

EFFET DE LA NATURE DE LA SOURCE DE CARBONE SUR LA DENITRIFICATION

AOUATI MOHAMED KHELIL, BOUGHERARA HASSINA, ZEROUAL SOMIA ET KEBABI BRAHIM

Laboratoire Pollution et Traitement des Eaux,
Département de Chimie,
Université des Frères Mentouri Constantine 1, Constantine, Algérie

Reçu le 21/01/2017 – Accepté le 05/06/2017

Résumé

Nous avons étudié dans ce travail l'élimination des ions nitrate dans un réacteur batch à 30°C en utilisant une culture mixte prélevée dans la station d'épuration d'El Menia (Constantine-Algérie). Nous avons commencé cette étude en utilisant le succinate de sodium comme source de carbone. Le succinate de sodium faisant partie du cycle de Krebs est facilement assimilable par les bactéries. Son utilisation a entraîné l'élimination pratiquement complète (98,96%) des ions nitrate après 80 heures de traitement. Cette dégradation a entraîné une augmentation du pH du milieu de 7,00 à 8,04. Il est connu que l'augmentation du pH entraîne une diminution de l'activité bactérienne. Nous avons remplacé le succinate de sodium par un mélange tampon d'acide acétique et d'acétate de sodium pour fixer le pH. Ceci a augmenté la vitesse de dénitrification pendant les premières heures de traitement là où l'effet tampon est maintenu. Cependant le rendement final de la dénitrification a diminué. L'utilisation des sources synthétiques de carbone nécessite l'ajout d'un milieu nutritif approprié. Certains produits naturels comme la farine de dattes contiennent à la fois des sources de carbone et les éléments constitutifs du milieu nutritif nécessaire pour la croissance bactérienne. La croissance bactérienne en présence de la farine de dattes a été meilleure que pour les deux premières sources de carbone étudiées. Le rendement de dénitrification a été meilleur que pour le mélange tampon et semblable à celui obtenu avec le succinate de sodium. Le pH optimal de dénitrification se situe dans la zone de pH neutres. La dénitrification est complète et ne s'arrête pas au stade de la formation des ions nitrite pour les trois sources de carbone.

Mots clés : Dénitrification, farine de dattes, nitrate, source de carbone, culture mixte.

Abstract

We studied in this work the elimination of nitrate ions in a batch reactor at 30°C using a mixed culture taken from the treatment plant of El Menia Constantine Algeria. We started this study using sodium succinate as a carbon source. Sodium succinate is part of the Krebs cycle and is easily assimilated by bacteria. Its use resulted in the almost complete (98.96%) removal of the nitrate ions after 80 hours of treatment. This degradation resulted in an increase in the pH of the medium from 7.00 to 8.04. It is known that the increase in pH leads to a decrease in bacterial activity. We replaced the sodium succinate with a buffer of acetic acid and sodium acetate to fix the pH. This increased the rate of denitrification during the first hours of treatment where the buffering effect is maintained. However, the final yield of denitrification has decreased. The use of synthetic carbon sources requires the addition of an appropriate nutrient medium. Some natural products such as date flour contain both carbon sources and components of the nutrient medium needed for bacterial growth. Bacterial growth in the presence of date flour was better than for the first two carbon sources studied. The denitrification yield was better than for the buffer mixture and similar to that obtained with sodium succinate. The optimum denitrification pH is in the neutral pH range. Denitrification is complete and does not stop at the stage of nitrite ion formation for the three carbon sources.

Keywords : denitrification, date flour, nitrate, carbon source, mixed culture.

