P12.A (2m)	0004	-0.05	-0.01	25.80	0.03	-0.01	0.01	0.03	0.30	17.00	16.00
P12.B (2,5m)	0005	-0.05	-0.01	33.50	0.07	-0.01	-0.01	0.04	0.20	15.00	15.80
P12.C (3,2m)	0006	-0.05	-0.01	31.80	0.05	0.01	0.01	0.04	-0.05	17.40	16.70
P75.A (4m)	0007	-0.05	-0.01	61.00	0.03	-0.01	-0.01	0.04	-0.05	21.00	20.40
P75.B (4,5m)	0008	-0.05	-0.01	55.60	0.05	0.01	-0.01	0.04	-0.05	19.10	19.60
P75.C (5m)	0009	-0.05	-0.01	58.30	0.03	-0.01	0.01	0.04	-0.05	19.90	19.50
P45.A (2m)	0010	-0.05	0.02	61.30	0.08	-0.01	0.02	0.05	-0.05	18.60	18.70
P45.B (4m)	0011	-0.05	-0.01	56.60	0.12	-0.01	0.01	0.05	0.05	18.20	18.00
P45.C (5m)	0012	-0.05	-0.01	58.70	0.15	-0.01	-0.01	0.04	-0.05	17.40	17.80

Tableau 4 - Analyses effectuées sur les formations géologiques



Figure 1

CONTROLE QUALITE DU SOL

Profondeur : 5 m. COUPE LITHOLOGIQUE REALISEE AU DROIT DU P12

30/12/1993

Prof. (m)	Figure	Carotte	DESCRIPTION GEOLOGIQUE	Echelle	Teneur en eau	NO ₃ mg/kg	NH ₄ mg/kg	Niotal mg/kg	Corga. mg/kg	Siotal mg/kg	P205 mg/kg	CaO mg/kg	U/gsm.1023/g	U/gsm.1023/g
0	0	0	terre vegetale Remblai											
0.70			Sills argileux fonces	1									150	150
1.70			1,90 Sills argileux beige à silex	2	17.00	0.03	0.01	0.01	0.30	0.03	1124	26.2	13	54
2.20			2,10	2,18										
2.50			2,50		15.00	0.07	0.01	0.01	0.20	0.04	1170	33.2		
2.70			2,70										7.2	2.5
			Craie alteree argileuse	3									5.8	7.5
			3,10		17.40	0.05	0.01	0.01	0.05	0.04	1106	30.8		
			3,30											
				4									0.07	0.11
5.00				5										



Profondeur : 5 m.

Figure 2

CONTROLE QUALITE DU SOL

COUPE LITHOLOGIQUE REALISEE AU DROIT DU P15

30/12/1993

Prof. (m)	Figure	Carotte 0 100	DESCRIPTION GEOLOGIQUE	Echelle	Teneur en eau	NO ₃ mg/kg	NH ₄ mg/kg	Niotal mg/kg	Corgan. mg/kg	Stotal mg/kg	P205 mg/kg	CaO mg/kg	U/C _{org} mg/100g	U/C _{total} mg/100g
0.00			Remblai	1										
1.00			argile remaniée	1										
1.46														
1.90				2	18.6	0.08	0.01	0.02	0.05	0.05	964	51.2	19	46
2.20			Craie franche friable à oxydation noire	3									23	19
3.70				3									7.6	17
3.70				4	18.2	0.12	0.01	0.01	0.05	0.05	2432	52.8	1.9	24
4.20			Craie franche sans tâches noires (remaniée)	4										
4.70														
5.00				5	17.4	0.15	0.01	0.01	0.05	0.04	2096	62.4		
				785										



