

Table des matières :

REMERCIEMENTS	1
TABLE DES MATIERES	1
INTRODUCTION GENERALE	5
I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	15
I.1. Généralités sur la dénitrification.....	18
I.1.1. Le cycle de l'azote et les voies de réduction microbiennes des nitrates	18
I.1.2. Aspects énergétiques de la dénitrification, comparaison avec la respiration aérobie .	19
I.1.3. De la souche <i>Paracoccus denitrificans</i> à un consortium microbien comme inocula dénitrifiants.....	21
I.2. Influence du dihydrogène, du pH alcalin et des concentrations élevées en nitrates sur la dénitrification microbienne.....	21
I.3. Dénitrification bactérienne en présence d'acier et de ciment solides	41
I.3.1. Croissance de biofilm sur les surfaces solides.....	41
I.3.2. Effet de l'insertion d'acier solide dans un milieu aqueux	41
I.3.3. Réductions des nitrates et des nitrites en présence d'acier	44
I.3.4. Influence de l'insertion de ciment en milieu aqueux.....	46
I.4. Conclusions de la synthèse bibliographique et perspectives de recherche.....	47
II. MATERIELS ET METHODES	49
II.1. Inocula, et milieux de culture	53
II.1.1. Inocula : <i>P. denitrificans</i>	53
II.1.2. Inocula : boues activées	53
II.1.3. Milieu de culture de <i>P. denitrificans</i>	53
II.1.4. Lixiviât de ciment.....	54
II.1.5. Régulation du pH.....	56
II.1.6. Régulation de la température	56
II.2. Bioréacteurs et montage expérimental	57
II.2.1. Bioréacteurs batch	57
II.2.2. Bioréacteurs continus.....	59
II.2.1. Sources de H ₂ et de N ₂	62
II.2.2. Acier et ciment solide, disposition dans les réacteurs	62
II.2.3. Liste des expériences.....	64
II.3. Méthodes analytiques.....	64
II.3.1. Analyses de la biomasse	64
II.3.2. Analyse du pH, des carbonates	65
II.3.3. Dosage des ions nitrate et nitrite	66

II.3.1.	Dosages de l'acétate, et de la DCO	68
II.3.2.	Dosages des éléments (Na, K, Ca, Fe, Si...)	69
II.3.3.	Analyse des matériaux solides	69
III.	DENITRIFICATION AVEC LA SOUCHE MODELE <i>PARACOCCLUS DENITRIFICANS</i>	71
III.1.	Comparaison de l'acétate et le dihydrogène comme accepteurs d'électrons en bioréacteurs batch	73
III.2.	Simulation de l'évolution du pH lors de la dénitrification	78
III.2.1.	Calculs théoriques de l'évolution du pH avec acétate	78
III.2.1.	Calculs théoriques de l'évolution du pH avec dihydrogène	83
III.3.	Comparaisons de deux méthodes d'acclimatation	86
III.3.1.	Comparaison de deux méthodes d'acclimatation à une élévation progressive de pH.	87
III.3.2.	Acclimatation à des concentrations élevées de nitrates en réacteurs batch successifs	97
III.4.	Conclusions du chapitre	100
IV.	DENITRIFICATION HETEROTROPHE AVEC UN CONSORTIUM BACTERIEN.....	101
IV.1.	Comparaison de trois méthodes d'acclimatation	104
IV.1.1.	Acclimatation par inoculations successives	105
IV.1.2.	Acclimatation en réacteurs continus.....	110
IV.1.3.	Acclimatation en réacteurs discontinus séquentiels à des concentrations élevées en nitrates (50-400 mM) dans trois cultures à pH 9, 10 et 11	117
IV.1.4.	Conclusions de la comparaison des trois méthodes d'acclimations.....	121
IV.2.	Comparaison de l'apport de nitrates et ou de nitrites sous forme de NaNO_3 , NaNO_2 et KNO_3	121
IV.3.	Dénitrification à pH hyperalcalins (pH 11,5 et 12)	129
IV.4.	Transition d'un donneur d'électrons organique (acétate) vers un donneur d'électrons inorganique (H_2)	132
IV.5.	Conclusions du chapitre	138
V.	DENITRIFICATION HYDROGENOTROPHE AVEC UN CONSORTIUM BACTERIEN	141
V.1.	Elévation de la concentration en nitrates (10-550 mM) à pH alcalin	144
V.1.1.	Elévation de la concentration en nitrates (10-100 mM) à pH 9, 10 et 11.....	145
V.1.2.	Elévation de la concentration en nitrates (50-150 mM) à pH 9, 10 et 10,5.....	151
V.1.3.	Elévation de la concentration en nitrates (200-550 mM) à pH 9, 10 et 11.....	154
V.1.4.	Conclusion des expériences d'élévations de la concentration en nitrates en hydrogénotropie	157
V.2.	Dénitrification à pH hyper alcalin (pH 11,5 et 12).....	158
V.3.	Dénitrification avec des pressions élevées de dihydrogène (1 à 10 bars)	162
V.3.1.	Autoclaves pressurisés	162
V.3.2.	Dénitrification à 1, 2 et 4 bars de dihydrogène à pH 9	163

V.3.3.	Dénitrification à 10 bars de dihydrogène et pH 9 ou pH 11.....	165
V.4.	Conclusions du chapitre	168
VI.	DENITRIFICATION AVEC UN CONSORTIUM BACTERIEN EN SYSTEME SOLIDE-LIQUIDE AVEC ACIER ET PATE DE CIMENT SOLIDES.....	171
VI.1.	Dénitrification hydrogénotrophe en présence de ciment	174
VI.1.1.	Incorporation de pâtes de ciment vieilli, en présence de 100 à 200 mM en nitrates.	175
VI.1.2.	Incorporation de pâtes de ciment frais, en présence de 50 à 150 mM en nitrates....	179
VI.2.	Dénitrification en présence d'acier d'armatures à béton armé.....	184
VI.2.1.	Incorporation d'acier d'armatures dans des cultures hydrogénotrophes	184
VI.2.1.	Incorporation d'acier d'armature à béton dans des cultures hétérotrophes	189
VI.3.	Dénitrification mixotrophe en présence d'acier et ciment solides	194
VI.4.	Conclusions du chapitre	203
	CONCLUSION GENERALE	205
	LISTE DES FIGURES.....	212
	REFERENCES	221

INTRODUCTION GENERALE

Contexte et enjeux

En France, fin 2017, le volume de déchets radioactifs a atteint 1,6 millions de m³ [1]. En 2030, environ 2,5 millions de m³ de déchets sont attendus. Ces déchets sont produits par diverses activités : l'énergie nucléaire, la recherche, la défense, etc. Les secteurs producteurs de déchets et la répartition de la production fin 2017 sont indiqués sur la Figure 1 qui a été extraite de l'inventaire 2019 des matières et des déchets radioactifs de l'Andra [2]. L'Andra (Agence Nationale pour la Gestion des Déchets Radioactifs) est l'organisme en charge de la gestion à long terme des déchets radioactifs produits en France.

Les déchets radioactifs contiennent un mélange de radionucléides (c'est-à-dire d'isotopes radioactifs d'américium, plutonium, césium, cobalt, strontium, etc.). Les déchets ont été catégorisés par l'Andra selon leur activité radioactive et leur durée de vie. La durée de vie d'un déchet est caractérisée par la période de ses radionucléides, c'est à dire le temps nécessaire pour que l'activité radioactive d'un radionucléide soit divisée par deux [2].

- Les déchets à vie très courte (VTC) contiennent des radionucléides dont la période est inférieure à 100 jours.
- Les déchets à vie courte (VC) contiennent des radionucléides qui ont une période inférieure ou égale à 31 ans.
- Les déchets à vie longue (VL) contiennent des radionucléides dont la période est supérieure à 31 ans.

La radioactivité se mesure par le becquerel (Bq) qui représente le nombre de désintégrations de nucléides par seconde qui se produisent dans une substance radioactive. A titre d'exemple, un humain a une activité de l'ordre de 0,11 Bq/g. L'Andra distingue les déchets selon leur radioactivité [2] :

- Les déchets de très faible activité (TFA) ont une activité inférieure à 100 Bq/g.
- Les déchets de faible activité (FA) ont une activité de dizaines à des centaines de milliers de Bq/g.
- Les déchets moyenne activité (MA) ont une activité d'un million à un milliard de Bq/g.
- Les déchets haute activité (HA) ont une activité de plusieurs milliards de Bq/g.

Les déchets HA sont les résidus issus de la dissolution chimique dans l'acide nitrique des combustibles usés. Ils sont vitrifiés puis conditionnés dans des conteneurs en acier. Les MAVL sont constitués, d'une part, des structures métalliques et des déchets activés ayant séjourné dans les réacteurs nucléaires (déchets inorganiques), et d'autre part, du traitement des effluents liquides (boues bitumées). Les FAVL sont constitués des résidus radifères (RRA) historiques provenant d'anciens sites industriels, de résidus solides banalisés (RSB), et d'une partie des déchets anciens conditionnés dans du bitume. Les FMA-VC et les TFA sont principalement des déchets de fonctionnement, de maintenance et de démantèlement des centrales nucléaires.

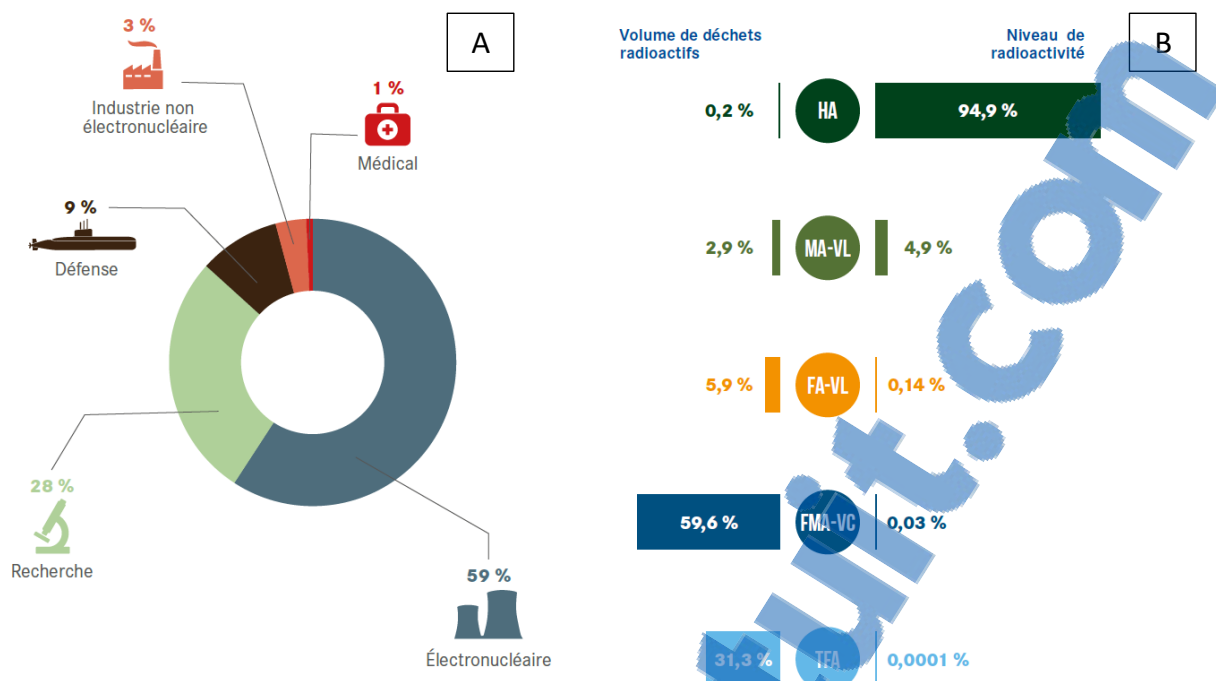


Figure 1 : (A) Répartition par secteur du volume de déchets radioactifs pris en charge par l'Andra fin 2017. (B) Répartition des volumes et niveaux de radioactivité fin 2016 selon le type de déchets, la signification des acronymes HA, MAVL, FAVL est indiquée dans le texte ci-dessus [2].

La part la plus importante du volume des déchets est constituée des déchets à faible à moyenne radioactivité à vie courte ou de très faible activité. Mais, les 3 % de déchets HA et MAVL représentent 99 % de la radioactivité, et requièrent des solutions de stockage robustes et durables à très long terme. Selon leur catégorie, ces déchets sont actuellement gérés par différentes filières de stockage de l'Andra :

- Les TFA sont stockés au centre industriel de regroupement, d'entreposage et de stockage (CIRES).
- Les FMA-VC sont stockés aux centres de stockage de la Manche et de l'Aube (CSM et CSA).
- Les FAVL sont entreposés avant d'être stockés à faible profondeur (stockage à l'étude).
- Les HA et MAVL sont entreposés sur les sites producteurs en attendant leur stockage au centre industriel de stockage géologique (Cigéo) de 400 à 500 m de profondeur.

Cigéo est un projet de stockage profond (jusqu'à 500 m) des déchets radioactifs les plus dangereux situé à Bure entre la Meuse et la Haute-Marne, Figure 2. Cigéo sera construit en profondeur dans une roche argileuse imperméable, du Callovo-Oxfordien (COx), choisie pour ses propriétés de confinement sur de très longues échelles de temps. Ce projet de construction souterrain a été initié suite à une campagne de recherche menée de 1991 à 2006, pour trouver une solution sur la gestion des déchets radioactifs les plus dangereux.

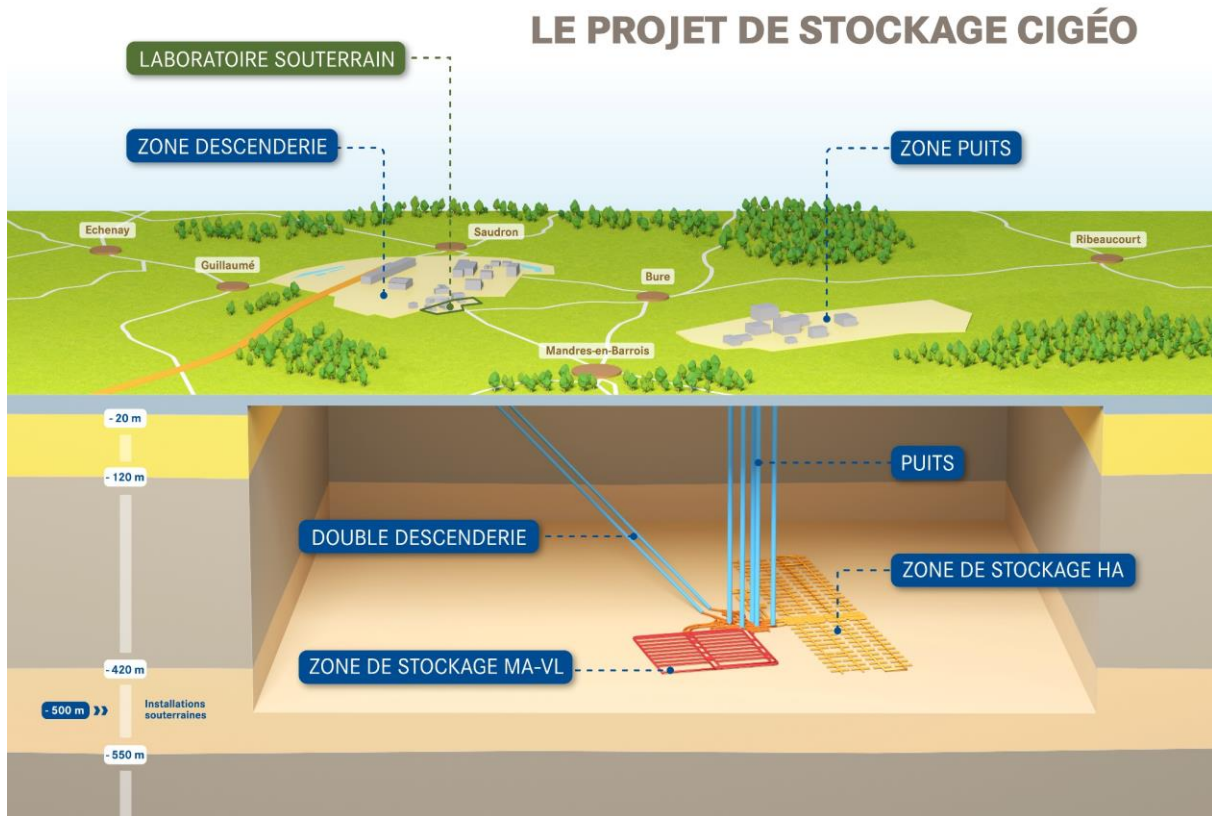


Figure 2 : Schéma des installations en surface et en profondeur du site de stockage Cigéo [3].

Pour concevoir le stockage géologique profond, l'Andra conduit des recherches dans des thématiques variées allant du comportement mécanique de la roche après creusement, à la diffusion et la rétention des éléments radioactifs ou chimiques. Pour travailler sur ces thématiques l'Andra a coordonné 7 groupements de laboratoire (GL) impliquant près de 80 laboratoires et organismes de recherches. Un de ces groupements de laboratoire a pour objectif d'étudier les comportements (précipitations, réactions, etc.) et les déplacements des espèces chimiques et radionucléides dans l'environnement des déchets radioactifs. Ce GL a été nommé CTEC d'après sa problématique officielle « *Comportement chimique et Transfert dans des Environnements / ouvrages à physico-chimie Complexe* ». Le GL CTEC a défini 9 objectifs de travail dont 2 ont été investis par le LMDC et le LGC à Toulouse :

- L'objectif 5 : « *Milieux nitrates concentrés ; Réactions redox au sein des ouvrages et influence des armatures* ». L'objectif est d'évaluer la réactivité des nitrates dans les environnements cimentaires à proximité des déchets, en conditions biotiques et abiotiques.
- L'objectif 8 : « *Déchets organiques - Stabilité biogéochimique des composés organiques dissous* ». L'objectif est d'évaluer la stabilité des molécules organiques dans les environnements cimentaires à proximité des déchets, en conditions biotiques et abiotiques.

Les travaux présentés dans ce manuscrit de thèse s'inscrivent dans l'objectif 5. Les nitrates sont problématiques à proximité des déchets radioactifs car ils peuvent nuire à la stabilité des radionucléides. L'objectif 5 est limité au contexte des déchets MAVL (et les FAVL par extension bien que leur stockage soit encore à l'étude). Ces déchets radioactifs sont parfois très concentrés en nitrates car ces derniers sont largement utilisés à plusieurs étapes de l'industrie nucléaire et du traitement des déchets radioactifs [4]. Par exemple, lors du traitement des déchets, du $Ba(NO_3)_2$ est ajouté pour faire précipiter les radionucléides [4,5].

Les déchets MAVL et FAVL sont confinés dans des fûts en acier appelés colis primaires. Les déchets MAVL sont en plus cloisonnés dans des sur-conteneurs en béton armé [6]. Certains déchets sont enrobés de bitume (hydrocarbures lourds) pour améliorer le confinement des radionucléides. Ces déchets contiennent donc de la matière organique [7]. Les conteneurs MAVL seront entreposés dans des alvéoles de stockage représentées sur la Figure 3, sur le site de Cigéo à 500 m de profondeur.

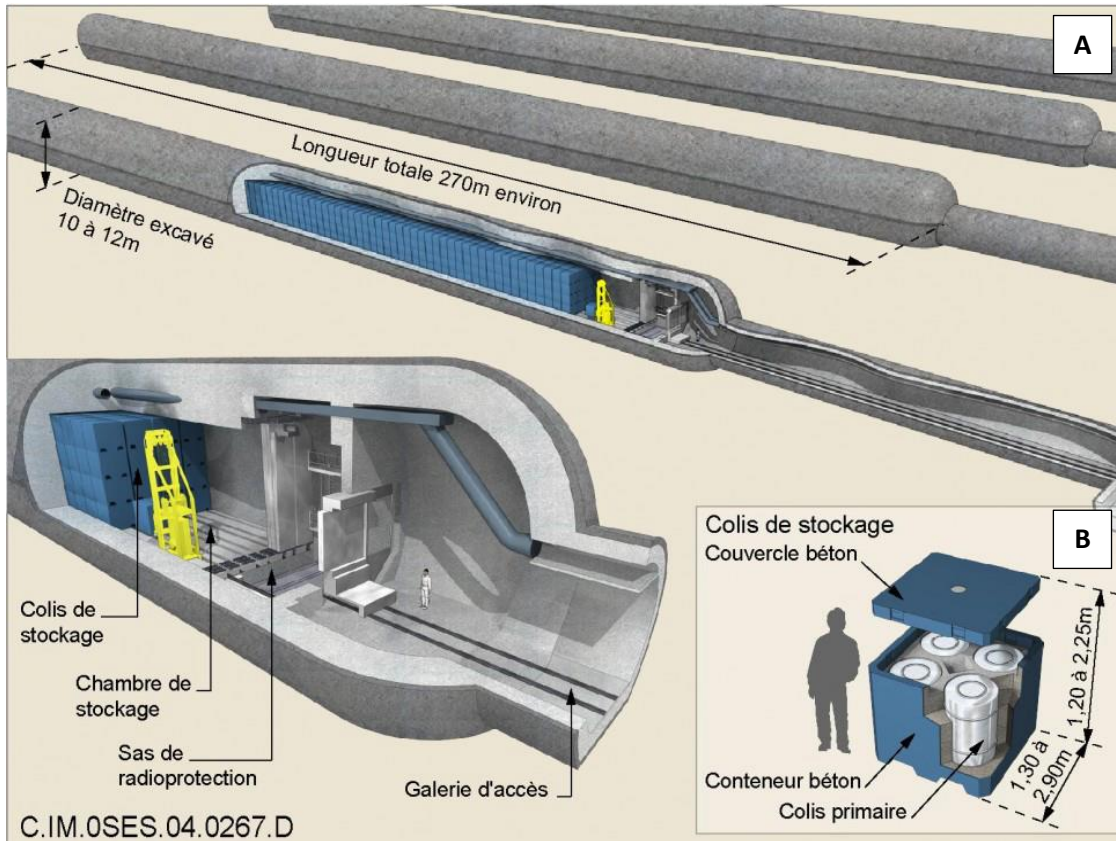


Figure 3 : Schéma d'une alvéole de stockage (A) et d'un conteneur (B) de déchets MAVL [3].

Si aucune solution alternative de gestion des déchets radioactifs n'a été trouvée à l'horizon 2100, les alvéoles de stockage, Figure 3, seront fermées et condamnées avec les déchets à l'intérieur. Les alvéoles de stockage commenceront alors à se saturer en eau, et l'environnement des déchets deviendra progressivement dépourvu d'oxygène (anaérobie). Pendant plusieurs milliers d'années, l'équilibre physico-chimique à proximité des déchets évoluera. Entre autres, les déchets MAVL pourraient relâcher des nitrates et des acides organiques (oxalate, benzoate, phtalate, gluconate, formate, acétate, [8]) dans des gammes de concentrations de 10 à 1000 mM pour les nitrates et de 0 à 10 mM pour les acides organiques. L'acier et les matériaux cimentaires solides seront omniprésents dans les ouvrages des alvéoles de stockage et dans les conteneurs de déchets radioactifs. Les matériaux cimentaires entraîneront un relargage d' OH^- qui génèra un pH alcalin estimé entre 9 et 13 [4,9,10]. La corrosion de l'acier peut entraîner la génération de dihydrogène. Du dihydrogène supplémentaire peut également être produit par radiolyse de l'eau. Des pressions élevées sont donc localement attendues sous l'effet du confinement des gaz produits. Des microorganismes endogènes de la roche hôte, ou bien apportés par l'activité humaine, sont susceptibles d'être présents dans les alvéoles de stockage. Pour se développer et survivre, ces microorganismes, particulièrement les bactéries, devront être alcalophiles, capables d'oxyder les acides organiques présents et/ou le dihydrogène [11,12], et surtout de respirer les nitrates, voire d'autres accepteurs d'électrons plus réduits [4].

Selon le type de déchets MAVL, plusieurs situations sont attendues, elles sont synthétisées dans le Tableau 1. L'effet de la radioactivité sur l'activité bactérienne ne sera pas étudié dans les travaux de cette thèse. Toutefois, le développement de communautés bactériennes a déjà été observé dans des environnements hautement radioactifs [9,13–15]. L'acétate sera considéré comme acide organique modèle pour la thèse car il est facilement utilisable pour les bactéries et est une molécule utilisée par de nombreux processus microbiens.

Tableau 1 : Synthèse des conditions attendues dans l'environnement à proximité des déchets radioactifs.

Stockage, type de déchet	Accepteurs d'électrons	Donneurs d'électrons	pH	Activité bactérienne	Ouvrages, et armatures
MAVL bitume	[NO ₃ ⁻] dizaines de mM	H ₂ , acétate, oxalate, benzoate	9 – 13	Consortium alcalophile et mixotrophique	Présence d'acier et de matériaux cimentaires
MAVL déchets inorganiques	[NO ₃ ⁻] centaines de mM à plusieurs mol/L	H ₂			

Des estimations ont tenté de quantifier le relâchement des nitrates contenus dans les déchets. Par exemple, dans le cas de déchets bituminés un modèle conservatif a permis de calculer qu'à proximité des déchets, 270 mM de nitrates seront relâchés, au bout de 70 ans. Cette concentration chutera rapidement par diffusion les 2000 premières années, pour tendre vers 30 mM au cours des millénaires suivants [16].

Problématique et objectifs de la thèse

Le relâchement des nitrates par les déchets est problématique car les nitrates peuvent établir des conditions oxydantes dans l'environnement proche des déchets ce qui favorisera la mobilité de certains radionucléides contenus dans les déchets. Cependant, les nitrates sont des accepteurs d'électrons tandis que les acides organiques et le dihydrogène sont des donneurs d'électrons. Théoriquement, des réactions d'oxydoréductions pourraient donc aboutir à la réduction des nitrates et permettre le retour à un environnement plus réducteur. Les bactéries sont capables de catalyser ces réactions d'oxydoréduction via le processus de la dénitrification dans lequel les nitrates sont transformés en diazote via une succession de réactions (NO₃⁻ → NO₂⁻ → NO → N₂O → N₂). L'Andra s'intéresse donc aux problématiques suivantes : Les bactéries peuvent-elles survivre dans l'environnement des déchets radioactifs ? Quelle est la réactivité des nitrates en présence de bactéries dans le contexte du stockage profond des déchets radioactifs ? Quelles sont les cinétiques de réduction des nitrates ?

L'environnement à proximité des déchets radioactifs, schématisé dans la Figure 4, est caractérisé par des conditions (pH alcalins, concentration en nitrates élevée, etc.) dans lesquelles la dénitrification bactérienne a été très peu étudiée. Pourtant ces conditions sont susceptibles d'impacter fortement l'activité bactérienne. En conséquence, depuis 2010, deux projets de recherche menés conjointement entre le LGC, le LDMC par Bertron, Erable et coll. [17,18], ont cherché à comprendre l'influence jouée par l'environnement des déchets sur la survie et l'activité catalytique des bactéries, Figure 4. Ces projets ont donné lieu à plusieurs études [4,19–25]. Le premier projet de recherche conduit par Alquier et coll. a posé les bases des protocoles expérimentaux et les premiers questionnements scientifiques [17]. L'étude a montré qu'en absence de bactéries, dans des milieux alcalins (pH 10 – 11) additionnés de nitrates et d'acétate ou même d'acier, il n'y avait pas de dénitrification. En présence de bactéries

en revanche, dans ces mêmes conditions, la réduction des nitrates a bien été observée. *Pseudomonas stutzeri* a pu réduire les nitrates à une concentration de 5 mM et à pH 9, tandis que *Halomonas desiderata* a pu réduire les nitrates à pH 11 et 12 mM de nitrates [20]. La deuxième étude conduite par Rafrafi et coll. visait à analyser la réactivité des nitrates à l'interface bitume – matrice cimentaire, avec de l'acétate ou du dihydrogène, à pH alcalin [18]. Il a montré que *Halomonas desiderata* pouvait réduire les nitrates dans un milieu cimentaire à pH 10 – 11 en présence d'acétate et de 6 mM de nitrates [19,20]. D'autre part, un consortium bactérien provenant d'un sédiment de lac alcalin a été capable de réduire les nitrates dans un milieu cimentaire à pH 11 en présence de matière organique et 6 mM de nitrates [22]. Enfin, *Paracoccus denitrificans* a pu réduire les nitrates sans matière organique avec du dihydrogène à pH 9 et 12 mM de nitrates. La réduction des nitrates était plus lente en présence de dihydrogène qu'en présence d'acétate.

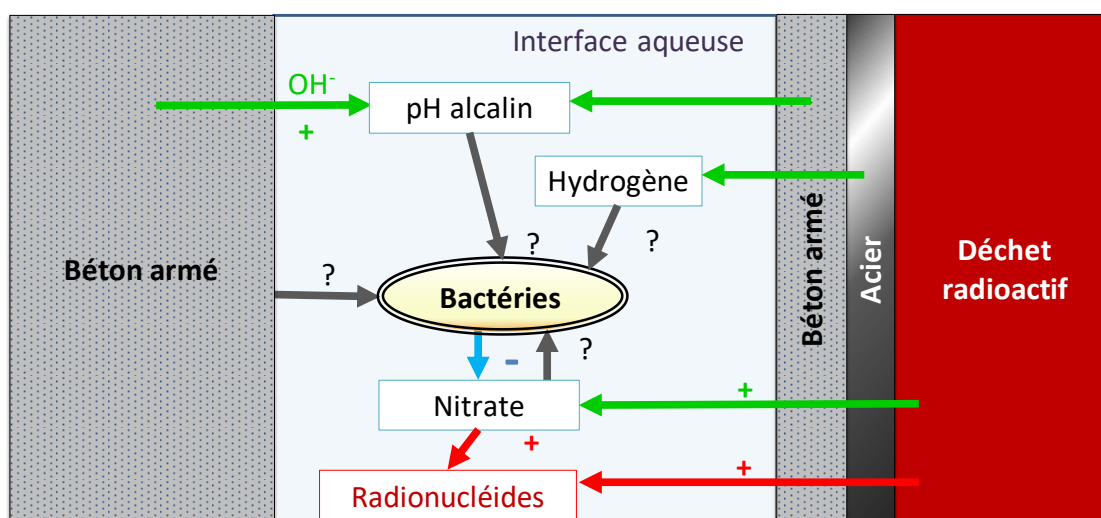


Figure 4 : Représentation schématique de l'environnement aqueux à l'interface entre les alvéoles et les conteneurs contenant les déchets radioactifs, après saturation en eau dans les alvéoles de stockage des déchets radioactifs.

Dans les études antérieures du LMDC et du LGC, la dénitrification bactérienne a donc été explorée dans des gammes de pH de 9 à 11 et de concentrations en nitrates de 1 à 10 mM et la quasi-totalité des expériences ont été réalisées en hétérotrophie. Dans la continuité des travaux précédents, il restait donc des questions scientifiques à explorer :

- L'effet de pH hyperalcalin (11,5 – 13) sur la réduction bactérienne des nitrates.
- L'effet de concentrations en nitrates élevées (100 – 1000 mM) sur la réduction bactérienne des nitrates.
- L'application de ces conditions à des cultures alimentées en dihydrogène sans acétate.
- L'effet combiné d'un pH alcalin et de concentrations en nitrates élevées sur la réduction bactérienne des nitrates en présence d'acétate ou de dihydrogène.
- L'effet de pressions élevées de dihydrogène sur l'activité bactérienne dénitrifiante.
- L'effet de l'acier et de matériaux cimentaires solides sur la réduction bactérienne des nitrates.

Organisation du manuscrit

Les objectifs techniques et scientifiques étaient ambitieux étant donné le peu d'études explorant la réduction bactérienne des nitrates à pH élevé et avec des concentrations en nitrates élevées. En effet, la majorité des études ont exploré la dénitrification bactérienne dans le contexte de traitement des

eaux usées dans des gammes de pH de 7 à 9 et de concentrations en nitrates de 0,1 à 10 mM de nitrates pour éviter de ralentir voir de stopper l'activité bactérienne [26–29].

. La stratégie expérimentale de la thèse a donc été de partir de systèmes simples (souche seule *P. denitrificans*, milieu de culture synthétique, pH et concentrations en nitrates relativement peu élevés) et de complexifier progressivement les systèmes en se rapprochant des conditions réelles du stockage des déchets radioactifs (consortium bactérien, milieu cimentaire, concentrations en nitrates et pH élevés, ajout d'acier et de ciment solides).

L'étude bibliographique du 1^{er} chapitre a été séparée en quatre axes se focalisant sur les conditions impactant le plus l'activité bactérienne : le pH alcalin, les concentrations élevées en nitrates, le dihydrogène comme donneur d'électrons, et l'ajout d'acier et de ciment solides.

Le 2^{ème} chapitre regroupe les matériaux et les protocoles expérimentaux. Différents modes de culture (batch, continu, discontinu séquentiel) et différents types de réacteurs ont permis de travailler avec une variété d'environnements notamment avec des pressions élevées de dihydrogène, ou avec des matériaux cimentaires et de l'acier solides. Les méthodes analytiques ont été décrites, à la fin du chapitre.

Dans le 3^{ème} chapitre, la réduction bactérienne des nitrates a été étudiée dans un système relativement simple avec la souche *P. denitrificans* afin de s'affranchir des interactions inter-espèces. L'effet de l'acétate (organique) ou du dihydrogène (minéral) en tant que donneur d'électrons pour les cellules bactériennes a été évalué pour une gamme de pH de 7 à 10. Des calculs à partir des équations bilans ont permis de simuler l'évolution du pH et de comprendre les différences entre les métabolismes hydrogénotrophe et hétérotrophe.

Le 4^{ème} chapitre avait pour objectif de déterminer les seuils de tolérance d'un consortium de bactéries provenant de boues activées d'une station d'épuration d'eaux usées domestiques, et les cinétiques de réduction des nitrates dans des gammes de pH et de concentrations en nitrates élevées, en présence d'acétate comme donneur d'électrons. Plusieurs séries d'expériences ont été élaborées pour acclimater le consortium bactérien via des élévations progressives de pH et de la concentration en nitrates. La concentration en nitrates a été élevée jusqu'à 750 mM et le pH a été élevé jusqu'à 12.

Dans le 5^{ème} chapitre, les mêmes types d'expériences que dans le chapitre précédent ont été réalisées mais avec le dihydrogène comme donneur d'électrons à la place de l'acétate. La concentration en nitrates a été élevée jusqu'à 560 mM et le pH a été élevé jusqu'à 12. Par ailleurs, dans les alvéoles de stockage, le dihydrogène pourrait s'accumuler localement générant des pressions élevées. Des expériences menées dans des autoclaves pressurisés en collaboration avec l'ISTerre ont permis d'observer l'effet de pressions d'H₂ élevées : jusqu'à 10 bars de H₂ et 100 bars de pression totale.

Enfin, dans le 6^{ème} chapitre, de l'acier et des matrices cimentaires solides ont été ajoutés pour se rapprocher encore plus des situations réelles du stockage. Les expériences ont été réalisées dans des gammes de concentration en nitrates (jusqu'à 400 mM) et de pH (9 - 11) élevées, en présence d'acétate et/ou de dihydrogène. Une expérience finale a permis de combiner la présence d'acier et de matériaux cimentaires en mixotrophie, c'est-à-dire en présence concomitante d'acétate et de dihydrogène.

Chapitre I :

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Table des matières :

I.1.3. De la souche <i>Paracoccus denitrificans</i> à un consortium microbien comme inocula dénitrifiants	21
I.2. Influence du dihydrogène, du pH alcalin et des concentrations élevées en nitrates sur la dénitrification microbienne.....	21
1. Introduction.....	24
2. Definition and biochemical aspects of denitrification	24
3. Influence of high nitrate concentration on denitrification	26
3.1. Regulation of denitrification, nitrite accumulation.....	26
3.2. High nitrate concentrations reported in the literature	28
4. Hydrogenotrophic metabolism and interactions with denitrification	29
4.1. Hydrogen oxidation catalysed by hydrogenase enzymes	29
4.2. Inorganic carbon assimilation	31
4.3. Comparison between hydrogenotrophic and heterotrophic denitrification	32
5. Influence of high pH on denitrification	33
5.1. Basics of pH effect on denitrification	33
5.2. Bacterial adaptations to alkaline pH	36
5.3. pH threshold values.....	38
6. Perspectives, denitrification at alkaline pH, with high nitrate concentration and with hydrogen as electron source.	38
7. Conclusions.....	40
I.3. Dénitrification bactérienne en présence d’acier et de ciment solides	41
I.3.1. Croissance de biofilm sur les surfaces solides.....	41
I.3.2. Effet de l’insertion d’acier solide dans un milieu aqueux	41
I.3.2.1. Corrosion de l’acier, et les produits de corrosion	42
I.3.2.2. Interactions entre l’acier et les bactéries.....	43
I.3.3. Réductions des nitrates et des nitrites en présence d’acier	44
I.3.4. Influence de l’insertion de ciment en milieu aqueux.....	46
I.4. Conclusions de la synthèse bibliographique et perspectives de recherche.....	47

Dans les alvéoles de stockage après des milliers d'années, la lixiviation des déchets MAVL peut entraîner un relargage des nitrates qui peut nuire à la stabilité des déchets. Cependant, en présence de matière organique ou de dihydrogène, l'activité bactérienne peut théoriquement réduire les nitrates en espèces azotées plus réduites par le processus de la dénitrification ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$).

Le premier objectif de cette thèse est donc, d'évaluer la capacité des bactéries à s'adapter aux conditions physico-chimiques à proximité des déchets ciblées par l'Andra. C'est à dire en absence d'oxygène, à pH alcalin entre 9 et 13, en présence de concentrations de 10 à 1000 mM en nitrates et de 0 à 10 mM en acétate ou de dihydrogène, et enfin en présence de ciment et d'acier solides. Le deuxième objectif est d'évaluer la bioréactivité des nitrates et de mesurer les cinétiques de réduction des nitrates dans les conditions précédemment décrites.

Pour comprendre le comportement des bactéries et optimiser au mieux les protocoles expérimentaux, les quatre conditions susceptibles d'avoir un effet important sur l'activité bactérienne ont été identifiées : le pH alcalin, les concentrations en nitrates élevées, l'hydrogénotropie et l'ajout d'acier et de ciment solide. L'étude bibliographique a été organisée en quatre axes d'après ces conditions. Dans un premier temps, la dénitrification a été étudiée d'un point de vue bioénergétique. Puis un article, sous forme de revue, publié dans le journal *International Journal of Molecular Sciences* a été intégré. Cette revue discute (i) des aspects biochimiques de la dénitrification, (ii) de l'effet des concentrations élevées en nitrates sur l'activité bactérienne, (iii) des différences entre la dénitrification hydrogénotrophe et la dénitrification hétérotrophe, (iv) de l'effet du pH alcalin sur l'activité bactérienne. Enfin dans la dernière partie est présenté l'effet de l'acier et de matériaux cimentaires solides sur l'activité bactérienne.

I.1. Généralités sur la dénitrification

I.1.1. Le cycle de l'azote et les voies de réduction microbiennes des nitrates

Plusieurs processus microbiens agissent sur le cycle de l'azote en transformant les différents composés azotés dont les nitrates [30], Figure 5.

- La réduction assimilatrice des nitrates : réduit les nitrates en ammonium pour assimiler ce dernier en le fixant à la glutamine.
- La fixation de l'azote : fixation du diazote gazeux en ammonium afin de l'assimiler dans les composés organiques. Ce processus est coûteux en énergie et nécessite une nitrogénase, il existe par exemple des symbioses entre les plantes et les bactéries dans lesquelles ces dernières fixent le diazote nécessaire à la plante.
- La réduction dissimilatrice des nitrates : permet de réduire les nitrates en ammonium, l'ammonium n'est pas assimilé, c'est uniquement une réaction d'oxydoréduction.
- La dénitrification : c'est la réduction des nitrates en espèce gazeuse, oxyde nitreux ou diazote
- Le processus ANAMMOX : c'est l'abréviation en anglais de anaerobic ammonium oxidation, dans lequel l'ammonium est oxydé par les nitrites en diazote.
- La nitrification : oxyde l'ammonium en nitrites ou nitrates.

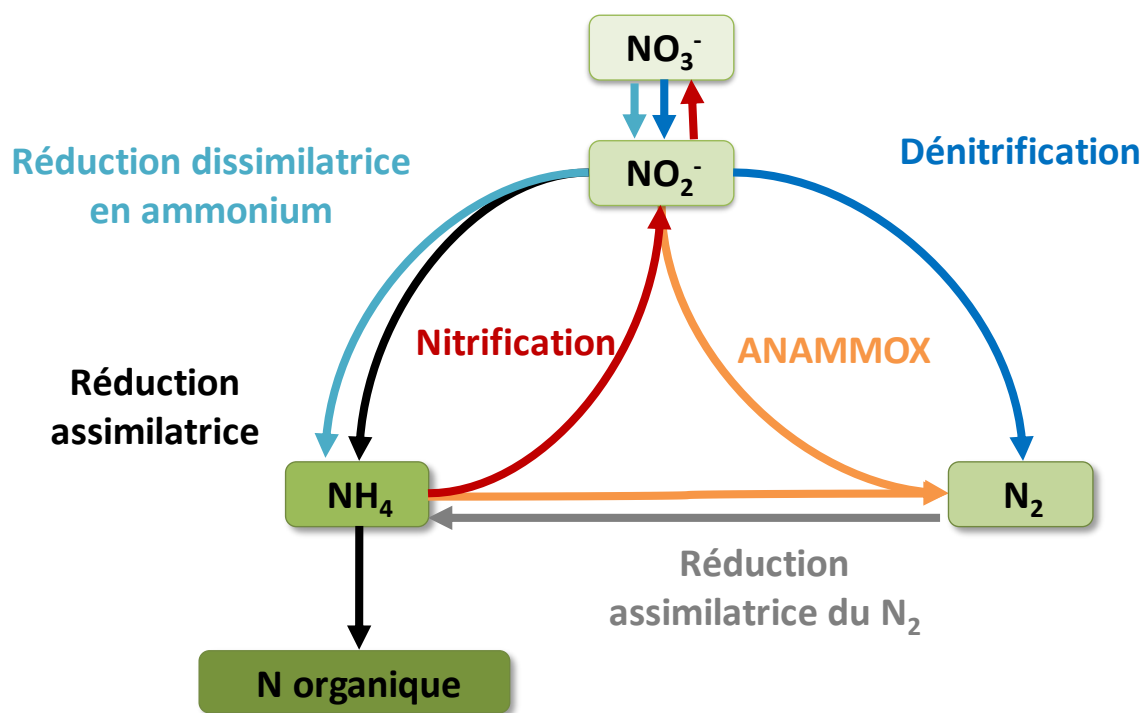


Figure 5 : Représentation schématique du cycle microbien de l'azote d'après [17,30].

Dans le contexte de la thèse, les processus microbiens d'intérêt sont ceux qui conduisent à la réduction des nitrates. Ce sont donc les processus de dénitrification ou de réduction dissimilatrice en ammonium qui sont susceptibles de réduire les nitrates. Les microorganismes privilégient l'une ou l'autre voie de réduction selon le ratio C/N et le type de substrat organique biodisponible [31,32]. Dans les environnements à proximité des déchets radioactifs, des concentrations élevées en nitrates et relativement faibles en matière organique sont attendues, le ratio C/N sera très faible ce qui favorise la dénitrification (Tableau 1). De plus, la matière organique sera présente essentiellement sous forme d'acides organiques, ce qui favorise la dénitrification. En conséquence le processus de réduction des nitrates attendu est la dénitrification, ce qui a été confirmé par les travaux collaboratif menés depuis 10 ans maintenant par le groupe LMDC-LGC à Toulouse [17,18].