ملخص

درسنا في هذا العمل تحلل أيونات النترات في مفاعل دفعي عند 30°C باستخدام خليط بكتيري مأخوذ من محطة المعالجة البيولوجية للمياه المستعملة الموجودة بالمنيا قسنطينة الجزائر. بدأنا هذه الدراسة باستخدام سوكسينات الصوديوم كمصدر للكربون. هذا الأخير يمثل إحدى مراحل دورة كريبس مما يسهل عملية تحلله من طرف البكتيريا. وقد أدى استخدامه إلى التحلل التام تقريباً (98,96%) لأيونات النترات خلال 80 ساعة من العلاج. أدى هذا التحلل في زيادة درجة حموضة الوسط من 7,00 إلى 8,04. من المعروف أن الزيادة في درجة الحموضة يؤدي إلى نقصان النشاط البكتيري. غيرنا سوكسينات الصوديوم بمحلول موقفي من حمض الأسيتيك و أسيتات الصوديوم لتثبيت درجة الحموضة. وقد أدى هذا إلى زيادة سرعة تحلل أيونات النترات خلال الساعات الأولى من العلاج. ومع ذلك، فإن نسبة تحلل النترات انخفضت. استخدام مصادر الكربون الاصطناعية يتطلب إضافة وسط مغذي مناسب. بعض المنتجات الطبيعية مثل مسحوق التمر يلعب دور مصدر للكربون ووسط مغذي في نفس الوقت. وكان نمو البكتيريا في وجود مسحوق التمر أفضل من مصادر الكربون الأولين. كانت نسبة تحلل أيونات النترات أفضل من المتحصل عليها باستخدام المحلول الموقفي و مماثلة لتلك التي تم الحصول عليها مع سوكسينات الصوديوم. درجة الحموضة المثلى لتحلل أيونات النترات تقع في منطقة pH محايد. تحلل النترات تام ولا يتوقف عند مرحلة تكوين أيون النتريت مع مصادر الكربون الثلاثة المستعملة.

الكلمات المفتاحية : إزالة النترات، مسحوق التمر، نترات، مصدر الكربون، خليط بكتيري.

Introduction :

La pollution des eaux par les nitrates à cause des pratiques agricoles est un problème croissant dans les principales zones agricoles du monde [1-3]. Les deux tiers des nitrates ajoutés se retrouvent dans les écosystèmes aquatiques [4, 5]. Le gouvernement Algérien veut diminuer la facture des importations alimentaires par une utilisation large et intense des terres agricoles. L'utilisation accrue d'engrais a entraîné une pollution progressive et continue des réserves d'eau par les ions nitrate. Une étude réalisée sur le barrage Ghrib Ain Defla (Nord-Ouest de l'Algérie) a montré que la concentration des ions nitrate en juillet est le double de celle du mois d'avril [6]. Cette période correspond à l'intervalle de temps durant lequel les engrais sont épandus dans les terres agricoles au voisinage de ce barrage. Cette pollution a atteint aussi les eaux souterraines. La concentration des ions nitrate dans la nappe aquatique de la plaine de la Mitidja (Nord de l'Algérie) a doublé en deux ans. Elle est passée de 130 mg/L en 2002 à 260 mg/L en 2004 [7] dépassant largement la norme O.M.S. (50 mg/L). Des valeurs de 80 à 120 mg/L ont été mesurées dans de nombreux puits captant la nappe de Chéria (Nord-Est de l'Algérie) [8]. La consommation d'une eau riche en ions nitrate provoque la méthémoglobinémie chez l'être humain [9]. Une forte concentration de ces ions dans les eaux douces continentales de surface entraîne leur eutrophisation.

Il existe plusieurs techniques physicochimiques de traitement des nitrates. Les plus utilisées sont les procédés d'échanges d'ions, l'osmose inverse [10] et les bioréacteurs à membrane combiné/adsorption sur charbon actif en poudre [11]. Les méthodes d'élimination de l'azote par voie physico-chimique ne semblent actuellement ni techniquement ni économiquement intéressantes. Ce sont des procédés d'une technologie assez complexe qui ne sont pas recommandables pour les pays en voie de développement. Les traitements biologiques apparaissent comme les mieux adaptés dans la majorité des cas, en raison de leur facilité de mise en œuvre et de leur coût modéré. Des processus nouveaux ont été développés au cours des dernières décennies. Ils sont appliqués à l'échelle industrielle et au niveau des stations d'épuration [12].