Figure 3

CONTROLE QUALITE DU SOL

Profondeur : 5 m. COUPE LITHOLOGIQUE REALISEE AU DROIT DU P16

30/12/1993

Prof. (m)	Figure	Carotte 0 100	DESCRIPTION GEOLOGIQUE	Echelle	Teneur en eau	NO ₃ mg/kg	NH ₄ mg/kg	Niotal mg/kg	Coprac mg/kg	Siotal mg/kg	P205 mg/kg	CaO mg/kg	UFC/cm.1023/g	UFC4 mL1023/g
			Rembloi	1										
1.30			Craie altérée légèrement argileuse										340 84	350 44
1.80			Craie plus franche, très légèrement argileuse	2										
2.30			Craie altérée argileuse zone de ballement à 2.45										8.4	14
3.00				3										
3.30			Craie altérée argileuse		23	0.15	0.01	0.01	0.05	0.03	810	48.8		
3.50				3,45									1.2	4
3.50			Craie franche avec passe verte de 20 cm		21.3	0.06	0.01	0.01	0.05	0.04	808	52.2	1.6	8.1
4.00				4										
4.30			Craie altérée argileuse											
4.50														
4.60			Craie franche avec passe de couleur verte de 10 cm		25.4	0.06	0.01	0.01	0.05	0.04	1384	64.8		
5.00				5										



Figure 4

CONTROLE QUALITE DU SOL

COUPE LITHOLOGIQUE REALISEE AU DROIT DU P75

Profondeur : 5 m.

31/12/1993

Prof. (m)	Figure	Carotte 0 100	DESCRIPTION GEOLOGIQUE	Echelle	Teneur en eau	NO ₃ mg/kg	NH ₄ mg/kg	Niotal mg/kg	Coppe mg/kg	Stotal mg/kg	P205 mg/kg	CaO mg/kg	UFC/m ³ 1923/g	UFC/m ³ 1923/g
0.00			Remblai											
1.00			Remblai de craie	1										
1.24			Silt argileux à nodules de craie											
1.60			Craie altérée légèrement silteuse	2									0	0
2.80				3									5.2	6.3
3.90			Craie franche	4	21	0.03	0.01	0.01	0.05	0.04	818	53.6	19	2.6
4.30														
4.40														
4.60					19.1	0.05	0.01	0.01	0.05	0.04	1084	60.4		
4.80													2.6	2.3
5.00				5	19.8	0.03	0.01	0.01	0.05	0.04	970	64.0		
				5,74										

Dénitrification biologique d'une nappe phréatique polluée par des composés azotés d'origine industrielle

Résultats & Discussion

Annexe 9

Essais de dénitrification en réacteurs

BRGM ANALYSE
 ETUDE A1309A -DE003762-

Tout échantillon liquide ou concernant des études d'environnement est détruit un mois après la délivrance des résultats sauf demande contraire du client.

LE(S) ELEMENT(S) SUIVANT(S) ONT ETE ANALYSE(S) DANS LE LABO : ICP/MS

: Fer. Mo: Molybdène Cu: Cuivre
 : Cobalt

METHODES ANALYTIQUES:(Modes Opératoires MO 029 et MO080)

Analyses par spectrométrie de masse avec excitation par plasma inductif.

Technique d'analyse multiélémentaire réservée aux déterminations d'éléments TRACES ou de MAJEURS po problèmes particuliers ne pouvant être résolus par les techniques habituelles.

RESULTATS:

Les résultats d'analyses semiquantitatives sont toujours donnés avec des fourchettes (ex As : 0,1 - 0,3 pour les majeurs et les traces.

50 éléments maximum sont déterminés par étude.

NOUS ATTIRONS L'ATTENTION DU DEMANDEUR SUR LE RISQUE D'UTILISATION ABUSIVE D SEMIQUANTITATIVES EN PARTICULIER L'ASSIMILATION DE L'UNE OU L'AUTRE DES BORNE D'ANALYSE.

Une valeur négative signifie inférieure à la limite inférieure de dosabilité (BINF).

Une valeur égale à la limite supérieure de dosabilité (BSUP) doit être considérée comme égale ou supérieure à cette limite.

formulaire QAL015

BRGM - ANALYSE
 ETUDE A1309A -DE003762- Le 18-MAY-94

Ech. / N.	Ele.	Fe	Mo	Cu	Co
	UNIT	g/t	g/t	g/t	g/t
	BINF	0.1	0.1	0.1	0.1
	BSUP	1000000.0	1000.0	100.0	100.0
CRAIE/NPC	0001	650.0	-0.1	3.9	3.2

Tableau 1 - Analyse chimique de la craie

	Réacteur 1	Réacteur 2	Réacteur 3	Réacteur 4
Azote nitrique (mg N/l)	0,079	71,5	0,429	0,025
Azote ammoniacal (mg N/l)	85,85	73,7	80,95	71,9
Azote nitreux (mg N/l)	0,01	1,32	0,01	0,01
C.O.T (mg/l)[~]	13,2	10,8	194	450
A.G.V.	*	*	*	*

*A.G.V. (Acides Gras Volatils) : aucun signal repérable pour les acides organiques suivants : acide valérique, acide propionique, acide iso-butyrique, acide iso-valérique, acide valérique, acide lactique.