I.1.2. Aspects énergétiques de la dénitrification, comparaison avec la respiration aérobie

La dénitrification biologique, est un processus de respiration bactérienne mettant en œuvre la réduction successive des composés azotés : nitrate, nitrite, oxyde nitrique, oxyde nitreux en diazote. Le processus de la respiration de ces espèces azotées, se déroule en deux phases. Dans une première phase, les coenzymes oxydées NAD^+ sont réduites en NADH, H^+ par un donneur d'électrons comme le dihydrogène ou l'acétate oxydés respectivement en protons ou en CO_2 . Dans une seconde phase, les coenzymes NADH, H^+ fournissent les électrons qui sont transportés le long de la chaîne de transport d'électrons jusqu'à l'accepteur final nitrates, nitrites, oxyde nitrique ou oxyde nitreux. Ce transport d'électrons est converti en gradient de protons à travers la chaîne de transport d'électrons, puis l'ATP-synthase converti le gradient de protons en ATP.

Il est possible de calculer l'enthalpie libre standard (ΔG^0) de la dénitrification qui est l'énergie potentielle libérée par une réaction. Si $\Delta G^0 = 0$ le système est à l'équilibre et n'évolue pas. Plus le ΔG^0 est négatif plus la réaction libère d'énergie. L'enthalpie libre standard s'exprime en fonction de la

différence des potentiels standards des couples d'oxydoréduction, équation (1). Les potentiels standards des couples (NO_3^-/N_2), ($\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$) et (NO_2^-/N_2) sont indiqués dans le Tableau 2.

$$\Delta G^0 = -n \cdot F \cdot \Delta E^0 \quad (1)$$

- ΔE^0 : différence entre les potentiels d'oxydoréduction du donneur et de l'accepteur d'électrons
- F : constante de Faraday = 96 494 J.mol⁻¹.V⁻¹
- n : nombre d'électrons transférés

Tableau 2 : Potentiel standard de différents couples d'oxydoréduction impliqués dans la dénitrification.

Métabolisme	Equation	Potentiel standard E ⁰ (V)
Dénitrification	$2 \text{NO}_3^- + 12 \text{H}^+ + 10 \text{e}^- = \text{N}_2 + 6 \text{H}_2\text{O}$	1,25
Réduction des nitrates en nitrites	$\text{NO}_3^- + 2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^- = \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}$	0,84
Réduction des nitrites en N ₂	$2 \text{NO}_2^- + 8 \text{H}^+ + 6 \text{e}^- = \text{N}_2 + 4 \text{H}_2\text{O}$	1,52

Les potentiels standards sont extraits de tables où le E⁰ est calculé à pH 0, 298 K, et 1 M de chaque espèce oxydo-réductrice. En biochimie, le E⁰ est exprimé à pH 7, 298 K, 1 M et s'écrit E^{0'}. Pour passer de E⁰ à E^{0'}, il suffit d'opérer un décalage de -0,42 V (potentiel du couple (H⁺/H₂)). Le potentiel standard du NADH à pH 7 est - 0,320 V. Ainsi, pour la respiration des nitrates en diazote d'après le Tableau 2, $\Delta E^{0'} = 1,25 - (0,42 - 0,32) = 1,15$ V et l'enthalpie libre par mole de donneur d'électrons est $\Delta G^{0'} = - 222$ kJ/mol.

En milieu aérobie, la respiration de l'O₂ est prépondérante car elle génère le plus d'énergie. En anaérobiose, plusieurs accepteurs d'électrons peuvent remplacer l'O₂, soit le NO₃⁻, le Fe³⁺ ou le SO₄²⁻. En utilisant l'équation (1) et les mêmes types de calculs, *Rizoulis et coll.* ont calculé l'enthalpie libre de la réaction entre plusieurs couples d'oxydoréduction et l'acétate en fonction du pH dans la Figure 6 [33]. L'enthalpie libre augmente avec l'élévation de pH, pour toutes les réactions d'oxydoréductions considérées. D'après le graphique, les couples d'oxydants thermodynamiquement favorables sont par ordre décroissant : (NO₃⁻/N₂) > (NO₃⁻/NO₂⁻) > (Fe³⁺citrate/Fe²⁺) > (Fe₂O₃/Fe²⁺) > (N₂/NH₃) > (SO₄²⁻/H₂S). En anaérobiose, la respiration des nitrates est donc le procédé biologique prépondérant. Ceci a été validé de manière expérimentale. Dans deux études distinctes, ont été comparées les réductions microbiennes des nitrates, du fer (III), et du sulfate en présence d'acétate [33] ou d'acide isosaccharinique comme donneurs d'électrons [34]. Les nitrates étaient réduits beaucoup plus rapidement que les autres accepteurs d'électrons.

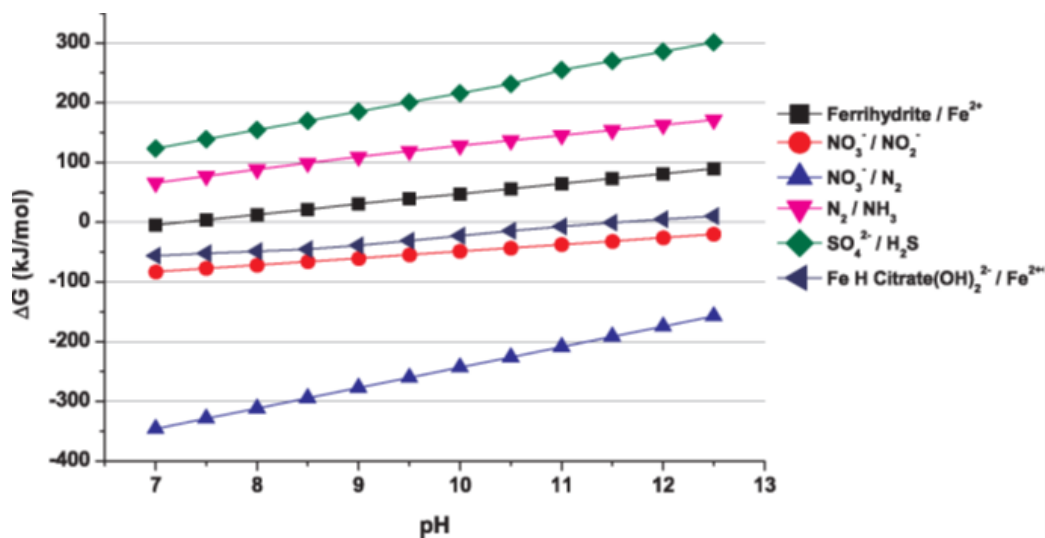


Figure 6 : Evolution de l'enthalpie libre de différents couples d'oxydants en fonction du pH [33].

I.1.3. De la souche *Paracoccus denitrificans* à un consortium microbien comme inocula dénitrifiants

La démarche expérimentale a consisté d'abord à acquérir des connaissances à partir de systèmes expérimentaux modèles puis au cours de la thèse de progressivement complexifier les systèmes d'étude pour se rapprocher du contexte réel du stockage des déchets radioactifs. En conséquence, le premier inoculum microbien utilisé était une souche bactérienne modèle déjà très étudiée dans le cadre de travaux fondamentaux sur la dénitrification : *Paracoccus denitrificans* [28,35,36]. *P. denitrificans* est une bactérie Gram négative, non mobile, aérobie anaérobie facultative, qui a la capacité de vivre dans des environnements variés [28]. Notre choix s'est préférentiellement orienté sur cette souche car elle possède les quatre réductases nécessaires à la dénitrification [35,36] et parce que cette bactérie est capable d'utiliser aussi bien de la matière organique que de l'hydrogène comme donneur d'électrons [28]. Des travaux précédemment réalisés conjointement au LGC et au LMDC ont déjà montré que *P. denitrificans* pouvait réduire les nitrates jusqu'à pH 9,5 ou en hydrogénotrophie [18].

Dans un second temps, pour se rapprocher de la réalité du contexte du stockage des déchets radioactifs, un consortium de microorganismes a été utilisé. Le consortium microbien a été échantillonné à partir de boues activées collectées dans une station d'épuration. Ce choix a été décidé en accord avec l'Andra en considérant que les bactéries susceptibles de se développer dans les alvéoles de stockage des déchets radioactifs sont majoritairement apportées par l'activité humaine [11,12] et pas nécessairement déjà adaptées à des pH ou des concentrations en nitrates élevées. Les consortia microbiens qui composent les boues activées sont caractérisés par une importante diversité microbienne. Il est donc probable qu'ils renferment les microorganismes capables de se développer dans les alvéoles de stockage. Il a d'ailleurs déjà été montré que les consortia microbiens issues des boues activées étaient capables de s'adapter et de réduire les nitrates, à des pH élevés [37], ou des concentrations en nitrates élevées [38] ou encore en hydrogénotrophie [39].

I.2. Influence du dihydrogène, du pH alcalin et des concentrations élevées en nitrates sur la dénitrification microbienne

Une partie significative de cette étude bibliographique a été publiée dans la revue internationale *International Journal of Molecular Sciences* sous le titre « Influence of hydrogen electron donor, alkaline pH, and high nitrate concentrations on microbial denitrification: a review ». L'article de revue est organisé selon quatre axes :

- La dénitrification microbienne et ses aspects biochimiques
- L'influence des concentrations en nitrates élevées sur la dénitrification microbienne
- L'influence du dihydrogène sur la dénitrification microbienne
- L'influence des pH alcalins sur la dénitrification microbienne

Influence of hydrogen electron donor, alkaline pH, and high nitrate concentrations on microbial denitrification: a review

Bacterial respiration of nitrate is a natural process of nitrate reduction, which has been industrialized to treat anthropic nitrate pollution. This process, also known as "microbial denitrification", is widely documented from the fundamental and engineering points of view for the enhancement of the removal of nitrates in waste water. For this purpose, experiments are generally conducted with heterotrophic microbial metabolism, neutral pH and moderate nitrate concentrations (< 50 mM). The present review focuses on a different approach as it aims to understand the effects of hydrogenotrophy, alkaline pH and high nitrate concentration on microbial denitrification. Hydrogen has a high energy content but its low solubility, 0.74 mM (1 atm, 30°C), in aqueous medium limits its bioavailability, putting it at a kinetic disadvantage compared to more soluble organic compounds. For most bacteria, the optimal pH varies between 7.5 and 9.5. Outside this range, denitrification is slowed down and nitrite (NO₂⁻) accumulates. Some alkaliphilic bacteria are able to express denitrifying activity at pH levels close to 12 thanks to specific adaptation and resistance mechanisms detailed in this manuscript, and some bacterial populations support nitrate concentrations in the range of several hundred mM to 1 M. In these highly nitrated environments, several other factors also contribute to denitrification (C/N ratios, bacterial population, etc.). A high concentration of nitrate generally leads to an accumulation of nitrite. Nitrite accumulation can inhibit bacterial activity and may be a cause of cell deaths.

Keywords: Hydrogenotrophic denitrification; high pH; high nitrate concentration; denitrifying bacteria; nitrite accumulation; acclimation; mineral carbon

Table of contents

1. Introduction.....	24
2. Definition and biochemical aspects of denitrification	24
3. Influence of high nitrate concentration on denitrification	26
3.1. Regulation of denitrification, nitrite accumulation.....	26
3.2. High nitrate concentrations reported in the literature	28
4. Hydrogenotrophic metabolism and interactions with denitrification	29
4.1. Hydrogen oxidation catalysed by hydrogenase enzymes	29
4.2. Inorganic carbon assimilation	31
4.3. Comparison between hydrogenotrophic and heterotrophic denitrification	32
5. Influence of high pH on denitrification	33
5.1. Basics of pH effect on denitrification	33
5.2. Bacterial adaptations to alkaline pH	36
5.3. pH threshold values.....	38

6. Perspectives, denitrification at alkaline pH, with high nitrate concentration and with hydrogen as electron source.....	38
7. Conclusions.....	40

1. Introduction

Microbial denitrification is considered as more efficient at high nitrate concentration and more economical than conventional techniques (reverse osmosis, ion exchange, electro dialysis, chemical denitrification, adsorption methods)[40,41]. It is a respiration process leading to the reduction of nitrate while an electron donor (organic matter, hydrogen...) is oxidized. Nitrate is gradually reduced to nitrite, nitric oxide, nitrous oxide, and finally to dinitrogen in four successive reactions catalysed by four microbial reductases. Microbial denitrification is still insufficiently investigated in non-conventional environments, such as high nitrate concentrations, alkaline pH and hydrogenotrophic metabolism, despite its interest in the processing of various problematic industrial wastes. Therefore, the aim of this literature review is to give some first indications of the possibilities of bacterial denitrification under these three conditions.

Several industries generate effluent and waste that can be highly concentrated in nitrate, sometimes associated with non-advantageous environments such as alkaline pH, and absence of organic matter. The disposal of radioactive waste deep underground faces a nitrate leaching issue in an alkaline environment. High nitrate concentrations (10 mM to 1 M) are expected in the vicinity of the radioactive waste, which could enhance radionuclide mobility [4,9,12]. The effluent from a stain-less steel plant was found to contain concentrations of up to 80 mM nitrate [42] and waste water from the explosives industry can reach nitrate concentrations of up to 500 mM [43]. The management of such highly concentrated nitrate waste has become a major concern for these industries. High nitrate concentrations are fairly detrimental for microbial denitrification; the maximal nitrate concentrations tested in literature range from hundreds of mM [44] to 1 M [45]. In particular, high nitrate concentrations cause nitrite accumulation, which is described as inhibiting, or even toxic, for bacteria [46–48]. Experimenting with high nitrate concentrations also requires high concentrations of the counter-ion Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , etc. to be added with nitrate. Caution is necessary here as there is no consensus on the effect of these cations [9].

Alkaline pH can be found in alkaline wastewaters [49], marsh soil management [50,51], alkaline and saline lakes [52], and in disposal facilities for radioactive wastes. The alkaline environment strongly affects microbial denitrification. As the pH affects the functioning of all enzymes, it can also create an imbalance between the reduction kinetics of the four reductases of denitrification. Alkaline pH thus causes accumulation of metabolic intermediates such as nitrite. The maximal pH tolerated by bacteria, even alkaliphilic ones, is around pH 11.5 to 12 [53].

Hydrogen is an alternative energy source replacing organic matter for denitrifying bacteria. In subsurface environments or in industrial contexts such as a radioactive waste subsurface repository, organic matter concentrations can be low to negligible, while hydrogen can be generated through water radiolysis, mineral reactions, volcanic activity or iron corrosion [13,54–56]. Hydrogenotrophic denitrification has also aroused interest in the field of wastewater treatment as it results in water with low organic matter content [32,57]. Such denitrification (without organic matter) is considered to result in slower nitrate reduction and bacterial growth kinetics than heterotrophic denitrification (with organic matter) [58,59]. This is mainly due to the low hydrogen solubility [60,61] and the necessity for hydrogenotrophic bacteria to assimilate inorganic carbon for growth [62].

2. Definition and biochemical aspects of denitrification

Microbial denitrification is a biological respiration process involving the successive reduction of nitrogen compounds: nitrate, nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide, to nitrogen. The four steps are catalysed by four different enzymes (reductases) (Figure 7) [32,63].

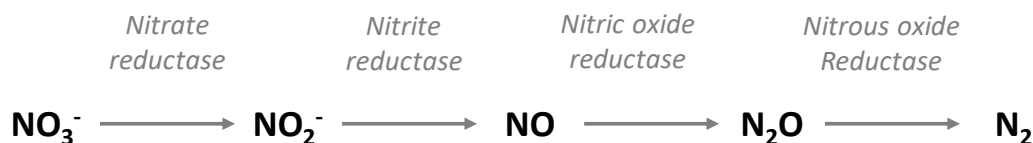
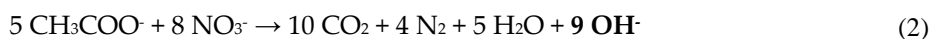


Figure 7. Overview of the four steps of microbial denitrification

Microbial denitrification is generally carried out by heterotrophic bacteria using, for example, acetate as the electron donor (reaction (2)). When the environment is more restrictive, without organic matter, hydrogen becomes an alternative source of electrons for bacteria [32] (reaction (3)). Microbial denitrification, whether heterotrophic or hydrogenotrophic, is always accompanied by the production of OH⁻ ions, which affect the pH of the environment if it is not buffered.



Nitrate respiration is the process in which electrons are transferred from a donor (organic matter, hydrogen) to the nitrate acceptor (Figure 8). This redox reaction along the respiratory chain cogenerates a gradient of protons through the bacterial cell membrane, which is finally converted into energy in the form of ATP by ATP synthase [63]. Firstly, the electrons from the primary source of electrons (acetate, hydrogen, methanol, etc.) regenerate co-enzymes, such as NADH, H⁺. NADH, H⁺, and other potential electron donors, such as fatty acids and succinate, transfer their electrons to the respiratory chain [36]. Then electrons are carried through the respiratory chain by three types of electron transporters: (i) the Coenzyme Q, known as Ubiquinone (UQ) in its oxidized state and Ubiquinol (UQH₂) in its reduced state, (ii) the cytochrome bc₁ complex, and (iii) the cytochrome c (Cyt. c) family of proteins containing a heme c [36,64]. Each of them can interact with several reductases [63,65].

The first reductase is the nitrate reductase (Nar). Three types of bacterial Nar complexes have been described. The membrane complex NarGHI is a molybdoenzyme, the active site of which faces the cytoplasm. This complex is usually adjacent to the narK membrane protein; it is an NO₃⁻/NO₂⁻ antiporter that absorbs NO₃⁻ and excretes NO₂⁻, Figure 8. The periplasmic reductase Nap reduces nitrate but cannot contribute to the proton gradient. The last complex, periplasmic assimilatory nitrate reductase (Nas) is quite distinct from other? reductase systems, as it is active in aerobic conditions [66]. The nitrite produced by the nitrate reduction, is then reduced by nitrite reductase (Nir). Two periplasmic types of enzymes have already been described: cd₁-nitrite reductase with a heme-based active site and nitrite reductase with a copper-based active site. The product of nitrite reduction, nitric oxide, is transformed by the membrane nitric oxide reductase (Nor) which is a member of the heme-copper oxidases family also capable of reducing oxygen [67]. The last reduction is made by nitrous oxide reductase. It is a periplasmic enzyme that contains two Cu cores inactivated by NO or O₂ [63,65,68].

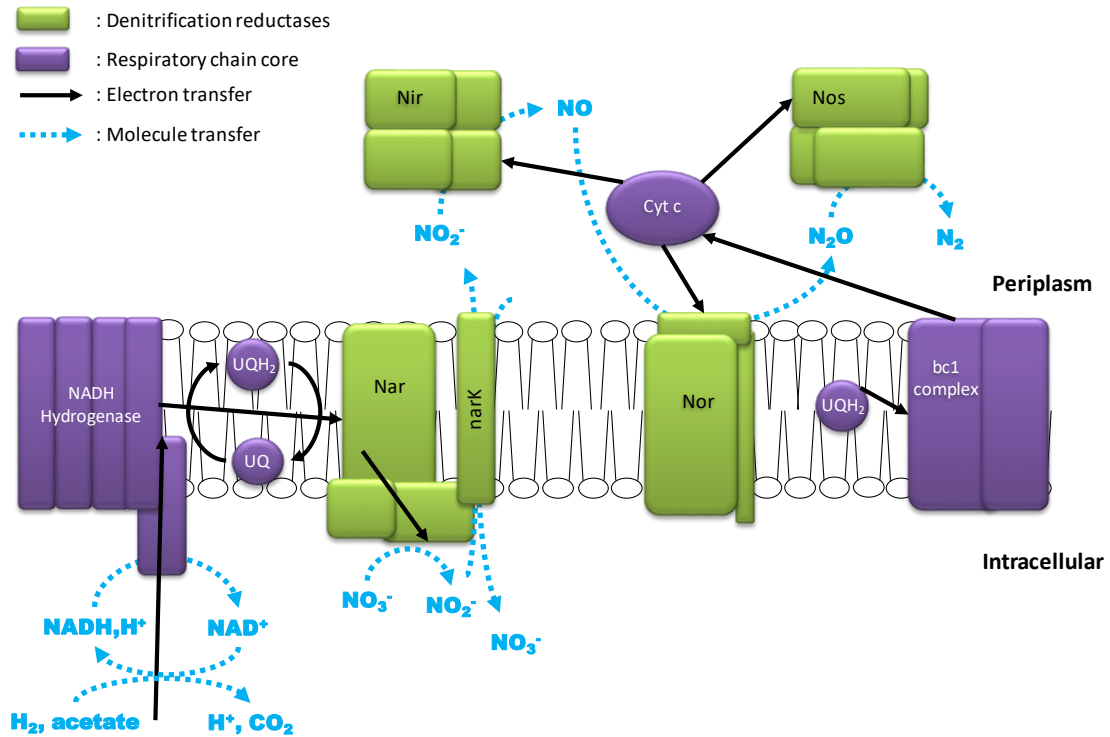


Figure 8. Schematic representation of the canonical respiratory chain of denitrification, inspired from [36,63,65].

3. Influence of high nitrate concentration on denitrification

3.1. Regulation of denitrification, nitrite accumulation

Many denitrifying bacteria are facultative anaerobic: in presence of oxygen the denitrification pathway is inhibited and only aerobic respiration remains as it has the most efficient free energy conservation. When O_2 is low and NO_3^- is available, denitrification is initiated. The denitrification intermediates NO_2^- and NO are toxic compounds to bacterial cells [46–48,65], their internal concentration is regulated below cytotoxic levels to mM and nM respectively [36,63]. Consequently, O_2 , NO_3^- , NO_2^- and NO are among the key signals that impact denitrification regulation. The regulation of the microbial denitrification at transcriptional level has been extensively studied using model denitrifying strains such as *Paracoccus denitrificans* or *Pseudomonas aeruginosa*. In denitrifying bacteria, the regulation of denitrification reductase gene transcription is managed by transcription factors of the FNR (Fumarate and Nitrate reductase Regulatory) family [35]. For example, in *P. denitrificans*, three types of FNR are involved: NarR (NO_3^- and NO_2^- sensitive), NnrR and FnrP (O_2 and NO sensitive). Each one stimulates the transcription of different reductase genes (Figure 9).

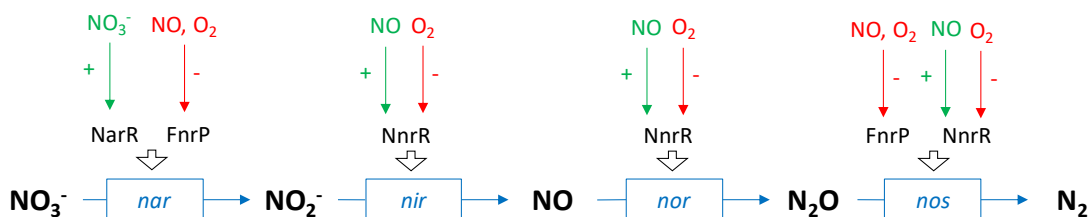


Figure 9. Schematic representation of the transcriptional regulation of the expression of genes encoding the different enzymes involved in denitrification in *P. denitrificans* [35,36].

In the well-studied denitrifying strain *P. aeruginosa*, the regulation is controlled by NarXL (NO_3^- and NO_2^- sensitive), ANR, DNR and NosR (NO and O_2 sensitive) [69–71]. To sum up, in denitrifying bacteria, at the genomic level, there is a substrate regulation with NO_3^- and a product regulation from NO , and NO_2^- , the aim of which is to equilibrate the internal concentration of cytotoxic compounds such as NO_2^- and NO [36]. Therefore, in culture under favourable conditions, NO_2^- and NO should not accumulate.

However, at a metabolic level, reductase competition can cause NO_2^- or N_2O external accumulation. In the respiratory chain, the transporters UQ can interact with three reductases (Nar, Nir and Nos) and the transporters Cyt c with two reductases (Nir and Nos) [72,73]. UQ and Cyt c are therefore solicited by several electron acceptors at the same time and, depending on the environmental conditions, such as the pH, electron transporters could transfer their electrons preferentially to one reductase rather than another [73,74]. Thus, at acidic pH (5.5), segmented denitrification was observed in *P. denitrificans* [73], i.e. the authors observed accumulation of NO_2^- and N_2O because UQ and Cyt c transferred electrons preferentially to some reductases, while at pH 8.5, there were no accumulations: UQ and Cyt c transferred electrons simultaneously to all reductases. Furthermore, the electron donor also impacts nitrite accumulation depending on the amount of electrons it is likely to supply. In one study, nitrite accumulation occurred when a culture of *Pseudomonas stutzeri* was fed with 5 mM of acetate (2 atoms of carbon) but did not occur with 5 mM of butyrate (4 atoms of carbon) [75]. Butyrate is likely to release 20 electrons during its oxidation, while acetate releases only 8 electrons, so it provides sufficient electrons while avoiding competition among reductases for electron acceptance. Thus, accumulation of intermediates such as nitrite could occur because of environmental conditions and despite the strict regulation of transcription. To prevent nitrite accumulation within the cell, bacteria use transporters such as narK to excrete the nitrite [76].

In a mixed bacterial population, two distinct bacterial phenotypes can affect the nitrate and nitrite equilibrium: (i) *nitrate respiring* bacteria unable to reduce nitrite, (ii) *true denitrifying* bacteria reducing nitrate and nitrite to dinitrogen [77–80]. Growth rates are higher for *nitrate respiring* bacteria and they rapidly become dominant. For example, growth rates three times higher have been observed for *nitrate respiring* bacteria [81]. Consequently, in the presence of nitrate, the domination of *nitrate respiring* bacteria causes accumulation of nitrite. Once nitrate is consumed, the *true denitrifiers* continue to develop using nitrite and become dominant. In one study, activated sludge was acclimatized to nitrate concentrations of 192 mM at pH 7 to 9 in SBR reactors. The dominant bacteria in the inoculum were *nitrate respiring* bacteria while the bacteria remaining at the culture end were *true denitrifying* bacteria [77]. In this experiment, the accumulation of nitrite was pH dependent: higher at higher pH. Glass et al. hypothesized that the activity of *true denitrifiers* was slowed by alkaline pH. In summary, in a culture inoculated by a mixed population, the bacterial population and the culture conditions, such as alkaline pH, will impact nitrite accumulation. Therefore, in single strain or mixed population cultures exposed to high pH or high nitrate concentrations, the nitrite accumulations should not follow the same patterns.

Nitrite accumulation is problematic to denitrifying culture and in general for bacterial activity. The nitrite can inhibit and slow down bacterial activity at relatively low concentrations (tens of mM) [82]. Several other bacterial metabolic pathways such as nitrification [33,47,83] or methanogenesis [84] are also sensitive to the presence of nitrite. Concentrations of 10 mM to 100 mM of nitrite have been described as responsible for inhibitions of O_2 assimilation, proline transport, or phosphorylating oxidation [46]. Moreover, nitrite can inhibit bacterial activity at genomic level. Concentrations of 10 to 20 mM of nitrite caused a decrease in the concentration of mRNAs encoding for nitrification enzymes in the *Nitrosospira multiformis* and *Nitrosospira europaea* strains [47]. Other studies have reported nitrite toxicity [82] and even bacterial cell mortality in the presence of nitrite [46,85]. However, some bacteria could develop resistance to nitrite, for instance *P. denitrificans* tolerated 140 mM of nitrite in presence of

oxygen [86]. In conclusion, nitrite accumulation could be one of the major issues when denitrifying culture is cultivated with high nitrate concentrations.

3.2. High nitrate concentrations reported in the literature

In the literature, the maximum concentrations of nitrate tested in denitrifying cultures were of the order of hundreds of mM [27,75,78,81]. For example, an activated sludge suspension was fed with aqueous solution containing 645 mM of nitrate [87]. Lagoon samples (Oak Ridge, USA) initially concentrated at 645 mM of nitrate have been almost entirely denitrified (residual concentration of 0.8 mM) within a year [44]. Denariuz et al. [45] have reported the ability of a single strain culture of *Bacillus halodenitrificans* to survive at a concentration of 1.06 M of nitrate. In another study, *Rhodococcus sp.* was grown on 0.9 M of nitrate and 0.9 M of NaCl in aerobiosis [88]. These studies show that bacterial activity is possible at nitrate concentrations up to molar concentration in particular conditions.

When using a synthetic medium for the cultivation of denitrifying bacteria or mixed consortia, the generation of such high concentrations of nitrate requires special attention to be paid to the counter-ion (NH_4^+ , Na^+ , Ca^{2+} , K^+ ...) added with nitrate. There is no consensus on the effect of these highly concentrated cations on bacterial growth and activities. Francis and Hatcher compared the effect of three counter-ions (NH_4^+ , Na^+ , Ca^{2+}) on the denitrification kinetics of coastal sediments. Cultures underwent progressive nitrate increases up to 285 mM [9]. For each increase in concentration of nitrate, denitrification kinetics were significantly higher when nitrate was added in the form of NH_4NO_3 . Additions of NaNO_3 and $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ resulted in comparable but lower reduction kinetics. In addition, the salinity of the culture medium also has a significant effect on denitrifying bacterial cultures. In culture with biomass initially adapted to 410 mM of NaCl, the NaCl concentration was increased from 8 to 1700 mM [89]. The results showed that the rate of denitrification decreased as the salt concentration increased. In contrast, some studies have reported rather high NaCl threshold concentrations: 1 M [90], 1.2 M [91], 1.9 M [38] and 4.25 M [45]. As a reminder and example, seawater contains 0.6 M of NaCl on average. Other studies observed denitrification enhancement by adding NaCl from 6.8 mM to 1.7 M [89] or calcium up to 3.75 mM [42].

Several studies have focused on the treatment of wastewater containing high nitrate concentrations, from 100 to 1000 mM, using activated sludge [37,38,42,87,91,92]. Experiments are presented in Table 3, showing the acclimation procedure and the nitrite build-up. The acclimation procedure made it possible to adapt bacteria to high nitrate concentrations by stepwise increases. As a result, in all experiments, the nitrates were totally reduced, and the distribution of bacterial communities in activated sludge changed in favour of *nitrate respiring* bacteria [87].

Table 3. Experiments with activated sludge cultures highly concentrated in nitrate, acclimation procedure and nitrite accumulation.

Experimental protocol	Acclimation procedure	Nitrate (in culture)	Nitrite build-up	Ref
Ca increase from 50 to 550 g/L at 45 mM nitrate, pH 8.5	Medium diluted x2 during 2 weeks	45 mM	max 2.5 mM	[42]
Nitrate increase to 580 mM and ionic strength from 0.8 to 3.0 in SBR, pH 9	Stepwise nitrate increase from 100 mM to 590 mM in about 6 weeks	100 mM 215 mM 300 mM	70 mM 140 mM 240 mM	[91]
Test at 140 mM nitrate in batch reactor, pH 9/ Nitrate increase to 1000 mM in continuous reactor	Stepwise nitrate increase Preculture: 14 mM to 140 mM in 5 weeks Culture: 140 to 1000 mM in 14 weeks	140 mM	50 mM ¹	[92]

Nitrate increase to 640 mM in SBR	Step-wise nitrate increase from 120 mM to 640 mM in 8 weeks	430 mM 290 mM 120 mM 60 mM	420 mM 290 mM 60 mM 0 mM	[87]
NaCl stress decrease from 11 to 0 % at 430 mM, in continuous reactor	Stepwise nitrate increase from 140 mM to 430 in 3 weeks	430 mM (influent)	70 - 360 mM (effluent)	[38]
pH increase from pH 7.5 to 12 in SBR	Step-wise pH increase from 7.5 to 11.5 in 8 weeks	60 mM	30 - 55 mM (high pH)	[37]

¹ Results of the batch culture

From Table 3 it is possible to estimate the proportion of reduced nitrites according to the initial nitrate concentration, Figure 10. Below 100 mM nitrate, the accumulation of nitrite does not exceed 90% of the initial nitrate concentration. Between 100 and 300 mM of nitrates, the accumulation of nitrite reaches between 40 and 70%. For concentrations greater than or equal to 300 mM, nitrites are no longer reduced except in one study [91]. Therefore, when experimenting on high nitrate concentration attention must be paid to the nitrite accumulation as it could reach concentrations as high as 420 mM. However, these studies focused on nitrate reduction, and longer experimental times might have allowed *true denitrifying* bacteria to proliferate and reduce nitrites.

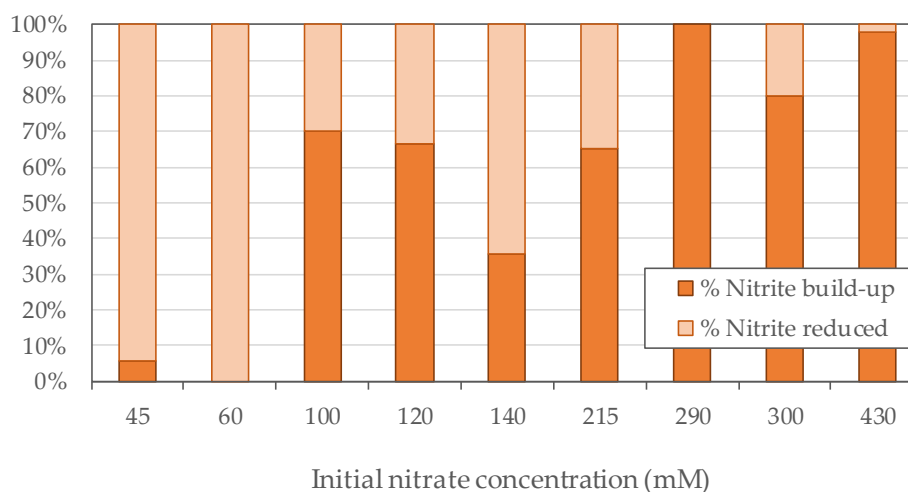


Figure 10. Proportion of nitrite reduced and accumulated according to the initial nitrate concentration in bacterial cultures.

4. Hydrogenotrophic metabolism and interactions with denitrification

Hydrogen is an alternative energy source for denitrifying microorganisms in selective environments without organic electron donors. This is mainly due to the fact that dihydrogen has a limited solubility which makes it less available to bacteria, and that bacteria have to assimilate inorganic carbon which is an additional energy expenditure [32].

4.1. Hydrogen oxidation catalysed by hydrogenase enzymes

Hydrogen can be used as an electron donor by different communities of bacteria reducing O_2 , NO_3^- , Fe^{2+} , SO_4^{2-} , and CO_2 as final electron acceptors [54,93]. In the first stage, the reversible oxidation of hydrogen into protons ($H_2 \leftrightarrow 2 H^+ + 2 e^-$) is catalysed by bacterial hydrogenases. Then, in the denitrification, the electrons are transferred to intermediates such as NAD^+ or bc1 complex, which

introduce the electrons into the respiratory chain. Hydrogenases consist of a protein part and a metal core constituting the active site of the enzyme. Hydrogenases are classified in three families differentiated by their metal core, which is composed of one iron atom, alone or associated with one nickel or iron atom: [NiFe], [FeFe], [Fe]. The [NiFe] and [FeFe] hydrogenases have a similar structure, with an active site protected inside a large protein monomer and connected externally by a channel allowing only hydrogen to enter. The other, smaller monomer contains FeS clusters to transport electrons to the respiratory chain, Figure 11 [94–97]. The [Fe] hydrogenase contains a mononuclear metal centre and is devoid of iron–sulfur clusters. It has only been identified in methanogenic Archaea [98]. The distribution of the three hydrogenase types in the bacteria and archaeobacteria are presented in Table 4. Most of the organisms studied as hydrogen-oxidizing denitrifiers belong to the phylum of Proteobacteria [32].

Table 4. Phyla producing [NiFe], [FeFe] and [Fe] hydrogenase, with examples of strains.

Phylum	Species, genus	Hydrogenase	Ref
Crenarchaeota (Archaea)	<i>Thermoproteus neutrophilus</i>	[NiFe]	[99]
Euryarchaeota (Archaea)	<i>Methanothermobacter marburgensis</i>	[Fe], [NiFe]	[100]
	<i>Thermococcus</i> sp.		[101]
Actinobacteria	<i>Streptomyces avermitilis</i>	[NiFe]	[102]
Aquificae	<i>Aquifex aeolicus</i>	[NiFe]	[103]
Chloroflexi	<i>Thermomicrobium roseum</i>	[NiFe], [FeFe]	[104]
Cyanobacteria	<i>Synechocystis</i> sp.	[NiFe]	[105]
Firmicutes	<i>Clostridium</i> sp.	[NiFe],[FeFe]	[106]
Proteobacteria	<i>Paracoccus denitrificans</i>	[NiFe], [FeFe]	[107,108]
	<i>Thauera</i> sp.		[109]
	<i>Hydrogenophaga</i> sp.		[110,111]
	<i>Pseudomonas stutzeri</i>		[80]
	<i>Escherichia coli</i>		[112]
	<i>Ralstonia eutropha</i>		[95,113]
	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	[114]	
Thermotogae	<i>Thermotoga maritima</i>	[FeFe]	[115]
Spirochaetes	<i>Treponema primitia</i>	[FeFe]	[116]

The regulation of hydrogenase production has been extensively studied in *Ralstonia eutropha* for industrial purposes [95,117,118]. In *R. eutropha* four [NiFe] hydrogenases have been identified: a membrane bound hydrogenase (MBH) linked to the respiratory chain by a cytochrome b, a cytoplasmic soluble hydrogenase (SH), an actinobacterial-type hydrogenase (not well known yet) and a regulatory hydrogenase (RH) [113,117]. The RH forms a tight complex with a histidine protein kinase and acts as a hydrogen sensor. In presence of hydrogen, the RH kinase complex enhances the production of MBH and SH by phosphorylation/dephosphorylation signals transmitted to MBH and SH transcription factors.

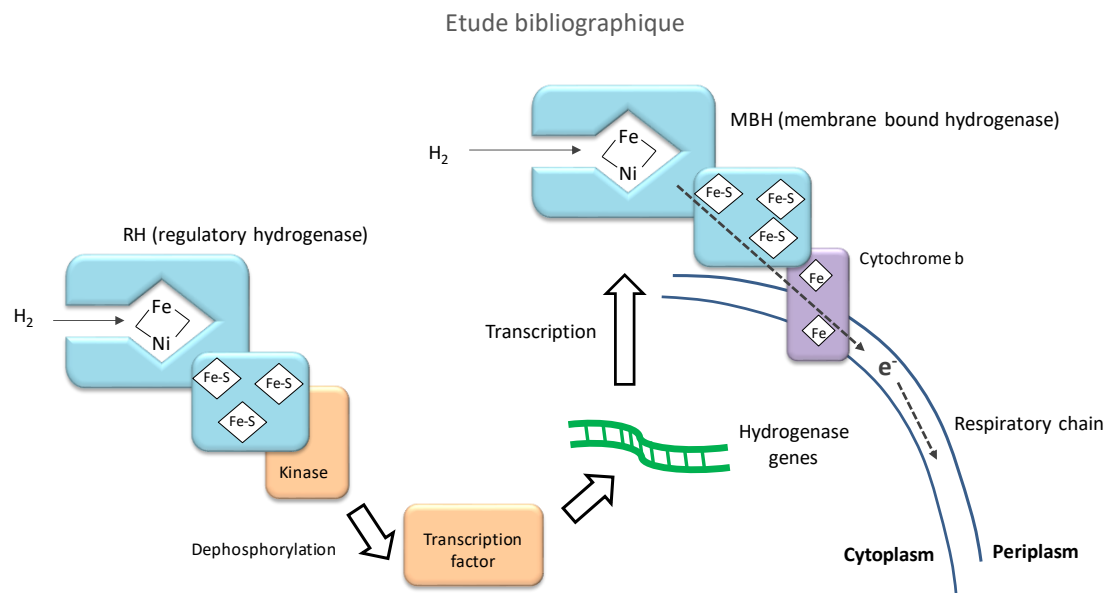


Figure 11. The regulatory [NiFe] hydrogenase and membrane bound [NiFe] hydrogenase in *Ralstonia eutropha*, [95,97].

A similar regulation system is used by other bacteria, such as *Rhodospseudomonas palustris* [114]. However, many different regulatory pathways have been identified in bacteria. For instance, in *Cyanobacterium Synechocystis*, three transcription factors regulate its hydrogenase: two positively acting regulators, LexA and AbrB1, and one repressor, AbrB2 [105]. In *Escherichia coli* three transcription factors again regulate its hydrogenase-1, ArcA and AppY enhance the hydrogenase production while IscR represses it. ArcA and AppY compete with IscR to bind with the hydrogenase gene promoter [119].

4.2. Inorganic carbon assimilation

In environments devoid of organic substrates, hydrogenotrophic bacteria have to assimilate inorganic carbon for growth. The enzymes involved in the carbon assimilation are the carboxylases. The mineral carbon assimilation requires energy in the form of reduced co-enzyme (NADH, H⁺, FADH, H⁺) and ATP. For instance, in the Calvin cycle, 3 ATP and 3 NADH, H⁺ are consumed per equivalent of CO₂ to produce glyceraldehyde-3-phosphate [120]. There are currently six known bacterial pathways leading to the assimilation of mineral carbon [49,50]:

- the reductive pentose phosphate (Calvin-Benson) cycle [120]
- the reductive acetyl-CoA (Wood-Ljungdahl) pathway
- the reductive citric acid cycle, the 3-hydroxypropionate bicycle
- the dicarboxylate/4-hydroxybutyrate cycle
- the 3-hydroxypropionate/ 4-hydroxybutyrate cycle.

Carboxylases are able to assimilate mineral carbon as CO₂ or HCO₃⁻. The availability of these forms is dependent on the pH as CO₂ can hydrate itself into carbonate species (H₂CO₃, HCO₃⁻ and CO₃²⁻) according to the pH. This hydration (H₂O + CO₂ ↔ H₂CO₃ ↔ HCO₃⁻ + H⁺ ↔ CO₃²⁻ + 2 H⁺) causes acidification. Most bacterial carboxylases assimilate the CO₂ form. However, at pH between 6.4 (pKa of (H₂CO₃/HCO₃⁻)) and 10.3 (pKa of (HCO₃⁻/CO₃²⁻)), the HCO₃⁻ form is dominant in solution. Bacteria have adapted by using carbonic anhydrases to catalyse the formation of CO₂ from HCO₃⁻ [122], or by using a few carboxylases capable of fixing the HCO₃⁻ form [123,124].

Mineral carbon can be supplied in aqueous solution either by bubbling CO₂ (g) or by adding soluble carbonates (H₂CO₃, HCO₃⁻, CO₃²⁻). The continuous supply of CO₂ (g) rapidly acidifies the pH of bacterial culture media [125]. In contrast, the addition of soluble carbonate buffers the solution. In addition, the mineral carbon supply must be balanced with a nitrogen supply in order to have an optimal

carbon/nitrogen ratio for bacterial growth. In theory, 0.2 mg HCO_3^- -C/mg NO_3^- -N [126] would be required. In practice, considerably higher C/N mass ratios have been used in order to prevent carbon limitation. For example a ratio of 7.8 mg HCO_3^- -C/mg NO_3^- -N was used in [62]. Ratios should be chosen with care; C/N ratios that are too high can lead to alternative nitrate reduction pathways, such as dissimilatory nitrate reduction to ammonium, while C/N ratios that are too low lead to the inhibition of denitrification [32].