La dénitrification biologique utilise des bactéries pour la transformation des nitrates en azote gazeux. [13, 14]. La présence d'une source de carbone organique dans la dénitrification hétérotrophe est nécessaire. Elle joue le rôle d'un donneur final d'électrons [15]. Les autres paramètres qui influencent la dénitrification sont la concentration

d'oxygène dissout [16], la température [17] et la concentration initiale des ions nitrate à éliminer [18]. La concentration et la nature de la source de carbone ont un effet important sur la vitesse, le rendement de dénitrification et le développement de la biomasse [14]. La source de carbone à ajouter doit satisfaire à certaines conditions comme le la modicité du coût, l'absence de toxicité, la facilité de stockage et la production de biomasse sans adaptation des microorganismes. Le méthanol est la source de carbone extérieur la plus utilisée. Il a obtenu cette place grâce à son faible coût et sa facile assimilabilité par les microorganismes. Le coût de la source de carbone représente plus de 50% du coût total de traitement [19, 20]. L'éthanol et l'acide acétique constituent d'autres sources de carbone commerciales intéressantes [21, 22]. L'inconvénient majeur lors de l'utilisation de ces deux sources de carbone est l'accumulation des ions nitrite lorsque la concentration initiale des ions nitrate à éliminer est élevée. Ceci inhibe la croissance des microorganismes [21]. Il existe d'autres sources de carbone utilisées pour la dénitrification comme les copeaux de bois [23], le coton [14], le glucose, les pailles de blé [21,] et le riz hydrolysé [13].

Le but de cette étude est l'utilisation de nouvelles sources de carbone ayant des propriétés pouvant améliorer la dénitrification hétérotrophe. La première source que nous avons utilisée est le succinate de sodium. Cette source fait partie du cycle de Krebs. Elle est donc facilement assimilable par les microorganismes. En outre, nous avons utilisé comme source de carbone un mélange d'acétate de sodium et d'acide acétique. Ce mélange tampon a pour but de fixer le pH du milieu. L'efficacité des microorganismes ne sera pas altérée par la variation du pH lors du traitement. Pour finir, nous avons utilisé une source de carbone naturelle: la farine de datte. La farine de datte contient du saccharose, du glucose et du fructose [24]. Ce sont d'excellentes sources de carbone. La farine de datte contient aussi certains minéraux comme le fer, le sodium, le potassium, le magnésium, le phosphore le calcium, le cuivre, le zinc, le manganèse, l'iode et certaines vitamines comme les vitamines B9, B6, B5, B3, B2, B1, C et la provitamine A [25]. Ces éléments formeront un excellent milieu nutritif pour la croissance bactérienne. L'utilisation de la farine de datte lors de la dénitrification ne nécessite donc pas l'ajout d'un milieu nutritif approprié. De plus il n'y a aucun risque d'intoxication du milieu récepteur par l'excès non complètement dégradé de cette source. A cela s'ajoutent les économies réalisées par la non utilisation d'un milieu nutritif et par le bas prix de la farine de datte.

EFFET DE LA NATURE DE LA SOURCE DE CARBONE SUR LA DENITRIFICATION

II. Matériels et méthodes

II.1. Matériels

Un spectrophotomètre UV-Visible Techcomp 8500 a été utilisé pour mesurer la densité de la population bactérienne ainsi que pour le dosage des ions nitrate et des ions nitrite. Le pH a été mesuré à l'aide d'un pH-mètre HANNA instruments HI 8519 N. Une microcentrifugeuse sigma 1-15 a été utilisée pour la séparation des microorganismes du milieu nutritif.

Les bactéries utilisées dans ce travail ont été prélevées dans le fond du bassin de dénitrification de la station d'épuration des eaux d'El Menia (Constantine-Algérie) [26]. Les germes dénitrifiants existent dans les zones où la concentration en oxygène dissout est faible [27]. Les boues contenant les microorganismes prélevées dans la station d'épuration sont mises en suspension par agitation dans de l'eau distillée. Les microorganismes récupérés après centrifugation sont mélangés à une solution contenant le milieu nutritif [28] dont la composition est donnée au tableau 1, les ions nitrate (1000 mg/L) et la source de carbone (1000 mg/L). Le mélange est introduit à 30°C dans un réacteur agité en anoxie obtenu par barbotage d'azote pour favoriser la dénitrification [29]. La croissance bactérienne est suivie par des mesures de l'absorbance à 600 nm à des intervalles de temps réguliers. Au stade de la croissance exponentielle, les microorganismes sont récupérés par centrifugation et sont de nouveau introduits dans une solution fraîche contenant le milieu nutritif, les ions nitrate et la source de carbone. Le cycle précédent est repris plusieurs fois avant l'utilisation des microorganismes dans notre étude. La farine de datte est obtenue par séchage, broyage et tamisage des dattes. Seule la fraction granulométrique entre 0,08 mm et 0,016 mm est utilisée dans cette étude.