Norme de potabilité : le facteur limitant est l'azote ammoniacal

Tableau 2 - Résultats des analyses chimiques effectuées sur les effluents

jours	R1 (éthanol faible)				R2 (éthanol faible+phosphates)				R3 (éthanol fort)				R4 (éthanol fort + phosphates)			
	Fe mg/l	Cu mg/l	Co µg/l	Mo µg/l	Fe mg/l	Cu mg/l	Co µg/l	Mo µg/l	Fe mg/l	Cu mg/l	Co µg/l	Mo µg/l	Fe mg/l	Cu mg/l	Co µg/l	Mo µg/l
jo+ 92	0,42	0,01	<5	<50	0,19	0,01	<5	<50	0,31	<0,01	<5	<50	0,17	<0,01	<5	<50
jo+98	0,07	0,01	<5	<50	0,09	0,02	<5	<50	0,12	<0,01	<5	<50	0,37	0,02	<5	<50
jo+105	0,06	0,01	<5	<50	0,17	0,02	<5	<50	0,07	<0,01	<5	<50	0,47	0,01	<5	<50
jo+112	0,08	0,01	<5	<50	0,19	0,02	<5	<50	0,06	<0,01	<5	<50	0,37	0,01	<5	<50
jo+119	0,09	0,02	<5	<50	0,09	0,01	<5	<50	0,19	0,01	<5	<50	0,2	0,02	<5	<50
jo+126	0,11	0,01	<5	<50	0,88	0,02	<5	<50	0,16	0,01	<5	<50	0,23	0,02	<5	<50
jo+134	0,15	0,02	<5	<50	0,17	0,02	<5	<50	0,15	0,01	<5	<50	0,10	0,02	<5	<50
jo+140	0,32	0,01	<5	<50	0,10	0,02	<5	<50	0,07	0,01	<5	<50	0,12	0,03	<5	<50

Tableau 3 - Concentrations résiduelles en métaux dans les effluents

Dénitrification biologique d'une nappe phréatique polluée par des composés azotés d'origine industrielle

Résultats & Discussion

Annexe 10

Cinétiques de dénitrification en batch

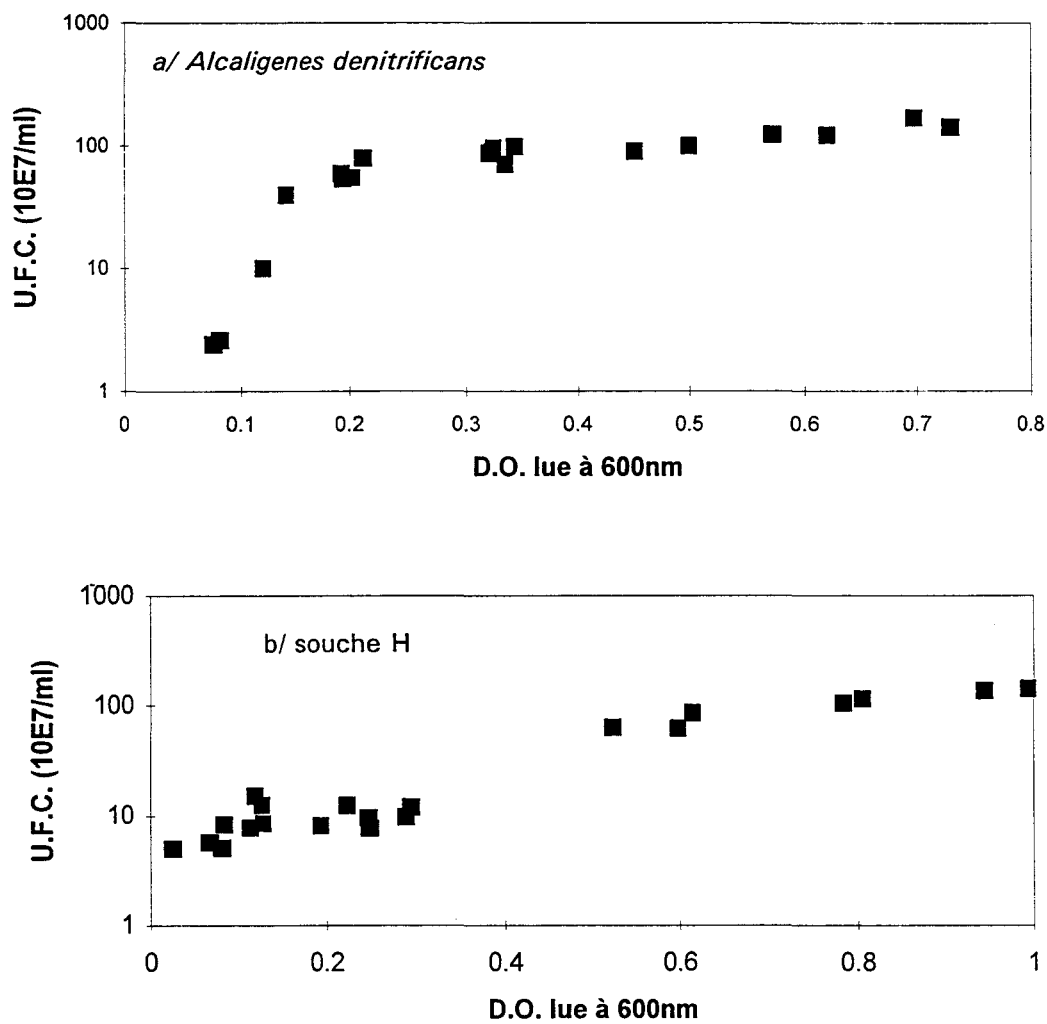
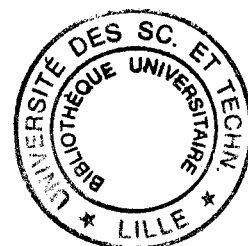