4.3. Comparison between hydrogenotrophic and heterotrophic denitrification

Interest in hydrogenotrophic denitrification for wastewater treatment has grown in recent decades, due to its low production of sludge [32,39,57]. In hydrogenotrophic cultures, denitrification and growth rate are lower than in heterotrophic cultures. In batch cultures of activated sludge, an initial concentration of 14 mM nitrate was reduced to 2.1 mM/d in heterotrophy and to 1.3 mM/d in hydrogenotrophy [59]. This difference can be explained by the additional energy expended for mineral carbon assimilation compared to organic carbon or the kinetic disadvantage of using hydrogen with low solubility. The aqueous solubility of hydrogen is 1.48 mg/L (0.74mM) at 30°C, thus hydrogen bioavailability can become limiting in fast biological processes [60]. In order to prevent hydrogen limitation, reactor designs have been optimized to improve gas-liquid transfers to porous membrane, hollow fibre, and silicone tube reactors [32]. These reactors are designed to improve the supply of hydrogen to bacterial cells. Thus, they result in better denitrification kinetics than simple batch reactors. In addition, based on Henry's law, the utilization of high hydrogen pressure makes it possible to increase the hydrogen solubility. To illustrate this beneficial effect, using a continuous reactor fed with 1 mM nitrate, the nitrate reduction rates were respectively 43 and 170 mM/d at $P_{\text{H}_2} = 0.4$ bar (1.5 bar total) and at $P_{\text{H}_2} = 1.3$ bar (3 bar total) [127]. In conclusion, hydrogenotrophic bacterial cultures often result in lower denitrification kinetics than in heterotrophic cultures [57,58]. However, in some studies, the optimization of hydrogen transfer to bacterial cells has made it possible to obtain denitrification kinetics comparable to those of heterotrophic denitrification [127–129]. An overview of the nitrate reduction rate observed in the literature according to the pH and the nitrate concentration is presented in **Table 5**. Concentrations from 0.1 to 40 mM and pH from 6.5 to 9.5 have been explored. The maximal nitrate reduction rate did not exceed an order of magnitude of 100 mM/d, except for the experiment with high hydrogen pressure and very low nitrate concentration [127].

Table 5. Overview of nitrate reductions rates in hydrogenotrophic cultures depending on the pH and the nitrate concentrations.

Inoculum	Experimental set-up	pH	Nitrate mM	Nitrate maximal reduction rate	Ref.
Activated sludge	Continuous reactor, heterotrophy or hydrogenotrophy	6.5 – 8.7	0.8 -2.3	ND	[26]
Consortium	Pressured Batch reactor	7.1	0.07 - 0.7	356.4 mM/d	[127]
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	Continuous and batch reactors	7.1 – 9	1.8 - 3.2	50.0 mM/d	[61]
<i>Paracoccus denitrificans</i>	Semi-batch reactors	6.5 – 9.5	40	8.4 mM/gDW/d	[28]
Activated sludge	Batch reactors	6.4 – 7	0.5 - 14.3	5.5 mM/d	[129]
Activated sludge	Batch and continuous reactors	ND	14	1.3 mM/d	[59]
Activated sludge	Continuous reactor	7 – 9.5	1	31 mM/d	[130]
Activated sludge	Sequencing batch reactors	7 – 9.5	1.4	27.4 mM/d	[39]

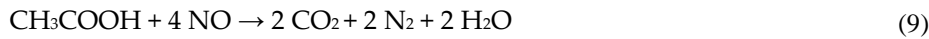
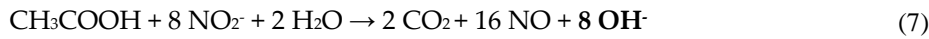
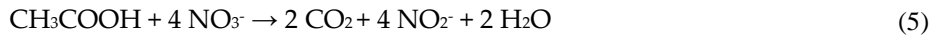
5. Influence of high pH on denitrification

5.1. Basics of pH effect on denitrification

The pH impacts all enzymes that have an optimal pH for working properly. In consequence, the majority of neutrophilic denitrifying bacteria have an optimal pH ranging between 7.5 and 9.5 [28,77,129,131]. At lower pH, denitrification activity is slowed down. According to some authors, the main reason is the formation of nitrous acid (HNO_2) from nitrite. Nitrous acid is a cytotoxic compound that can easily cross bacterial membranes [86]. Other theories suggest a direct effect of pH on reductases or electron transporters contributing to the reduction of nitrate. Under the influence of pH, electron transporters may preferentially give their electrons to specific reductases. For example, a study was carried out to measure nitrite reductase activity and nitrous oxide reductase activity according to pH variation from 6.4 to 9.2 [74]. Cytochrome c was more oxidized by nitrite reductase than by nitrous oxide reductase at $\text{pH} < 7.3$ and vice versa at $\text{pH} > 7.3$ [74].

For pH values above the classical optimal pH range of 7.5 to 9.5, the denitrification kinetics recorded in the literature are generally slower and nitrite accumulations have often been observed [26,129]. In addition, the alkalinization of microbiological culture media is accompanied by an increase of the occurrence of precipitates. Denitrifying tests were performed for pH values from 7.7 to 9.5 [130]. At pH 9.5, in the presence of soluble carbonates, the increasing pH led to the precipitation of calcium carbonates, thereby modifying the bioavailability of carbonate and Ca^{2+} ions in the solution. Other precipitates (CaHPO_4 , $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) are likely to form depending on the pH and the nutrients that may be added [26]. At high pH, all these precipitation phenomena could limit the nutrients available for proper bacterial denitrification.

On the other hand, the bacterial denitrification has an effect on pH. The reactions below describe the reduction from nitrate to nitrite ((4) and (5)), then nitrite to nitric oxide ((6) and (7)), then nitric oxide to dinitrogen ((8) and (9)) with acetate or hydrogen. The nitrite reduction to nitric oxide ((6) and (7)) is the only reduction step that produces OH⁻ with either acetate or hydrogen [26]. Therefore, at alkaline pH, stopping the nitrite reduction would be a way for bacteria to avoid further pH increases. This would provide an explanation for the many observations of nitrite accumulations in denitrifying cultures performed in alkaline media.



However, in heterotrophic denitrification, organic matter (such as acetate) is oxidized to CO₂, which has an acidifying action and could compensate for OH⁻ alkalization. Calculations of pH were made to better understand the pH evolution in heterotrophic cultures supplemented with acetate and a carbonate buffer. In the pH range of 8 to 14, considering that all the strong base OH⁻ reacts with CO₂ to produce HCO₃⁻ and then with HCO₃⁻ to produce CO₃²⁻, equation (2) can be rewritten by introducing (10).



Therefore, the pH can be calculated from the Henderson-Hasselbalch equation by determining the final concentration of HCO₃⁻ and CO₃²⁻ depending on the nitrate reduced, Table 6.

Table 6. Calculation of pH in culture buffered with carbonate and fed with acetate according to the reduced nitrate concentration.

Equivalentents	$[\text{HCO}_3^-]_{\text{produced}} \Leftrightarrow 7/8 [\text{NO}_3^-]_{\text{reduced}} \quad [\text{CO}_3^{2-}]_{\text{produced}} \Leftrightarrow 3/8 [\text{NO}_3^-]_{\text{reduced}}$
Final carbonate concentrations	$[\text{CO}_3^{2-}]_{\text{final}} = [\text{CO}_3^{2-}]_{\text{initial}} + [\text{CO}_3^{2-}]_{\text{produced}} = [\text{CO}_3^{2-}]_{\text{initial}} + 3/8 [\text{NO}_3^-]_{\text{reduced}}$ $[\text{HCO}_3^-]_{\text{final}} = [\text{HCO}_3^-]_{\text{initial}} + [\text{HCO}_3^-]_{\text{produced}} = [\text{HCO}_3^-]_{\text{initial}} + 7/8 [\text{NO}_3^-]_{\text{reduced}}$
Henderson-Hasselbalch equation	$\text{pH} = 10.32 + \text{Log} \left(\frac{[\text{CO}_3^{2-}]_{\text{final}}}{[\text{HCO}_3^-]_{\text{final}}} \right)$
Final equation	$\text{pH} = 10.32 + \text{Log} \left(\frac{[\text{CO}_3^{2-}]_{\text{initial}} + \frac{3}{8} [\text{NO}_3^-]_{\text{reduced}}}{[\text{HCO}_3^-]_{\text{initial}} + \frac{7}{8} [\text{NO}_3^-]_{\text{reduced}}} \right)$

Therefore, the pH can be expressed as in equation (11). If the nitrate concentration is significantly higher than the initial carbonate concentration, the pH tends to 10 (= 10.32 + log (3/7)). Therefore, during the denitrification with acetate, the pH may acidify or alkalize depending on whether the initial pH is higher or lower than 10. This pattern is reported in denitrifying cultures as "self-acidification" at alkaline pH [32,86,129] and "self-alkalinization" at acidic pH [22,27].

$$\text{pH} = 10.32 + \text{Log} \left(\frac{[\text{CO}_3^{2-}]_i + \frac{3}{8} \times [\text{NO}_3^-]}{[\text{HCO}_3^-]_i + \frac{7}{8} \times [\text{NO}_3^-]} \right) \quad (11)$$

In the case of hydrogenotrophic denitrification, there is no CO₂ production. The pH can only increase due to the production of OH⁻, which can react with HCO₃⁻ to form CO₃²⁻. Therefore, the pH from a hydrogenotrophic culture buffered with carbonate can be calculated from equation (3) and the Henderson-Hasselbalch equation, Table 7.

Table 7. Calculation of pH in culture buffered with carbonate and fed with hydrogen according to the reduced nitrate concentration

Equivalentents	$[\text{HCO}_3^-]_{\text{consumed}} \Leftrightarrow [\text{OH}^-]_{\text{produced}} \Leftrightarrow [\text{NO}_3^-]_{\text{reduced}}$ $[\text{CO}_3^{2-}]_{\text{produced}} \Leftrightarrow [\text{OH}^-]_{\text{produced}} \Leftrightarrow [\text{NO}_3^-]_{\text{reduced}}$
Final carbonate concentrations	$[\text{CO}_3^{2-}]_{\text{final}} = [\text{CO}_3^{2-}]_{\text{initial}} + [\text{CO}_3^{2-}]_{\text{produced}} = [\text{CO}_3^{2-}]_{\text{initial}} + [\text{NO}_3^-]_{\text{reduced}}$ $[\text{HCO}_3^-]_{\text{final}} = [\text{HCO}_3^-]_{\text{initial}} - [\text{HCO}_3^-]_{\text{consumed}} = [\text{HCO}_3^-]_{\text{initial}} - [\text{NO}_3^-]_{\text{reduced}}$
Henderson-Hasselbalch equation	$\text{pH} = 10,32 + \text{Log} \left(\frac{[\text{CO}_3^{2-}]_{\text{final}}}{[\text{HCO}_3^-]_{\text{final}}} \right)$
Final equation ¹	$\text{pH} = 10,32 + \text{Log} \left(\frac{[\text{CO}_3^{2-}]_{\text{initial}} + [\text{NO}_3^-]_{\text{reduced}}}{[\text{HCO}_3^-]_{\text{initial}} - [\text{NO}_3^-]_{\text{reduced}}} \right)$

¹ : does not apply if $[\text{HCO}_3^-]_{\text{initial}} < [\text{NO}_3^-]_{\text{reduced}}$, in this case the pH is directly calculated from [OH⁻].

During hydrogenotrophic denitrification, as expressed in equation (12), the pH increases regardless of the initial pH. However, the pH could also increase during mineral carbon assimilation. When hydrogenotrophic bacteria assimilate CO₂ and HCO₃⁻ for growth, the carbonate equilibrium is affected and the pH increases.

$$\text{pH} = 10,32 + \text{Log} \left(\frac{[\text{CO}_3^{2-}]_i + [\text{NO}_3^-]}{[\text{HCO}_3^-]_i - [\text{NO}_3^-]} \right) \quad (12)$$

In conclusion, in hydrogenotrophic cultures, the pH would increase during the denitrification and during the mineral carbon assimilation. Consequently, hydrogenotrophic bacteria without any means of acidifying the pH are more sensitive to alkaline pH than heterotrophic bacteria, which are able to acidify pH above 10.

An overview of the nitrate reduction rate observed in the literature on heterotrophic cultures is presented in Table 8. Concentrations from 10 to 1000 mM and pH from 5.5 to 12 are explored. The maximal nitrate reduction rate was comprised between 10 to 1000 mM/d orders of magnitude. Therefore, higher pH and larger nitrate concentration ranges were explored in heterotrophy than in hydrogenotrophy (see Table 5). The nitrate reduction rates, up to 5000 mM/d, were also higher in heterotrophy.

Table 8. Overview of nitrate reduction rates in heterotrophic cultures according to the pH and the nitrate concentrations

Inoculum	Experimental set-up	pH	Nitrate mM	Nitrate maximal reduction rate	Ref.
<i>P. denitrificans</i>	Batch reactor, anaerobic	ND	17	36 mM/d	[132]
<i>P. denitrificans</i>	Batch reactor, anaerobic transition	5.5 – 9.5	25	60 mM/d	[73]

<i>P. denitrificans</i>	Batch reactor, anaerobic, high cell density	6.4 – 9.2	25	4887 mM/d	[74]
<i>P. denitrificans</i>	Continuous reactor anaerobic transition	6.8 – 7.5	25	6 mM/d	[27]
Activated sludge	Sequencing batch reactors, anaerobic	6.5 – 9	192	600 mM/d	[77]
Activated sludge	Batch reactor, anaerobic	10 – 12	15	2 mM/d	[33]
Activated sludge	Sequencing batch reactors, anaerobic	7.2	120 - 645	1710 mM/d	[87]
Activated sludge	Sequencing batch reactors, anaerobic	7.5 – 12	120	1177 mM/d	[37]
Activated sludge	Sequencing batch reactors, anaerobic	7.5 et 9	192 - 580	564 mM/d	[91]
<i>Bacillus halodenitrificans</i>	Batch reactor, anaerobic	7.5 – 9	1006	ND	[45]
Activated sludge	Sequencing batch reactors, anaerobic	8.5	42	137 mM/d	[42]
Activated sludge	Expanded granular sludge bed	6 - 8	142 - 1000	99.9 % removal efficiency	[92]

5.2. Bacterial adaptations to alkaline pH

Most bacterial processes are significantly slowed down in alkaline medium. However, some bacteria described as alkaliphilic grow optimally at pH above 9 [133]. Alkaliphilic bacteria, such as *Bacillus sp.*, are isolated from alkaline ecological niches [134] and have been extensively studied recently for industrial purposes [135,136]. Surprisingly, one of the main difficulties when experimenting on alkaline bacterial cultures is to create and maintain a high pH in the culture medium [53]. The use of buffers such as phosphate and carbonate can be an option based on their high pKa: pKa ($\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$) = 10.32 and pKa ($\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$) = 12.32.

Several protective mechanisms that allow them to maintain their metabolic activity at high pH can be illustrated by the example of the genus *Bacillus sp.* These mechanisms seek to keep the internal pH of the cells as low as possible and to adapt the internal enzymatic activity to high pH levels [137,138](Figure 12).

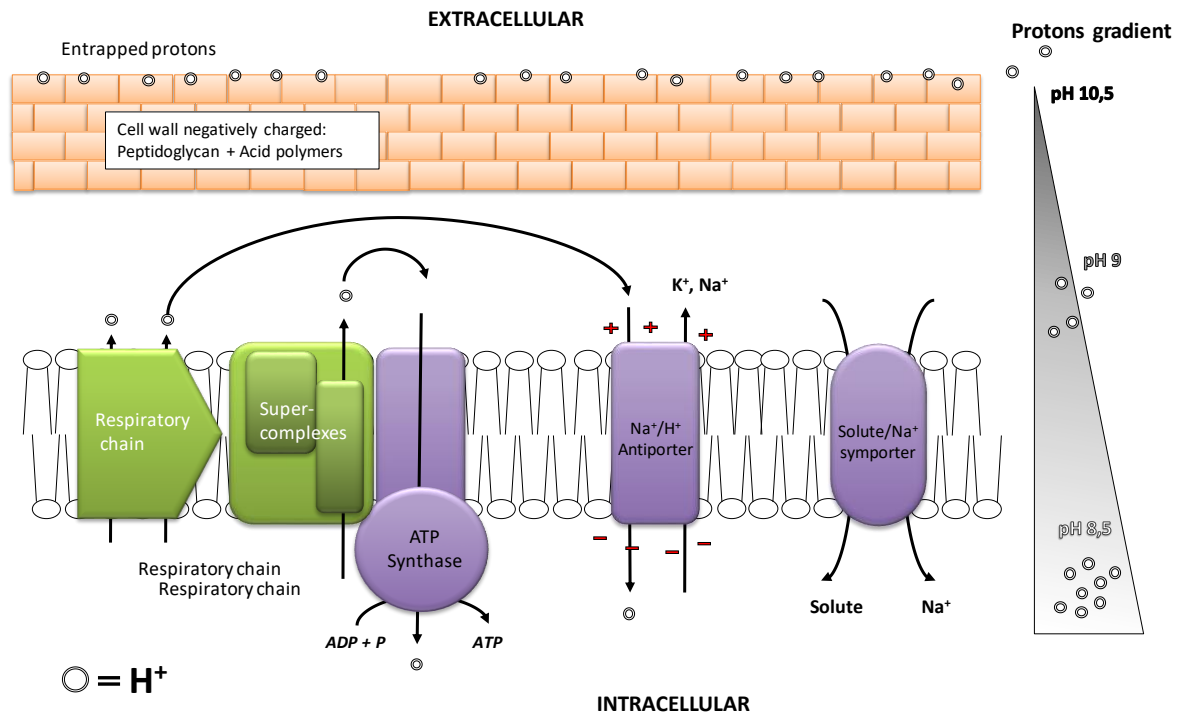


Figure 12. Protective mechanisms of *Bacillus sp.* cultivated at pH 10.5, adapted from [133,139].

In *Bacillus sp.* the first protective barrier in alkaliphilic bacteria, the bacterial wall, has additional acidic polymers and peptidoglycans, installing a selective permeability to Na⁺ and H⁺ while blocking OH⁻ anions [137,138]. Then, on the bacterial membrane, transporters ensure that the pH in the cytoplasm is maintained as low as possible by a constant flow of protons inwards. In alkaliphilic bacteria, there are several types of membrane transporters allowing protons to be absorbed: Na/H anti-transporters, K/H anti-transporters, and the Mrp (Na/H) anti-transporter [139]. The Mrp anti-transporter is a super enzymatic complex encoded by several genes [139]. It has a crucial role in the absorption of protons, and has been identified in several alkaliphilic bacterial strains [133,139]. These cellular mechanisms of protection would only generate a maximum difference of about 2 pH units between the cytoplasm and the culture medium [53,137]. As proof, with *B. pseudofirmus*, Sturr et al. [140] showed that the internal pH was maintained 8.3 when the external pH was 10.8. However, this bacterium was no longer able to regulate its intracellular pH for external pH above 11.4.

Therefore, bacteria also need to adapt to the alkalization of their internal pH to maintain their activity. A major challenge would be to adapt the respiratory chain, which at neutral pH generates a proton gradient used for ATP synthesis or molecule transports. However, at alkaline pH, the proton gradient is reversed. To maintain nutrient absorption, alkaliphilic bacteria use a gradient of Na⁺ ions. The sodium gradient created by membrane transporters replaces the proton gradient for the transport of nutrients (Figure 12). Thus, sodium is a key factor involved in the resistance to alkaline pH. Adaptations related to the functioning of ATP-synthase have also been reported to counter-balance the low concentration of protons in the periplasm [139]. In the respiratory chain, enzymes group together into super-complexes to facilitate proton transport to ATP-synthase and improve promiscuity with ATP-synthase. The cytoplasmic membrane is organized into micro-domains that allow the respiratory chain and ATP-synthase to be compartmentalized and fixed nearby. Finally, ATP-synthase, itself, is modified to improve its affinity for protons [139].

Amino acid substitutions were also observed on various enzymes not necessarily involved in respiration (phosphorylases, amylases, proteases, etc.), allowing them to operate efficiently at alkaline pH [141]. The optimal pH for proteins of alkaliphilic bacteria is therefore higher than those of

neutrophilic bacteria. Horikoshi [133] highlighted an extracellular protease with an optimal pH of 11.5. This enzyme was able to maintain its protease activity up to pH 13.0. Amino acids sequence analyses of a protease [142], an amylase [143] and a phosphoserine aminotransferase of *Bacillus sp.* showed a common trend in amino acid substitutions. Negatively charged amino acids tended to be replaced by neutral amino acids. Amino acids such as lysine were replaced by arginine, which has a higher pKa. At protein structural level, an increase in the number of hydrogen or hydrophobic bonds was observed [144].

These adaptation strategies have mostly been demonstrated from specific alkaliphilic bacterial species of the genus *Bacillus*. These bacteria are not necessarily denitrifying. However, there are alkaliphilic denitrifying bacteria, such as *Halomonas desiderata*, which have been isolated from a soda lake [145]. This species has shown an ability to grow and catalyse nitrate reduction in aqueous media from pH 10 to pH 12 [19,143,144]. It is likely that this type of denitrifying and alkaliphilic bacteria would use the same mechanisms as described for species of the genus *Bacillus*.

5.3. pH threshold values

It seems that there is a limit between pH 11.5 and pH 12 beyond which the physiology of bacterial cells is no longer possible. Many alkaliphilic bacteria already have their cellular activity significantly slowed down above pH 11 [19,134,145]. Several studies have compared biological reduction kinetics for pH values of 10, 11 and 12. A first study tested the reduction of Cr (IV) [83] with Lake Mono sediments (California, USA), a second tested the reduction of nitrate with Buxton sediments [33]. In both studies, no activity was observed at pH 12. In contrast, other works reported bacterial survival for pH 12 or even higher [19,136,146]. However, as stated by Sorokin, particular attention must be paid to the operating conditions and a critical eye kept on what is reported [53]: (i) the pH of the culture is sometimes not maintained during the experiment or even not indicated, (ii) the pH reported in the feed medium is likely to be different from the culture pH in contact with bacteria. For example, alkaliphilic bacteria isolated from an alkaline lake were cultivated at a pH adjusted to very high values (up to 13.2) [138]. But this pH decreased over time and bacterial growth was only observed when the pH had decreased below 12.0. In another experiment, the authors correctly indicated a difference of 2 pH units between the pH in the feeding medium and the pH in the culture [37].

6. Perspectives, denitrification at alkaline pH, with high nitrate concentration and with hydrogen as electron source.

The impact of the association of high nitrate concentrations and alkaline pH on denitrification has not been well studied, especially with hydrogen as an energy source for denitrifying bacteria. Yet there is a strong interest in industrial perspectives, for nuclear waste repository management for instance. The Figure 13 sums up the different nitrate concentrations and pH investigated in the literature. It brings to light an important lack of knowledge concerning denitrifying cultures at high pH and high nitrate concentrations. In particular, there are no studies that have tested a pH above 9 and a nitrate concentration above 120 mM. Therefore, future exploratory experiments conducted at high pH and high nitrate concentration should bring appreciable knowledge.

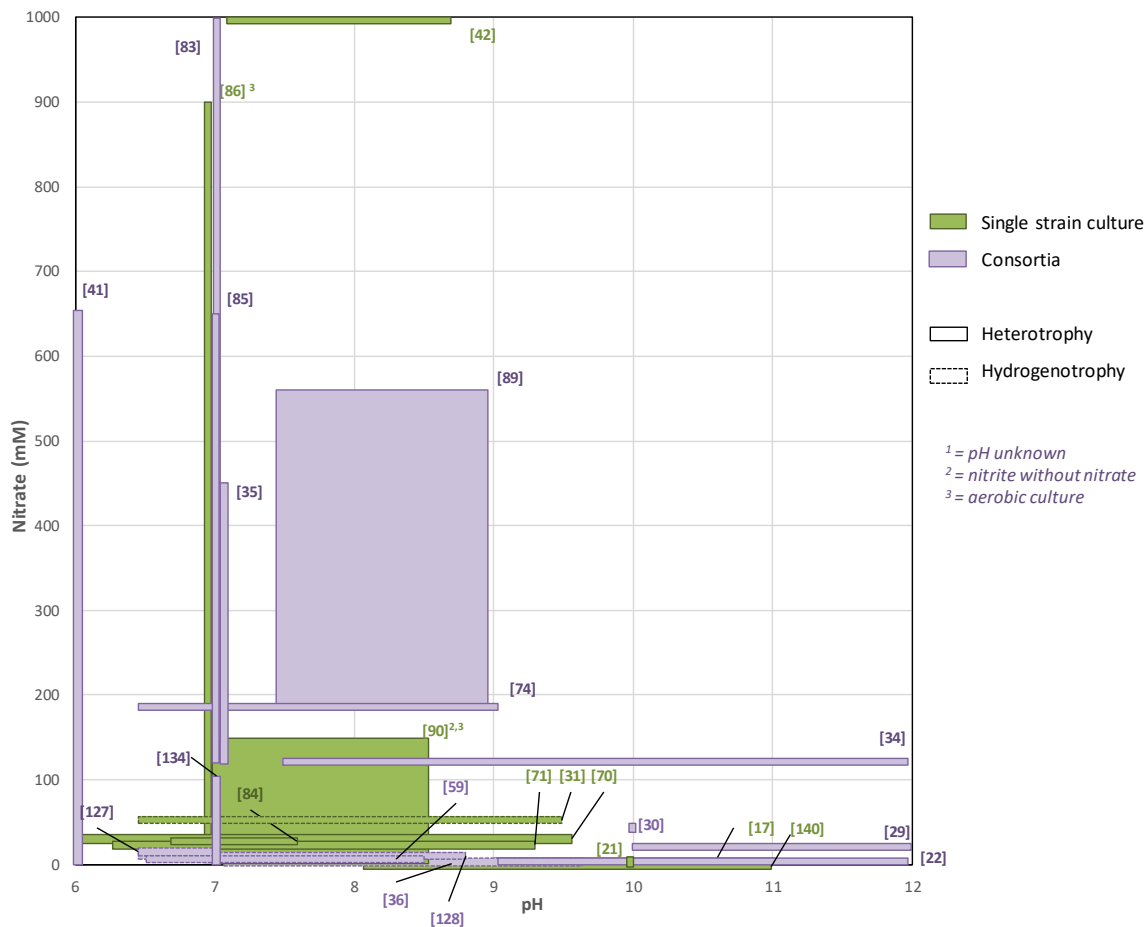


Figure 13. General literature overview of the experiments of bacterial denitrification conducted at alkaline pH and/or at high nitrate concentrations.

Despite the lack of experiments at high pH and high nitrate concentrations. Speculations can be made about the behaviour of bacteria in this type of environment, based on the paragraphs above. Concentrations of the order of 100 mM and pH values above 9.5 are likely to cause nitrite accumulations (up to 100% of the initial nitrate concentration according to Figure 10). Particular attention should be paid to monitoring nitrite as it is likely to inhibit bacterial activity at low concentrations (tens of mM). Moreover, while testing high nitrate concentrations, attention must be paid to the counter ion added with the nitrate as it could affect both pH and nitrate resistance. When testing alkaline pH, the pH must be buffered and must be closely monitored as denitrifying activity modifies the pH. Carbonates could be used as a buffer at an alkaline pH, especially since they provide a mineral carbon source for bacteria in hydrogenotrophy. It seems unlikely that hydrogenotrophic denitrifying bacteria would be active at pH > 11, as the alkalization concomitant with their activity would quickly raise the pH to the threshold pH of around 11.5 to 12.

7. Conclusions

Exploring microbial denitrification in environments associated with alkaline pH, high nitrate concentration and hydrogen as electron sources seems possible at pH up to 11.5 to 12 and nitrate concentrations up to hundreds of mM. However, there is a lack of research associating these conditions and the potential negative effects of the three have generally been studied separately.

The maximal nitrate concentrations tested in the literature are generally about a few hundred mM of nitrate. At these concentrations, nitrite accumulation can reach 100% of the initial nitrate concentration. Nitrite is generally described as cytotoxic for bacterial cells at low concentrations (tens mM). Some authors have succeeded in cultivating bacterial strains in culture media containing 1 M of nitrate. The counter ion added with nitrate, and more generally the salinity of the solution, is a major factor affecting the survival of bacteria. Some bacteria are tolerant to high salinities while others are inhibited by high concentrations of sodium. In addition, in a consortium, the composition of the bacterial population is decisive in the nitrite/nitrate balance and in the consortium resistance to high concentrations of nitrate.

In hydrogenotrophic cultures, denitrification and cell growth kinetics are generally slower than in heterotrophic cultures. The key reason is the availability of hydrogen, which is poorly soluble in aqueous media. The obligation for hydrogenotrophic bacteria to assimilate mineral carbon for growth is also a limiting factor. In addition, hydrogenotrophic denitrification appears to be more sensitive to high pH and more likely to cause nitrite accumulation than heterotrophic denitrification.

The pH is a determining factor for the survival of bacteria, the maximum limit values, below which microbial activity is possible, being between pH 11.5 and 12. The reduction of nitrite to nitric oxide generates high alkalinity and, as a result, nitrite is likely to accumulate at alkaline pH. For most bacteria, denitrification is therefore incomplete for $\text{pH} > 9.5$, nitrite accumulation is observed and reduction kinetics are slowed down. The denitrification process has an opposite impact on the pH if the electron donor is organic or hydrogen. Heterotrophic bacteria are able to acidify the medium when the initial pH is high, while hydrogenotrophic bacteria only alkalinize the medium. This crucial difference explains why hydrogenotrophic bacteria are more sensitive to alkaline pH.

I.3. Dénitrification bactérienne en présence d'acier et de ciment solides

De l'acier et des matrices cimentaires seront présents dans la structure en béton armée des alvéoles de stockage. De plus, les déchets MAVL seront conditionnés dans un colis en acier et dans un sur-conteneur en béton armé. En présence de bactéries, l'acier et la matrice cimentaire solides peuvent favoriser la colonisation de biofilms bactériens sur leurs surfaces. L'organisation des bactéries en biofilm leur offre de nombreux avantages, en particulier la résistance à des stress environnementaux [15,147]. Par ailleurs, l'acier et le ciment peuvent influencer l'équilibre chimique du milieu réactionnel des bactéries. En outre, le ciment a tendance à élever le pH par le relâchement d' OH^- en solution. Le ciment peut aussi relâcher des ions potentiellement utilisés par les bactéries en particulier le Na, K et le Ca. L'acier quant à lui peut être impliqué dans de nombreuses réactions d'oxydoréductions générant des produits de corrosion tels que le dihydrogène et des oxydes de fer modifiant aussi le pH.

I.3.1. Croissance de biofilm sur les surfaces solides

Les bactéries sont capables de coloniser sans problème l'acier [15,148], ou les matrices cimentaires [149,150]. Ces matériaux utilisés en industrie sont parfois colonisés par une densité de population tellement élevée qu'on parle d'encrassement (biofouling en anglais) [15,147,148]. Un biofilm microbien est une communauté pluricellulaire complexe adhérant à une surface, et sécrétant une matrice protectrice. Le biofilm génère un microenvironnement protecteur qui permet aux cellules de survivre dans des environnements hostiles puis de se disperser pour coloniser de nouveaux habitats [147]. Dans les biofilms, des multitudes d'espèces microbiennes peuvent coexister en exprimant des métabolismes microbiens qui peuvent être assez différents [151]. La structure du biofilm, bien souvent complexe et hétérogène, est constituée de micro-colonies de microorganismes et d'une matrice de polymères sécrétés par les microorganismes [147]. Cette matrice est classiquement composée de substances polymériques extracellulaires, c'est-à-dire de protéines et de polysaccharides et en quantité moindre d'ADN, lipides, et autres macromolécules organiques.

Si les biofilms microbiens sont observés dans une grande variété d'environnements, c'est qu'ils offrent plusieurs avantages. Les surfaces sur lesquelles adhèrent les biofilms apportent une stabilité dans des environnements turbulents. Elles peuvent aussi accélérer les réactions microbiennes. De plus, la structuration en biofilm offre aux bactéries une protection contre un large éventail de stress environnementaux : toxicité des métaux, pH, salinité, températures extrêmes, antibiotiques [147,152]. De plus, dans le biofilm, des zones de dormance où l'activité bactérienne est très ralentie ont parfois été identifiées, les bactéries en état de dormance sont inactives mais peuvent survivre à des environnements extrêmes en attendant des conditions plus favorables [147]. Enfin la résistance globale du biofilm à un stress particulier peut être augmentée en accueillant en son sein des bactéries spécialisées dans la résistance à ce stress. Ces bactéries sont appelées persistantes [147]. En définitive en s'organisant en biofilm, les bactéries sont capables de résister à des conditions qualifiées d'extrêmes. Elles sont par exemple capables de survivre dans des piscines de stockage de combustibles nucléaires avec peu de matière organique [15].

I.3.2. Effet de l'insertion d'acier solide dans un milieu aqueux

L'acier utilisé dans le cadre de cette thèse est un acier d'armature de béton armé. En France, les aciers d'armature sont nommés B 500, composés essentiellement de Fe, avec 0,22 % de C, 0,05 % de P, 0,05

% de S, 0,01 % de N et 0,50 % d'un mélange de Mn, Cr, Mo, V, Ni, Cu. Le fer est un potentiel donneur sous les formes Fe^0 et Fe^{2+} et accepteur d'électrons sous les formes Fe^{2+} et Fe^{3+} . Il peut donc être impliqué dans diverses réactions d'oxydoréduction qui peuvent conduire à la modification de sa structure et la solubilisation de Fe^{2+} ou Fe^{3+} . Ce processus est appelé corrosion.

I.3.2.1. Corrosion de l'acier, et les produits de corrosion

En milieu anaérobie, les oxydants de l'acier sont les nitrates, l'eau, les protons ou le Fe^{3+} . Plusieurs exemples de demi-équations d'oxydoréductions impliquées dans la corrosion de l'acier sont présentés dans le Tableau 9.

Tableau 9 : Exemples de demi-équations d'oxydation et de réduction impliquées dans la corrosion de l'acier.

Demi-équations d'oxydation		Demi-équations de réduction	
$Fe^0 \rightarrow Fe^{2+} + 2 e^-$	[151]	$NO_3^- + 10 H^+ + 8 e^- \rightarrow NH_4^+ + 3 H_2O$	[153]
$Fe^0 \rightarrow Fe^{3+} + 3 e^-$	[151]	$NO_3^- + 6 H^+ + 5 e^- \rightarrow \frac{1}{2} N_2 + 3 H_2O$	[153]
$2 Fe^0 + 3 H_2O \rightarrow Fe_2O_3 + 6 e^- + 6 H^+$	[154]	$2 H_2O + 2 e^- \rightarrow 2 OH^- + H_2$	[154]
$3 Fe^0 + 4 H_2O \rightarrow Fe_3O_4 + 8 e^- + 8 H^+$	[154]	$Fe^{3+} + e^- \rightarrow Fe^{2+}$	[151]

Dans le processus de corrosion, généralement, il y a une perte de masse de Fe^0 oxydé en Fe^{2+} et en Fe^{3+} solubles ou en divers produits de corrosion. Dans un milieu carbonaté anaérobie, les produits de corrosion les plus fréquemment rencontrés sont :

- Les oxydes de fer, avec la magnétite Fe_3O_4 , la maghémite $\gamma-Fe_2O_3$ et l'hématite $\alpha-Fe_2O_3$, etc. [154,155].
- Les oxyhydroxydes de fer avec la goethite $\alpha-FeOOH$, la lépidocrocite $\gamma-FeOOH$ et la ferrihydrite $Fe_5O_8 \cdot 4(H_2O)$, etc. [155].
- Les rouilles vertes de formule générale $Fe^{II}_4Fe^{III}_2(OH)_{12}X_n \cdot n H_2O$ [154,155].
- Les produits de corrosion carbonatés tels que la sidérite $FeCO_3$ et la chukanovite $Fe_2(OH)_2CO_3$ [154,155].

La formation d'un produit de corrosion dépend de plusieurs paramètres, en particulier du pH et du potentiel d'oxydoréduction du milieu. Le diagramme Pourbaix du fer (Figure 14) présente les formes thermodynamiquement stables du fer en fonction du pH et du potentiel d'oxydoréduction de la solution. Tous les oxydes et hydroxydes de fer ne sont pas représentés. Des oxydes mixtes composés à la fois de Fe^{2+} et Fe^{3+} , comme la magnétite, ont un domaine de stabilité situé entre les oxydes de Fe^{2+} et les oxydes de Fe^{3+} . D'après la Figure 14, les formes solubles Fe^{2+} et Fe^{3+} ne sont pas stables à pH alcalin.

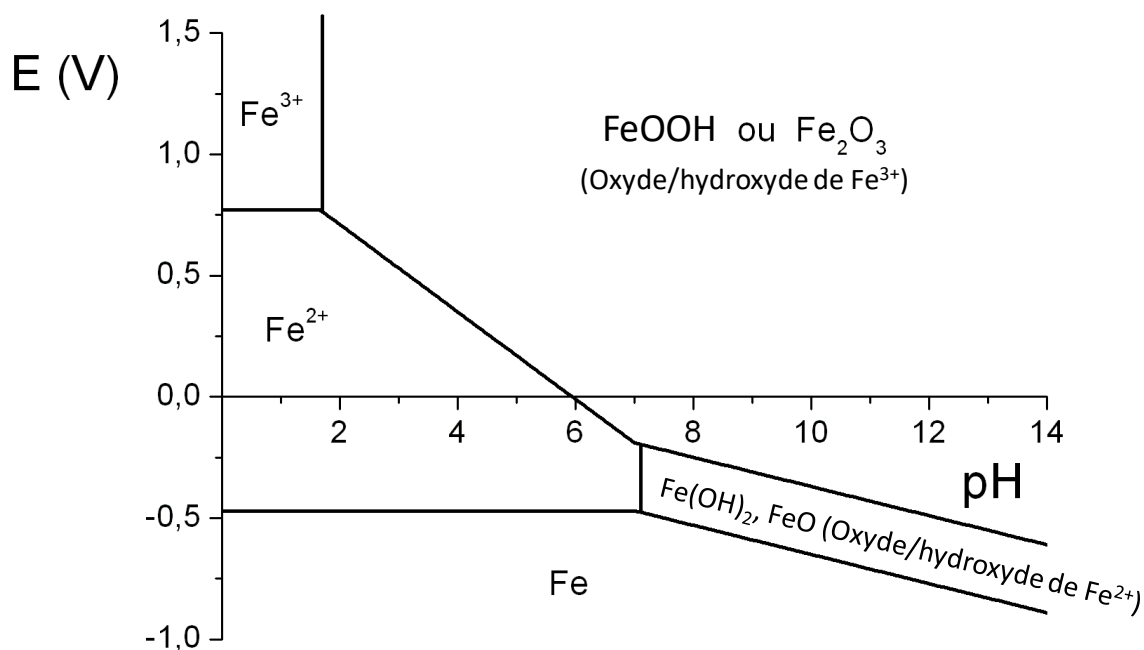


Figure 14 : Diagramme de Pourbaix du fer, domaine de stabilité du Fe⁰, Fe²⁺, Fe³⁺ et de certains oxyhydroxydes de fer en fonction du potentiel d'oxydoréduction et du pH de la solution.

La corrosion de l'acier modifie sa structure de manière généralisée ou localisée. La corrosion généralisée se manifeste à vitesse égale en tous points du métal entraînant une diminution régulière de son épaisseur. La corrosion localisée en revanche se manifeste par des altérations localisées causées par : des défauts dans la couche protectrice (corrosion par piqures), des accumulations d'agents agressifs dans des solutions stagnantes (corrosion cavernuse), et des contraintes physiques (corrosion sous contrainte) [154]. Pour ralentir ces processus de corrosion en industrie, une couche protectrice d'oxydes de fer est mise en place pour stabiliser l'acier. Les produits de corrosion pourraient avoir plusieurs effets dans la solution. Les oxydes et hydroxydes de fer libérés pendant la corrosion notamment la magnétite, la lépidocrocite, la goethite pourraient avoir un effet catalyseur sur les réactions d'oxydoréduction comme la réduction des nitrates par l'acétate [156,157]. Le Fe²⁺ et le Fe³⁺ solubles pourraient servir de nutriments pour les bactéries [158].

1.3.2.2. Interactions entre l'acier et les bactéries

Certaines bactéries sont capables d'utiliser le fer comme donneur d'électrons, d'autres utilisent le fer comme accepteur d'électrons. Les bactéries ferro-oxydantes oxydent le Fe²⁺ en Fe³⁺ [151,154]. Certaines couplent cette oxydation à la réduction des nitrates. Divers minéraux sont formés, la magnétite, la ferrihydrite ou la lépidocrocite [154]. A l'inverse, les bactéries ferri-réductrices sont capables de réduire le Fe³⁺ en Fe²⁺ [154,155]. Elles utilisent par exemple le dihydrogène ou la matière organique comme donneurs d'électrons. Elles accélèrent particulièrement la corrosion du fer en dissolvant la couche protectrice d'oxydes de fer [159].

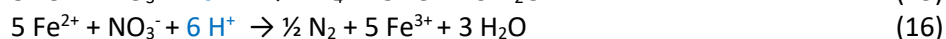
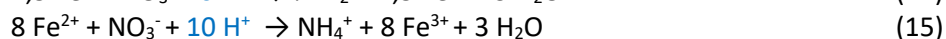
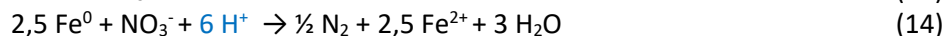
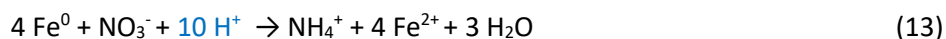
Les bactéries doivent aussi assimiler le fer comme nutriment. En effet, le fer est essentiel dans de nombreux processus bactériens tels que la synthèse d'ADN, ou d'ARN, le transport d'électrons et la

respiration des nitrates [160,161]. Au niveau de la chaîne respiratoire des bactéries dénitrifiantes, le fer est présent dans certains transporteurs d'électrons (complexe bc1, NADH déshydrogénase [65]), et dans certains types de réductases comme les nitrates, nitrites et nitrique oxyde réductases. Les hydrogénases incluent aussi des noyaux avec du fer [96,97,162]. En conséquence, le fer est généralement ajouté comme nutriment dans les milieux bactériens synthétiques. Les bactéries sont capables d'assimiler les formes solubles du fer, les ions Fe^{3+} et Fe^{2+} . Le Fe^{2+} est assimilé sans trop de difficulté car il est relativement soluble à pH neutre. Cependant dans les milieux oxydants le fer est oxydé en Fe^{3+} qui a une solubilité très faible à pH neutre ou alcalin [160], Figure 14. Il y a un grand écart entre la solubilité faible du Fe^{3+} (10^{-14} mM à pH 7) et les concentrations en fer nécessaires à une croissance bactérienne optimale, estimées entre 10^{-4} à 10^{-2} mM de Fe [161]. Les bactéries ont donc développé des stratégies spécifiques pour assimiler le fer. Il s'agit notamment (i) de l'utilisation de systèmes de réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} (plus soluble) à la surface des cellules [161], (ii) de l'utilisation de chélateurs du fer, appelés sidérophores, qui ont une grande affinité pour le Fe^{3+} [160,161,163], (iii) de l'acidification à proximité des surfaces des cellules pour solubiliser le Fe^{3+} ou le Fe^{2+} [160,161].