II.2. Méthodes d'analyses

Le dosage des ions nitrate a été réalisé d'une façon indirecte. Nous avons fait réagir les ions nitrate avec le salicylate de sodium pour obtenir le paranitrosalicylate de sodium. Ce dernier a été dosé à 415 nm [30].

Les nitrites ont été dosés aussi d'une façon indirecte. L'acide sulfanilique en milieu chlorhydrique, en présence d'ion ammonium et de phénol forme avec les ions nitrite un complexe qui est dosé à 435 nm [30].

Le dosage de la source de carbone a été réalisé par la mesure de la demande chimique en oxygène. L'oxydation énergétique en milieu sulfochromique de la matière organique entraîne une modification de la concentration en dichromate de potassium. Le dosage spectrophotométrique de l'oxydant résiduel à 340 nm nous permet de déterminer la quantité de la matière organique présente dans notre échantillon initial [30].

L'évolution de la turbidité durant nos expériences a été mesurée à une longueur d'onde de 600 nm.

Cette mesure nous a permis de déterminer l'évolution de la quantité de biomasse. Une courbe a été établie reliant la densité optique à 600 nm avec la masse de la biomasse récupérée après centrifugation.

Tableau 1. Composition du milieu de culture [28]

Elements	Concentrations
KH ₂ PO ₄	1,00 g/L
K ₂ HPO ₄	1,00 g/L
KNO ₃	1,00 g/L
NaCl	1,00 g/L
MgSO ₄	0,20 g/L
CaCl ₂	0,02 g/L
Solution TE	1,00 ml/L
pH	Ajusté à 4,2

Tableau 2. Composition de la solution minérale

Eléments	Concentrations
HCl 37%	6,76 ml/L
FeCl ₂ 4H ₂ O	1,5 g/L
H ₃ BO ₃	0,06 g/L
MnCl ₂ 4H ₂ O	0,1 g/L
CoCl ₂ 6H ₂ O	0,12 g/L
ZnCl ₂	0,07 g/L
NiCl ₂ 6H ₂ O	0,025 g/L
CuCl ₂ 2H ₂ O	0,015 g/l
NaMoO ₄ 2H ₂ O	0,025 g/L
EDTA	5,2 g/L

III. Résultats et discussions

III.1. Effet de la source de carbone sur la croissance bactérienne et la dénitrification

Nous avons commencé notre travail par une étude de la dénitrification avec un pH libre. Nous avons utilisé une concentration initiale en ions nitrate égale 1000 mg/L. Les sources de carbone utilisées sont le succinate de sodium, un mélange tampon d'acétate de sodium et d'acide acétique et finalement la farine de datte. La dénitrification est d'autant plus rapide que la quantité de carbone disponible est importante et rapidement biodégradable. Cette tendance s'inverse au delà d'un certain rapport de la concentration du carbone sur celle de l'azote (C/N). La vitesse maximale de dénitrification dans nos conditions d'étude a été obtenue pour une valeur du rapport C/N égale à 2,5 [29]. La consommation des ions nitrate par les bactéries entraîne leur multiplication. La figure 1 montre la cinétique de la croissance bactérienne. Elle suit quatre phases principales quelque soit la source de carbone utilisée. La première phase est la phase de latence. Durant cette phase le nombre de