Figure 1 - Corrélation entre la mesure de la densité optique à 600 nm et le nombre d'U.F.C. dénombrées par ml.



RESUME

Les eaux souterraines exploitées sont souvent peu profondes et facilement accessibles aux pollutions, notamment aux nitrates. Il est donc important d'étudier la faisabilité de systèmes simples et peu coûteux de dénitrification biologique *in situ*, de nappes phréatiques.

Dans le cas présent, l'aquifère crayeux a été pollué par des infiltrations en provenance d'une usine d'engrais azotés. Le panache de pollution de la nappe s'étend sur plusieurs kilomètres en aval du site. L'acquisition de paramètres physico-chimiques et biologiques, dans la zone d'étude, a montré de fortes teneurs en nitrates (parfois supérieures à 1500 mg NO₃⁻/l), une faible population bactérienne et l'absence de substrat carboné disponible pour ces micro-organismes.

Lors d'essais de reproduction de l'écosystème naturel, en réacteurs-pilotes à biofilms fixés sur des supports minéraux (craie ou pouzzolane), une dénitrification biologique rapide s'est mise en place lorsqu'un inoculum est introduit au démarrage. L'apport optimal en carbone organique est déterminé égal à 0,8-1 g DCO/g NO₃⁻ à éliminer, quelque soit la source de carbone utilisée (glucose ou éthanol). Une stabilisation de la concentration résiduelle en nitrates proche de 150 mg/l (85-90% d'élimination) est observée parallèlement à une concentration excessive de nitrites (60 mg/l) dans les effluents. L'addition de métaux, associés aux enzymes de la dénitrification (fer, cuivre, cobalt et molybdène), à l'état de traces a réduit la concentration résiduelle en nitrites de façon significative (80 à 98%), parallèlement à l'augmentation du rendement de dénitrification au-dessus de 95-98%. Par ailleurs, l'étude en culture pure de deux souches isolées lors de ces expériences (*Alcaligenes denitrificans* et une souche "H") a confirmé l'incidence, dans le processus de dénitrification, des éléments métalliques dès les très faibles concentrations (inférieures à 100 µg/l).

Au terme de ces travaux, il apparaît que la mise en place d'une installation pilote de terrain devra intégrer les résultats de laboratoire, et particulièrement le choix du système nutritif pour les micro-organismes, l'approvisionnement en apports carbonés et phosphorés et l'addition de métaux à l'état de traces, au moins lors du démarrage.