D'un autre côté, l'activité des microorganismes peut altérer la structure de l'acier et accélérer la corrosion de l'acier on parle de biocorrosion [148,151,164]. Les microorganismes peuvent initier ou accélérer la biocorrosion par différents mécanismes [151] : les réactions d'oxydoréduction avec le fer, la production de métabolites acides, oxydantes ou réductrices, la dégradation de la couche de protection du fer, l'accélération de la corrosion localisée sur les zones fragiles, etc. Inversement, l'activité microbienne peut parfois conduire au ralentissement de la corrosion, en consommant par exemple les espèces oxydantes à proximité de l'acier [165], ou par la production d'une couche protectrice. Volkland et coll. ont observé l'inhibition de la corrosion par la production microbienne d'une couche composée de phosphate et de fer très stable, la vivianite ($\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$) [165].

1.3.3. Réductions des nitrates et des nitrites en présence d'acier

En milieu anaérobie, le Fe^0 et le Fe^{2+} peuvent réduire les nitrates en produisant du diazote ou de l'ammonium [18,166,167]. Les réactions (13) et (14), correspondent à la réduction des nitrates par le Fe^0 produisant respectivement de l'ammonium et du diazote. Les réactions (15) et (16) illustrent la réductions des nitrates par le Fe^{2+} [168–170]. Le pH s'élève lors de l'oxydation du Fe^0 ou du Fe^{2+} par les nitrates. Lorsque le pH est neutre voir alcalin, le Fe^{2+} et le Fe^{3+} précipitent sous formes d'oxydes de fer, plus stables.



En condition abiotique, la réduction des nitrates par le fer est dépendante du pH, elle est favorable à pH acide voire neutre [18,166,167,171]. Dans une étude, la réduction de 0,8 mM de nitrates par le Fe^0 a été complète à pH 2 ou 3 (pH final 4,5). En revanche à pH 4, seulement 0,1 mM des nitrates ont été réduits (pH final 6,5) [166]. Lorsque l'acidité est insuffisante, des précipités d'oxyhydroxydes de fer se forment à la surface du fer réduisant la surface réactive du fer et inhibant la réduction des nitrates [166,167]. Hwang et coll. ont résolu ce problème en augmentant la surface réactive du fer en utilisant des nanoparticules de fer [172]. De cette manière 1,6 mM de nitrates ont été totalement réduits à pH

7,0, le pH final était 11,0. Tang et coll. ont réussi à réduire 0,7 mM sur 1 mM de nitrates à pH 8,4 en utilisant de la poudre de fer prétraité à l'HCl (pour éliminer les oxydes de fer), le pH final était environ 10,0 [173]. Par ailleurs, des températures élevées (150 °C) ont permis à Truche et coll. de réduire 1,8 mM de nitrates à pH 7 à partir d'une poudre d'acier, le pH final était 11,8 [168]. L'acier peut donc réduire de faibles concentrations de nitrates jusqu'à pH 8,4. Cependant, la surface réactive du fer doit être maximisée en utilisant des poudres ou des nanoparticules pour contrebalancer la formation d'une barrière protectrice d'oxyhydroxydes de fer. Ainsi des travaux précédents ont montré qu'à 30°C, à pH neutre ou alcalin la réduction abiotique des nitrates par le fer n'est pas possible à cause de la couche protectrice d'oxyhydroxydes de fer stable à pH alcalin [18,19].

Par ailleurs, les études observent généralement que l'ammonium est le produit de la réduction des nitrates [166,167,172,173]. Mais d'autres études ont montré que le diazote et l'ammonium pouvaient tous les deux se former [153,174,175]. La formation de l'un ou l'autre dépendait du pH [153,174]. En effet, les réductions par le Fe^0 des nitrates en ammonium ou en diazote illustrées dans les équations (13) et (14) ont un ΔE^0 respectif de 0,74 V et 0,48 V [153,174]. La réduction des nitrates en ammonium par le fer a une différence de potentiel standard plus élevée mais consomme plus de protons. La production d'ammonium serait donc favorable thermodynamiquement à pH acide [153]. En revanche plus le pH serait élevé plus la formation de diazote serait favorisée.

La réduction des nitrates par le fer a aussi été étudiée en présence de bactéries, généralement à des pH neutres [154,158,176,177]. Une étude a observé la réduction des nitrates couplée à l'oxydation du fer jusqu'à pH 10,5 [178]. De plus, l'acier n'est pas nécessairement ajouté sous forme de poudre ou de nanoparticules, mais sous forme de coupons [177], ou de feuilles d'acier [179]. En présence de bactéries, la réduction des nitrates par le fer semble donc être moins sensible au pH élevé. Cependant, en présence de bactéries le fer ne réduirait pas directement les nitrates [176]. Les bactéries semblent réduire les nitrates en nitrites uniquement en présence d'un autre donneur d'électrons. Ce sont les nitrites qui oxyderaient alors le Fe^{2+} [154]. Deux explications permettent de justifier cette hypothèse. D'après le Tableau 2, le potentiel standard du couple redox (NO_2^-/N_2) est supérieur à celui du couple (NO_3^-/N_2). D'un point de vue thermodynamique la réduction des nitrites par le fer est donc avantaagée [153]. Dans une étude menée en présence de Fe^0 et de nitrates ou de nitrites, le rendement maximal de réduction des nitrates ou des nitrites par le Fe^0 était respectivement de 68% et 83 % [153]. En revanche les nitrites sont considérés comme inhibiteurs parfois toxiques pour les bactéries [46,85]. Par conséquent, les nitrites ont souvent tendance à s'accumuler en présence de bactéries [72,73,75,180].

Par ailleurs, le fer pourrait affecter la réduction des nitrates en agissant comme catalyseur sans être impliqué comme donneur ou accepteur d'électrons. Ainsi des études ont montré que plusieurs précipités de fer dont la magnétite, la lépidocrocite, l'hématite ou encore la goethite pouvaient catalyser la réduction des nitrates ou des nitrites par le Fe^0 ou le Fe^{2+} [156–158,175,181,182]. En effet deux études ont montré que la magnétite catalyserait la réduction des nitrates par le Fe^0 [156,181]. Par exemple dans une solution avec 7 mM de nitrates à pH 6,7, 35 % des nitrates ont été réduits en présence de Fe^0 seul, et 100 % des nitrates ont été réduits en présence de Fe^0 et de magnétite [156]. D'autres études ont montré que les différents oxydes de fer FeOOH comme la goethite ou la lépidocrocite ont stimulé la réduction des nitrites ou des nitrates par le Fe^{2+} [157,158,183]. Sørensen et Thorling ont comparé la réduction de 200 μM de nitrites en présence de Fe^{2+} avec ou sans lépidocrocite à pH 8. Avec la lépidocrocite, une réduction de 50 μM a été observée, sans lépidocrocite la réduction des nitrites était négligeable [157]. Van Cleemput et coll. ont montré que l'hématite pouvait aussi catalyser la réduction des nitrites par le Fe^{2+} [182]. Enfin, dans d'autres travaux, de l'acier a été inséré dans des milieux en présence de nitrates et de dihydrogène. L'acier a eu un effet stimulant sur la réduction des nitrates par le dihydrogène [18,184].

I.3.4. Influence de l'insertion de ciment en milieu aqueux

Le ciment est un liant, sous forme de matériau granulaire pulvérulent, qui fait prise et durcit sous l'action de l'eau. Il est utilisé dans la préparation du béton qui est lui-même un matériau composite, associant ciment et granulats (sables, graviers, etc.). Le béton armé est constitué de béton et d'armatures en acier permettant d'améliorer les propriétés mécaniques du béton. Les ciments ordinaires sont actuellement classés sous la dénomination « CEM » suivi d'un chiffre romain allant de I à V en fonction de leur composition. L'Andra préconise l'utilisation de bétons à base de CEM I (ciment Portland ordinaire) et CEM V (ciments aux laitiers et aux cendres) pour la fabrication des colis secondaires des déchets MAVL [17]. Le ciment Portland ordinaire (CEM I) est constitué d'environ de 95 % d'un mélange d'argile et de calcaire cuit à haute température et de 5% de sulfate de calcium. La composition du CEM V intègre en plus les laitiers et les cendres volantes qui sont respectivement des résidus de l'industrie sidérurgique (hauts fourneaux) ou de la production d'électricité (centrales thermiques). Lors de l'hydratation du ciment, les hydrates majoritairement formés sont les silicates de calcium hydratés notés C-S-H $((CaO)_x(SiO_2)_y(H_2O)_z)$, la portlandite $(Ca(OH)_2)$ et les aluminates de calcium $((CaO)_3(Al_2O_3))$. La matrice cimentaire est donc caractérisée par sa forte basicité ($pH > 13$) liée à sa teneur en ions OH^- . En présence de laitiers et de cendres, la portlandite est consommée pour former des C-S-H. Comme les C-S-H sont chimiquement plus stables que la portlandite, ceux-ci confèrent au béton CEM V une résistance accrue aux agressions chimiques. Les bétons de CEM V sont par exemple réputés plus stables vis-à-vis de la lixiviation que les bétons de CEM I [17]. C'est le ciment CEM V qui a été étudié dans les travaux de cette thèse.

Dans le contexte de stockage des déchets radioactifs, certaines espèces chimiques pourraient dégrader le béton CEM V. Par exemple le ciment CEM V est altéré par les acides organiques (acétate, oxalates, ...), le CO_2 ou le NH_4^+ [149,185,186]. L'acétate à pH acide peut dissoudre les hydrates du ciment par des réactions acido-basiques. Le NH_4^+ favoriserait la dissolution des hydrates de ciment. Le CO_2 provoque la carbonatation de la matrice cimentaire. Il en résulterait une diminution de la porosité de surface qui a tendance à limiter l'altération de la matrice cimentaire, et une acidification du ciment ce qui augmente son altération [149]. Dans une étude, des pâtes de ciment CEM V ont été exposées à des solutions aqueuses composées entre autre d'acide acétique et de nitrates pour un ratio de 50 cm^2/L [24]. L'évolution du milieu liquide après exposition des pâtes de ciment à un renouvellement quotidien de la solution est présentée dans la Figure 15.

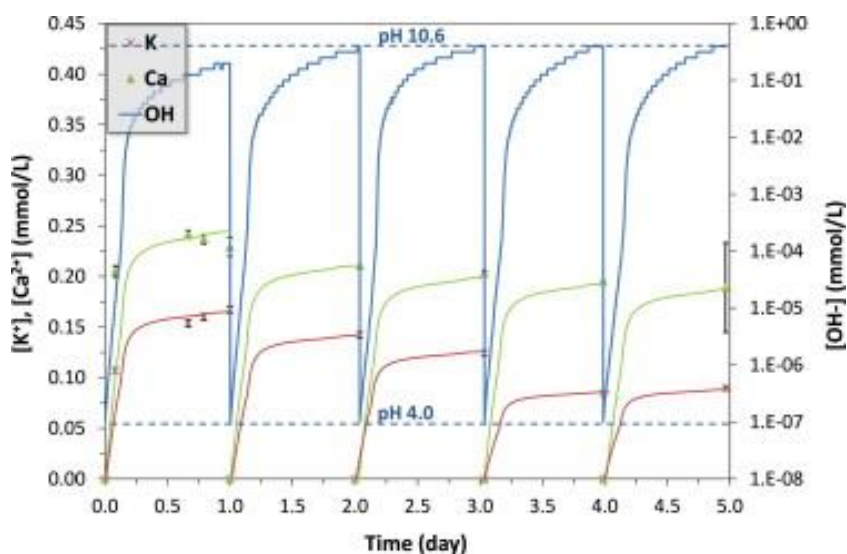


Figure 15 : Concentrations de OH^- (calculé d'après le pH), K^+ et Ca^{2+} et dans un essai de lixiviation avec 0,5 mM d'acétate et 32,3 mM de nitrates [24].

A chaque renouvellement de solution, le pH initialement à 4,0 est monté jusqu'à 10,6 en moins d'un jour. Le ciment a provoqué une alcalinisation du milieu très rapide par des relâchements de OH^- contenus dans la matrice cimentaire. Par ailleurs cette étude a montré que l'acétate et les nitrates étaient stables dans le milieu liquide en présence de ciment. La présence de ciment solide devrait donc conduire : (i) à la lixiviation de cations de la matrice cimentaire majoritairement Na, K, Ca, (ii) l'élévation du pH des solutions à des valeurs très alcalines ($> \text{pH } 11$), (iii) la formation de calcite favorisée par la concentration élevée de CO_3^{2-} .

I.4. Conclusions de la synthèse bibliographique et perspectives de recherche

Le pH est un facteur prépondérant impactant fortement l'activité bactérienne. Pour la majorité des bactéries, l'activité bactérienne est ralentie à $\text{pH} > 9,5$, des accumulations de nitrites sont alors observées. Les valeurs limites de pH sont comprises entre $\text{pH } 11,5$ et 12 , au-dessus de ces valeurs maximales, l'activité bactérienne n'a pas été observée. Par ailleurs, la maîtrise des milieux (stabilisation, précipitations...) à des pH très alcalins est problématique. Les carbonates peuvent être utilisés comme tampon dans la culture, stabilisant efficacement le pH pour des valeurs autour du pKa du couple ($\text{HCO}_3^- / \text{CO}_3^{2-}$) à $10,3$. De plus, les carbonates sont indispensables pour les bactéries hydrogénotrophes qui en ont besoin comme source de carbone minéral.

Les concentrations maximales en nitrates qui ont été testées dans les études sont de l'ordre de quelques centaines de mM. Cependant, des auteurs ont réussi à cultiver une espèce bactérienne dans un milieu de culture contenant 1 M de nitrates. Dans des cultures avec des concentrations élevées en nitrates, des accumulations de nitrites importantes sont généralement observées. L'évolution des nitrites est donc un paramètre à prendre en compte lorsque des concentrations élevées en nitrate sont ajoutées dans des cultures bactériennes. Les nitrites peuvent provoquer des ralentissements de l'activité bactérienne, ils pourraient même causer des morts cellulaires. Dans un consortium, l'équilibre des communautés bactériennes entre bactéries « *nitrate respiring* » ou « *true denitrifier* » est déterminante dans l'équilibre nitrites/nitrates et dans la résistance du consortium aux nitrates. Par ailleurs, le contre-ion utilisé avec les nitrates, et plus généralement la salinité de la solution, ont aussi un effet important sur l'activité bactérienne [9].

Dans les cultures hydrogénotrophes (sans matière organique), les cinétiques de dénitrification et de croissance cellulaire sont généralement plus lentes que dans les cultures en présence de matière organique. Un des facteurs limitants est la disponibilité du dihydrogène, liée à sa faible solubilité en milieu aqueux. La nécessité d'assimiler du carbone inorganique (en absence de carbone organique) est aussi un facteur limitant. Par ailleurs, la dénitrification hydrogénotrophe semble plus encline à causer des accumulations de nitrites et à alcaliniser le milieu de culture que la dénitrification hétérotrophe.

L'ajout de d'acier et de matrice cimentaire solide pourrait faciliter la formation de biofilm sur les surfaces. L'organisation des bactéries en biofilm permettrait aux bactéries de tolérer plus facilement des conditions environnementales stressantes. L'acier pourrait faciliter la réduction des nitrates et des nitrites par divers mécanismes. Il pourrait être utilisé dans différentes réactions d'oxydoréduction avec les nitrates. Il pourrait aussi être impliqué en tant que catalyseur pour les réactions de dénitrification ou en tant que nutriments pour les bactéries. Le ciment en revanche pourrait ralentir l'activité bactérienne en causant l'alcalinisation du milieu par lixiviation de OH^- . Tous les facteurs recensés stimulant ou ralentissant la réduction bactérienne des nitrates sont synthétisés dans la Figure 16.

Etude bibliographique

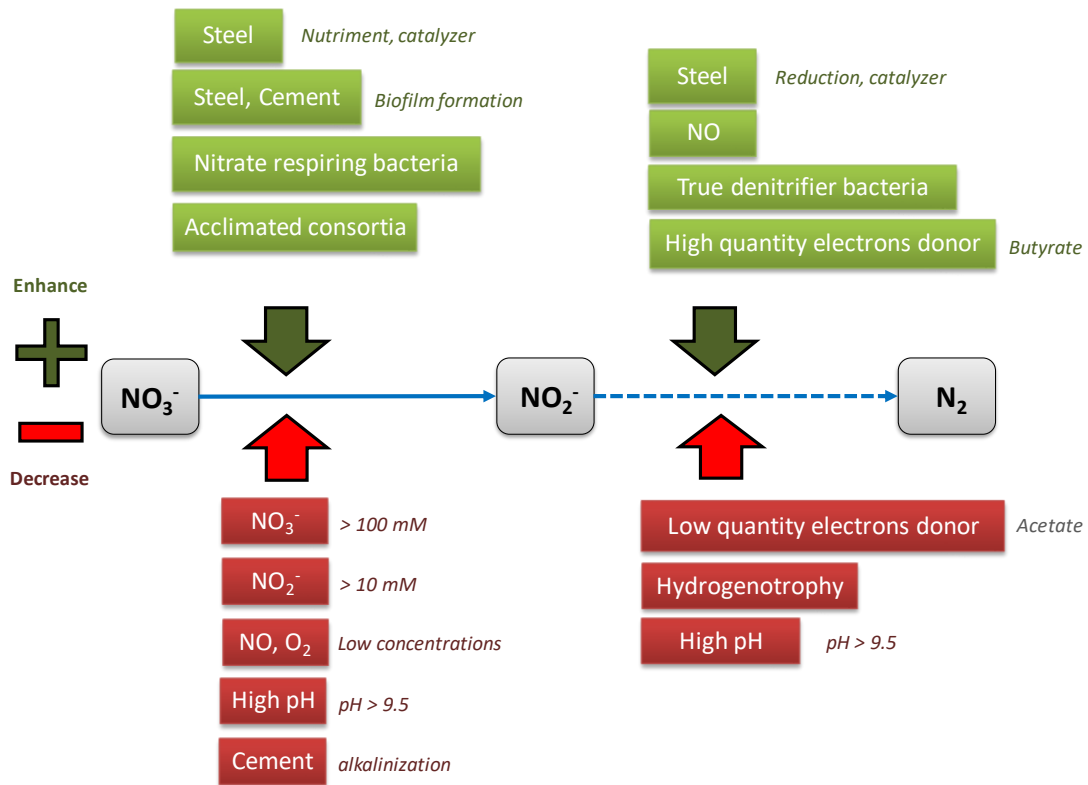


Figure 16 : Synthèse des facteurs environnementaux stimulant ou ralentissant la réduction bactérienne des nitrates et des nitrites.

Malgré une recherche bibliographique orientée sur les pH et les concentrations en nitrates élevées, il n'a pas été trouvé d'étude s'intéressant à la combinaison des pH supérieures à 9 et des concentrations en nitrates supérieures à 120 mM, Figure 13. Ce champ d'investigation est ouvert, et nécessite de multiples expérimentations afin de combler ce manque de connaissance.

Chapitre II :

MATERIELS ET METHODES

Table des matières :

II.1.	Inocula, et milieux de culture	53
II.1.1.	Inocula : <i>P. denitrificans</i>	53
II.1.2.	Inocula : boues activées	53
II.1.3.	Milieu de culture de <i>P. denitrificans</i>	53
II.1.4.	Lixiviat de ciment.....	54
II.1.5.	Régulation du pH.....	56
II.1.6.	Régulation de la température	56
II.2.	Bioréacteurs et montage expérimental	57
II.2.1.	Bioréacteurs batch	57
II.2.2.	Bioréacteurs continus.....	59
II.2.1.	Sources de H ₂ et de N ₂	62
II.2.2.	Acier et ciment solide, disposition dans les réacteurs	62
II.2.2.1.	Ciment solide.....	62
II.2.2.2.	Acier solide	62
II.2.3.	Liste des expériences.....	64
II.3.	Méthodes analytiques.....	64
II.3.1.	Analyses de la biomasse	64
II.3.1.1.	Densité optique (DO).....	64
II.3.1.2.	Caractérisation de la population bactérienne par pyroséquençage.....	65
II.3.2.	Analyse du pH, des carbonates	65
II.3.2.1.	Mesure de pH et de potentiel redox	65
II.3.2.2.	Dosage des carbonates.....	66
II.3.3.	Dosage des ions nitrate et nitrite	66
II.3.3.1.	Analyses extemporanées par kits.....	66
II.3.3.2.	Dosage des ions nitrate, nitrite et acétate par HPIC	66
II.3.3.3.	Comparaisons des analyses en kits ou HPIC.....	67
II.3.1.	Dosages de l'acétate, et de la DCO	68
II.3.1.1.	La mesure de la concentration en acétate par kit enzymatique.....	68
II.3.1.1.	La mesure d'acétate par HPIC	68
II.3.1.2.	Comparaison HPIC et analyse en Kit.....	68
II.3.2.	Dosages des éléments (Na, K, Ca, Fe, Si...)	69
II.3.2.1.	Analyses en ICP-OES	69
II.3.2.2.	Analyses en HPIC	69
II.3.3.	Analyse des matériaux solides	69
II.3.3.1.	Spectroscopie Raman	69

II.3.3.1. Microscopie Electronique à balayage couplée à des analyses EDS..... 70

Pour répondre à la problématique de « la réactivité des nitrates en présence de bactéries dans le contexte du stockage profond des déchets radioactifs » deux objectifs ont été définis. Le premier objectif est d'évaluer la capacité des bactéries à s'adapter aux conditions physico-chimiques à proximité des déchets, c'est à dire en absence d'oxygène, à pH alcalin compris entre 9 et 13, en présence de concentrations de 10 à 1000 mM en nitrates et de 0 à 10 mM en acétate, en présence de dihydrogène, et de pâte de ciment et acier solides. Le deuxième objectif est d'évaluer les cinétiques de réduction des nitrates dans les conditions précédemment décrites.

L'analyse bibliographique a permis de faire ressortir les points suivants :

- La dénitrification est optimale en anaérobiose.
- La maîtrise des milieux (stabilisation, précipitations...) à des pH très alcalins est problématique d'autant plus en présence de bactéries qui peuvent modifier le pH de leur milieu.
- Les carbonates peuvent servir de tampon pH et de source minérale de carbone pour les bactéries hydrogénotrophes.
- Les bactéries survivent difficilement à des pH entre 11,5 et 12, ou des concentrations en nitrates de l'ordre du 1 M.
- Aucune étude ne s'est intéressée à la combinaison des pH supérieurs à 9 et des concentrations en nitrates supérieures à 120 mM. Ce champ d'investigation est donc vierge.

L'un des enjeux de cette thèse, a donc été de trouver un protocole expérimental permettant de tester à la fois des pH élevés et des concentrations en nitrates élevées dans des cultures bactériennes. En effet, il est possible que les bactéries ne puissent pas survivre à cet environnement non favorable. La question est encore plus ouverte si l'on intègre la possibilité ou non d'utiliser le dihydrogène comme donneur d'électrons sans matière organique.

Pour réussir au mieux l'adaptation des bactéries dans ces environnements difficiles, des réacteurs batch, des réacteurs continus et des réacteurs discontinus séquentiels ont été comparés. Le pH a été strictement contrôlé notamment par l'ajout de tampon carbonate. Le ciel gazeux de tous les réacteurs a été saturé par 100 % de N₂(g) ou de H₂(g) à 1 bar pour maintenir les cultures en anaérobiose.

Plusieurs types d'analyses ont été nécessaires : (i) des analyses des communautés bactériennes (densité, population), (ii) des analyses chimiques pour caractériser le milieu de culture et l'évolution des nitrates, (iii) et des analyses des matériaux solides sur les pâtes de ciment et l'acier.

Ce chapitre présente donc :

- Les populations bactériennes utilisées comme inoculum (*P. denitrificans*, boues activées).
- Les milieux de culture, milieu spécifique à *P. denitrificans* ou lixiviat de ciment.
- Les modalités de régulation du pH.
- Les différents bioréacteurs utilisés et mode de culture (batch, continu, discontinu séquentiel).
- Les modalités d'ajout de pâte de ciment ou d'acier.
- Un résumé du plan d'expérience utilisé.
- Les différents types d'analyses (biomasse, pH, nitrate, nitrite, acétate, cations majoritaires, analyses des matériaux solides).

II.1. Inocula, et milieux de culture

II.1.1. Inocula : *P. denitrificans*

La souche de *P. denitrificans* provient de l'institut DSMZ (souche n°413). L'échantillon liquide contenant la souche a été mis en culture dans le milieu 81 préconisé par DSMZ. Les échantillons de culture étaient ensuite conservés à -80 °C dans du glycérol (25%) [18].

II.1.2. Inocula : boues activées

Dans l'objectif de se rapprocher des conditions réelles de stockage, un consortium microbien (ou communauté microbienne) a été utilisé. Le consortium provient de boues activées qui ont été collectées dans le bassin d'aération de la station d'épuration des eaux usées de Castanet-Tolosan. Les boues activées sont caractérisées, en moyenne par une concentration en nitrates de 0,7 mM, un pH de 7,6 et des MVS de 6,45 g/L (MVS = masse volatile en suspension, représente la fraction organique de la masse sèche de l'échantillon). Les échantillons liquides ont été centrifugés (4610 g, 10 min, 25°C), le culot était ensuite pesé et ajouté dans les cultures.

II.1.3. Milieu de culture de *P. denitrificans*

Le milieu de culture minéral utilisé uniquement pour *P. denitrificans* est le milieu 81 légèrement modifié, préconisé par le fournisseur de la souche (DSMZ), dont la composition est présentée dans le Tableau 10. Pour la préparation de ce milieu, les solutions A et B (voir Tableau 10) ont été autoclavées séparément. Les solutions commerciales d'éléments traces et de vitamines étaient produites par le groupe ATCC et fournies déjà stérilisées (références respectives : ATCC® MD-TMS™ et ATCC® MD-VS™). Les solutions d'acétate, de nitrates et la solution de carbonate sont filtrées à 0,2 μm avant ajout. Pour les expériences en milieu hydrogénotrophe, les vitamines n'ont pas été ajoutées car elles comportent des composés organiques.

Tableau 10 : Milieu synthétique minéral préconisé par DSMZ pour la culture de *P. denitrificans*

Solution	Espèce chimique	Concentration	Volume eau (mL)
Solution A	NH ₄ Cl	1 g	908
	MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,5 g	
	CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,01 g	
Solution B	Ferric ammonium citrate	2,5 g/L	20
Solution tampon	NaHCO ₃	84 g/L	20
Traces	ATCC® MD-TMS™		10
Vitamines	ATCC® MD-VS™		10
Acétate	NaCH ₃ COO	1 mol/L	20
Nitrates	NaNO ₃	1 mol/L	12
Total			1000

II.1.4. Lixiviat de ciment

Le lixiviat de ciment a été utilisé uniquement pour les expériences avec les boues activées. La synthèse et la conservation du lixiviat ont évolué au cours des expériences. Dans un premier temps, pour les réacteurs de petits volumes (Cf expériences §IV.1.1), le lixiviat a été fabriqué en immergeant des morceaux de pâtes de ciment CEM V avec un ratio de 63 cm²/L (soit un ratio massique de 22 g/L) dans de l'eau du robinet pendant trois jours. Le protocole est schématisé sur la Figure 17.

Pour toutes les autres expériences, les plus gros volumes de réacteurs et les consommations élevées de milieu ont nécessité la synthèse et la conservation de gros volumes de lixiviat de ciment. La pâte de ciment a été concassée puis tamisée pour atteindre une granulométrie comprise entre 0,5 et 1,25 mm. Les granules cimentaires ont ensuite été immergés dans de l'eau du robinet avec le ratio massique de 1 g/L dans une bouteille hermétique saturée de diazote. Le mélange a été agité à 900 rpm avec un barreau aimanté pendant 24h environ, jusqu'à atteindre approximativement un pH de 11,4 et une conductivité de 530 μ S.

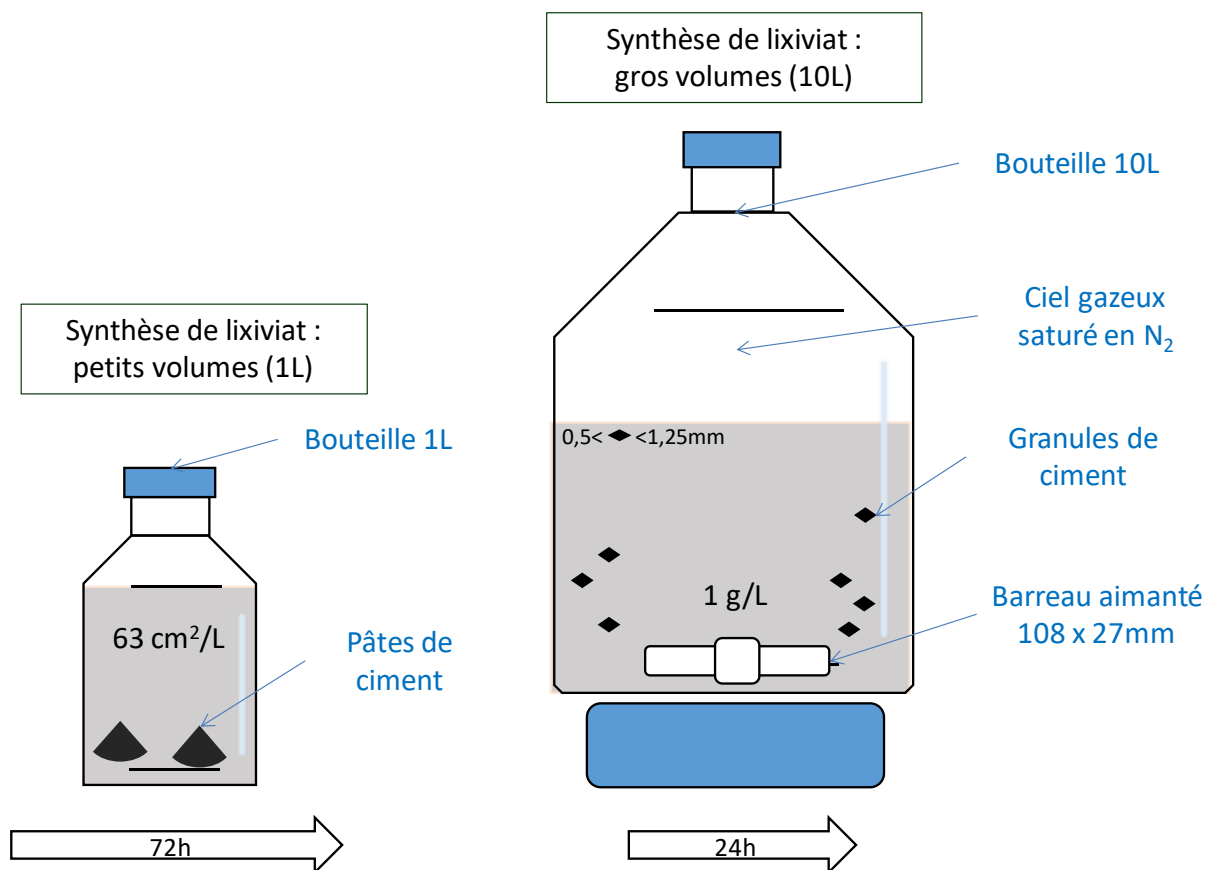


Figure 17 Protocoles de synthèse du lixiviat de ciment, en fonction des volumes de lixiviat à synthétiser.

La stabilité du lixiviat était très dépendante des échanges gazeux, en particulier avec le CO₂ de l'air. La Figure 18 permet d'illustrer ce phénomène : deux lixiviats de ciments ont été comparés lors de leur fabrication puis lors de leur conservation. Le premier lixiviat de ciment a été fabriqué et conservé à l'air libre, le second a été saturé en diazote pendant la fabrication et après chaque ouverture du contenant. La saturation en diazote a permis une bien meilleure conservation du lixiviat de ciment. Les contenants ont donc été saturés au diazote après chaque manipulation du lixiviat.

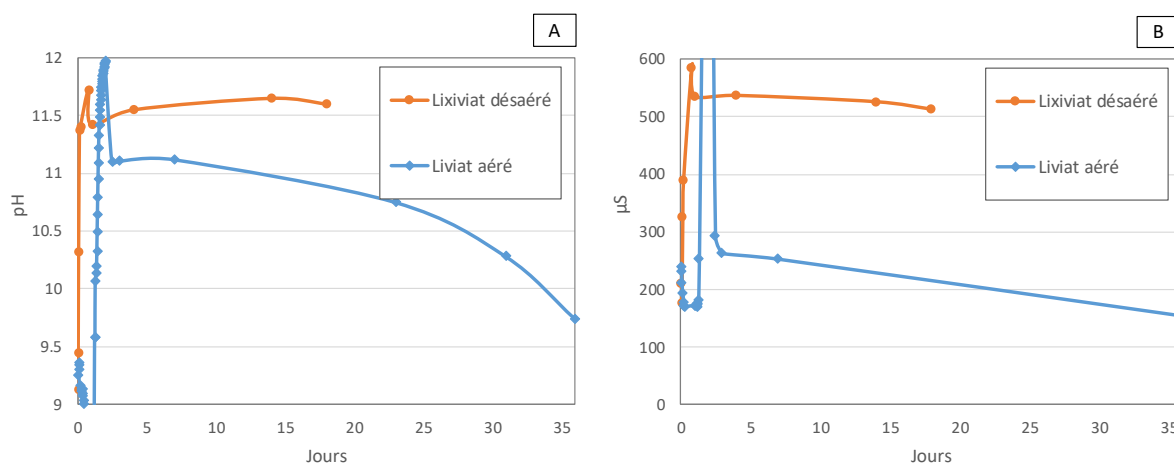


Figure 18 : Evolutions du pH (A) et de la conductivité (B) d'un lixiviat de pâte de ciment aéré et d'un lixiviat de pâte de ciment désaéré (saturé au N₂).

La composition des lixiviats de ciment (désaérés et synthétisés dans les bouteilles de 10 L) a été analysée par ICP-OES (explication de la méthode au § II.3.2.1). Le Tableau 11 présente les analyses des éléments Na, K, Ca, Mg, Al, Si (en mM) et Fe (μM). Les éléments majoritaires (Na, K, Ca) sont peu concentrés, le lixiviat de ciment est un milieu pauvre. Le lixiviat a été inoculé uniquement par des boues activées les étapes de stérilisation de milieu n'étaient donc pas nécessaires.

Tableau 11 : Composition des différents lixiviats de ciment préparés sur la période 2017-2019 dans le cadre des travaux de la thèse

Date	pH	Conductivité μS	Na mM	K mM	Ca mM	Mg mM	Al mM	Fe μM	Si mM
mars-17	11.2	408							
avr.-17	11.5	535							
avr.-17	11.5	470	0.38	0.14	1.06	0.10	0.04	< 0.2	0.06
mai-17	11.1	464	0.66	0.16	0.89	0.05	0.04	0.07	0.27
juin-17	11.4	572	0.63	0.13	0.88	0.14	0.04	< 0.2	0.18
sept.-17	11.4	747	0.52	0.16	0.52	0.11	0.03	< 0.2	0.16
oct.-17	11.4								
janv.-18	11.5	644	0.50	0.11	1.09	0.11	0.04	0.07	0.22
févr.-18	11.4	580	0.75	0.13	1.16	0.07	0.05	0.05	0.34
avr.-18	11.3	467	0.44	0.15	1.11	0.18	0.05	0.07	0.28
juin-18	11.7	720	0.40	0.15	1.49	0.10	0.07	0.07	0.24
août-18	11.1	384							
sept.-18	11.4	435	0.53	0.14	0.65	0.33	0.05	0.04	0.26
janv.-19	11.2	362	0.51	0.15	0.87	0.13	0.05	0.07	0.25
janv.-19	11.6	630							
janv.-19	11.2	540							
moyennes	11.4	530.5	0.5	0.1	1.0	0.1	0.0	0.06	0.2
Ecart-type	0.2	114.3	0.11	0.01	0.26	0.07	0.01	0.01	0.1

II.1.5. Régulation du pH

Le pH des milieux a été alcalinisé par des ajouts de NaOH (10 M) ou acidifié par des ajouts d'HCl (10 M). La soude et l'acide chlorhydrique ont été utilisés à des concentrations très élevées pour éviter de diluer les cultures. La saturation du ciel gazeux des cultures en diazote ou dihydrogène, et l'utilisation d'un tampon carbonate (50 mM de NaHCO_3) ont permis de stabiliser le pH. L'utilisation des carbonates est adaptée au pH alcalin car le couple ($\text{HCO}_3^- / \text{CO}_3^{2-}$) a un pKa égal à 10,32.

Un autre système de régulation automatique du pH a été mis en œuvre dans une seule expérience (Cf § IV.1.2.1). Il permettait d'ajouter automatiquement de la soude (125 mM) dans le réacteur par le biais d'une pompe (modèle BL 7916, marque Hanna) pilotée par un régulateur de pH. Ce système a permis de s'affranchir du tampon carbonate mais a vite été abandonné en raison du dimensionnement mal approprié de la pompe.

II.1.6. Régulation de la température

Il est difficile de prévoir avec précision la température qui régnera à proximité des déchets dans les alvéoles de stockage. Dans un milieu géologique profond et en fonction de l'activité des radionucléides, la température pourrait augmenter. Les alvéoles de stockage MAVL sont dimensionnées pour limiter la hausse de température à 30°C. Cependant, les températures attendues par l'Andra sont entre 20 et 25 °C [17]. En accord avec l'Andra, il a été convenu de conduire à 30 °C tous les travaux concernant l'étude de la bioréactivité des nitrates.

II.2. Bioréacteurs et montage expérimental

Au cours des expériences, les réacteurs ont été conduits en mode batch, continu et discontinu séquentiel. Les réacteurs discontinus séquentiels étaient similaires aux batch, mis à part qu'ils étaient ponctuellement réalimentés en milieu frais. En revanche, les réacteurs continus ont nécessité un montage plus complexe avec une alimentation continue en milieu et gaz tout en maintenant les réacteurs hermétiques aux échanges gazeux avec l'air.

II.2.1. Bioréacteurs batch

Tous les réacteurs sont maintenus à 30 °C dans des bains maries ou grâce à une double enveloppe thermostatée. Les réacteurs sont agités à 300 rpm par le biais d'un agitateur orbital, un barreau aimanté, ou une hélice. Différents types de réacteurs batch ont été mis en œuvre selon les expériences et sont illustrés dans la Figure 19. Les réacteurs étaient hermétiques aux gaz. Des désaérations par barbotage de N₂ ou H₂ (15 min minimum) après toute manipulation ont été réalisées pour éliminer l'air du ciel gazeux. Dans d'autres réacteurs un flux continu de H₂ ou N₂ était assuré par des tiges cannelées terminées par un fritté.

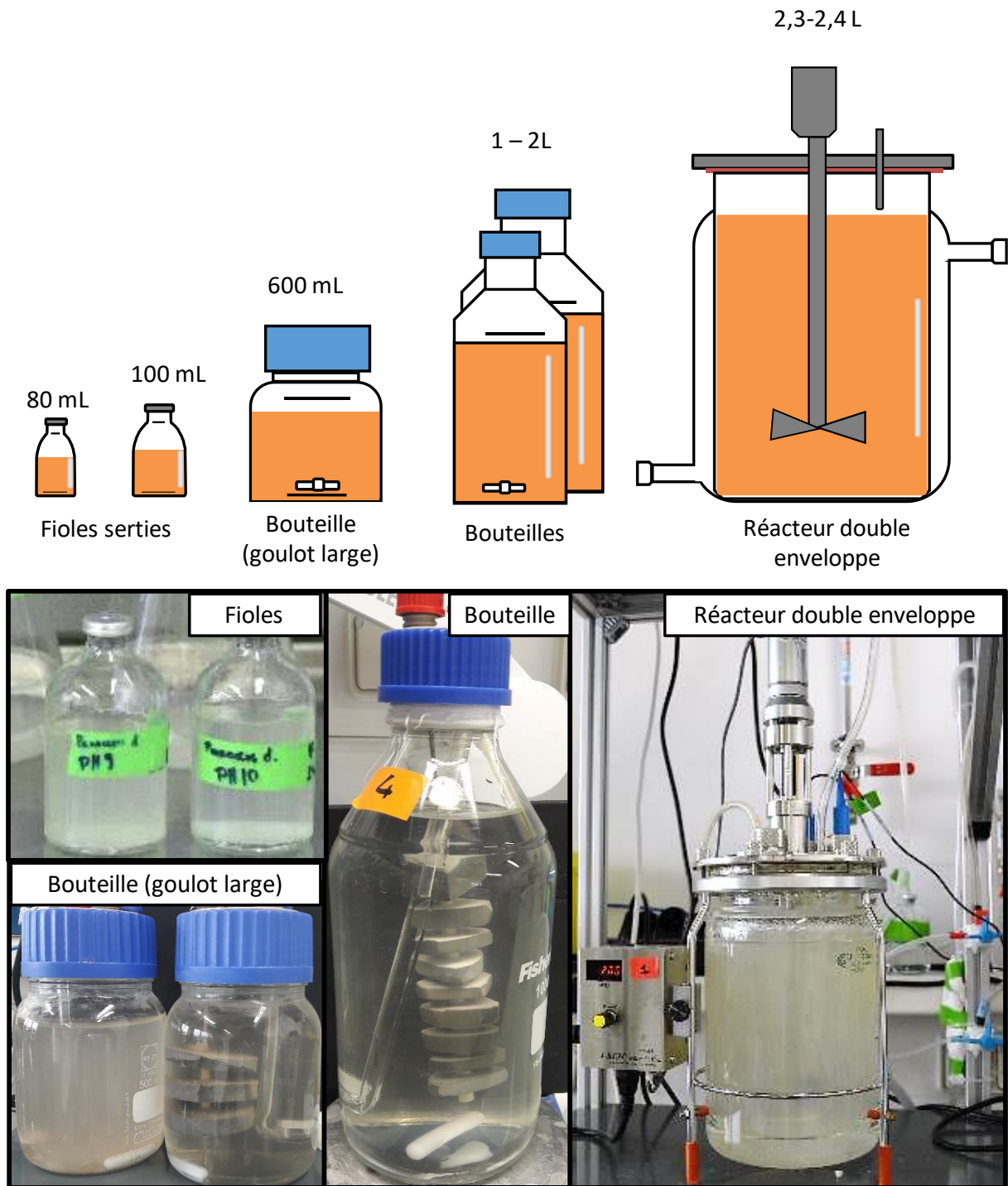


Figure 19 : Schémas et photographies de la verrerie utilisée pour les différents réacteurs.

L'agitation a été ajustée à 300 rpm dans tous les réacteurs pour assurer une homogénéisation du milieu quel que soit le volume des bioréacteurs. Les bioréacteurs discontinus séquentiels sont des réacteurs batch avec un fonctionnement séquentiel. C'est-à-dire que les réacteurs suivent une alternance de périodes, présentée dans la Figure 20. A la fin d'une période batch les réacteurs ne sont plus agités pendant plusieurs heures jusqu'à ce que la biomasse décante. Enfin le surnageant est éliminé et remplacé par du milieu frais. L'acétate était ajouté de manière régulière afin qu'il soit maintenu à une valeur constante (généralement 20 mM).