bactéries reste constant. Elle correspond à une période où les bactéries inoculées dans le milieu s'adaptent à leur nouvel environnement et synthétisent les enzymes nécessaires à la métabolisation des substrats disponibles. La durée de cette phase varie selon la nature et la concentration de la source de carbone utilisée. Dans cette étude elle est de 10 heures pour le mélange tampon, 18 heures pour la succinate de sodium et 20 heures pour la farine de datte. A la fin de cette phase commence une deuxième phase où la croissance bactérienne est rapide. Le nombre de cellules en culture augmentent exponentiellement par rapport au temps. L'insuffisance des nutriments pour les bactéries au cours de la troisième phase entraîne un ralentissement de leur croissance. La quatrième phase correspond à une phase stationnaire. Il n'y a aucune augmentation du nombre de bactéries dans cette phase. La croissance bactérienne est fonction de la nature et de la concentration de la source de carbone. L'utilisation du succinate de sodium donne un bon taux de croissance des bactéries. Cette source de carbone est facilement assimilable par les bactéries car elle fait partie du cycle de Krebs [31]. Le pH initial augmente au cours de la dénitrification. Il est passé de 7,00 à 8,04 la fin de la dénitrification. L'utilisation du mélange tampon comme source de carbone améliore la croissance bactérienne surtout au début du processus là où l'effet tampon est maximum. Cet effet diminue avec le temps à cause de la consommation de la source de carbone par les bactéries. Cela a pour effet l'inhibition de la croissance bactérienne. La farine de datte constitue un milieu nutritif naturel propice à la croissance bactérienne. C'est la source de carbone qui donne le meilleur taux de croissance.

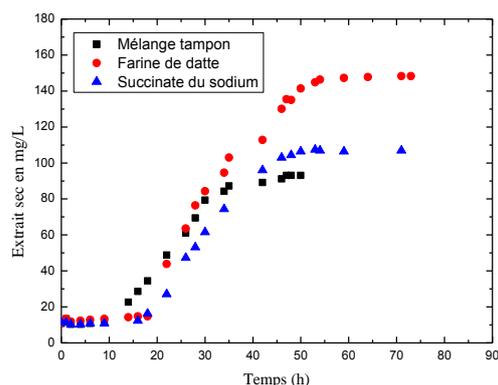


Figure 1. Croissance bactérienne

La figure 2 montre la cinétique de dénitrification d'un gramme des nitrates pour les trois sources de carbone.

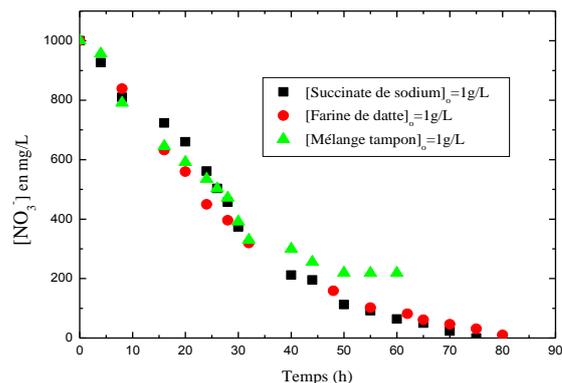


Figure 2. Cinétique de dénitrification

Les cinétiques de réduction des ions nitrate en utilisant le succinate de sodium et la farine de datte comme sources de carbone sont similaires. Le traitement abouti à une concentration en nitrates inférieure à 50 mg/L (la norme de l'O.M.S) après 80 heures de traitement. Le taux de dénitrification est de 98,96% et 97,66% pour le succinate de sodium et la farine de datte respectivement. La cinétique de dénitrification en présence du mélange tampon est rapide durant les premières heures de traitement. La dégradation du mélange tampon par les bactéries inhibe son efficacité. Ceci entraîne une augmentation du pH et par conséquent diminue la vitesse de dénitrification avec le temps. Le taux de dénitrification dans ce cas est de 79,31%.

III.2. Production des nitrites au cours de la dénitrification

La dénitrification biologique est un processus anoxique dans lequel les nitrates sont transformés en nitrites puis en azote gazeux sous l'action des bactéries hétérotrophes. [12, 13]. Les nitrates ne sont pas toxiques à dose physiologique tant qu'ils sont sous cette forme. Ils ont une toxicité indirecte. Le danger vient de la possibilité de leur transformation en nitrites qui ont une toxicité directe [33]. Il faut donc s'assurer que la dégradation des nitrates est complète et ne s'arrête pas au stade nitrite. Le processus ne sera pas intéressant s'il y a une accumulation des nitrites même à des petites quantités (la norme O.M.S. pour les nitrites est de 3 mg/L).

L'évolution de la concentration des nitrites en fonction du temps de traitement est représentée sur la figure 3. La concentration augmente pendant la dénitrification et atteint une valeur maximale après environ 10 heures de traitement pour la farine de datte, 27 heures pour le mélange tampon et 35 heures pour le succinate de sodium. Les concentrations des nitrites pour les trois sources de carbone étudiées diminuent graduellement avec le temps après ces pics. Une concentration inférieure aux normes O.M.S. est observée après 80 heures de

EFFET DE LA NATURE DE LA SOURCE DE CARBONE SUR LA DENITRIFICATION

dénitrification. Ces résultats suivent le modèle typique de la dénitrification biologique [7]. L'augmentation de la concentration des nitrites est passagère. L'accumulation des nitrites est moins importante en présence du succinate de sodium car cette source de carbone est plus facilement assimilable par les bactéries.

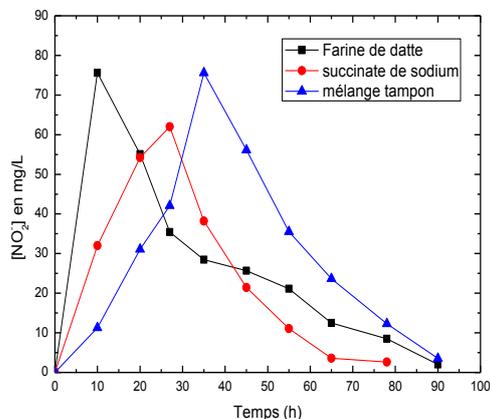


Figure 3. Evolution de la concentration des nitrites au cours de la dénitrification

III.3. Dénitrification en utilisant la farine de datte comme source de carbone

Les meilleurs résultats relatifs à la croissance bactérienne et à la dénitrification ont été obtenus avec la farine de datte comme source de carbone. Seule cette source sera utilisée dans la suite de cette étude.

III.3.1. Effet du pH sur la dénitrification

L'activité bactérienne dépend du pH lors de la dénitrification [34, 35]. Ceci est due au fait que la plupart des enzymes intervenant dans la dénitrification ont un groupe basique ou un groupe acide intervenant dans l'action catalytique. L'association des ions hydrogène ou hydroxyle produits dans le milieu avec le groupement acide ou basique de l'enzyme conduit une perte de son activité catalytique [36]. Le processus de dénitrification dépend de l'activité bactérienne et donc du pH. Nous avons représenté sur la figure 4 l'effet du pH initial sur le rendement de dénitrification après 100 heures de traitement et une concentration initiale en ions nitrate égale à 1000 mg/L. Il est clair que la dénitrification est optimale pour les pH se situant entre 6,5 et 7,5. Nous avons un taux de dénitrification de 95% pour un pH initial de 7,00.

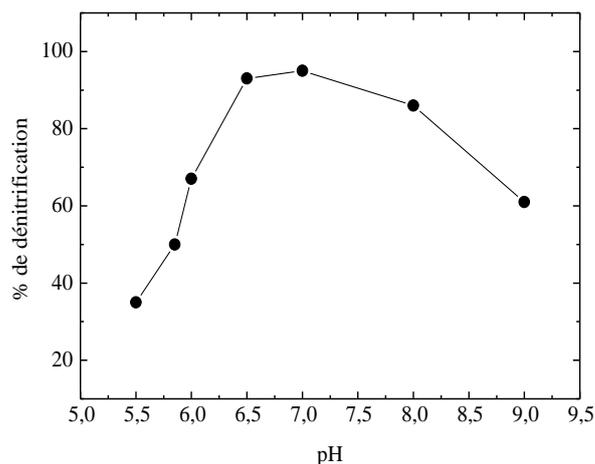


Figure 4. Effet du pH sur la dénitrification avec la farine de datte comme source de carbone

Conclusion

L'efficacité d'une culture mixte prélevée dans la station d'épuration d'El Menia (Constantine – Algérie) a été testée pour la dénitrification. Nous avons étudié trois sources de carbone dans un réacteur batch: le succinate de sodium, un mélange tampon d'acétate de sodium et d'acide acétique et finalement la farine de datte. L'utilisation d'une source de carbone synthétique nécessite l'ajout d'un milieu nutritif approprié. A cet effet la farine de datte a été utilisée à la fois comme source de carbone et milieu nutritif. La cinétique de croissance commence par une phase de latence, suivie d'une phase de croissance exponentielle et se termine par une phase de stagnation après l'épuisement de la source de carbone et du polluant. Les cinétiques de réduction des nitrates pour le succinate de sodium et la farine de datte sont similaires et une concentration en nitrates inférieure à 50 mg/L (la norme de l'O.M.S.) est obtenue après 80 heures de traitement avec un taux de dénitrification de 97,66% et 98,96% pour le succinate et la farine de datte respectivement. L'utilisation du succinate de sodium a entraîné une augmentation du pH qui passe de 7 à 8,04. L'utilisation d'un mélange tampon acétique a augmenté la vitesse de dénitrification pendant les premières heures de traitement là où l'effet tampon est maintenu. La dégradation des nitrates en utilisant les trois sources de carbone est complète et ne s'arrête pas au stade nitrite. La formation de ce dernier est seulement une étape intermédiaire.