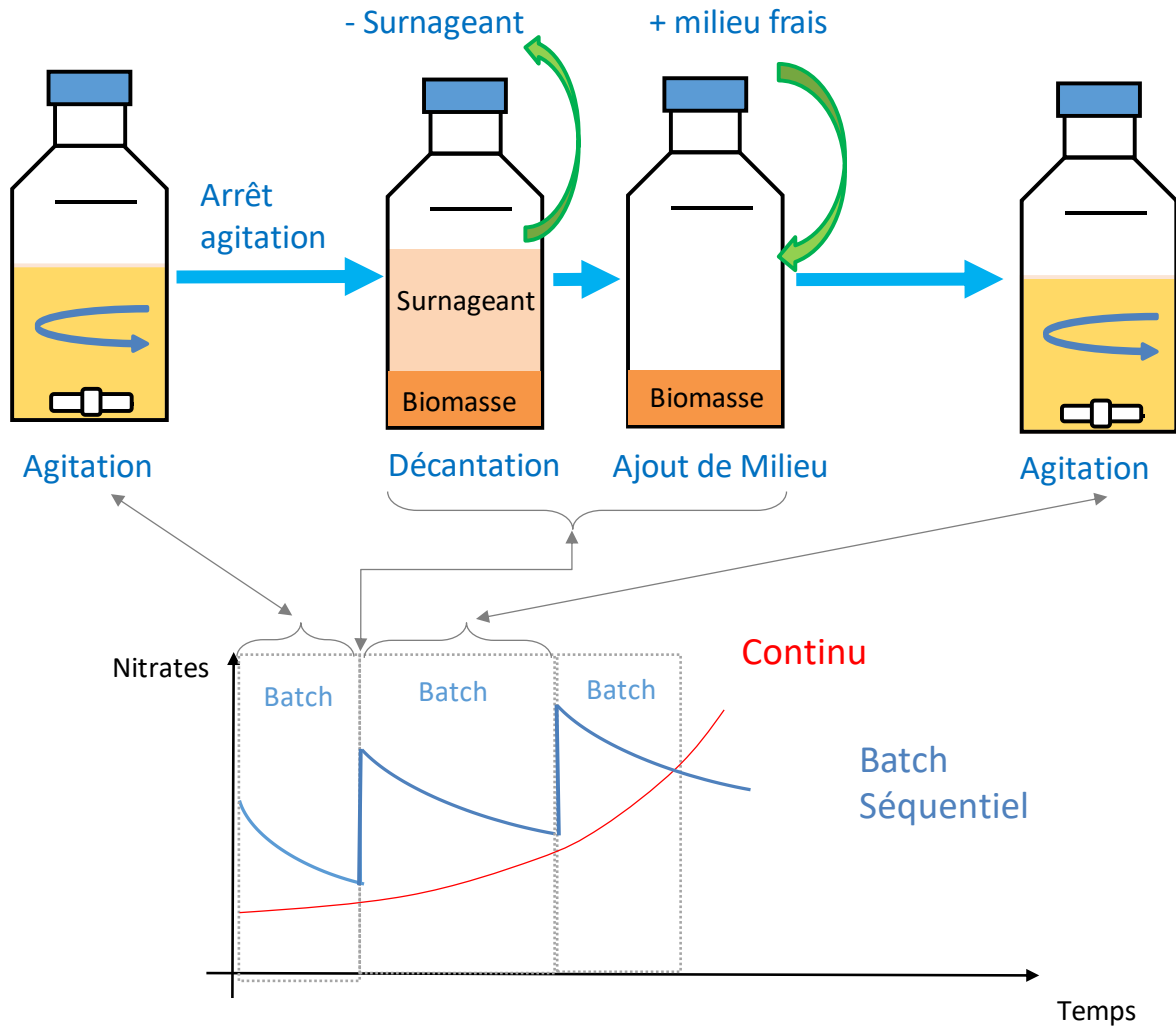


Figure 20 : Protocole opératoire des réacteurs discontinus séquentiels. Exemple d'une culture acclimatée progressivement à des concentrations élevées en nitrates, comparaison avec une culture continue.

II.2.2. Bioréacteurs continus

Les cultures continues ont été réalisées dans des réacteurs borosilicatés Chemglass de 3 L (volume utile 2,4 L) à double enveloppe. Chaque réacteur a un couvercle en acier inoxydable jointé avec plusieurs ouvertures filetées permettant d'ajouter différents composants de manière hermétique. Le tube de soutirage a une hauteur variable et détermine donc le volume de la culture (réglé de 2,2 à 2,4 L). Les réacteurs sont connectés à deux circuits : le circuit d'alimentation et le circuit de gaz.

Circuit d'alimentation :

Le circuit d'alimentation ravitaille le réacteur en milieu frais et soutire du milieu de culture par des pompes péristaltiques. Chaque réacteur a sa propre pompe péristaltique (2 pompes Ismatecs IP haute précision et une pompe Masterflex (L/S 7-200t.min⁻¹) avec une tête de pompe (L/S à chargement éclair)). Le débit d'alimentation a été fixé à la valeur la plus faible possible (0,2 mL/min) pour éviter le lessivage de la biomasse. A ce débit, la consommation de milieu est 0,3 L/jour, le temps de séjour hydraulique (HRT) dans un réacteur de 2,2 L est de 7,6 jours. La Figure 21 représente le circuit d'alimentation du réacteur. Pour la pompe Masterflex, des tubes Masterflex de 0,8 mm de diamètre

intérieur, et pour les pompes Ismatecs IP, des tubes Manifold 0,51 mm, ont été utilisés. Les tuyaux en sortie sont plus larges afin de contrôler le volume utile du réacteur.

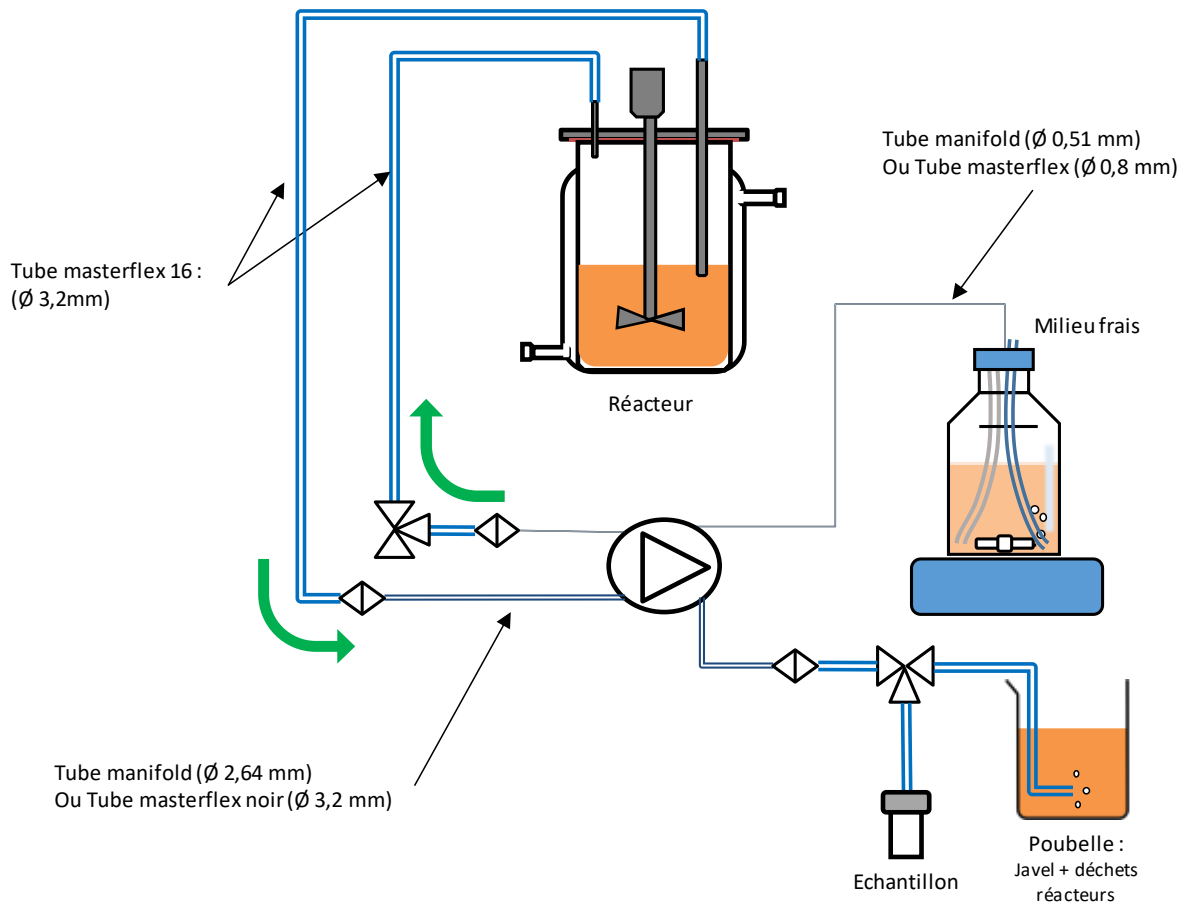


Figure 21 : Circuit d'alimentation et de soutirage du milieu réactionnel d'un réacteur continu.

Circuit de gaz :

Le circuit de gaz, Figure 22, a pour objectif de saturer le réacteur en N₂ ou H₂ afin d'assurer le maintien de l'anaérobiose, ce qui limite les contaminations aérobies et stabilise le pH.

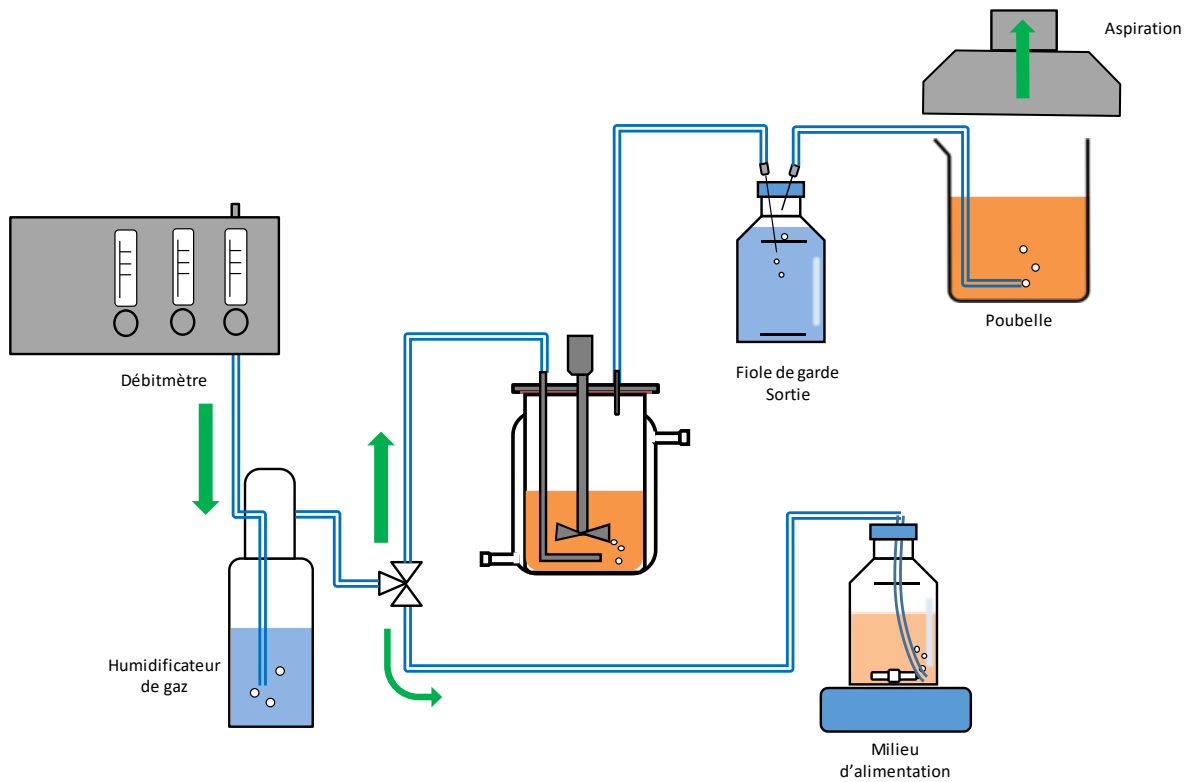


Figure 22 : Circuit de circulation des gaz vers le réacteur et le milieu d'alimentation.

Un humidificateur à l'entrée permet d'humidifier le gaz et d'éviter l'évaporation de la phase aqueuse. L'humidificateur et la fiole de garde en sortie évitent les retours d'air en cas de panne sur le circuit d'alimentation en gaz. La Figure 23, illustre l'ensemble du montage des trois réacteurs continus.



Figure 23 : photographie de l'ensemble du montage des réacteurs continus.

II.2.1. Sources de H₂ et de N₂

Le N₂ provenait du réseau général du LGC, des bouteilles alimentaient en continu tout un réseau dans le laboratoire. Cependant, des ruptures de l'approvisionnement en N₂ pouvaient se produire ponctuellement. Il était donc nécessaire d'anticiper ces arrêts imprévisibles en utilisant des fioles de gardes. Un flux continu de H₂ a été généré par un électrolyseur ND-H2 de la marque F-DGSI à partir d'eau ultra pure (système PURELAB OPTION – ELGA).

II.2.2. Acier et ciment solide, disposition dans les réacteurs

II.2.2.1. Ciment solide

Des cylindres de pâtes de ciment hydraté CEM V/A ROMBAS (≈ 120 mm de haut – 50 mm de diamètre), ont été fournis par Virginie Blin et Nathalie Macé du Laboratoire de Mesures et Modélisation de la Migration des Radionucléides, CEA. La pâte de ciment est conservée dans une solution saline alcaline liquide afin de la préserver de l'altération, Tableau 12. Dans les expériences où du ciment solide a été ajouté dans les cultures, les pâtes de ciment ont été insérées sous formes de pâtes de ciment triangulaires, obtenues par sciage des cylindres initiaux (8 mm de haut – 25 mm de côté) ou sous formes de cylindres (8 mm de haut – 50 mm de diamètre). Les pâtes de ciment triangulaires ou cylindriques étaient percées au centre et ainsi maintenues par une tige en titane dans les réacteurs.

Tableau 12 : Composition de la solution saline utilisée pour la conservation des pâtes de ciment.

	Na (mM)	K (mM)	Ca (mM)	Cl (mM)	SO ₄ (mM)	pH
Solution	77 ± 1	208 ± 5	0,3 ± 0,1	1,5 ± 0,9	1,74 ± 0.08	13,3 ± 0,1

II.2.2.2. Acier solide

Des armatures de béton armé (acier au carbone) de diamètre 10 mm ont été utilisées. La quantité d'acier à ajouter dans les cultures a été calculée en fonction des cotes présentées dans la Figure 24, inspirées de différents documents de l'Andra.

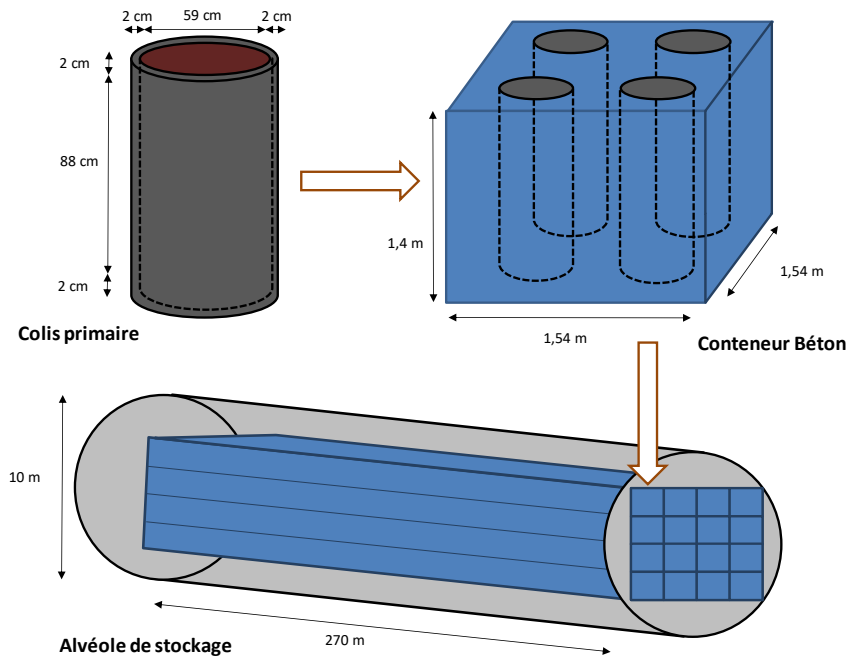


Figure 24 : Représentation schématique avec cotes d'une alvéole de stockage et des colis de déchets MAVL.

En considérant que (i) le milieu réactionnel des bactéries dans l'alvéole correspond au volume total de l'alvéole, (ii) que le ratio acier/béton est de 80 kg/m^3 , et (iii) que le béton des conteneurs MAVL et de l'alvéole est armé, il a été calculé qu'il faut ajouter 40 cm d'acier (soit 4 tiges de 10 cm) par litres de culture. Les tiges d'acier sont maintenues par un fil en nylon et séparées par des entretoises plastiques. La Figure 25 permet de visualiser l'exemple d'insertion de pâtes de ciment et d'acier solides dans un réacteur.

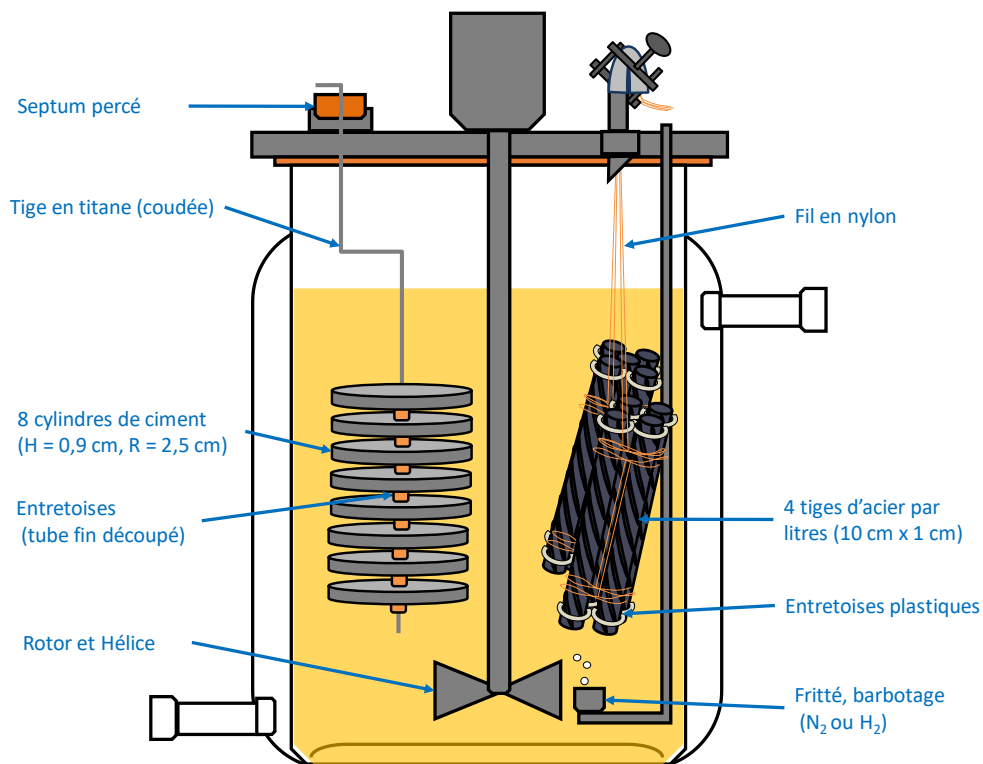


Figure 25 : Schéma du montage des réacteurs à double enveloppe en présence d'acier et de ciment solides.

II.2.3. Liste des expériences

Dans le Tableau 13 est présenté l'ensemble des expériences qui ont été réalisées au cours de la thèse. Les gammes de concentrations en nitrates et de pH ont été indiquées.

Tableau 13 : Plan des expériences de la thèse.

	Expérience	Conditions	[nitrates] mM	pH
Chapitre 3	Comparaison Aérobie / anaérobie	Batch , Acétate, <i>P. denitrificans</i>	10	8 – 11
	Comparaison Hétéro/Hydrogénotrophie	Batch , Acétate ou H ₂ , <i>P. denitrificans</i>	10	7 – 10
	Acclimatation au pH élevé	Batch , Acétate, <i>P. denitrificans</i>	10	7 – 11.2
	Acclimatation au pH élevé	Continu , Acétate, <i>P. denitrificans</i>	10	7 – 11.2
	Acclimatation à des [nitrates] élevées	Batch , Acétate, <i>P. denitrificans</i>	40 –760	7 – 8
Chapitre 4	Acclimatation au pH élevé	Batch , Acétate, Boues activées	10	7 – 11
	Acclimatation au pH élevé	Continu , Acétate, Boues activées	10	7 – 11.8
	Acclimatation à des [nitrates] élevées	Batch , Acétate, Boues activées	40 –760	7 – 8
	Acclimatation à des [nitrates] élevées	Continu , Acétate, Boues activées	10 –760	8 – 9
	Acclimatation à des [nitrates] élevées selon 3 pH	Séquentiel, Acétate, Boues activées	50 –400	9 –11
	Comparaison de NaNO ₃ , NaNO ₂ et KNO ₃	Séquentiel, Acétate, Boues activées	50 –200	9.5
	Dénitrification à pH hyperalcalin	Batch , Acétate, Boues activées	50	11.5 – 12
	Transition de l'acétate vers l' H ₂	Séquentiel, Acétate puis H ₂ , Boues activées	50 –100	9 – 11
Chapitre 5	Acclimatation à des [nitrates] élevées selon 3 pH	Séquentiel, H ₂ , Boues activées	10 –100	9 –11
	Acclimatation à des [nitrates] élevées selon 3 pH	Séquentiel, H ₂ , Boues activées	50 –150	9 –10.5
	Acclimatation à des [nitrates] élevées selon 3 pH	Séquentiel, H ₂ , Boues activées	200 –550	9 –11
	Dénitrification à pH hyperalcalin	Batch , H ₂ , Boues activées	50	11.5 – 12
	Dénitrification avec des pressions élevées de H ₂	Batch , H ₂ (1 à 10 bars), Boues activées	10	9
Chapitre 6	Insertion de pâtes de ciment vieilli	Séquentiel, H ₂ , Boues activées, ciment	100 –200	9.5 –10.2
	Insertion de pâtes de ciment frais	Séquentiel, H ₂ , Boues activées, ciment	50 –150	9.5 –10
	Insertion d'acier en présence d'H ₂	Batch, H ₂ , Boues activées, acier	10	9
	Insertion d'acier en présence d'acétate	Séquentiel , H ₂ , Boues activées, acier	50 –400	9
	Insertion d'acier et de ciment avec H ₂ et acétate	Séquentiel , H ₂ , acétate, Boues activées, acier et ciment	50 –400	9–11

II.3. Méthodes analytiques

Pour toutes les analyses chimiques, un volume de 5 mL est prélevé dans les cultures afin de limiter l'impact de l'échantillonnage sur le fonctionnement des expérimentations qui ont duré jusqu'à 240 jours. Immédiatement après le prélèvement, 1 mL de l'échantillon est analysé par spectrophotométrie à 600 nm. Le volume restant est filtré à 0,2 µm (Minisart PES, Fisher Scientific) puis soit analysé directement (par kit de dosage) soit stocké à -20°C pour analyses ultérieures (HPIC).

II.3.1. Analyses de la biomasse

II.3.1.1. Densité optique (DO)

La DO est une mesure d'absorbance par spectrophotométrie à 600 nm réalisée avec un spectrophotomètre Jenway (modèle 7315). A cette longueur d'onde, la DO est théoriquement proportionnelle à la quantité de cellules bactériennes en suspension. Cette mesure est simple et instantanée, mais elle peut présenter des limites d'applications à pH alcalin. En effet le milieu minéral de *P. denitrificans* en particulier a tendance à précipiter à pH élevé. C'est pourquoi, la DO de contrôles abiotiques a été soustraite à la DO de cultures de *P. denitrificans*. Les valeurs de DO présentées permettent d'avoir une estimation de la densité cellulaire. D'autres méthodes de suivi ont été testées (mesure de masses sèches, comptage cellulaire, etc.) mais elles n'étaient pas optimales par rapport aux nombres importants d'échantillons, et présentaient des limites d'application. Par exemple la mesure de la masse sèche est elle aussi impactée par la formation de précipités non biologiques à pH alcalins.

II.3.1.2. Caractérisation de la population bactérienne par pyroséquençage

Pour obtenir des quantités de biomasse suffisantes, de gros volumes de culture (voire la culture entière) ont été centrifugés (Heraeus Megafuge 40R, 4610 g, 10 min, température ambiante). Une extraction ADN est ensuite réalisée sur les culots.

Extraction ADN :

L'ADN des culots a été extrait par des kit DNeasy PowerBiofilm de la marque QIAGEN. Après extraction, une quantification rapide de l'ADN par spectrophotométrie aux longueurs d'ondes 230, 260 et 280 nm permet d'estimer la qualité de l'ADN extrait. Les échantillons d'ADN extraits sont alors envoyés au laboratoire américain Research and Testing Laboratory (RTLab) à Lubbock (Texas).

Séquençage ADN :

Le pyroséquençage a été réalisé par RTLab en ciblant l'ARN 16S des procaryotes, avec l'amorce universelle : 515F GTGCCAGCMGCCGCGGTAA - 806R GGACTACHVGGGTWTCTAAT. RTLab réalise ensuite les analyses bio-informatiques. Tout d'abord les erreurs de séquençages, les séquences uniques et le « bruit » sont supprimés. Les séquences avec un taux d'homologie de 96 % sont regroupées par l'algorithme USEARCH dans des groupes de séquences redondantes appelées OTU (Operational Taxonomic Units). Chaque groupe est comparé à une base de données issue du site NCBI (National Center for Biotechnology Information) en utilisant le logiciel BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool nucleotidic). Les correspondances de chaque OTU sont quantifiées de manière relative à tous les niveaux taxonomiques et envoyées par RTLab sous forme de fichier texte.

II.3.2. Analyse du pH, des carbonates

II.3.2.1. Mesure de pH et de potentiel redox

Le pH et le potentiel redox ont été mesurés par des sondes à électrode gélifiée FisherBrand reliées à une centrale d'acquisition Consort (modèle C3060 à 8 voies). Le potentiel redox est mesuré en continu (fréquence d'acquisition de 60 min). Il permet de vérifier que l'anaérobiose est bien respectée dans les bioréacteurs.

Le pH est mesuré en continu (fréquence d'acquisition de 60 min). Comme le pH est plutôt alcalin, les sondes sont étalonnées régulièrement avec des solutions tampon à pH 7, pH 10,01 et pH 12,46.

II.3.2.2. Dosage des carbonates

Les concentrations en CO_3^{2-} et HCO_3^- peuvent être déterminées grâce à un titrage à l'acide chlorhydrique (HCl). Les concentrations en CO_3^{2-} et HCO_3^- sont calculées aux équivalences (saut de pH) avec les équations (17) et (18).

$$[\text{CO}_3^{2-}]_{\text{initial}} = \frac{n_{\text{H}^+}}{V_{\text{échantillon}}} = \frac{[\text{H}^+] \times V_{\text{éq1}}}{V_{\text{échantillon}}} \quad (17)$$

$$[\text{HCO}_3^-]_{\text{initial}} = \frac{n_{\text{H}^+}}{V_{\text{échantillon}}} = \frac{[\text{H}^+] \times (V_{\text{éq2}} - V_{\text{éq1}}) - [\text{H}^+] \times V_{\text{éq1}}}{V_{\text{échantillon}}} \quad (18)$$

II.3.3. Dosage des ions nitrate et nitrite

II.3.3.1. Analyses extemporanées par kits

Les tests en kit (Hach Lange) pour le dosage des nitrates et des nitrites sont réalisés sur des échantillons filtrés à 0,2 μm . Le kit des nitrates est le LCK 340 (gamme 22-155 mg/L N- NO_3^-), le kit nitrite est le LCK 341 (gamme 0,05-2 mg/L N- NO_2^-). Le dosage se fait avec un spectrophotomètre Hach Lange (modèle DR 3900). Des mesures d'ammonium ont aussi été réalisées avec les kits LCK 304 (gamme 0,015-2000 mg/L N- NH_4^+). Ces mesures réalisées à de nombreuses reprises lors des expériences avec acier servaient de simple vérification, la concentration en ammonium mesurée dans les cultures était toujours nulle.

II.3.3.2. Dosage des ions nitrate, nitrite et acétate par HPIC

La chromatographie ionique haute performance (HPIC) permet de mesurer la concentration en anions (acétate, nitrate, nitrite) avec une grande sensibilité. L'HPIC utilisée est de marque Dionex (ICS-3000), composé de :

- Une pompe à gradient avec générateur d'éluant (EGC III KOH, Dionex)
- Un passeur d'échantillon AutoSampler AS 3000
- Une précolonne NG1, (4 x 50 mm, Dionex) ajoutée dans la chaîne pour retenir les composés aromatiques hydrophobes
- Une précolonne IonPac AG11-HC (4 x 50 mm, Dionex) et une colonne de séparation IonPac AS11-HC (4 x 250 mm, Dionex)
- Un suppresseur ASRS 300 (4 mm, Dionex)
- Un suppresseur CRD 200 (4 mm, Dionex)
- Un détecteur conductimétrique.

L'acquisition et le traitement des données ont été assurés grâce au logiciel Chroméléon. Deux gammes d'étalonnage distinctes sont nécessaires l'une pour les anions et une pour les acides organiques. Le débit de l'éluant est 1 mL/min, l'éluant est un mélange de KOH et d'eau ultra pure dont le gradient de concentration est présenté dans la Figure 26. Au cours de la thèse le gradient initial Figure 26 (A), a été optimisé en un gradient plus progressif [8], Figure 26 (B).

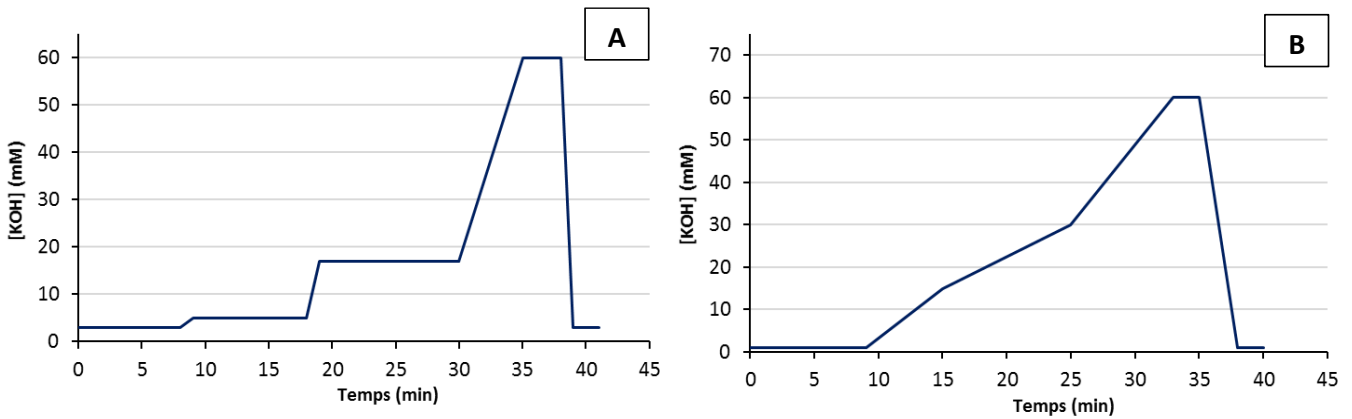


Figure 26 : Gradient d'éluant utilisé pour l'HPIC : eau ultra pure additionnée de KOH, (A) première version du gradient, (B) version optimisée du gradient.

II.3.3.3. Comparaisons des analyses en kits ou HPIC

Généralement, l'activité des cultures était suivie grâce aux kits. Ces analyses étaient ensuite vérifiées par HPIC. L'analyse en HPIC est considérée plus fiable que les kits de dosages rapides, qui peuvent être influencés par divers éléments du milieu. En particulier les kits nitrates mesuraient une partie des nitrites.

Une relation entre les mesures par kits et par HPIC a été déterminée avec l'objectif d'agrèger les résultats des deux types d'analyses. Pour cela, un premier correctif a été appliqué aux kits nitrates qui prennent en compte environ ¼ des nitrites de l'échantillon. Le deuxième correctif a été appliqué aux kits nitrates et nitrites en comparant des dosages en HPIC et en kits. Les résultats de 130 échantillons pour des gammes de nitrates et de nitrites de 0 à 200 mM ont été comparés dans la Figure 27. La Figure 27 a permis de déterminer les correctifs à appliquer pour intégrer les résultats des kits à ceux de l'HPIC, équations (19) et (20).

$$[\text{nitrates}]_{\text{corrigée}} = 0,9654 ([\text{nitrates}]_{\text{kit}} - 0,2436 [\text{nitrites}]_{\text{kit}}) + 0,0253 \quad (19)$$

$$[\text{nitrites}]_{\text{corrigée}} = 0,9276 [\text{nitrites}]_{\text{kit}} - 0,8095 \quad (20)$$

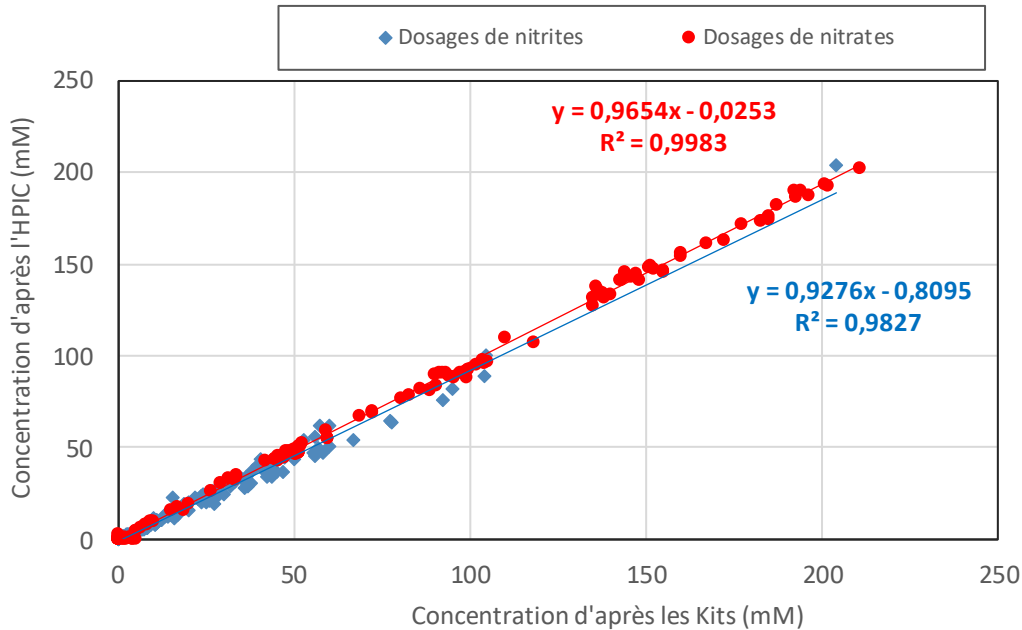


Figure 27 : Comparaison des dosages de nitrates et de nitrites par analyse en HPIC ou en Kit sur 130 échantillons.

II.3.1. Dosages de l'acétate, et de la DCO

II.3.1.1. La mesure de la concentration en acétate par kit enzymatique

Les mesures d'acétate par kits enzymatiques ont été réalisées avec des kit K-ACETAK de la marque Megazyme. En principe la réaction de l'acétate avec l'ATP, entraîne plusieurs réactions successives qui conduisent à la consommation de NADH,H⁺. C'est le NADH,H⁺ qui est dosé à 340 nm (par le spectrophotomètre Jenway, modèle 7315). La très faible longueur d'onde nécessite l'utilisation de cuve en quartz.

II.3.1.1. La mesure d'acétate par HPIC

Le protocole d'analyse en HPIC de l'acétate est identique à celui des nitrates et des nitrites §II.3.3.2 à l'exception près qu'une autre gamme étalon est nécessaire pour l'acétate. En effet, les étalons mélangeant acétate, nitrates et nitrites sont instables.

II.3.1.2. Comparaison HPIC et analyse en Kit

Comme pour les dosages de nitrates et de nitrites, les dosages d'acétate en kits enzymatiques ont été comparés aux dosages en l'HPIC. Dans la Figure 28, 70 échantillons dosés en HPIC et en kits ont été représentés. Malgré 5 points aberrants qui ont été supprimés, le coefficient de corrélation ($R^2 = 0,7606$) est toujours insuffisant. Les analyses en kit sont trop hétérogènes, par rapport aux analyses HPIC. Une explication envisageable de l'instabilité des kits est leur sensibilité à la température et au pH étant donné la nature enzymatique du test. Les kits acétate ont donc uniquement servi à vérifier que l'acétate n'était pas limitant dans les cultures.

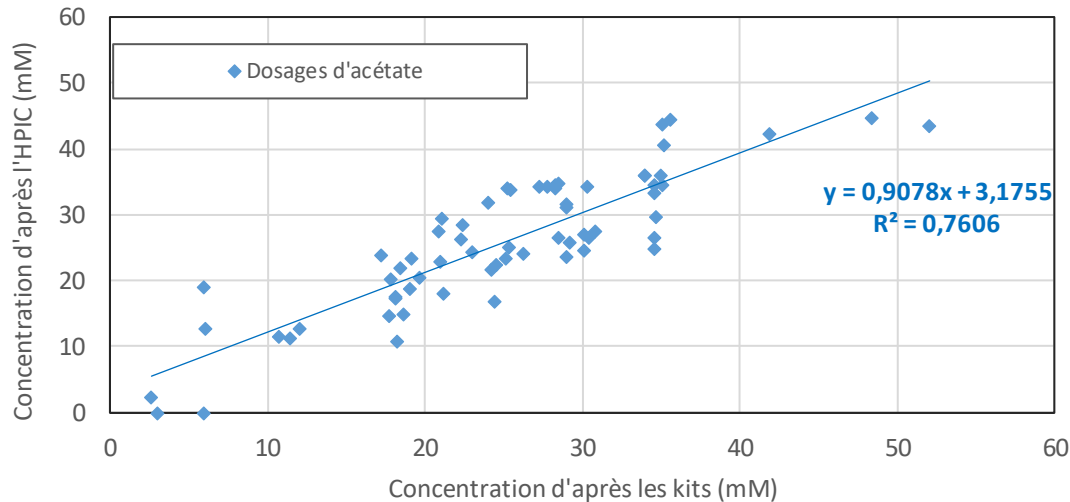


Figure 28 : Comparaison des dosages d'acétate par analyse en HPIC ou en Kit sur 70 échantillons.

II.3.2. Dosages des éléments (Na, K, Ca, Fe, Si...)

II.3.2.1. Analyses en ICP-OES

Les dosages des éléments Na, K, Ca etc. et des concentrations totales en Fe(II)/Fe(III) ont été réalisés en ICP-OES (Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry). Les analyses ont été réalisées avec un système Optima 7000 DV de PerkinElmer et un nébuliseur du type MEINHARD. Les résultats ont été ensuite analysés à l'aide du logiciel WinLab32.

II.3.2.2. Analyses en HPIC

Le protocole d'analyse des cations (calcium, magnésium, sodium, potassium, ammonium) était relativement proche du protocole présenté au paragraphe II.3.3.2. Quelques différences sont notables : la colonne était une IonPac CS 16, Dionex, associée à un suppresseur CSRS 300 4 mm. L'éluant, un mélange d'eau pure et de 30 mM de méthane sulfonique, était pompé de manière isocratique pour une analyse de 30 min.

II.3.3. Analyse des matériaux solides

Des observations des surfaces de pâtes de ciment ont été tentées en épifluorescence, elles n'ont pas été concluantes à cause de l'auto fluorescence de la calcite. Les résultats ne seront donc pas présentés.

II.3.3.1. Spectroscopie Raman

Les tiges d'aciers ont été analysées par spectroscopie Raman. Une lumière monochromatique est envoyée sur l'échantillon, la lumière diffusée est analysée. Elle est composée entre autres des radiations stock caractérisées par un changement d'énergie et une dégradation de leur longueur d'onde. L'analyse des radiations stock permet d'établir un spectre avec des pics dont le décalage des longueurs d'ondes est définie par la nature de l'échantillon. L'appareil utilisé était un microscope confocal laser (LABRAM- high resolution – 800 mm) avec une longueur d'onde de 532 nm. Le microscope était calibré en fréquence avec la bande d'ordre 1 du silicium à $520,7 \text{ cm}^{-1}$. Des filtres d'opacité de 1 % à 10 % ont permis de diminuer la puissance initiale du laser (8 mW) afin d'éviter

d'abimer l'échantillon par surchauffe. Les pics des d'intensités de plusieurs oxyhydroxydes de fer sont présentés dans le Tableau 14.

Tableau 14 : Caractérisations de 12 oxyhydroxydes de fer en fonction des décalages de pics dans les spectres Raman (vert foncé = pic le plus élevé, vert clair = 2^{ème} pic le plus élevé).

Nom	Formule	Raman shifts (cm ⁻¹)						REF
Iron(II) hydroxide	Fe(OH) ₂	460	550					[187]
Goethite	α-FeOOH	244	299	385	480	548	681	[187,188]
Akaganeite	β-FeOOH	314	380	549	722			[187]
Lepidocrocite	γ-FeOOH	250	348	379	528	650	–	[188]
Feroxyhyte	δ-FeOOH	297	392	666				[187]
Hematite	α-Fe ₂ O ₃	225	245	295	412	497	612	[188]
Maghemite	γ-Fe ₂ O ₃	350	512	665	730	–	–	[188]
Ferrihydrite	Fe ³⁺ ₂ O ₃ . ½H ₂ O	370	510	710		-	–	[188]
Magnetite	Fe ₃ O ₄	310	540	670	–	–	–	[188]
Siderite	FeCO ₃	184	287	731	1090	–	–	[188]
Wuestite	FeO	595	–			–	–	[188]

II.3.3.1. Microscopie Electronique à balayage couplée à des analyses EDS

Les pâtes de ciment ont été analysées par Microscopie électronique. Un prétraitement consistant à fixer et déshydrater les structures biologiques a été appliqué. Ce traitement se décompose en plusieurs étapes.

- 1) Fixation : immersion de la pâte pendant 2 heures dans un mélange : 50 % glutaraldéhyde à 4 %, 25 % d'un tampon phosphate (0,4 M, pH 7,4) et 25% d'eau distillé (v/v/v)
- 2) Rinçage : immersion durant 15 min. deux fois dans un mélange : 50 % de sucrose (0,4 M), 25 % de tampon phosphate (0,4 M, pH 7,4) et 25 % d'eau distillée (v/v/v)
- 3) Déshydratation dont l'objectif est d'éliminer l'eau progressivement :
 - 5 min dans 50 % acétone-50 % d'eau (v/v)
 - 5 min dans 70% acétone 30 %-d'eau (v/v)
 - 30 min dans 100 % acétone
 - 10 min dans 50 % acétone-50 % d'hexamethyldisilazane (HDMS) (v/v)
 - 100 % HDMS jusqu'à évaporation complète.

Après cette déshydratation, une fine couche métallique de carbone est pulvérisée sur les échantillons. Les échantillons sont observés en MEB (Microscopie Electronique à balayage) par un microscope MEB JEOL JSM 6380LV avec une tension d'accélération de 15 kV. Des observations des électrons rétrodiffusés (BSE) couplés à une analyse EDS (Energy Dispersive X-ray Spectroscopy) avec un détecteur Bruker XFlash® 6/30 ont permis d'obtenir une composition chimique quantitative relative. L'analyse des électrons secondaires (SEI) a permis d'illustrer la topographie des échantillons.

Chapitre III :

**DENITRIFICATION AVEC LA SOUCHE MODELE *PARACOCCLUS*
*DENITRIFICANS***

Table des matières :

III.1. Comparaison de l'acétate et le dihydrogène comme accepteurs d'électrons en bioréacteurs batch	73
III.2. Simulation de l'évolution du pH lors de la dénitrification	78
III.2.1. Calculs théoriques de l'évolution du pH avec acétate	78
III.2.1. Calculs théoriques de l'évolution du pH avec dihydrogène	83
III.3. Comparaisons de deux méthodes d'acclimatation	86
III.3.1. Comparaison de deux méthodes d'acclimatation à une élévation progressive de pH.	87
1. Introduction.....	88
2. Materials and methods	89
2.1. Bacterial strain <i>P. denitrificans</i> and growth medium.....	89
2.2. Batch bioreactors:	89
2.2.1. Independent batch cultures	89
2.2.2. Acclimation by successive cultures	89
2.3. Continuous bioreactor:.....	90
2.4. Growth medium analysis:.....	90
2.4.1. Optical density.....	90
2.4.2. Chemical analysis	90
2.4.3. pH monitoring	90
3. Results	91
3.1. Acclimation of batch cultures.....	91
3.1.1. Independent batch cultures	91
3.1.2. Acclimation by successive inoculations.....	91
3.2. Acclimation in a continuous bioreactor	92
3.3. Discussion	93
III.3.2. Acclimatation à des concentrations élevées de nitrates en réacteurs batch successifs	97
III.4. Conclusions du chapitre	100

D'après l'étude bibliographique et les travaux antérieurs réalisés au LMDC et au LGC [17,18], la dénitrification dans un environnement inspiré du contexte de stockage de déchets radioactifs, i.e. avec des pH élevés, des concentrations en nitrates élevées et avec du dihydrogène comme donneur d'électrons, peut ralentir l'activité bactérienne et provoquer l'accumulation de nitrites. C'est pourquoi, dans ce chapitre, les premières expérimentations de cultures dénitrifiantes ont été effectuées avec un inoculum simple : la souche modèle *P. denitrificans*. Cette souche, *P. denitrificans* a été choisie car elle possède l'ensemble des réductases de la dénitrification. Elle est très adaptable, capable d'utiliser plusieurs sources de carbone [132], plusieurs donneurs d'électrons (de type organique comme l'acétate ou minéral comme le dihydrogène [28]) et différents accepteurs d'électrons (comme l'oxygène, les nitrates ou encore des composés soufrés [189]).

L'objectif de ce chapitre était de répondre aux questions soulevées dans l'étude bibliographique. Quel est l'effet d'un pH élevé ou d'une concentration en nitrates élevée sur la dénitrification bactérienne ? Quel est le comportement du milieu réactionnel lorsqu'il est tamponné à pH alcalin ? Quelles sont les différences entre l'utilisation de l'acétate ou du dihydrogène comme donneur d'électrons dans une culture dénitrifiante ? Quelles sont les cinétiques de réductions des nitrates à pH élevés ou avec une concentration élevée de nitrates ?

Pour répondre à ces questions, l'effet du pH sur des milieux non inoculés a été évalué. Puis, la dénitrification a été étudiée en présence d'acétate ou de dihydrogène comme donneur d'électrons selon quatre pH échelonnés de 7 à 10.

L'évolution du pH lors de la dénitrification a ensuite été simulée par le biais de calculs se basant sur les équations de la dénitrification. L'objectif était d'approfondir la compréhension de l'impact de la dénitrification sur le pH d'un milieu en présence de dihydrogène ou d'acétate.

Enfin, les valeurs maximales de pH et de concentrations en nitrates tolérées par *P. denitrificans* ont été évaluées. Pour cela, deux procédures d'acclimatation ont été mises en place afin d'élever progressivement les pH ou les concentrations en nitrates jusqu'à pH 11,2 ou 750 mM de nitrates.

III.1. Comparaison de l'acétate et le dihydrogène comme accepteurs d'électrons en bioréacteurs batch

Cette série d'expériences visait à comparer l'effet du pH sur l'activité de *P. denitrificans* en présence d'acétate ou de dihydrogène. Dans ces expériences réalisées en bioréacteur batch, *P. denitrificans* était cultivée sur milieu minéral synthétique préconisé pour cette bactérie, à savoir le milieu 81 de DSMZ.

Démarche expérimentale :

Une préculture avec acétate à pH 9 a servi d'inoculum à quatre cultures hydrogénotrophes saturées en H₂(g) sans acétate, et quatre cultures hétérotrophes avec acétate saturées en diazote, Figure 29. Chaque culture a testé un pH différent 7, 8, 9 et 10. Par abus de langage, nous considérons l'hydrogénotrophie par l'apport de dihydrogène comme seule source d'électrons et de carbone minéral comme seule source de carbone. Plus rigoureusement, il faudrait utiliser l'expression « hydrogéo-auto-trophie ». Des contrôles abiotiques ont été suivis en parallèle afin de vérifier la stabilité du pH des milieux.

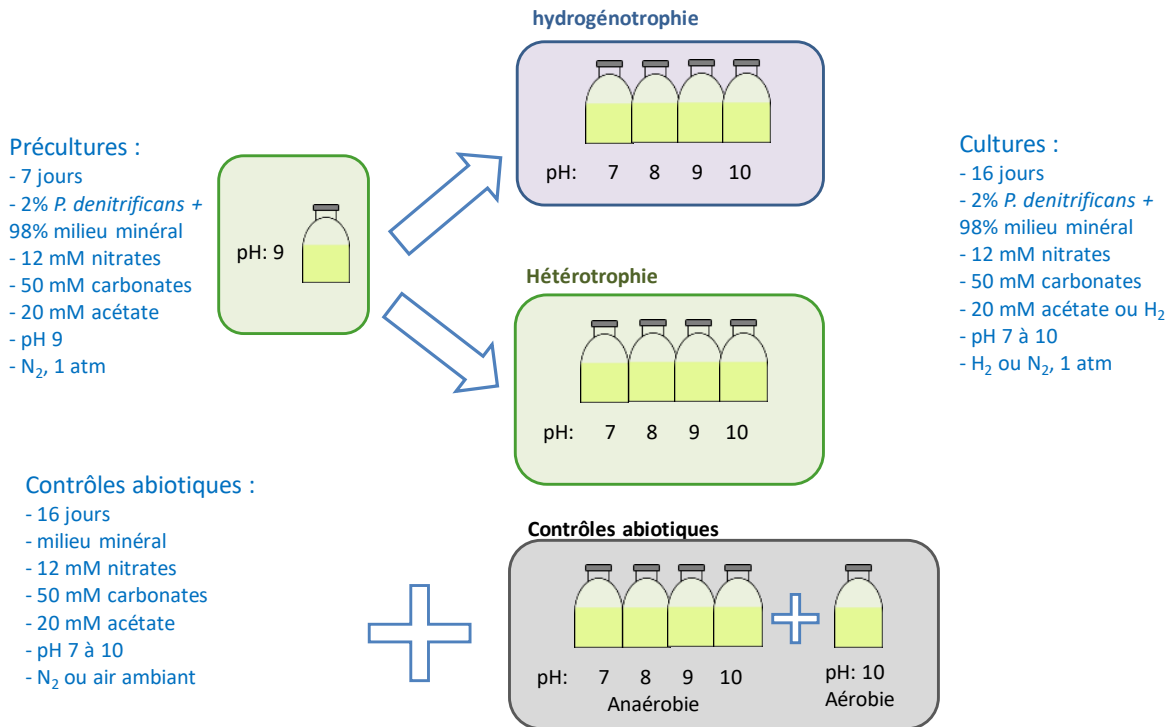


Figure 29 : Protocole expérimental des réacteurs batch à pH 7, 8, 9 et 10 conduits en hydrogénotrophie, en hétérotrophie et des contrôles abiotiques.

Résultats :

La Figure 30, présente l'évolution du pH et de la DO à 600 nm dans les contrôles abiotiques non inoculés. Cinq contrôles abiotiques ont été comparés : 4 contrôles en fioles anaérobies à pH 7,8, 9 et 10, et un contrôle en erlenmeyer aérobie à pH 10 (noté contrôle aérobie).

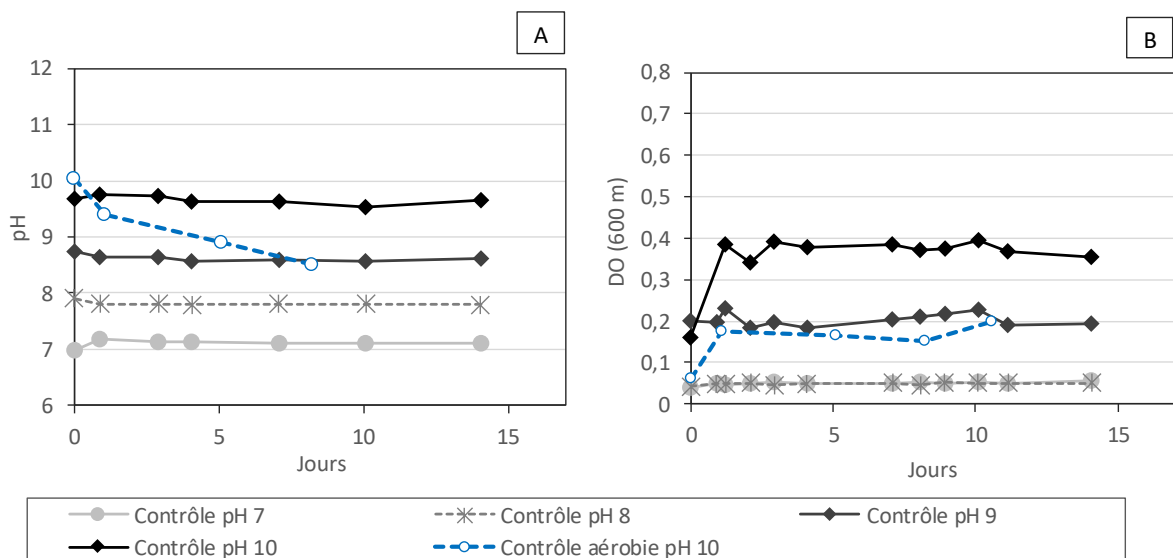


Figure 30 : Evolution du pH (A) et de la DO (B) des contrôles abiotiques anaérobies à pH 7, 8, 9, et 10 et du contrôle abiotique aérobie à pH 10.

Les milieux dans les fioles en anaérobiose avaient un pH stable tandis que le témoin en aérobie a subi une diminution de pH rapide. Comme les milieux étaient abiotiques, la modification de pH observée venait certainement des échanges gazeux avec le CO₂ contenu dans l'air. Celui-ci peut jouer le rôle d'acidifiant quand il se dissout dans l'eau via la réaction d'hydratation $H_2O + CO_2 = H_2CO_3 = H^+ + HCO_3^-$. La capacité du CO₂ à acidifier les milieux est une problématique pour la stabilité du pH. Cependant, en anaérobiose, la saturation en N₂ et l'étanchéité des fioles ont été suffisantes pour prévenir l'acidification des milieux pendant au 14 jours.

Après un jour la DO a évolué en fonction du pH et est restée stable pendant les jours restants de l'expérience. Plus le pH du milieu était alcalin, plus la DO était élevée. L'élévation du pH a induit l'apparition progressive de précipités qui augmentent les valeurs de la DO à 600 nm. Ces précipités étaient probablement dus à la présence du tampon carbonate réagissant avec d'autres espèces chimiques comme le fer ou le calcium et précipitant facilement à pH alcalin.

La Figure 31 et la Figure 32 présentent le suivi du pH et de la DO à 600 nm des cultures bactériennes hétérotrophes et hydrogénotrophes à pH 7, 8, 9, 10. La DO des contrôles abiotiques, présentée Figure 30, a été soustraite à la DO des culture hétérotrophes et hydrogénotrophes.

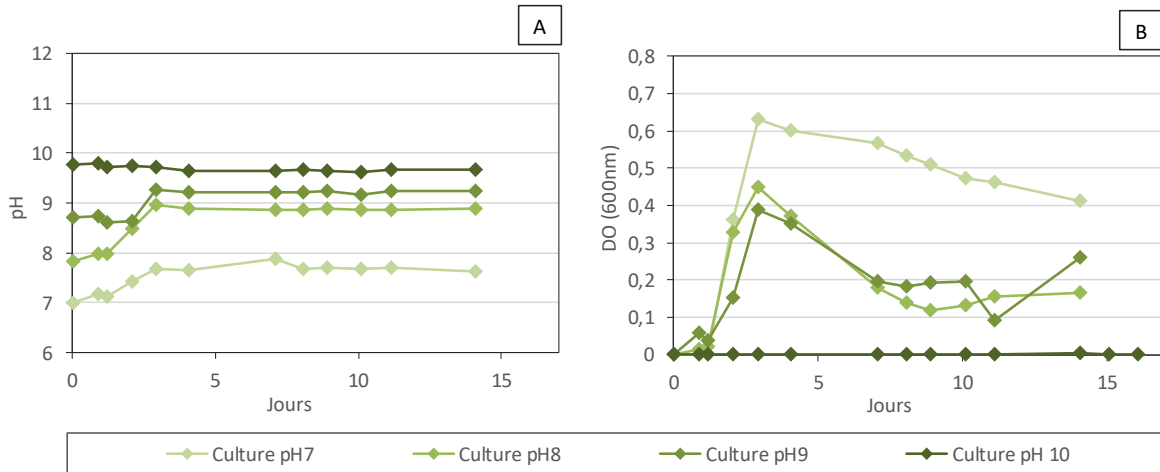


Figure 31 : Effet de différents pH initiaux 7, 8, 9 et 10 sur les évolutions du pH (A) et de la DO (B) en hétérotrophie. Conditions expérimentales : quatre bioréacteurs batch, *P. denitrificans*, milieu minéral, 20 mM d'acétate, 12 mM de nitrates.

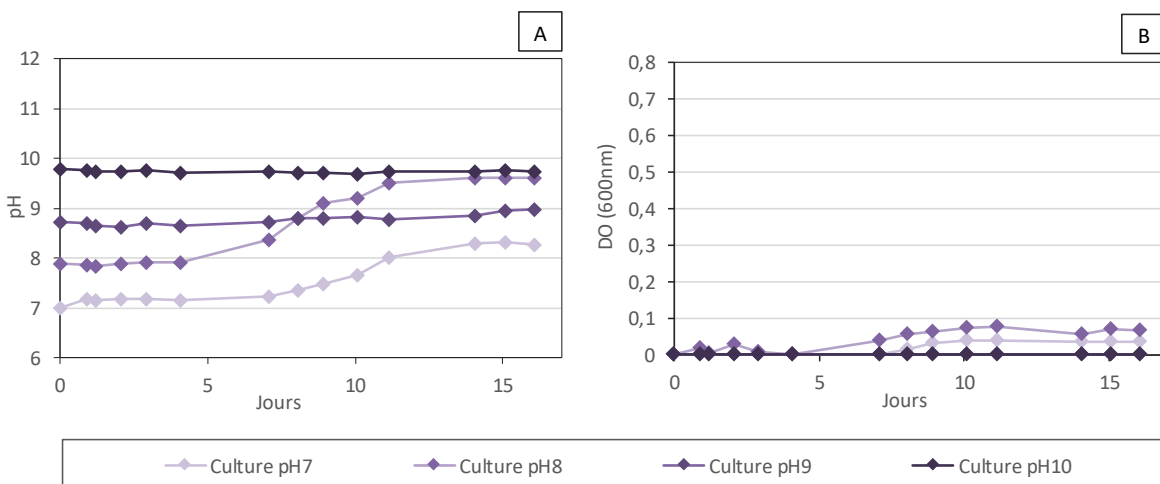


Figure 32 : Effet de différents pH initiaux 7, 8, 9 et 10 sur l'évolution du pH (A) et de la DO (B) en hydrogénotrophie. Conditions expérimentales : quatre bioréacteurs batch, *P. denitrificans*, milieu minéral, 1 bar d'H₂, 12 mM de nitrates.

Dans les cultures hétérotrophes (Figure 31) aux pH initiaux 7, 8 et 9 le pH s'est alcalinisé de 0,3 à 1 unité de pH sur les trois premiers jours. Le pH est resté stable pendant le reste de l'expérience. Dans les cultures hydrogénotrophes (Figure 32), l'augmentation du pH dans les cultures initialement à pH 7 et 8 a été plus importante : de 1,3 à 1,7 unités de pH et s'est effectuée avec un temps de latence de 6 jours. Dans les cultures à pH 9 et 10 le pH est resté constant. L'élévation de pH supérieure avec le dihydrogène par rapport à l'acétate, peut s'expliquer par la capacité des bactéries à d'acidifier leur milieu en oxydant l'acétate en CO₂ alors que les bactéries hydrogénotrophes ne peuvent pas contrebalancer la génération d'OH⁻ lors de la réduction des nitrates [32].

Concernant la DO, elle a atteint une valeur maximale légèrement supérieure à 0,6 en hétérotrophie en 3 jours. En hydrogénotrophie, la DO ne dépassait pas 0,1. La DO était dépendante du pH initial quel que soit le donneur d'électrons. Plus le pH initial était élevé plus la DO était faible, les pH alcalins ont donc un effet négatif sur la croissance de *P. denitrificans*.

La Figure 33 présente, pour les cultures hétérotrophes, l'évolution des concentrations en nitrates et acétate. Les nitrites ne sont pas représentés, car il n'y a pas eu de production détectable de nitrites. La Figure 34 présente, pour les cultures hydrogénotrophes, l'évolution des concentrations en nitrate et nitrite. Le milieu était dépourvu d'acétate.

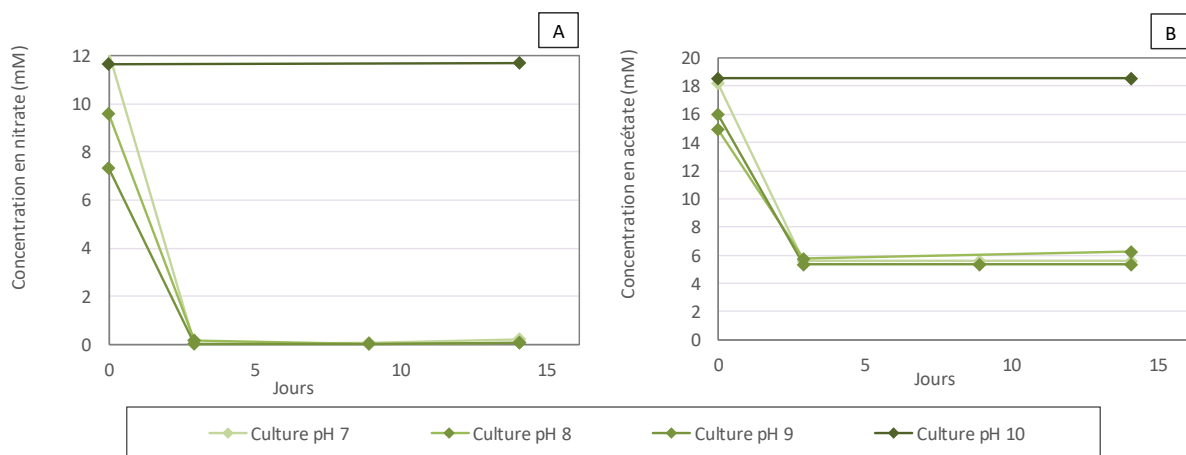


Figure 33 : Effet de différents pH initiaux 7, 8, 9 et 10 sur l'évolution des concentrations en nitrates (A) et en acétate (B) en hétérotrophie. Conditions expérimentales : quatre bioréacteurs batch, *P. denitrificans*, milieu minéral, 20 mM d'acétate, 12 mM de nitrates.

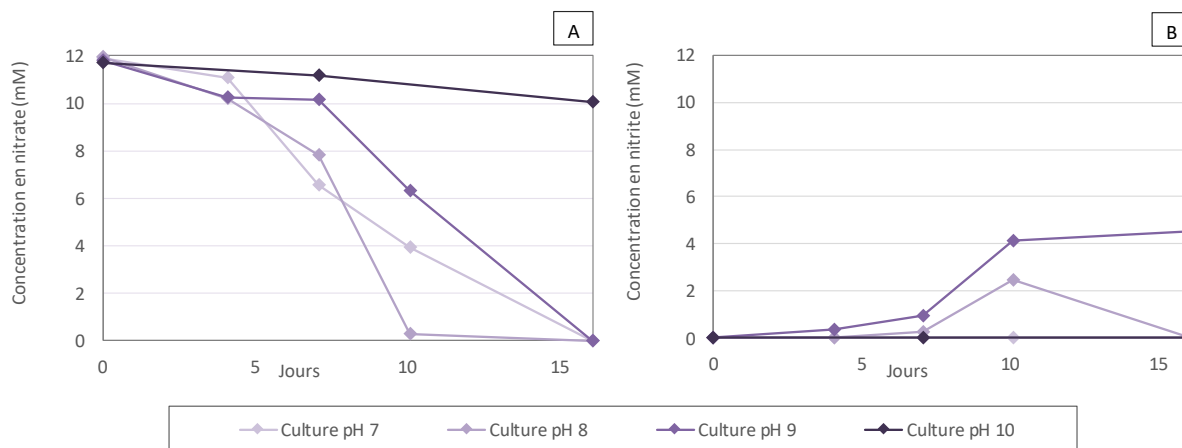


Figure 34 : Effet de différents pH initiaux 7, 8, 9 et 10 sur l'évolution des concentrations en nitrates (A) et en nitrites (B) en hydrogénotropie. Conditions expérimentales : quatre bioréacteurs batch, *P. denitrificans*, milieu minéral, 1 bar de 100 % d' H_2 , 12 mM de nitrates.

En hétérotrophie (Figure 33), les nitrates et l'acétate ont été consommés en 3 jours, excepté dans la culture à pH 10. A ce ratio acétate/nitrate les nitrates sont limitants et l'acétate a été introduit en excès, c'est pourquoi il n'était pas totalement consommé. En effet comme l'illustre l'équation (2), lors de la dénitrification 5 équivalents acétate sont consommés pour 8 équivalents nitrates. En hydrogénotropie (Figure 34), la réduction des nitrates était plus lente, les nitrates étaient consommés entre 10 jours et 16 jours à pH 7, 8 et 9, soit une cinétique maximale de réduction des nitrates de 1,2 mM/j à pH 7. La croissance bactérienne et la cinétique de réduction des nitrates étaient plus élevées en présence d'acétate qu'en présence de dihydrogène à 1 bar. Une explication possible est que le dihydrogène soluble est moins concentré à 1 bar (0,74 mM à 30°C) que l'acétate qui lui est ajouté à hauteur de 20 mM. Les expériences avec des pressions plus élevées en dihydrogène, présentées dans le paragraphe V.3.1, permettent de dissoudre plus de dihydrogène en phase aqueuse et ainsi évaluer l'effet de la solubilité du dihydrogène sur l'activité bactérienne. La nécessité d'assimiler du carbone minéral en milieu hydrogénotrophe a pu aussi fortement ralentir *P. denitrificans*. En effet, il a été dénombré 6 voies d'assimilation du carbone minéral nécessitant toutes une dépense énergétique importante sous forme d'ATP ou de coenzyme de réduction [120–122].

Une accumulation de nitrites a été observée dans les cultures à pH 8 et à pH 9. L'accumulation des nitrites observée dépendait du pH initial des cultures : plus le pH était élevé, plus les nitrites s'accumulaient. En effet, la réduction des nitrites est l'étape clé qui alcalinise le milieu. Or, en hydrogénotropie il n'y a pas de possibilité d'acidifier le milieu par l'oxydation de l'acétate en CO_2 . En résumé, la dénitrification hydrogénotrophe conduit à des cinétiques de réductions des nitrates plus lentes [58] et une accumulation de nitrites [39,62,129,190]. *P. denitrificans* a été capable de réduire les nitrites, c'est donc une bactérie de type « *true denitrifier* », par opposition aux bactéries « *nitrate respiring* » qui ne réduisent que les nitrates en nitrites [191].

Conclusions :

Les solutions contrôles ont permis de vérifier la stabilité du pH des milieux dans une gamme de pH alcalin. Pour maintenir le pH à une valeur fixe, il est indispensable d'éviter les échanges gazeux avec l'extérieur en saturant les réacteurs avec du N_2 ou du H_2 . Par ailleurs, ces expériences ont permis de valider le fait que *P. denitrificans* est capable de réduire les nitrates, avec de l'acétate ou avec du dihydrogène jusqu'à pH 9. Ces conclusions confirment les travaux précédents de Rafrafi et coll. [192], dans lesquels *P. denitrificans* a pu dénitrifier en condition anaérobie en présence d'acétate jusqu'à pH

~ 9,5. Cette expérience illustre l'adaptabilité de *P. denitrificans* et confirme que cette souche est capable de dénitrifier en hydrogénotrophie sans matière organique [28,120,126].

La réduction bactérienne des nitrates était quatre fois plus élevée en présence de 20 mM d'acétate qu'en présence de dihydrogène (1 bar, 100% H₂). Ce ralentissement peut s'expliquer entre autres par la faible solubilité du dihydrogène et la nécessité d'assimiler du carbone minéral pour la croissance des bactéries [32,60]. En conséquence, en hydrogénotrophie, l'accumulation des nitrites était plus importante et directement liée au pH.

Enfin, cette expérience a mis en lumière que la dénitrification a un effet sur le pH malgré l'ajout d'un tampon carbonate dans le milieu de culture. Il a été observé des élévations de pH dans les cultures en présence d'acétate ou en présence de dihydrogène. L'influence des réactions de dénitrification sur le pH est discutée plus en détail dans la partie qui suit.

III.2. Simulation de l'évolution du pH lors de la dénitrification

Cette partie présente les calculs qui ont permis de simuler l'évolution du pH pendant la dénitrification dans un milieu contenant 50 mM de carbonates, en présence d'acétate ou de dihydrogène.

III.2.1. Calculs théoriques de l'évolution du pH avec acétate

Des exemples tirés de différentes expériences avec acétate, sont présentés dans la Figure 35.

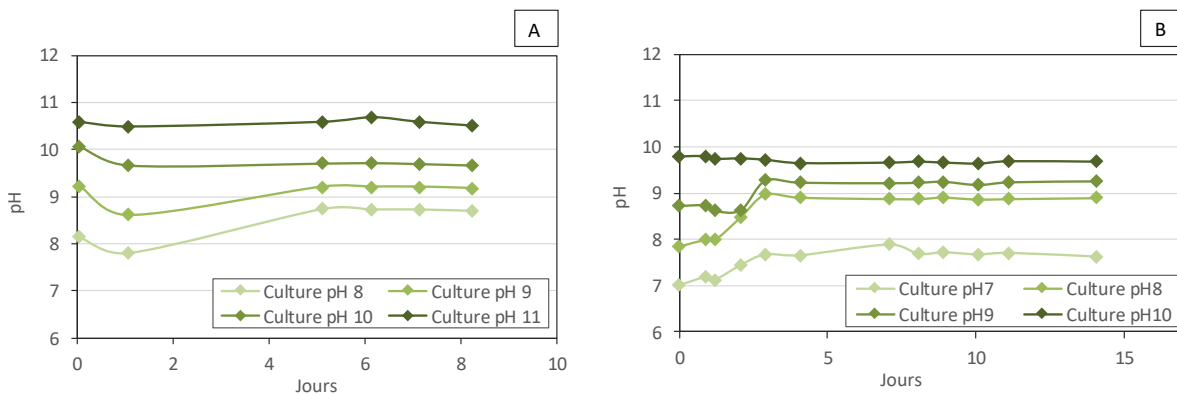


Figure 35 : Evolution du pH dans des cultures de *P. denitrificans* avec 20 mM d'acétate et 12 mM de nitrates dans un milieu minéral tamponné par 50 mM de carbonate, (A) expérience non détaillée dans le manuscrit, (B) expérience III.1.

Sur ces graphiques, différentes évolutions du pH sont identifiables. Pour la culture à pH 10 dans la Figure 35 (A), le pH diminue. A l'inverse, pour des pH ≤ 9 les milieux de culture s'alcalinisent. Certaines études rapportent un phénomène de « self-acidification » à pH supérieur à 9 [22,58,77] et de « self-alkalinisation » à pH neutre [136,193].

Pour déterminer le pH lors de la dénitrification, le principe des calculs est que dans un milieu alcalin en excès de carbonate, le pH peut être déterminé par l'équation d'Henderson-Hasselbalch (21). L'objectif était donc de pouvoir déterminer la concentration finale en CO₃²⁻ et HCO₃⁻ en fonction de la concentration en nitrates réduite.

$$\text{pH} = \text{pKa} + \text{Log}\left(\frac{[\text{base}]}{[\text{acide}]}\right) = 10,32 + \text{Log}\left(\frac{[\text{CO}_3^{2-}]}{[\text{HCO}_3^-]}\right) \quad (21)$$

Les calculs ont été limités au domaine de pH de 8 à 14 dans lequel seules les formes CO_3^{2-} et HCO_3^- sont présentes comme l'illustre le diagramme de prédominance de la Figure 36.

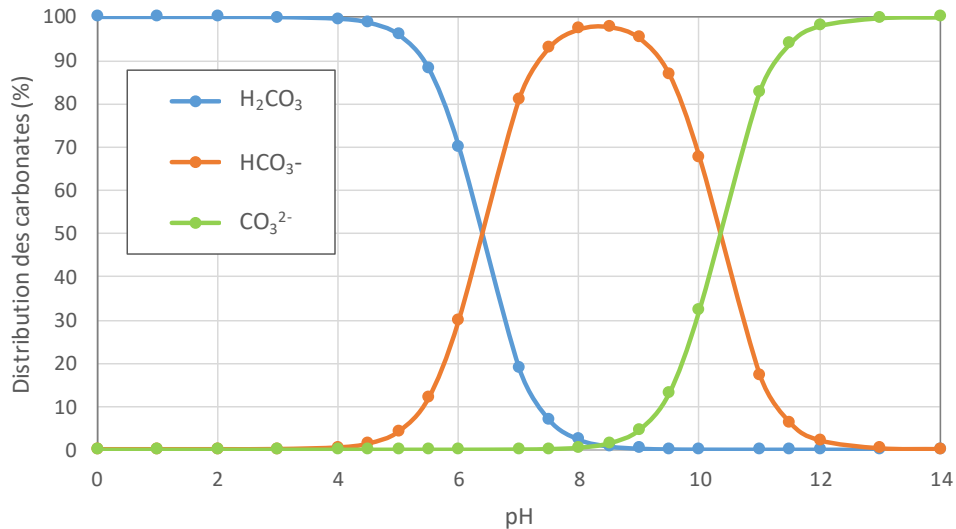
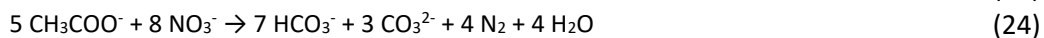
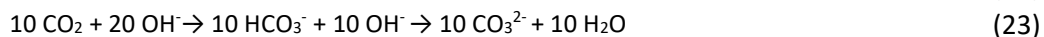
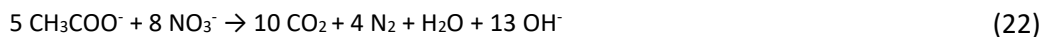


Figure 36 : Diagramme de prédominance des espèces solubles de carbonates en fonction du pH (tracé d'après l'équation de Henderson-Hasselbalch).

La réaction (22) présente le bilan de la dénitrification hétérotrophe dans laquelle 8 équivalents de nitrates et 5 équivalents d'acétate sont consommés pour former 10 équivalents de CO_2 . L'acétate ($\text{pKa} = 4,75$) est sous sa forme déprotonée dans la gamme de pH de 8 à 14. Dans cette gamme de pH, le CO_2 peut réagir avec la base forte OH^- pour former du CO_3^{2-} et/ou du HCO_3^- selon la réaction (23). En faisant l'hypothèse que tous les OH^- sont consommés par réaction acido-basique avec le CO_2 ou le HCO_3^- on obtient l'équation (24).

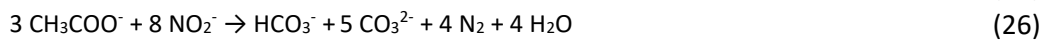


Avec l'équation Henderson-Hasselbalch (21) il est alors possible d'exprimer le pH en fonction des concentrations finales en carbonate. Les concentrations finales en carbonate peuvent être elle-même déterminées en fonction de la concentration en nitrates réduite, Tableau 15.

Tableau 15 : Calculs de pH, en présence d'acétate, en fonction de la concentration en carbonate initiale et de la concentration en nitrates réduite.

Equation de la dénitrification	$5 \text{ CH}_3\text{COO}^- + 8 \text{ NO}_3^- \rightarrow 7 \text{ HCO}_3^- + 3 \text{ CO}_3^{2-} + 4 \text{ N}_2 + 4 \text{ H}_2\text{O}$
Equivalences	$[\text{HCO}_3^-]_{\text{produit}} \Leftrightarrow 7/8 [\text{NO}_3^-]_{\text{réduit}} \quad [\text{CO}_3^{2-}]_{\text{produit}} \Leftrightarrow 3/8 [\text{NO}_3^-]_{\text{réduit}}$
Expression des concentrations en carbonate	$[\text{CO}_3^{2-}]_{\text{final}} = [\text{CO}_3^{2-}]_{\text{initial}} + [\text{CO}_3^{2-}]_{\text{produit}} = [\text{CO}_3^{2-}]_{\text{initial}} + 3/8 [\text{NO}_3^-]_{\text{réduit}}$ $[\text{HCO}_3^-]_{\text{final}} = [\text{HCO}_3^-]_{\text{initial}} + [\text{HCO}_3^-]_{\text{produit}} = [\text{HCO}_3^-]_{\text{initial}} + 7/8 [\text{NO}_3^-]_{\text{réduit}}$
Equation de Henderson-Hasselbalch	$\text{pH} = 10.32 + \text{Log} \left(\frac{[\text{CO}_3^{2-}]_{\text{final}}}{[\text{HCO}_3^-]_{\text{final}}} \right)$
Equation finale	$\text{pH} = 10.32 + \text{Log} \left(\frac{[\text{CO}_3^{2-}]_{\text{initial}} + \frac{3}{8} [\text{NO}_3^-]_{\text{réduit}}}{[\text{HCO}_3^-]_{\text{initial}} + \frac{7}{8} [\text{NO}_3^-]_{\text{réduit}}} \right)$

Les mêmes calculs peuvent être appliqués aux différentes étapes de la dénitrification. La réaction (25) présente la réduction du NO_3^- en NO_2^- . La réaction (26) présente la réduction NO_2^- en N_2 .



Finalement le pH final de la réduction des nitrates en diazote est déterminé par l'équation (27). Le pH final de la réduction des nitrates en nitrites est déterminé par l'équation de (28). Le pH final de la réduction des nitrites en diazote est déterminé par l'équation de (29)

$$\text{NO}_3^- \rightarrow \text{N}_2 \quad \text{pH} = 10,32 + \text{Log} \left(\frac{[\text{CO}_3^{2-}]_i + \frac{3}{8} [\text{NO}_3^-]}{[\text{HCO}_3^-]_i + \frac{7}{8} [\text{NO}_3^-]} \right) \quad (27)$$

$$\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \quad \text{pH} = 10,32 + \text{Log} \left(\frac{[\text{CO}_3^{2-}]_i - \frac{2}{8} [\text{NO}_3^-]}{[\text{HCO}_3^-]_i + \frac{6}{8} [\text{NO}_3^-]} \right) \quad (28)$$

$$\text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2 \quad \text{pH} = 10,32 + \text{Log} \left(\frac{[\text{CO}_3^{2-}]_i + \frac{5}{8} [\text{NO}_2^-]}{[\text{HCO}_3^-]_i + \frac{1}{8} [\text{NO}_2^-]} \right) \quad (29)$$

D'après l'équation (27), lors de la réduction des nitrates en diazote, si la concentration en carbonate initiale est négligeable devant la concentration en nitrates réduite, le pH final s'équilibre vers 9,95 (= 10,32 + log (3/7)). Lors de la réduction des nitrites en diazote (équation (29)), si la concentration de carbonates initiale est négligeable par rapport à la concentration en nitrites réduite, le pH final s'équilibre vers 11,02 (= 10,32 + log (5)). En revanche pendant la réduction des nitrates en nitrites (équation (28)), le pH diminue de manière hétérogène selon le pH initial. Si la quantité de CO_3^{2-} initiale

est inférieure ou égale à 2/8 de la concentration en nitrates réduite alors le pH n'est plus calculable par l'équation du Tableau 15. Le pH s'exprime alors en fonction des formes HCO_3^- et H_2CO_3 . Ces calculs ne sont pas présentés car ils correspondent à une gamme de pH inférieure à 8, Figure 36.

D'après les équations (27), (28) et (29) dans un milieu avec 50 mM de carbonates et une concentration jamais limitante en acétate, le pH suit les courbes d'évolution de la Figure 37.

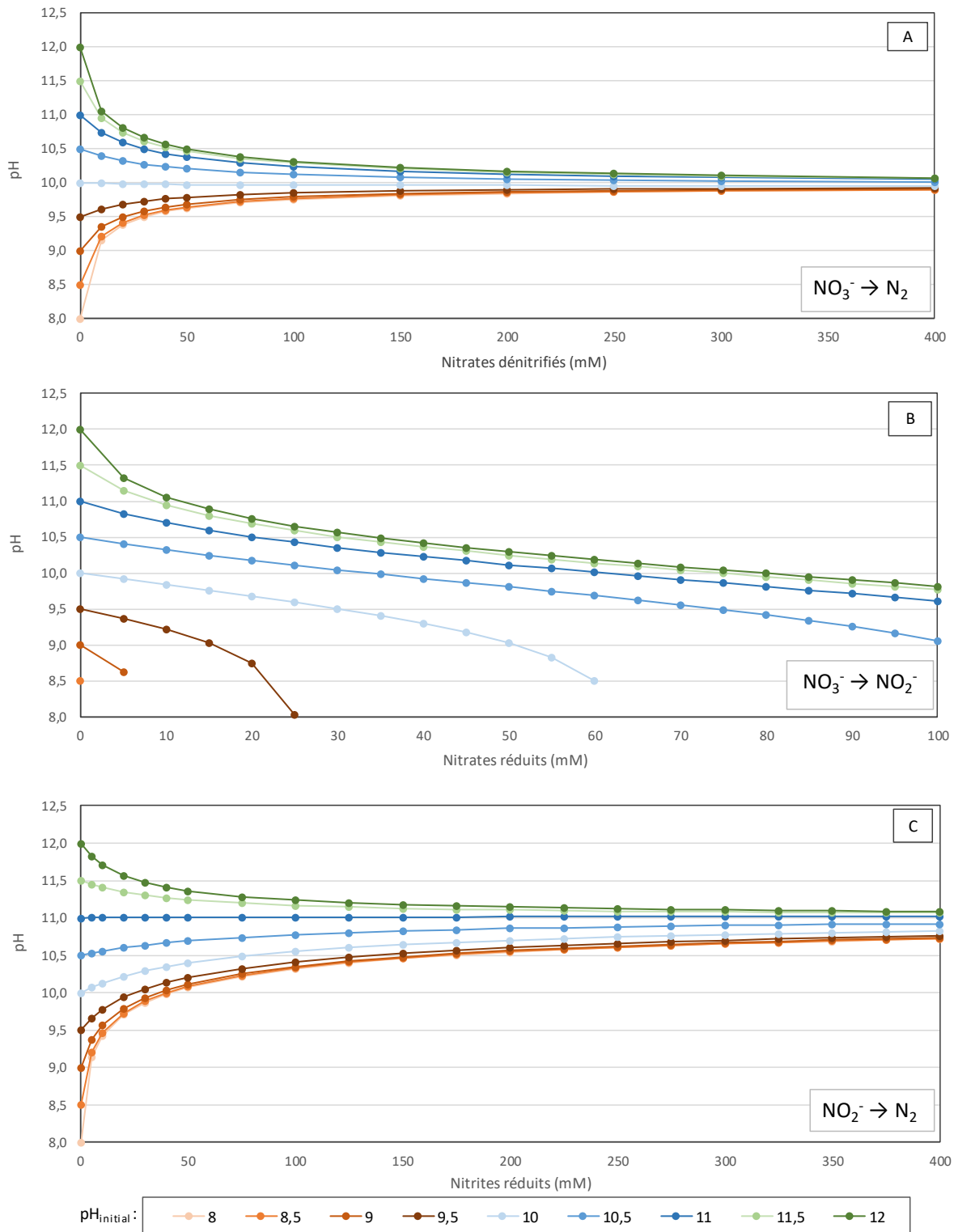


Figure 37 : Courbes d'évolutions théoriques du pH d'une culture, en présence d'acétate non limitant et de 50 mM de carbonate, en fonction du pH initial et de la concentration en nitrates ou en nitrites réduite : (A) réduction des nitrates en diazote, (B) réduction des nitrates en nitrites, (C) réduction des nitrites en diazote.

La Figure 37, illustre qu'il faut utiliser des quantités de carbonates largement supérieures aux concentrations en nitrates pour espérer tamponner efficacement le pH. L'utilisation de 50 mM de

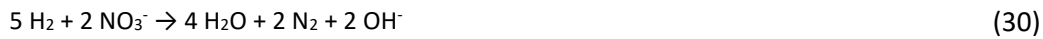
carbonate a donc permis de stabiliser le pH, mais pas de le fixer. Lors de la dénitrification avec acétate il y a potentiellement donc trois évolutions distinctes du pH :

- (i) lors de la dénitrification jusqu'au diazote le pH du milieu tend vers 10, il peut être acidifié ou alcalinisé selon le pH initial,
- (ii) lors de la réduction des nitrates en nitrites le pH du milieu est acidifié,
- (iii) lors de la réduction des nitrites en N₂ le pH tend vers 11, les milieux à pH < 11 sont donc alcalinisés,

Toutes ces tendances sont vérifiées ont été comparées plus amplement avec les résultats expérimentaux des chapitres suivants.

III.2.1. Calculs théoriques de l'évolution du pH avec dihydrogène

L'équation bilan de la dénitrification hydrogénotrophe est présentée dans la réaction (30). Avec dihydrogène il n'y pas de production de CO₂ qui puisse acidifier le pH. L'alcalinisation générée par la réduction des nitrates n'est donc pas contrebalancée.