Références

- [1] Andersen L.J., Kristiansen H. Nitrate in groundwater and surface water related to land use in the Karup basin, Denmark. Environ. Geol. 5 (1984) 207–212.
- [2] Nolan, B.T. Relating nitrogen sources and aquifer susceptibility to nitrate in shallow ground

waters of the United States. *Ground Water*. 39 (2001) 290–299.

[3] **Bremen N., Boyer E.W., Goodale C.L., Jaworski N.A., Paustian K., Seitzinger S.P., Lajtha K., Mayer B., van Dam D., Howarth R.W., Nadelhoffer K.J., Eve M., Billen G.** Where did all the nitrogen Fate of nitrogen inputs to large watersheds in the northeastern U.S.A. *Biogeochemistry*. 57–58 (2002) 267–293.

[4] **Smil V.** *Enriching the earth: Fritz Haber, Carl Bosch, and the transformation of world food production*. MIT Press, Cambridge, MA, United States (2001).

[5] **Aesoy A., Odegaard H., Batch K., Pujol R., Hamon M.** Denitrification in a packed bed biofilm reactor (Biofor) - experiments with different carbon sources, *Water Research*. 32 (1998) 1463–1470.

[6] **Hamaidi M.S. Hmaid F., Zoubiri A., Bouaklil F. et Dhan Y. (2009).** Etude de la dynamique des populations phytoplanctoniques et résultats préliminaires sur les blooms toxiques à cyanobactéries dans le barrage de Ghrib (Ain Defla-Algérie). *European Journal of Scientific Research*. ISSN 1450-216 X Vol 32 No.3 (2009) 369-380.

[7] **Salem Z. (2007). Lebik H., Cherafa W. K. et Allia K.** Valorisation of olive pits using denitrification. *Desalination*. 204 (2007) 72–78.

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

[9] **Ono Y., Somiya I., Oda Y.,** Identification of a carcinogenic heterocyclic amine in river water, *Water Research*. 34 (2000) 890–894.

[10] **Goodrich A., Lykins W., Klark M.** Drinking water from agriculturally contaminated groundwater. *J Environ Qual*. 20 (1991) 707–17.

[11] **Urbain V., Benoit R., Manem J.** Membrane bioreactor: a new treatment tool. *J AWWA M* (1996) 75–86.

[12] **Yu Zhang, Zhuang Shi, Mingxiang Chen, Xiyang Dong, Jiti Zhou.** Evaluation of simultaneous nitrification and denitrification under controlled conditions by an aerobic denitrifier culture. *Bioresource Technology*. 175 (2015) 602–605.

[13] **Xinping Yang, Shimei Wang, Lixiang Zhou.** Effect of carbon source, C/N ratio, nitrate and dissolved oxygen concentration on nitrite and ammonium production from denitrification process by *Pseudomonas stutzeri* D6. *Bioresource Technology*. 104 (2012) 65–72.

[14] **Fernández-Nava Y., Marañón E., Soons J., Castrillón L.** Denitrification of high nitrate concentration wastewater using alternative carbon sources. *Journal of Hazardous Materials*. 173 (2010) 682–688.

[15] **Ying Xu, Tian-Lei Qiu, Mei-Lin Han, Jun Lia, Xu-Ming Wang.** Heterotrophic denitrification

of nitrate-contaminated water using different solid carbon sources. *Procedia Environmental Sciences*. 10 (2011) 72–77.

[16] **Francisco J., David Cervantes A.D.L.R., Jorge G.,** Nitrogen removal from wastewaters at low C/N ratios with ammonium and acetate as electron donors. *Bioresour. Technol.* 79 (2001) 165–170.

[17] **Hu Z., Zhang J., Xie, H., Li S., Wang J., Zhang T.** Effect of anoxic/aerobic phase fraction on N₂O emission in a sequencing batch reactor under low temperature. *Bioresour. Technol.* (2011) 102 5486–5491.

[18] **Wong B.T., Lee, D.J.** Denitrifying sulfide removal and carbon methanogenesis in a mesophilic, methanogenic culture. *Bioresour. Technol.* 102 (2011). 6673–6679.

[19] **McDonald D.V.** Denitrification by fluidized biofilm reactor, *Water Science. Technology*. 22 (1990) 451–461.

[20] **Rabah F.K.J., Dahab M.F.,** Nitrate removal characteristics of high performance fluidized-bed biofilm reactors, *Water Research*. 38 (2004) 2719–2728.

[21] **Constantin H., Fick M.** Influence of C-sources on the denitrification rate of a high-nitrate concentrated industrial wastewater, *Water Research*. 31 (1997) 538–589.

[22] **Glass C., Silverstein J.,** Denitrification kinetics of high nitrate concentration water: pH effect on inhibition and nitrite accumulation, *Water Research*. 32 (1998) 831–839.

[23] **Schipper L.A., Robertson W.D., Gold A.J., Jaynes D.B., Cameron S.C.** Denitrifying bioreactors an approach for reducing nitrate loads to receiving waters. *Ecol. Eng.* 36 (2010) 1532–1543.

[24] **Nasiruddin Khan M., Sarwar A., Farooq Wahab M. and Haleem R.** Physico-chemical characterization of date varieties using multivariate analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture J Sci Food Agric*. 88 (2008) 1051–1059.

[25] **Chourfi W., Bougherara H., Kebabi B.** Characterization of the sludge of Ibn Ziad Constantine sewage treatment plant for its landspreading, *Scientific Study & Research Chemistry & Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry*. 17(1) (2016). 027–034.

[26] **Stanier R.Y.** *Microbiologie générale*, Masson et CIE éditeurs. (1976) pp. 225–370.

[27] **Patureau D.** Etude cinétique et physiologique d'une bactérie dénitrifiante en conditions aérobies. Suivi en réacteur aéré, parfaitement mélangé, en culture pure et en culture mixte associée à une flore nitrifiante, (1995). Thèse pour l'obtention du diplôme de doctorat.

- [28] **Bougherara H., Bentabet O., Meribout R., Cheurfi W. and Kebabi B.** Denitrification in Natural Nutritious Medium. *Journal of Environmental Science and Engineering*. 5 (2011) 1093–1099.
- [29] **Rodier J.** L'analyse de l'eau, sixième édition (1978).
- [30] **Kim M., Jeong S., Yoon S., Ja -Cho, Kim Y.H., Kim M.J., Ryu E.Y., and Lee S.J.** Aerobic Denitrification of *Pseudomonas putida* AD-21 at Different C/N Ratios. *Journal of bioscience and bioengineering*. Vol. 106, No. 5 (2008) 498–502.
- [31] **Wilbert F. H. Sijbesma, Jonas S. Almeida, Maria A. M. Reis and Helena Santos.** Effect of Nitrite During Denitrification by *Pseudomonas fluorescens*; An In Vivo ³¹P-NMR Study. *Biotechnology and bioengineering*. 52 (1996).
- [32] **Langone M., Jia Y., Suzanne C. M., Haaijer S., Huub Op den Camp J. M., Mike S. M. Jetten and Gianni Andreottola.** Coexistence of nitrifying, anammox and denitrifying bacteria in a sequencing batch reactor. *Frontiers in Microbiology*. 5 (2014) 1–12
- [33] **Merkel W., Bohlerw E. and Frimmel F. H.** Heterotrophic Denitrification: The Influence of oxygen and pH Value. *Acta hydrochim. hydrobiol.* 21 (1993) 5, 249–257.
- [34] **Galloway, J.N., Aber, J.D., Erisman, J.W., Seitzinger, S.P., Howarth, R.W., Cowling, E.B., Cosby, B.J.** The nitrogen cascade. *Bioscience*. 53 (2003) 341–356.