Dans le milieu, les concentrations finales en carbonate sont donc uniquement dépendantes de la production de OH⁻ car il réagit avec le HCO₃⁻ pour former du CO₃²⁻. De la même manière le pH peut être exprimé à partir de l'équation Henderson-Hasselbalch (21) en fonction des concentrations finales en carbonate, Tableau 16.

Tableau 16 : Calculs de pH, en présence de dihydrogène, en fonction de la concentration en carbonate initiale et de la concentration en nitrates réduite.

Equation de la dénitrification	$5 \text{ H}_2 + 2 \text{ NO}_3^- \rightarrow 4 \text{ H}_2\text{O} + 2 \text{ N}_2 + 2 \text{ OH}^-$
Equivalences	$[\text{HCO}_3^-]_{\text{consommé}} \Leftrightarrow [\text{OH}^-]_{\text{produit}} \Leftrightarrow [\text{NO}_3^-]_{\text{réduit}}$ $[\text{CO}_3^{2-}]_{\text{produit}} \Leftrightarrow [\text{OH}^-]_{\text{produit}} \Leftrightarrow [\text{NO}_3^-]_{\text{réduit}}$
Expression des concentrations en carbonate	$[\text{CO}_3^{2-}]_{\text{final}} = [\text{CO}_3^{2-}]_{\text{initial}} + [\text{CO}_3^{2-}]_{\text{produit}} = [\text{CO}_3^{2-}]_{\text{initial}} + [\text{NO}_3^-]_{\text{réduit}}$ $[\text{HCO}_3^-]_{\text{final}} = [\text{HCO}_3^-]_{\text{initial}} - [\text{HCO}_3^-]_{\text{consommé}} = [\text{HCO}_3^-]_{\text{initial}} - [\text{NO}_3^-]_{\text{réduit}}$
Equation de Henderson-Hasselbalch	$\text{pH} = 10.32 + \text{Log} \left(\frac{[\text{CO}_3^{2-}]_{\text{final}}}{[\text{HCO}_3^-]_{\text{final}}} \right)$
Equation finale	$\text{pH} = 10.32 + \text{Log} \left(\frac{[\text{CO}_3^{2-}]_{\text{initial}} + [\text{NO}_3^-]}{[\text{HCO}_3^-]_{\text{initial}} - [\text{NO}_3^-]} \right)$

Pour mémoire c'est uniquement la réduction des nitrites en monoxyde d'azote qui génère l'alcalinité lors de la dénitrification hydrogénotrophe [26], réaction (31). Les coefficients stœchiométriques des réactions (31) et (30) sont identiques, les calculs du Tableau 16 s'appliquent donc à la réduction des nitrites en monoxyde d'azote.



Finalement l'évolution du pH lors la réduction des nitrates en diazote peut se calculer à partir de l'équation (32). L'évolution du pH lors de la réduction des nitrites en monoxyde d'azote peut se calculer à partir de l'équation (33).

$$\text{NO}_3^- \rightarrow \text{N}_2 \quad \text{pH} = 10,32 + \text{Log} \left(\frac{[\text{CO}_3^{2-}]_i + [\text{NO}_3^-]}{[\text{HCO}_3^-]_i - [\text{NO}_3^-]} \right) \quad (32)$$

$$\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \quad \text{pH} = 10,32 + \text{Log} \left(\frac{[\text{CO}_3^{2-}]_i + [\text{NO}_2^-]}{[\text{HCO}_3^-]_i - [\text{NO}_2^-]} \right) \quad (33)$$

L'équation (32) ou (33) sont valables tant que la concentration finale en HCO_3^- n'est pas négligeable c'est-à-dire si $[\text{HCO}_3^-]_i \leq [\text{NO}_3^-]$ (ou $[\text{NO}_2^-]$). Au-delà de cette limite, le pH n'est plus déterminé par les carbonates. Le pH est alors directement lié à la génération de OH^- avec $\text{pOH} = -\log([\text{OH}^-])$. D'après les équations (32) et (33) dans un milieu avec 50 mM de carbonates et une alimentation en dihydrogène jamais limitante, le pH suit les courbes d'évolution de la Figure 38. Les pointillés sur les courbes représentent le moment à partir duquel le pH est directement calculé à partir de pOH.

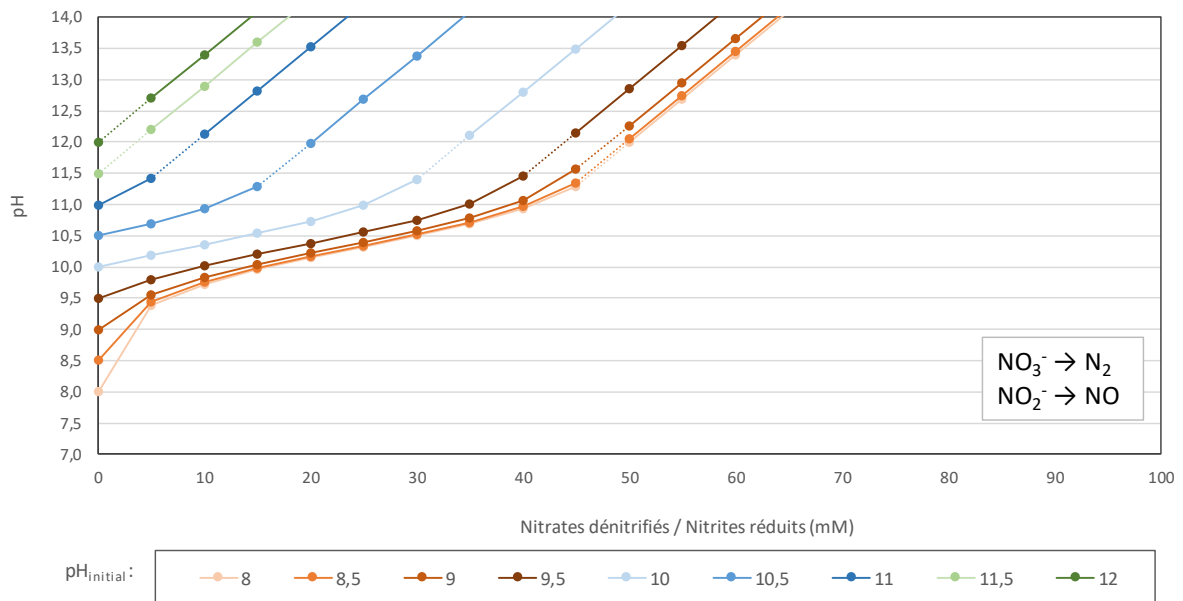


Figure 38 : Courbes d'évolutions théoriques du pH d'une culture bactérienne dénitrifiante alimentée avec du dihydrogène en fonction du pH initial et de la concentration en nitrates réduite en diazote ou de la concentration en nitrites réduite en monoxyde d'azote.

D'après la Figure 38 en hydrogénotropie, au fur et à mesure que les nitrates ou nitrites sont réduits le pH augmente quel que soit le pH initial. Plus précisément, la réduction des nitrites en monoxyde d'azote est l'étape verrou qui alcalinise encore plus le pH du milieu, ce qui explique pourquoi des accumulations de nitrites sont souvent observées dans les cultures hydrogénotropes.

Cependant en hydrogénotropie, l'assimilation de carbone minéral peut aussi provoquer l'élévation du pH. En effet, la consommation de CO_2 va déplacer l'équilibre des carbonates et produire des OH^- comme indiqué dans la réaction (34). La production de 1 ou 2 équivalents OH^- va déplacer l'équilibre des carbonates en faveur de CO_3^{2-} et alcaliniser le pH.



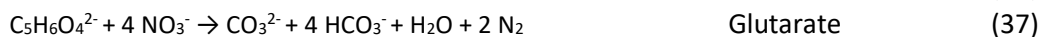
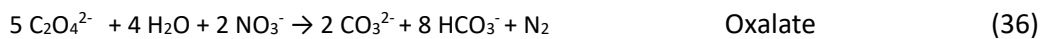
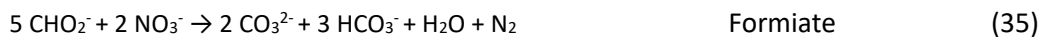
Ainsi la consommation de le CO_2 alcalinise le pH, mais il est difficile d'évaluer cette alcalinisation étant donné qu'au moins six voies différentes d'assimilation du carbone ont été observées [121,122]. De plus, certaines bactéries possèdent les enzymes pour assimiler le HCO_3^- plutôt que du CO_2 . C'est pourquoi les calculs théoriques de l'évolution du pH lors de la dénitrification hydrogénotrophe présentés dans la Figure 38 sont à priori juste si la croissance d'une culture est nulle. En hétérotrophie l'acétate n'est pas nécessairement modifié avant d'être assimilé car il est déjà directement utilisé dans plusieurs voies métaboliques. L'impact sur le pH lors de l'assimilation d'acétate est donc négligeable comparé aux concentrations élevées en nitrates.

Conclusions :

Lorsque la dénitrification est couplée à l'oxydation de l'acétate, la production de CO_2 peut compenser l'alcalinisation liée à la dénitrification. En conséquence avec acétate, lors de la dénitrification de quantités élevées de nitrates, le pH tend vers 10. Si les nitrites s'accumulent le pH de la culture suit deux évolutions de pH différentes. D'abord, pendant la réduction des nitrates en nitrites le pH diminue. Puis pendant la réduction des nitrites en diazote le pH tend vers 11, ce qui équivaut à une alcalinisation pour les milieux à $\text{pH} < 11$. La réduction des nitrites est donc l'étape clé qui génère l'alcalinité lors de la dénitrification.

Avec dihydrogène le pH s'élève quel que soit le pH initial dès lors que les nitrites sont réduits. L'oxydation du dihydrogène n'est pas suffisante pour contrebalancer la réduction des nitrites. De plus, en parallèle de la dénitrification, l'assimilation de carbone minéral alcalinise aussi le milieu. Comme il existe plusieurs voies d'assimilation et deux formes de carbone assimilées il est difficile de prédire le pH final des cultures hydrogénotrophes.

L'évolution du pH peut aussi être simulée lors de la dénitrification avec d'autres acides organiques étudiés dans le cadre de l'objectif 8 du projet GL CTEC de l'Andra : acide formique, oxalique, glutarique et phtalique. L'objectif 8 intitulé « Déchets organiques - Stabilité biogéochimique des composés organiques dissous » se concentre sur l'étude des acides organiques dans le contexte de stockage de déchets radioactifs. A l'instar de l'acide acétique, les acides : formique, oxalique, glutarique et phtalique sont susceptibles d'être présents dans l'enceinte de stockage de déchets radioactifs. En supposant que ces acides organiques soient totalement oxydés en CO_2 , les réactions bilan ci-dessous ont permis de tracer les graphiques présentés dans la Figure 39, toujours pour une concentration en carbonate fixée à 50 mM.



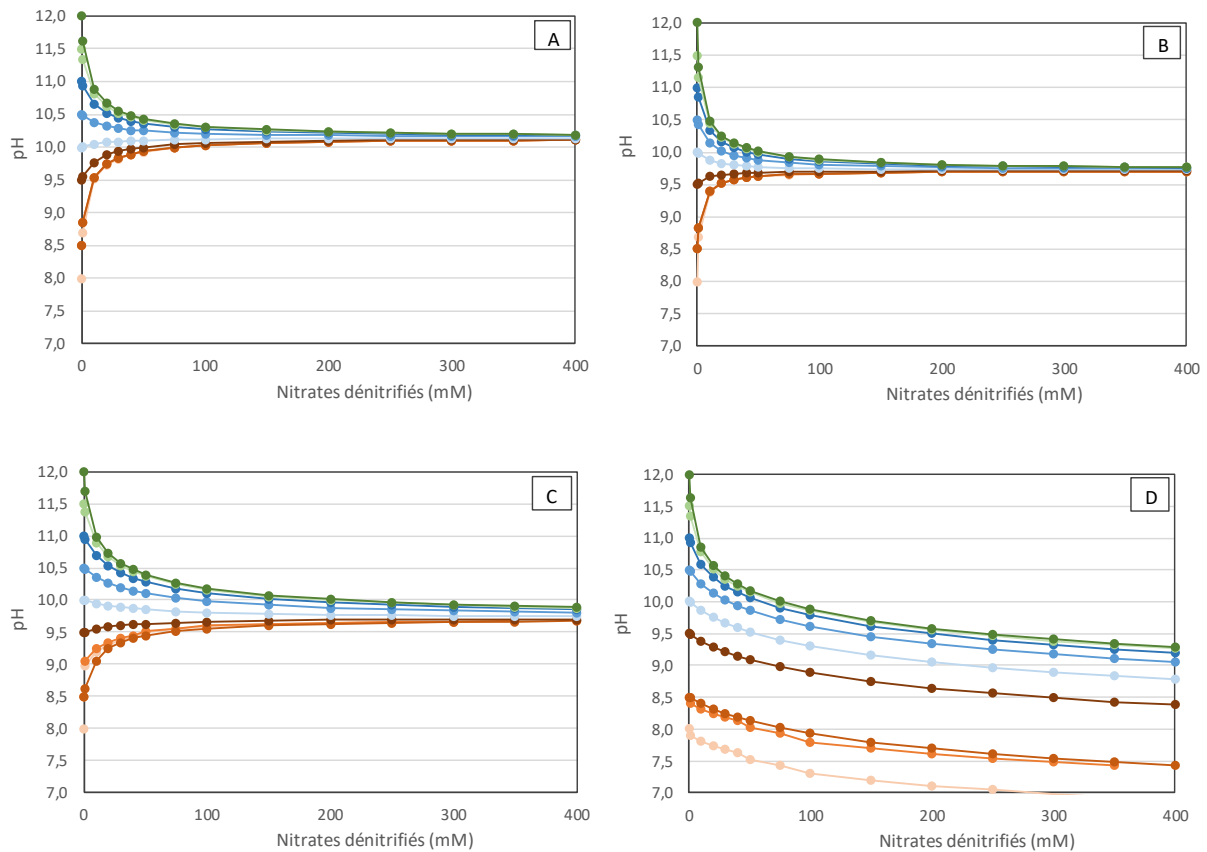


Figure 39 : Evolutions du pH de cultures bactériennes en présence de formiate (A), oxalate (B), glutarate (C) et phtalate (D) en fonction du pH initial et de la concentration en nitrates réduite en diazote.

Pour des concentrations élevées de nitrates dénitrifiés, en présence de formiate (1 Carbone), d'acétate (2 C), d'oxalate (2 C) et de glutarate (5 C) le pH tend à s'équilibrer respectivement vers 10,1, 10,0, 9,7 et 9,7. Pour le phtalate (8 C) la consommation d' OH^- et la production de CO_2 sont telles que le milieu s'acidifie quel que soit le pH initial. L'évolution du pH lors de l'oxydation d'un acide organique semble donc être liée au nombre de carbone oxydables en CO_2 et à l'état d'oxydation initial de ses carbones. Dans les alvéoles de stockage, les bactéries ont donc un moyen d'acidifier le pH en couplant la dénitrification à l'oxydation de la matière organique en CO_2 .

III.3. Comparaisons de deux méthodes d'acclimatation

L'expérience III.1, a montré que *P. denitrificans* pouvait dénitrifier jusqu'à pH 9 en présence d'acétate. *P. denitrificans* était directement exposé à des pH alcalins sans aucune procédure d'acclimatation. Dans cette partie deux méthodes d'acclimatation ont été testées afin d'évaluer la tolérance de *P. denitrificans* lorsqu'elle est confrontée à des pH progressivement élevés ou des concentrations en nitrates progressivement élevées. Des réacteurs batch successifs ont permis d'effectuer une élévation graduelle du pH ou de la concentration en nitrates. Puis un réacteur alimenté en continu a permis d'élever en continu et de façon progressive le pH d'une culture.

III.3.1. Comparaison de deux méthodes d'acclimatation à une élévation progressive de pH

Des cultures batch de *P. denitrificans* confrontées directement à des pH alcalins ont été comparées à des cultures acclimatées soit par des réacteurs batch successifs soit par un réacteur alimenté en continu. Les travaux réalisés ont fait l'objet de l'article intitulé « Adaptation of neutrophilic *Paracoccus denitrificans* to denitrification at highly alkaline pH » soumis en tant que short communication dans le journal *Environmental Science and Pollution Research*.

Adaptation of neutrophilic *Paracoccus denitrificans* to denitrification at highly alkaline pH

Keywords

Nitrate reduction; High pH; Denitrifying bacteria; Acclimation; Batch and continuous bioreactors

Abstract

Bacterial denitrification is widely documented at neutral pH in order to improve the removal of nitrate in wastewater treatment processes. However, certain industrial contexts generate alkaline waste and effluent containing nitrate that must be denitrified. To obtain more information on denitrification at alkaline pH, this study evaluated the possibility of adapting a neutrophilic denitrifying strain, *Paracoccus denitrificans*, to alkaline pH. Firstly, *P. denitrificans*' denitrifying activity was evaluated without acclimation in batch bioreactors at pH 7.0, 8.0, 9.0 and 10.0. Then, two acclimation methods using successive batch bioreactors and a continuous bioreactor allowed *P. denitrificans* to be gradually exposed to alkaline pH: from 8.5 to 11.2 in 26 and 72 days respectively. Results showed that *P. denitrificans* could grow and catalyse nitrate reduction (i) at pH 9.0 without acclimation, (ii) at pH 10.5 in successive batch cultures with progressively increasing pH, and (iii) at pH 10.8 in continuously fed culture with a hydraulic retention time (HRT) of 8 days. It was shown that denitrification affected the pH despite the presence of carbonate buffering of the *P. denitrificans* growth medium. With acetate as an electron donor, the pH of a carbonate buffered medium tends towards pH 10 during the process of denitrification.

1. Introduction

Nitrate pollution is a persistent health and environmental problem on a worldwide scale. Among the sectors giving rise to large fluxes of nitrate, several industries generate effluent and waste also associated with alkaline pH levels. The disposal of radioactive waste deep underground faces a nitrate leaching issue with an expected pH between 9 and 13 [4,9,12,22] and effluent from a stainless steel plant can reach pH 9.6 [42]. Denitrification has also been tested in alkaline soils (pH \approx 10) polluted by agriculture, sampled in the former Lake Texcoco in Mexico [52].

Bacterial denitrification is an efficient and economical solution for nitrate removal in a polluted environment [40,41]. It is a reduction of nitrate to dinitrogen via four successive reduction steps ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$). The bacterial denitrification process is particularly well documented in the literature for a pH range from neutral to sub-alkaline (pH 7 to 9) [32,194,195]. Several studies have evaluated denitrification in alkaline contexts to meet the industrial needs mentioned above. Some studies used alkaliphilic inoculate already adapted to high pH levels [21,33,146] while others tested the acclimation of neutrophilic consortia to alkaline pH. Dhamole et al. succeed in acclimating activated sludge from pH 7.5 to 11.5 [37]. However, with consortium inocula, it is rather unclear whether there is an enrichment of the population by a selection of alkaliphilic bacteria or whether bacteria evolve and adapt to alkaline pH. Therefore, the fundamental question that is addressed here is whether it is possible for a neutrophilic bacterium to adapt to alkaline pH.

To evaluate the adaptability of a bacterium to alkaline pH, a neutrophilic single strain *P. denitrificans* was confronted with alkaline pH. The success of its adaptation was evaluated through its activity (acetate and nitrate reduction). *P. denitrificans* was chosen as model strain because it is able to produce the four reductases leading to the complete reduction of nitrate to N₂ [191] and it has a versatile metabolism adaptable to various environments [28,132]. *P. denitrificans* has already been thoroughly investigated as a denitrifying model ; it is a Gram-negative, non-mobile, facultative anaerobic bacterium. The optimal pH for *P. denitrificans* activity is around pH 8 [28,73].

To successfully adapt bacteria to a stressful environment, acclimation procedures that apply progressive environmental modifications have been tested. The key to the acclimation procedure to alkaline pH is certainly related to the balance between the rate of the pH elevation and the time of bacteria generation, as adaptation occurs through mutations and selection [196]. It has already been shown that bacterial strains are capable of adapting, on time scales from an hour to a day, to different environmental changes, such as glucose [197] or oxygen [198] limitation. In the present work, two acclimation procedures, successive inoculation in batch reactors and a continuous reactor, inspired by [199], were compared with cultivation without an acclimation method:

- Direct batch exposure in bioreactors where the pH was initially set at 7.0, 8.0, 9.0, or 10.0.
- A gradual increase from pH 8.5 to 11.2 by successive inoculations in batch bioreactors (Δ pH \approx 1 every 10 days)
- A gradual increase from pH 8.5 to 11.2 in a continuous-feed bioreactor (pH increase over 72 days)

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strain *P. denitrificans* and growth medium

P. denitrificans was purchased from DSMZ (strain n°413). The growth medium was based on DSMZ growth medium 81 recommended for *P. denitrificans* optimal activity. Distilled water was supplemented with 1g NH₄Cl, 0.5 g MgSO₄, 0.01 g CaCl₂, 0.05 g Fe(NH₄)citrate, 4.2 g (50 mM) NaHCO₃ and 10 mL of trace solution (ATCC) per litre. 20 mM acetate and 10 mM nitrate were added, this ratio being used to prevent acetate from becoming limiting. The final medium COD was 1.2 g/L. Carbonate (NaHCO₃) was added as a buffer solution to stabilize the pH. The pH of the growth medium was adjusted by NaOH and HCl 1M. Bioreactors were stirred at 200 rpm and the temperature was set at 30°C, the optimal temperature for *P. denitrificans* [28,73,132].

2.2. Batch bioreactors:

Batch bioreactors were 150 mL hermetic glass flasks, containing 100 mL of growth medium flushed with N₂ after each opening to maintain anaerobic conditions.

2.2.1. Independent batch cultures

Four batch bioreactors at pH 7.0, 8.0, 9.0 and 10.0 were inoculated simultaneously with 1 mL of a preculture at an optical density of 0.2 (preculture = one week of culture at pH 8.0, with 20 mM acetate and 10 mM nitrate).

2.2.2. Acclimation by successive cultures

One millilitre of the same preculture as in independent batch cultures was used to inoculate the first culture at pH 8.5. When the culture reached maximal optical density (OD), 5 mL of this culture was used to inoculate the second culture at pH 9.5. This re-inoculation process was used successively at pH 10.5 and 11.2. Finally, the pH gradually increased from 8.5 to 11.2 in 26 days (Δ pH \approx 1 every 10 days).

2.3. Continuous bioreactor:

A glass bioreactor of 2.3 L was inoculated with 23 mL of preculture at 0.2 OD (preculture = one week culture at pH 8.0, with 20 mM acetate and 10 mM nitrate). The reactor was fed with the fresh medium by a peristaltic pump. In order to slowly increase the pH in the reactor and minimize cell washout, the feeding flow was adjusted to 0.2 ml.min⁻¹, the lowest that was possible without clogging the pipes. Therefore the HRT was set to 8 days, (HRT = volume of reactor / influent flow-rate [200]). Anaerobic conditions were maintained by a constant N₂ gas flow of 80 mL.min⁻¹. The pH was continuously increased from 8.5 to 11.2 over 72 days by increasing the feeding medium pH. The overall pH increase rate was 0.04 units per day. From day 72 to day 87 and from day 92 to day 125, the feeding was stopped and the reactor was monitored in batch mode. Two successive batch periods were set at pH 10.8 to obtain a better reading of *P. denitrificans* activity. Between these two batch periods (from day 87 to 92), the pH was increased to 10.8 by temporary continuous feeding.

2.4. Growth medium analysis:

2.4.1. Optical density

Bacterial cell density was evaluated by measuring OD at 600 nm with a spectrophotometer (JENWAY 7315).

2.4.2. Chemical analysis

After sample filtration at 0.22 µm (Minisart PES, Fisher Scientific), soluble nitrate, nitrite, and acetate concentrations were quantified by high-performance ion chromatography (Dionex ICS-3000) coupled to a conductometric detector with a chemical suppressor (Thermo Scientific ADRS 600, 4 mm). A Thermo Scientific IonPac AS11-HC analytical column (4 x 250 mm) was used with an AG11-HC guard column (4 x 50 mm) and a KOH elution gradient. The details of the method are described in [23].

2.4.3. pH monitoring

Fisherbrand pH probes with gel electrolyte connected to a multi-channel Consort data logger (model C3060) were used to monitor the pH.

3. Results

3.1. Acclimation of batch cultures

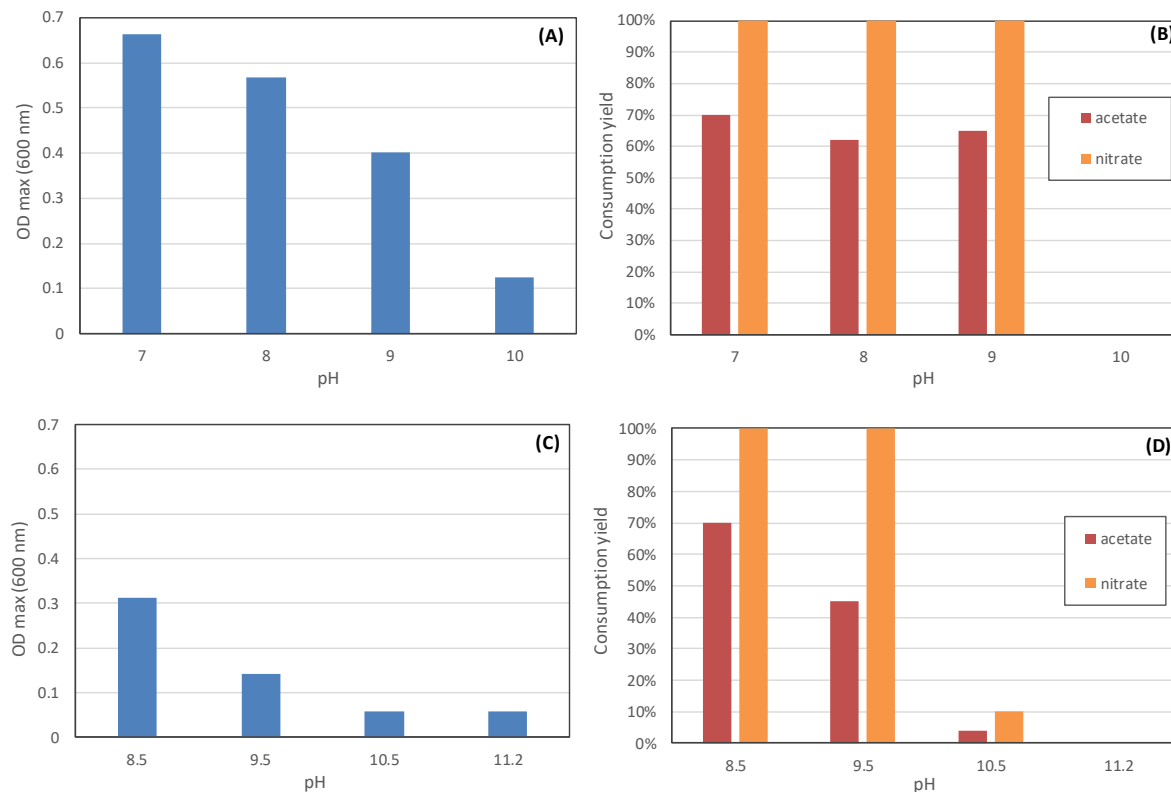
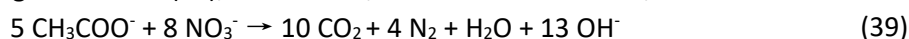


Figure 40: Effect of the pH increase on OD evolution and on acetate and nitrate consumption yields for *P. denitrificans* batch cultures without acclimation (A and B) and for *P. denitrificans* batch cultures with successive inoculations (C and D).

3.1.1. Independent batch cultures

According to Figure 40 (A), the maximum OD decreased as the pH increased. At pH 10.0, a pronounced drop in OD marked a decline in the growth of *P. denitrificans*. The nitrate reduction yield was 100% from pH 7.0 to pH 9.0 (Figure 40 (B)). At the same time, the acetate reduction yield was around 65 %. Therefore, the molar ratio of acetate/nitrate consumed was 0.65, which is close to the stoichiometric ratio of the complete bacterial denitrification into dinitrogen occurring with acetate as the electron donor. According to reaction (39), the acetate/nitrate molar ratio is $5/8 = 0.625$.



At pH 10.0, no reduction was detectable. Without any particular acclimation, *P. denitrificans* was able to maintain an observable denitrifying activity only up to pH 9.0. The activity of *P. denitrificans* stopped at a pH between 9.0 and 10.0.

3.1.2. Acclimation by successive inoculations

In this experiment, the pH values investigated were shifted to obtain information on the activity of *P. denitrificans* at different pH, especially between pH 9.0 and 10.0. According to Figure 40 (C), the growth of *P. denitrificans* fell by more than 60% between pH 8.5 and pH 9.5. At pH 10.5 and 11.2, a negligible cellular proliferation of *P. denitrificans* cells was observed. The nitrate consumption yield was 100 %

at pH 8.5 and pH 9.5, Figure 40 (D). Despite lower OD values compared to the independent batch experiments, *P. denitrificans* was able to remove all the nitrate. So *P. denitrificans* was successfully adapted to pH 8.5 and 9.5. The consumption of acetate decreased with increasing pH. At pH 9.5 the acetate/nitrate ratio was 0.45 – below the stoichiometric ratio of 5/8. It can be considered that the denitrification was partial, a part of nitrate was not reduced to the dinitrogen stage. At pH 10.5 the nitrate reduction yield was 10%. Thus, acclimation by successive inoculations enabled *P. denitrificans* to maintain a low nitrate reduction at pH up to 10.5 with negligible cell growth.

3.2. Acclimation in a continuous bioreactor

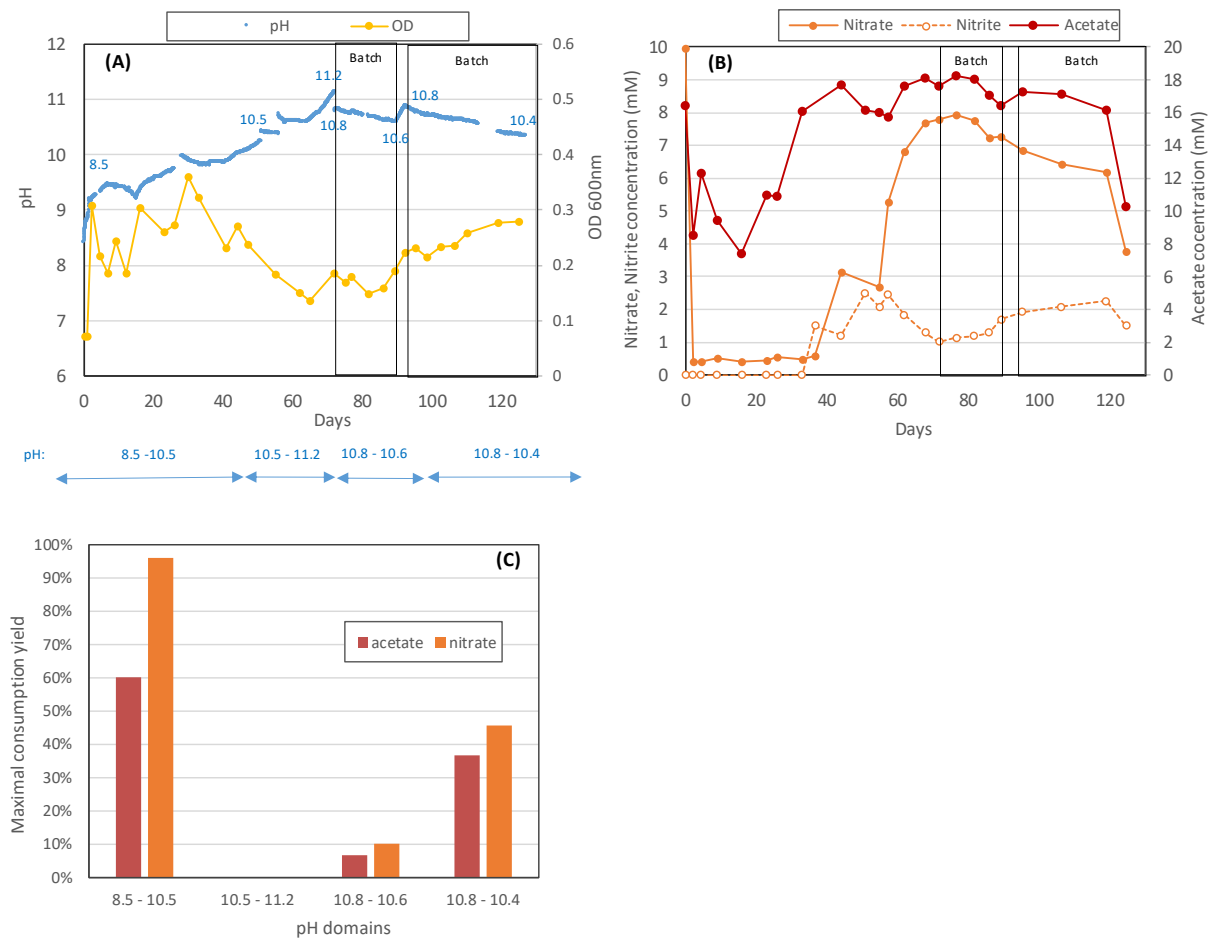


Figure 41: Effect of the pH increase on the evolutions of OD and pH (A), nitrate, nitrite, and acetate concentrations (B), acetate and nitrate consumption yield (C) for *P. denitrificans* cultivation in a continuous flow bioreactor.

From day 0 to day 72, the pH of the medium in the continuous flow bioreactor was progressively raised from 8.5 to 11.2 by modulating the pH of the fresh medium supply. Starting from day 72, no further denitrifying activity was detectable from *P. denitrificans* and, therefore, the continuous supply of fresh medium was stopped. A first batch period was operated simultaneously to a manual pH decrease to 10.8 (batch period means the interruption of fresh medium supply). During this first batch period of 15 days, the pH decreased to 10.6. Then for 5 days, the fresh medium was supplied again to increase the pH from 10.6 to 10.8 for the start of the second batch period on day 92. During the second batch period, the pH decreased again from 10.8 to 10.4 in 33 days. In order to facilitate the analysis of the

results, the timeline of the experiment was segmented into four distinct periods defined by the pH, the OD, and the nitrate consumption yield evolutions, as reported in Figure 41 (A):

- [8.5-10.5]: The OD reached a maximum value of 0.36. Both nitrate and nitrite reductions were almost total (Figure 41 (B) and (D)).
- [10.5-11.2]: The OD decreased while the concentration of nitrate increased in the bioreactor. Nitrate reduction and bacterial growth were negligible while fresh medium supplied 10 mM nitrate continuously at 0.2 mL.min⁻¹.
- [10.8-10.6]: During the first batch phase, the OD remained constant; a slight reduction of 1.2 mM of nitrate (10%) was observed.
- [10.8-10.4]: During the second batch phase, the OD increased and 45 % of the nitrate was reduced. Nitrate consumption and cell growth clearly accelerated during the second batch period. During the first batch period, *P. denitrificans* was still slowed down by the former alkaline pH at 11.2; then, during the second batch period, *P. denitrificans* successfully adapted to pH 10.8.

3.3. Discussion

Without acclimation, *P. denitrificans* could reduce nitrate at a pH of up to 9.0 but not at pH 10.0. In other words, *P. denitrificans* could not adapt to a pH rise greater than one pH unit. With the method using successive cultures in batch bioreactors, the pH was increased from 8.5 to 11.2 in 26 days by pH shifts of one pH unit (0.7 for the last iteration). *P. denitrificans* was able to reduce nitrate up to pH 10.5 with this method. The exposure time at each increasing pH was about one week, Table 17. Considering the generation time of *P. denitrificans*, which was estimated at 20 hours at pH 9 in a control culture (results not presented), 7 days offered the possibility for several generations to multiply during the time of the successive batch experiments. However, increasing the pH by one pH unit likely induced a sharp change that caused cell growth inhibition.

Using the continuous pH acclimation procedure, the pH was progressively elevated from 8.5 to 11.2 in 72 days, Table 17. As a result, *P. denitrificans* was able to reduce nitrate at pH 10.8, and survive at pH 11.2 for 24 hours. However, the growth of *P. denitrificans* became particularly slow at pH above 10.5. The bacterial cells were leached out of the bioreactor by the flow of the fresh medium. The interruption of fresh medium flow, i.e. the transition from continuous to batch operation, made it possible to restore the growth of *P. denitrificans* in the bioreactor and consequently to observe a further quantifiable reduction of nitrate. In conclusion, at pH > 10.5, batch periods were necessary to detect the denitrifying activity of *P. denitrificans*. These results highlight the importance of time and of progressive changes in the acclimation method.

Table 17: Overview of the initial pH, nitrite reduction, duration of each batch culture or continuous culture period, and the pH evolution for each experimental test condition.

	pH	Nitrite reduction	Time (days)	pH evolution
Cultures without acclimation	7	Total	14	↗ to 8
	8	Total	14	↗ to 9
	9	Total	14	↗ to 9.4
	10	Null	14	=
Cultures acclimated by successive inoculations	8.5	Total	4	↗ to 9.2
	9.5	Total	10	↗ to 9.6
	10.5	Total	12	=
	11.2	Null	12	=
Culture acclimated in a continuous flow bioreactor	8.5 - 10.5	Total	52	↗
	10.5 - 11.2	Null	20	↗
	10.8 - 10.6	Null	15	↘
	10.8 - 10.4	Total	33	↘

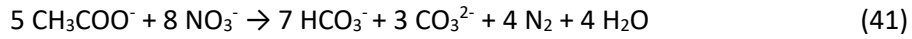
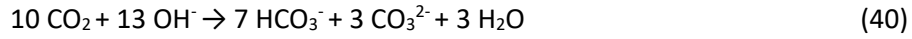
To adapt to alkaline pH, *P. denitrificans* is thought to use pH sensors to trigger pH regulation systems. Bacterial pH sensors have been described in the literature, usually as transcriptional factors, sigma factors or other DNA binding proteins [201]. In *E. coli*, the Na/H transporter also plays a role in detecting pH changes [201]. Then, at alkaline pH, several pH regulation systems, such as the membrane transporters Na/H or K/H or drugs/H would be stimulated [141,202]. To adapt to long-term environmental change, new adaptive mechanisms can emerge by means of spontaneous mutations acquired over generations and selected in response to the environmental pH pressure. According to the evolutionary convergence theory, two distinct bacterial species facing the same environmental pressure may develop a similar adaptive characteristic. Therefore, the adaptive mechanisms acquired by *P. denitrificans*, confronted to a high pH, could be similar to, or at least serve the same purpose as, those described for other alkaliphilic bacteria:

- Modifications of the cell wall to shift the permeability to protons [133,139,141].
- Creation of microenvironments protected from alkaline pH by cells structuring into biofilm, or cell membrane structuration into micro-domains [139,152].
- Stimulation of the synthesis of membrane transporters maintaining proton flows towards the cytosol: Na/H anti-transporters, K/H anti-transporters, and the Mrp(Na/H) anti-transporter [133,139].
- Modifications in the amino acid sequence of proteins causing structural changes (multiplication of hydrogen and hydrophobic bonds etc.) to adapt their pH tolerance [142–144].
- Synthesis of chaperone proteins that restore the functional structure of proteins denatured by high pH [141,152].

Results also showed that, during bacterial denitrification, the pH of the medium could increase or decrease despite the presence of carbonate buffering the solution. In batch cultures with an initial pH below pH 9.5, the pH systematically increased. In the continuous bioreactor, during the two batch periods at pH 10.8, the pH decreased. Therefore, according to the initial pH, two opposite pH evolutions were observed: acidification starting from pH 10.8 and alkalization at pH < 9.5. Similarly,

in the literature, "self-acidification" at high pH of 10.0 or 11.0 [22,58,77] and "self-alkalinization" at pH 7.0 [136,193] have been reported in denitrifying cultures.

Considering a theoretical reaction in which all nitrate is reduced to dinitrogen in the presence of acetate and bacteria, it is possible to model the pH evolution from denitrification reaction (39) using the same calculation as [10]. During the reaction, the CO₂ production can acidify the solution while the OH⁻ can alkalinize the solution. Considering that, in the 8-12 pH domain, OH⁻ reacts with the CO₂, producing HCO₃⁻ and CO₃²⁻ according to reaction (40), the reaction (39) can be transformed into reaction (41).



Therefore, the final pH can be calculated by the Henderson-Hasselbalch equation according to the initial pH (determined by the initial HCO₃⁻ and CO₃²⁻ concentrations) and the concentration of nitrate reduced to dinitrogen. Equation (42) expresses the pH evolution during complete denitrification with acetate.

$$\text{pH} = 10.32 + \text{Log} \left(\frac{[\text{CO}_3^{2-}]_{\text{initial}} + \frac{3}{8} [\text{NO}_3^-]_{\text{reduced}}}{[\text{HCO}_3^-]_{\text{initial}} + \frac{7}{8} [\text{NO}_3^-]_{\text{reduced}}} \right) \quad (42)$$

$$\text{pKa} (\text{HCO}_3^- / \text{CO}_3^{2-}) = 10.32$$

$$\begin{aligned} \text{pH} &= \text{pKa} + \text{Log} \left(\frac{[\text{CO}_3^{2-}]_{\text{final}}}{[\text{HCO}_3^-]_{\text{final}}} \right) \\ \text{with:} \quad &= \text{pKa} + \text{Log} \left(\frac{[\text{CO}_3^{2-}]_{\text{initial}} + [\text{CO}_3^{2-}]_{\text{produced}}}{[\text{HCO}_3^-]_{\text{initial}} + [\text{HCO}_3^-]_{\text{produced}}} \right) \\ &= \text{pKa} + \text{Log} \left(\frac{[\text{CO}_3^{2-}]_{\text{initial}} + \frac{3}{8} [\text{NO}_3^-]_{\text{reduced}}}{[\text{HCO}_3^-]_{\text{initial}} + \frac{7}{8} [\text{NO}_3^-]_{\text{reduced}}} \right) \end{aligned}$$

According to the equation given above, during the heterotrophic denitrification with acetate, if the initial carbonate concentration is negligible compared to the nitrate reduced, the pH tends to 10.0 ($10.32 + \log(3/7) = 10.0$) regardless of the initial pH. This explains why, in the cultures at pH 10.8, the medium acidified while, in the culture below pH 9.5, the medium alkalinized. In our study with 50 mM carbonates for batch cultures at pH 7, 8, 8.5, 9 and 9.5, where both nitrate and nitrite were totally reduced (see Table 17), the theoretical final pH calculated would be respectively 9.1, 9.1, 9.2, 9.4 and 9.6. The data from the theoretical evaluation are relatively close to the experimental data presented in Table 17 except for the culture at pH 7. In the culture at pH 7, the very rapid depletion of nutrients could ultimately lead to lysis of bacterial cells (apoptosis phenomena) leading to a significant release of protons and, consequently, decreasing the pH. In this simple synthetic medium it is therefore possible to predict the pH evolution during denitrification. In more complex and heterogeneous media such as wastewater several compounds can interfere with the pH evolution (phosphate, carbonate, organic acids, etc.). However, whatever the type of alkaline environment, the production of CO₂ by the oxidation of acetate or other organic compounds would be a mean of acidification. On the other hand, the chemical nature of the medium may influence the rapidity of the pH evolution. Natural buffers such as carbonates (water hardness) or phosphates would slow down the pH evolution.

Conclusion

The acclimation method, especially the rate of the pH rise, impacted the activity of *P. denitrificans*. Without pH acclimation, neutrophilic *P. denitrificans* was active at pH 9.0. When a progressive pH elevation was applied for a period of 72 days with a continuous supply of fresh medium in a bioreactor, *P. denitrificans* was able to adapt and reduce nitrate at pH up to 10.8. Denitrification also affected the pH despite the presence of a buffer. It has been highlighted that, in synthetic media in which carbonates are in excess, the pH tends to 10.0 during the denitrification with acetate.

III.3.2. Acclimatation à des concentrations élevées de nitrates en réacteurs batch successifs

Démarche expérimentale :

Les cultures de *P. denitrificans* ont été soumises à une augmentation graduelle de nitrates de 40 à 760 mM. Les différentes cultures ont été conduites dans des réacteurs batch opérés successivement : une culture n servait à inoculer la culture $n+1$ dont la concentration en nitrates était plus élevée, Figure 42.

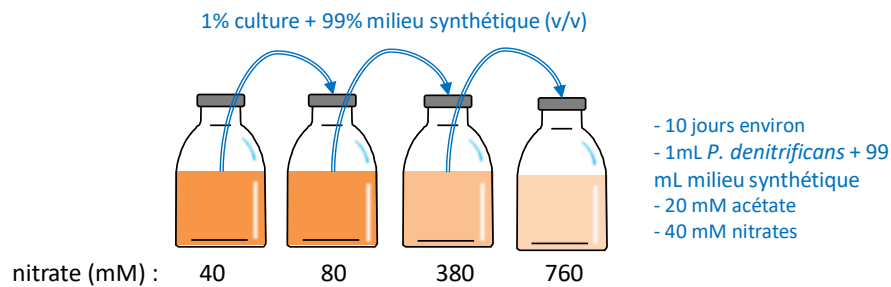


Figure 42 : Protocole expérimental de l'acclimatation de *P. denitrificans* à des concentrations élevées en nitrates en réacteurs batch successifs.

Dans la Figure 43 sont présentés les suivis du pH, de la DO, et l'évolution de la concentration relative en nitrates et en nitrites dans les cultures. Les carbonates n'ont pas été ajoutés, et le pH n'a pas été régulé. Le pH n'était donc pas défini par l'équilibre des carbonates. Dans cette expérience, l'évolution des concentrations en nitrate a été présentée en % et la concentration finale en nitrate a été indiquée sur le graphique. En effet, du fait des grandes disparités entre les concentrations (de 40 à 760 mM) le graphique exprimé en mM est peu lisible.

Résultats :

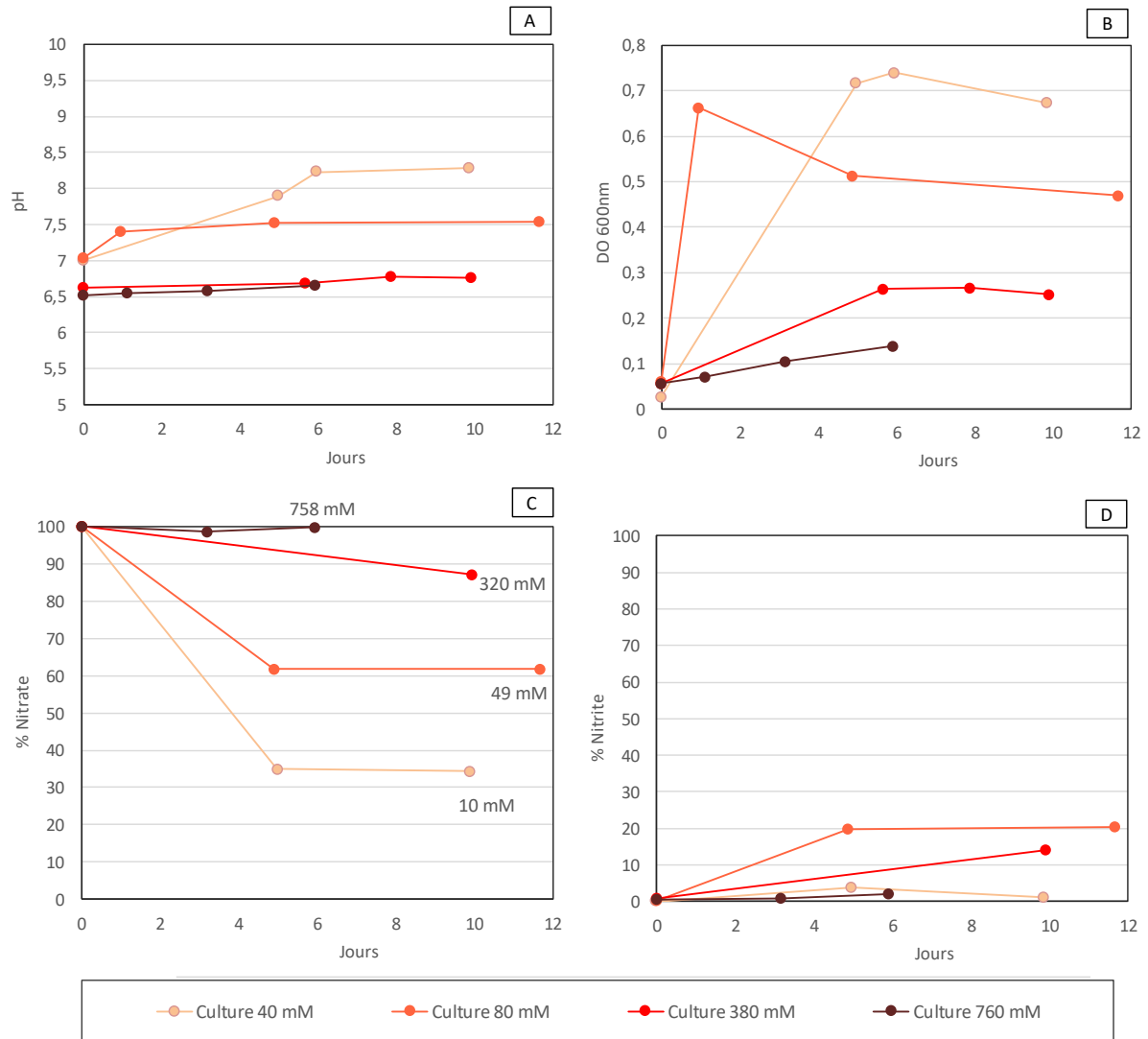


Figure 43 : Influence de l'élévation de la concentration en nitrates de 40 à 760 mM dans des bioréacteurs batch successifs sur les évolutions du pH (A), de la DO (B), des % de nitrates non consommés (C), des % de nitrites accumulés (D). Conditions expérimentales : quatre bioréacteurs batch, *P. denitrificans*, milieu minéral, 20 mM d'acétate.

Cette expérience a été réalisée sans ajout de tampon carbonate. Le pH s'est élevé dans la culture à 40 mM et 80 mM de nitrates. L'activité bactérienne a donc probablement causé l'alcalinisation du pH dans les cultures à 40 mM et 80 mM de nitrates, tandis que dans les cultures à 380 mM et 760 mM de nitrates l'activité bactérienne était trop faible pour modifier le pH. D'après le suivi de la DO, toutes les cultures ont eu une croissance même à 760 mM. Les cinétiques de croissance étaient ralenties pour les cultures à 380 et 760 mM en nitrates.

Les nitrates ont été consommés jusqu'à des concentrations initiales de 380 mM. *P. denitrificans* est capable de maintenir la réduction des nitrates au moins jusqu'à 380 mM de nitrates. En outre, il y a eu une accumulation de nitrites relativement faible dans les cultures à 80 et 380 mM. Il n'y a pas eu d'accumulation de nitrites à 40 mM. Dans cette culture les nitrites ont probablement été réduits à la même vitesse que les nitrates. Dans les culture de souche seule, l'équilibre entre les nitrates et les nitrites est contrôlé par une compétition entre les réductases des nitrates et des nitrites [72,73,75,180]. Ainsi, dans des conditions favorables (40 mM en nitrates par exemple) la dénitrification peut se dérouler en une seule étape. En revanche quand la concentration en nitrates est plus élevée,

les réductases entrent en compétition pour les électrons. La nitrate réductase est alors avantagée par rapport à la nitrite réductase ce qui conduit à l'accumulation de nitrites [81].

Conclusions :

Les expériences d'acclimatation aux pH élevés, puis aux concentrations élevées en nitrates permettent d'avoir un aperçu des seuils de tolérance de *P. denitrificans* en présence d'acétate. En utilisant la méthode d'acclimatation par réacteur batch successifs, avec des élévations de pH de 8,5 à 11,2 ou de concentration en nitrates de 40 à 760 mM en 26 jours, *P. denitrificans* était capable de réduire les nitrates jusqu'à pH 10,5 ou 380 mM de nitrates. Par la méthode d'acclimatation en réacteur continu, le pH a été augmenté de 8,5 à 11,2 en 72 jours avec un temps de rétention hydraulique de 8 jours. *P. denitrificans* a pu alors réduire les nitrates jusqu'à pH 10,8. En revanche sans procédure d'acclimatation, *P. denitrificans* n'a pu réduire les nitrates que jusqu'à pH 9. D'après ces résultats, il est fondamental d'utiliser une procédure d'acclimatation afin d'exposer les bactéries de manière progressive à des pH alcalins ou des concentrations élevées en nitrates. L'acclimatation avec des élévations progressives de concentrations en nitrates ou de pH permet aux bactéries de s'adapter et d'acquérir différents mécanismes de résistance. Dans le cas d'une espèce seule, l'adaptation sur le long terme se fait via des mutations spontanées qui se propagent au fur et à mesure des générations si elles présentent un avantage sélectif[196].

P. denitrificans est donc adaptable à une partie des gammes de pH et de concentrations en nitrates attendues dans les enceintes de de stockage de déchets radioactifs. Il est en plus confirmé que *P. denitrificans* est capable d'utiliser le dihydrogène comme donneur d'électrons. C'est donc une souche modèle valide pour l'étude de la dénitrification dans le contexte de stockage de déchets radioactifs.

III.4. Conclusions du chapitre

Un premier lot d'expérience a comparé l'effet de deux donneurs d'électrons, l'acétate et le dihydrogène sur l'activité dénitrifiante de *P. denitrificans* selon quatre pH de 7 à 10. La dénitrification avec acétate (4 mM/j) était bien plus rapide que la dénitrification avec dihydrogène (1,2 mM/j). Les principaux facteurs ralentissant la dénitrification hydrogénotrophe sont, premièrement, la solubilité faible du dihydrogène (1,48 mg/L à 30°C soit 0,74 mM), qui en fait un substrat rapidement limitant pour les procédés biologiques [60]. Deuxièmement, la nécessité d'assimiler du carbone minéral pour la croissance cellulaire est aussi contraignante pour les bactéries hydrogénotrophes. L'assimilation de carbone minéral peut s'effectuer par six voies différentes, toutes consommatrices d'énergie [120–122].

Par ailleurs, la réduction des nitrates et des nitrites a causé l'alcalinisation du pH que ce soit avec acétate ou dihydrogène. Pour comprendre l'évolution du pH lors de la dénitrification, des calculs ont été réalisés à partir des équations bilans de la dénitrification avec acétate ou avec dihydrogène. D'après ces calculs, dans un milieu tamponné par les carbonates en présence d'acétate, la dénitrification de quantités élevées de nitrates fait tendre le pH 10. Si les nitrites s'accumulent dans les cultures, alors le pH s'acidifie d'abord lors de la réduction des nitrates en nitrites. Puis lors de la réduction des nitrites en diazote, le pH tend vers 11. En revanche en présence de dihydrogène, le pH ne peut que s'alcaliniser lors de la réduction des nitrites. L'alcalinisation est accélérée si les bactéries hydrogénotrophes assimilent du carbone minéral. L'alcalinisation lors de la réduction des nitrites ou lors de l'assimilation du carbone minéral pourrait expliquer pourquoi la dénitrification hydrogénotrophe est plus facilement ralentie que la dénitrification hétérotrophe lorsque le pH est alcalin [32,58]. Cela expliquerait aussi pourquoi il y a eu de nombreuses observations d'accumulations de nitrites dans les cultures hydrogénotrophes [39,62,129,190].

Des procédures d'acclimatation ont permis de tester des élévations progressives de pH ou de concentrations en nitrates en présence d'acétate. Dans la première méthode d'acclimatation, les cultures ont été réalisées successivement, avec des élévations graduelles de pH de 8,5 à 11,2 ou de concentrations en nitrates de 40 à 760 mM en 26 jours. *P. denitrificans* était capable de réduire les nitrates jusqu'à pH 10,5 ou 380 mM de nitrates. Dans la deuxième méthode d'acclimatation, par le biais d'une culture alimentée en continu, le pH a été augmenté de 8,5 à 11,2 en 72 jours. Dans ces conditions, *P. denitrificans* a pu réduire les nitrates jusqu'à pH 10,8 et survivre ponctuellement à pH 11,2. Les procédures d'acclimatation sont donc fondamentales et permettent aux bactéries de s'adapter aux changements progressifs. Par exemple, *P. denitrificans* a pu acquérir de nouveaux systèmes de résistance via des modifications génétiques transmises au fil des générations [196]. Ces mutations génétiques sont susceptibles d'arriver en quelques heures pour les bactéries [152,198].

P. denitrificans est donc une souche dénitrifiante modèle utilisable dans le contexte de stockage de déchets radioactifs : elle a pu dénitrifier avec de l'acétate ou du dihydrogène, à des pH alcalins ou des concentrations élevées en nitrates. Cependant, pour la suite des travaux, et en concertation avec l'Andra, il a été choisi de travailler sur des consortiums bactériens. En effet, les bactéries qui ont été pour l'instant observées dans le site souterrain de Bure sont organisées en communautés d'espèces mixtes. Il est donc préférable de travailler sur des consortiums afin d'extrapoler plus facilement les résultats aux situations de stockage. Les boues activées provenant d'un bassin d'aération de station d'épuration ont été choisies comme consortium bactérien.

Chapitre IV :

**DENITRIFICATION HETEROTROPHE AVEC UN CONSORTIUM
BACTERIEN**

Tables des matières :

IV.1. Comparaison de trois méthodes d'acclimatation	104
IV.1.1. Acclimatation par inoculations successives	105
IV.1.1.1. Acclimatation des boues activées aux pH alcalins	105
IV.1.1.2. Acclimatation des boues activées à des concentrations élevées de nitrates	107
IV.1.2. Acclimatation en réacteurs continus.....	110
IV.1.2.1. Acclimatation des boues activées à des pH progressivement alcalins.....	111
IV.1.2.2. Acclimatation des boues activées à des concentrations élevées de nitrates	114
IV.1.3. Acclimatation en réacteurs discontinus séquentiels à des concentrations élevées en nitrates (50-400 mM) dans trois cultures à pH 9, 10 et 11	117
IV.1.4. Conclusions de la comparaison des trois méthodes d'acclimations.....	121
IV.2. Comparaison de l'apport de nitrates et ou de nitrites sous forme de NaNO_3 , NaNO_2 et KNO_3	121
IV.3. Dénitrification à pH hyperalcalins (pH 11,5 et 12)	129
IV.4. Transition d'un donneur d'électrons organique (acétate) vers un donneur d'électrons inorganique (H_2)	132
IV.5. Conclusions du chapitre	138

Dans le chapitre précédent il a été montré que les cultures hétérotrophes de *P. denitrificans* permettaient des cinétiques de réduction des nitrates et des densités de biomasse plus élevées que les cultures hydrogénotrophes. En utilisant l'acétate comme donneur d'électrons, *P. denitrificans* a été acclimaté à pH 10,8 et 380 mM de nitrates par des élévations progressives de pH ou de concentrations en nitrates. La méthode d'acclimatation en continu ou par réacteurs batch successifs a eu un impact différent sur les seuils de tolérance de *P. denitrificans*.

L'objectif de ce chapitre est d'évaluer en présence d'acétate, les seuils de tolérance d'un consortium de boues activées exposées à des pH et des concentrations en nitrates progressivement accrus. Les cinétiques de réduction de nitrates ont été évaluées dans ces mêmes conditions de pH et de concentrations en nitrates. L'utilisation d'une communauté de microorganismes issue de boues activées, permet de se rapprocher des conditions réelles du système de stockage où cohabite une diversité de microorganismes introduits par l'activité humaine [11,12]. Le consortium issu des boues activées a été cultivé avec du lixiviat de ciment pour se rapprocher des conditions cimentaires réelles. La communauté microbienne, grâce à sa diversité, devrait théoriquement être adaptable aux pH alcalins, aux concentrations élevées en nitrates ou à l'hydrogénotrophie [37,126,203–205].

Dans un premier temps, deux méthodes d'acclimatation utilisées auparavant sur des cultures de *P. denitrificans* (et présentées au chapitre précédent) ont été comparées à une nouvelle méthode d'acclimatation. Des acclimations aux pH alcalins ou aux concentrations en nitrates élevées ont été comparées en réacteurs batch, continus ou discontinus séquentiels. Dans les réacteurs discontinus séquentiels, une période batch est suivie d'une période courte de décantation permettant à la biomasse de se déposer dans la partie basse du réacteur. Le surnageant, faiblement concentré en biomasse est remplacé par du lixiviat de ciment avec des concentrations en nitrates ou des pH plus élevés, puis une nouvelle période batch est initiée. Avec cette méthode, trois réacteurs discontinus séquentiels à pH 9, 10 et 11 ont été alimentés avec des milieux de plus en plus concentrés en nitrates (de 50 à 400 mM). La concentration en acétate était maintenue à 20 mM par ajout régulier.

Ensuite, trois réacteurs discontinus séquentiels alimentés avec des concentrations croissantes de NaNO_3 , NaNO_2 ou KNO_3 ont été comparés afin d'évaluer l'impact (i) de concentrations élevées en nitrites, (ii) de la nature du contre ion (Na^+ et K^+) ajouté en concentration élevée (conjointement aux nitrates) sur l'activité dénitrifiante des bactéries.

Puis, une expérience réalisée par le biais de réacteurs batch a permis d'évaluer l'impact de pH hyperalcalins sur les cultures de bactéries issues de boues activées. Deux cultures à pH 11,5 et 12,0 ont été alimentées avec une concentration initiale de 50 mM en nitrates. Cette dernière expérience a nécessité un temps long (240 jours) afin d'observer l'activité dénitrifiante dans cette gamme de pH très élevée.

Enfin, une transition du donneur d'électrons de l'acétate vers le dihydrogène a été effectuée sur trois cultures pour comparer l'activité des bactéries issues de boues activées avec acétate ou avec dihydrogène. Ces trois cultures ont été ajustées à pH 9, 10 et 11 au fur et à mesure de l'expérience, pour évaluer l'effet du pH sur des cultures hydrogénotrophes.

IV.1. Comparaison de trois méthodes d'acclimatation

Trois procédures d'acclimatation ont été testées en réacteurs batch successifs, en réacteurs alimentés en continu et en réacteurs séquentiels discontinus. Les différentes procédures mises en œuvre visaient à acclimater les bactéries à des valeurs de pH et de concentrations en nitrates élevées. A la différence de *P. denitrificans*, deux hypothèses peuvent expliquer l'acclimatation des bactéries, (i) les populations

naturellement les plus tolérantes sont devenues dominantes au sein du consortium, (ii) certaines bactéries ont acquis une meilleure tolérance à ces conditions par transferts de gènes horizontaux.

IV.1.1. Acclimatation par inoculations successives

Dans cette expérience, les cultures ont été conduites dans des réacteurs batch opérés successivement : une culture n servait à inoculer la culture $n+1$ dont le pH ou la concentration en nitrates étaient plus élevés.

Démarche expérimentale :

L'inoculum provenant des boues activées a été cultivé en anaérobiose, dans du lixiviat de ciment. Les cultures ont été soumises soit à une élévation graduelle de pH de 8,5 à 11,0, soit à une élévation graduelle de la concentration en nitrates de 40 à 760 mM comme décrit sur la Figure 44. Après 10 jours, une fraction (1%) de la culture n était utilisée pour inoculer la culture $n+1$ suivante dont le pH ou la concentration en nitrates étaient plus élevés.

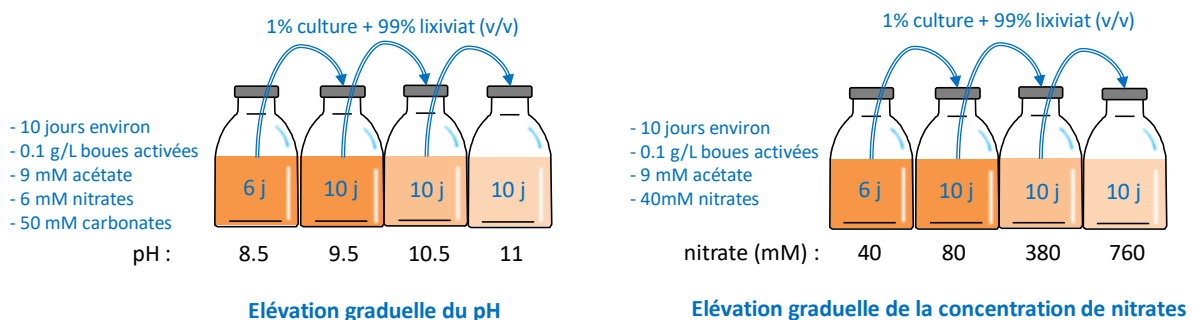


Figure 44 : Protocole expérimental des acclimations des boues activées de pH 8,5 à pH 11,2 ou de 40 à 760 mM de nitrates en réacteurs batch successifs.

Au cours des expériences d'acclimatation au pH élevé, 50 mM de carbonates ont été ajoutés. Le pH initial des milieux de cultures était ajusté avec du HCl ou du NaOH (10 M). Au cours des expériences d'acclimatation aux concentrations en nitrates élevées il n'y a pas eu d'ajouts de tampon ni de régulation du pH.

IV.1.1.1. Acclimatation des boues activées aux pH alcalins

Sur la Figure 45 est présentée l'évolution du pH et de la DO à 600 nm des cultures inoculées à partir des échantillons de boues activées.

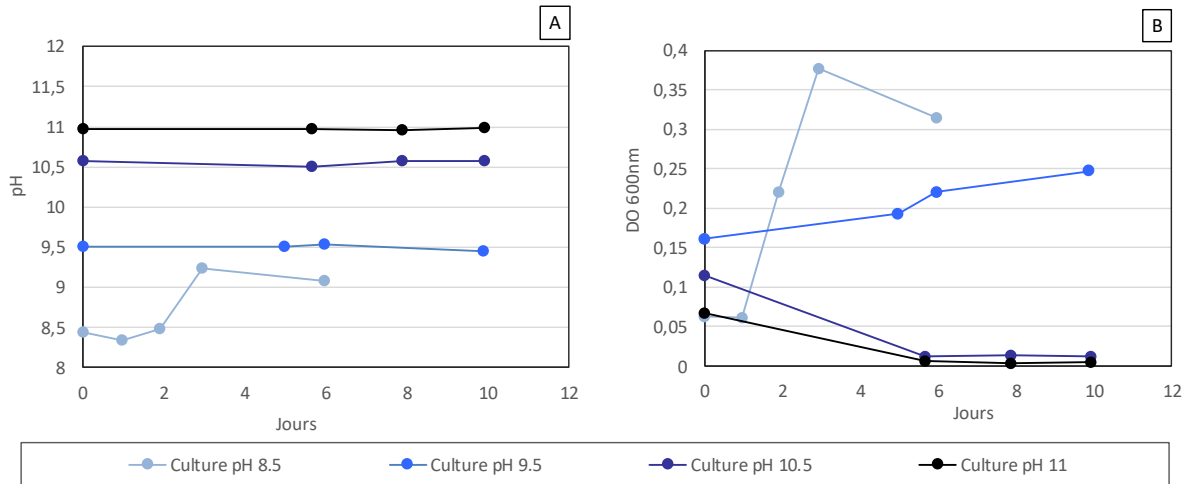


Figure 45 : Influence de l'élévation du pH de 8,5 à 11,2 dans des bioréacteurs batch successifs sur les évolutions du pH (A), et de la DO (B). Conditions expérimentales : quatre bioréacteurs batch, bactéries issues de boues activées, lixiviat de ciment, 9 mM d'acétate, 6 mM de nitrates.

Il y a eu une augmentation du pH dans la culture à pH initial 8,5, malgré la présence de solution tampon carbonates à 50 mM. Pour les pH initiaux supérieurs à 8,5, le pH est resté stable au cours du temps. L'évolution du pH des différentes cultures est similaire à celle du pH des cultures de *P. denitrificans* présentée dans la section III.3.1. Dans les cultures de pH initial < 9,5, une alcalinisation a été observée. Dans les cultures de pH initial $\geq 9,5$, le pH est resté constant. Les calculs de simulation (voir chapitre précédent et annexe XX) d'évolution du pH du milieu dénitrifiant permettent d'expliquer ce résultat : en présence d'acétate dans un milieu tamponné par 50 mM de carbonates, la dénitrification fait tendre le pH vers 10. D'après la section III.2.1, en considérant que 6 mM de nitrates ont été dénitrifiés, les pH finaux théoriques des cultures à pH 8,5, 9,5, 10,5 et 11, devraient être respectivement de 9,1, 9,6, 10,4 et 10,8. Les pH théoriques des cultures à pH initiaux 9,5 et 10,5 restent donc stables alors que celui de la culture à pH initial 8,5 s'élève de 0,6 unité de pH, et le pH de la culture à pH initial 11 diminue de 0,2 unité de pH. D'après les résultats expérimentaux, les pH finaux des cultures étaient de 9,1, 9,5, 10,5 et 11,0. Ainsi, les cultures à pH 8,5, 9,5 et 10,5 suivent l'évolution de pH théorique lors de la dénitrification de 6 mM de nitrates.

La DO a augmenté pour les cultures à pH initiaux 8,5 et 9,5, elle est restée faible et a diminué pour les cultures à pH initiaux 10,5 et 11,0.

Le suivi analytique de l'évolution des concentrations en nitrates, et nitrites est présenté dans les graphiques (A) et (B) de la Figure 46. Le suivi de la concentration en acétate est présenté dans la Figure 46 (C).

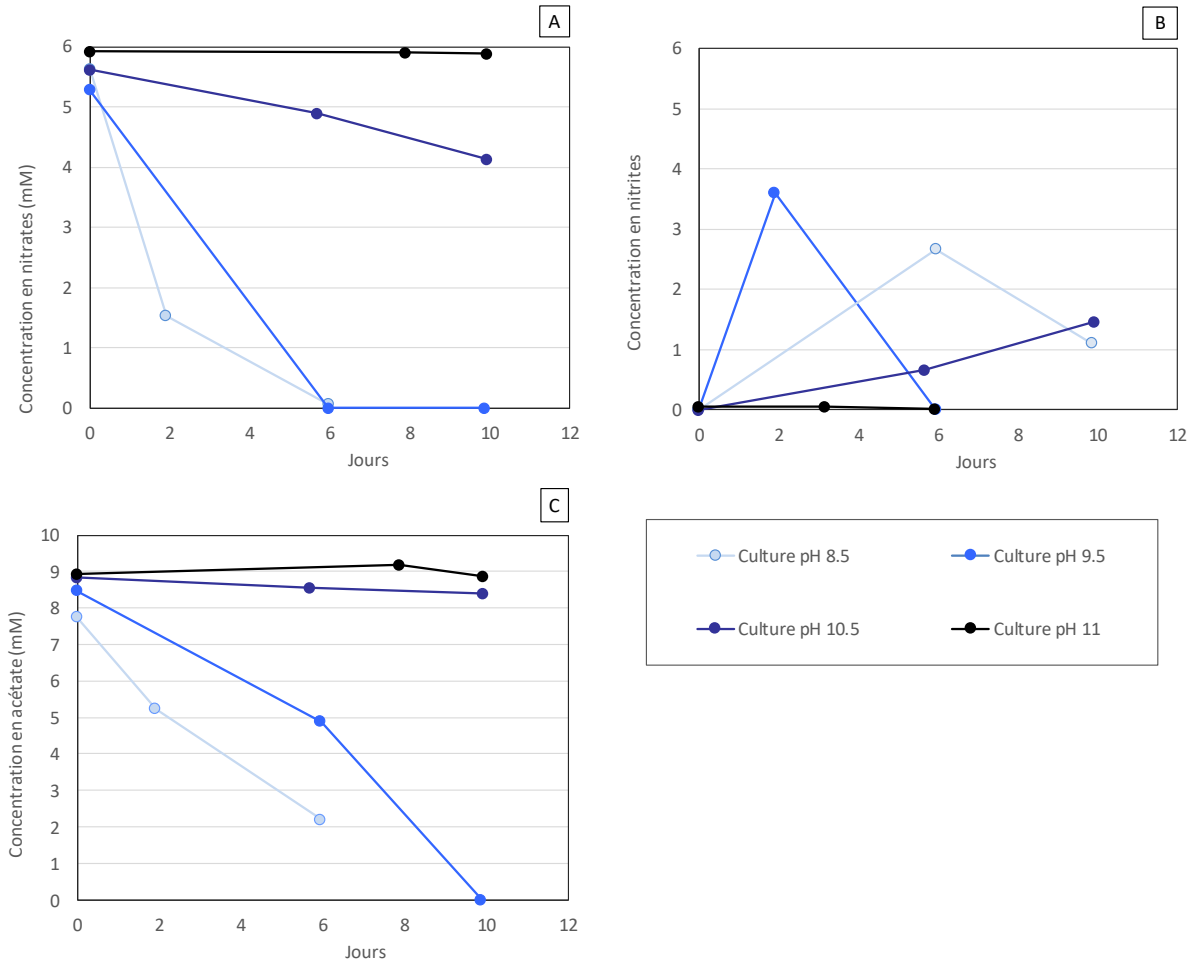


Figure 46 : Influence de l'élévation du pH de 8,5 à 11,2 dans des bioréacteurs batch successifs sur les évolutions des nitrates (A), des nitrites (B), de l'acétate (C). Conditions expérimentales : quatre bioréacteurs batch, bactéries issues de boues activées, lixiviat de ciment, 9 mM d'acétate, 6 mM de nitrates.

D'après les graphiques (A) et (B) de la Figure 46, la consommation des nitrates était totale à pH 8,5 et 9,5, et une consommation de 30 % des nitrates initialement introduits a été observée en 10 jours à pH 10,5. Les nitrites se sont accumulés dans les cultures à pH 8,5, à pH 9,5 et à 10,5. Les accumulations étaient décalées dans le temps en fonction du pH : plus le pH était élevé, plus la réduction des nitrates était lente et plus l'accumulation des nitrites était retardée. La consommation d'acétate est observée jusqu'à pH 10,5, mais pas à pH 11,0. Les boues activées sont donc capables de dénitrifier en condition hétérotrophe jusqu'à un pH limite maximal de 10,5.

IV.1.1.2. Acclimatation des boues activées à des concentrations élevées de nitrates

Les boues activées ont été cultivées dans du lixiviat de ciment avec 9 mM d'acétate et des concentrations croissantes en nitrates élevées par inoculations successives de 40 mM à 760 mM. Dans la Figure 47 (A) est présenté le suivi du pH dans les cultures. Aucune solution tampon carbonate n'a été utilisée, ni de régulation du pH. Le suivi de la concentration en acétate n'a pas été présenté car à partir de 380 mM de nitrates, les analyses en HPIC ont nécessité des dilutions importantes des échantillons (jusqu'à 1/1250) afin de protéger la colonne d'HPIC. En conséquence, l'analyse de l'acétate (en concentration constante à 9 mM) devient imprécise et non fiable.

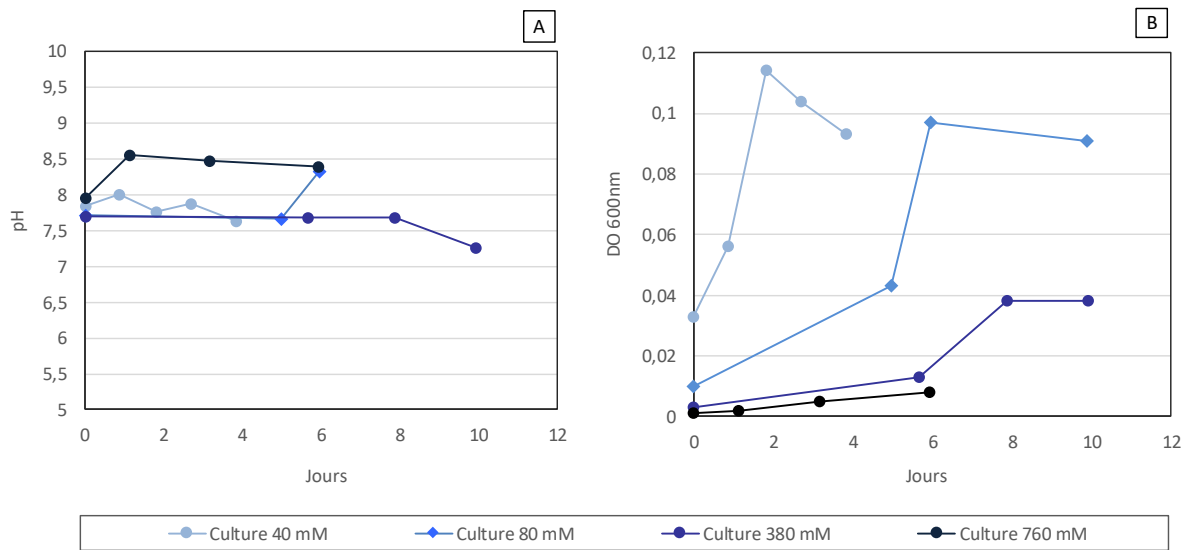


Figure 47 : Influence de l'élévation de la concentration en nitrates de 40 à 760 mM dans des bioréacteurs batch successifs sur les évolutions de pH (A) et de la DO (B). Conditions expérimentales : quatre bioréacteurs batch, bactéries issues de boues activées, lixiviat de ciment, 9 mM d'acétate.

Malgré l'absence de solution tampon, le pH a peu évolué dans les cultures. L'évolution de la DO est présentée sur la Figure 47 (B). Il y a eu une élévation de la DO au cours du temps pour toutes les concentrations en nitrates testées. L'élévation de la DO était plus faible pour les concentrations en nitrates plus élevées.

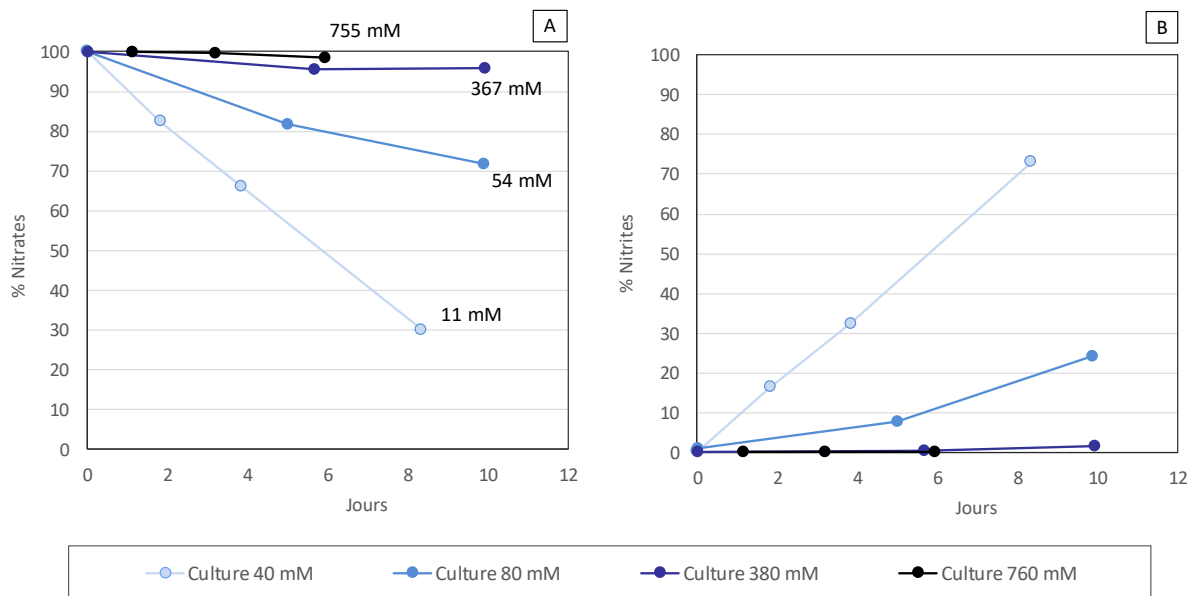


Figure 48 : Influence de l'élévation de la concentration en nitrates de 40 à 760 mM dans des bioréacteurs batch successifs sur les évolutions des nitrates (en % des nitrates initiaux) (A), des nitrites en (% des nitrates initiaux) (B). Conditions expérimentales : 4 bioréacteurs batch, lixiviat de ciment, 9 mM d'acétate.

Le suivi analytique des proportions (%) de nitrates, et nitrites par rapport à la concentration initiale en nitrate est présenté dans la Figure 48, graphiques(A) et (B), et les concentrations finales en nitrates

sont indiquées sur les courbes Les nitrates ont été partiellement consommés jusqu'à des concentrations initiales de 380 mM. D'après ces résultats, comme pour *P. denitrificans*, les boues activées sont capables de maintenir les réductions de nitrates et de nitrites au moins jusqu'à 380 mM. En outre, une accumulation de 75 % et 25 % nitrites a été observée respectivement pour les cultures à 40 mM et 80 mM en nitrates. A 380 mM de nitrates, la réduction des nitrates était relativement faible, les nitrites n'ont pas été observés. Dans l'expérience d'acclimatation aux nitrates de *P. denitrificans*, il y a eu des accumulations de nitrites à 80 et 380 mM de nitrates mais pas à 40 mM. De plus avec *P. denitrificans*, les accumulations en nitrites n'ont pas dépassé 20 % de la quantité de nitrates initialement ajoutée. Il y a donc une différence importante entre l'accumulation des nitrites en culture avec un consortium ou avec une espèce seule. Pour une espèce seule comme *P. denitrificans*, les compétitions enzymatiques entre les réductases peuvent conduire à l'accumulation de nitrites [73,75,180], Cf §3.1.

En consortium en revanche, le facteur le plus déterminant sur l'équilibre nitrate/nitrite est la distribution des espèces bactériennes. Des études ont montré que deux types de populations se partageaient la dénitrification [77,78,81]. Dans un premier groupe, les bactéries « *nitrate respiring* » réduisent uniquement les nitrates sans pouvoir réduire les nitrites. Le second groupe est constitué de bactéries capables de réduire les nitrates et les nitrites jusqu'au stade diazote, elles sont qualifiées de « *true denitrifying bacteria* ». Les bactéries respirant les nitrates ont des taux de croissance plus élevés [81]. Elles ont donc proliféré en conditions favorables ce qui entrainerait alors une accumulation en nitrites importante. Ceci expliquerait pourquoi l'accumulation en nitrites dans la culture à 40 mM a atteint 75 % avec un consortium et seulement 5 % avec *P. denitrificans*. En revanche pour des concentrations en nitrates plus élevées comme 80 ou 380 mM, seules les bactéries « *true denitrifier* » plus tolérantes aux concentrations élevées en nitrates se développaient. A noter qu'un modèle de communauté dénitrifiante plus détaillé a été proposé dans la bibliographie. Des études ont montré que dans différents sols, une proportion importante des bactéries ne possédaient pas la totalité des gènes synthétisant les enzymes de la dénitrification [206,207]. Par exemple dans une étude, sur 176 isolats, 30 phénotypes étaient dénitrifiants au sens strict (réduction des nitrites en formes azotées gazeuses), 5 étaient capables de réduire uniquement le N_2O et en tout 70 pouvaient réaliser au moins une étape de réduction de la dénitrification [207]. Ces travaux ont suggéré que les étapes de la dénitrification sont partagées entre les bactéries. Chaque réductase est exprimée par les bactéries en fonction de ses avantages sélectifs par rapport à la communauté dénitrifiante. Ainsi certaines bactéries ne vont exprimer qu'une étape de réduction, d'autres vont exprimer plusieurs ou la totalité des réductases [206,207]. Cependant dans le cadre de cette thèse il n'a pas été possible de quantifier les gaz (NO , N_2O et N_2). C'est pourquoi la catégorisation « *nitrate respiring* » et « *true denitrifier* » a été utilisée.

Une autre hypothèse peut venir étayer l'explication de l'accumulation de nitrites plus importante en consortium qu'avec une espèce seule. Le milieu de culture de *P. denitrificans* lui était spécifique alors que les boues activées étaient cultivées dans du lixiviat de ciment, un milieu pauvre. Le fer, par exemple, était très faiblement concentré dans le lixiviat de ciment. Des mesures en ICP ont montré qu'il atteignait en moyenne $0.04 \mu M$ (les résultats d'analyses de lixiviat de ciment sont détaillés dans la section II.1.4). Dans le milieu de *P. denitrificans*, du fer était ajouté à une concentration de 0,2 mM, cet élément y est donc 5000 fois plus concentré. Le fer est un élément essentiel, il a un impact significatif sur la réduction des nitrites. En effet, le fer peut par exemple favoriser la synthèse des réductases et de protéines de la chaîne respiratoire, réduire directement les nitrites [154,176,177,179], ou servir de catalyseur pour les différentes réductions de la dénitrification [156–

158,175,181,182]. Tous ces mécanismes sont détaillés dans l'étude bibliographique I.3 ou dans la partie expérimentale avec acier VI.2.

Conclusions :

Les acclimations en réacteurs batch successifs permettent d'avoir un aperçu des gammes de pH et de concentrations en nitrates dans lesquelles les boues activées sont capables de réduire les nitrates et les nitrites, en présence d'acétate. Les boues activées sont capables de réduire nitrates et nitrites à pH 10,5 ou à une concentration de 380 mM en nitrates. *P. denitrificans* une souche de type « *true denitrifier* », a pu réduire les nitrates dans les mêmes gammes de pH et de concentrations en nitrates. Cependant l'accumulation des nitrites a été globalement plus élevée dans les cultures inoculées par les boues activées à 40 mM de nitrates ou à pH 8,5 et 9,5. Ceci s'expliquerait par la prolifération de bactéries « *nitrate respiring* » ne réduisant que les nitrates en nitrites dans la culture à 40 mM de nitrates. En revanche, dans les cultures de boues activées à 80 et 380 mM en nitrates, ce sont des bactéries de type « *true denitrifier* » qui auraient dominé la population des boues activées, en conséquence l'accumulation des nitrites était plus faible, et comparable à celle des cultures avec *P. denitrificans*.

La méthode d'acclimation en réacteurs batch successifs peut encore être optimisée. En effet, cette méthode peut être considérée comme « brutale » pour les bactéries. Les bactéries ont subi des augmentations soudaines de 1 unité de pH ou de 40 à 380 mM de nitrates. De plus la méthode d'inoculations successives peut être stressante pour les bactéries, et le faible ratio d'inoculation (1/100 v/v) a conduit à la dilution progressive de la biomasse. Pour résoudre ces problèmes, des réacteurs continus ont été mis en place. L'absence de ré-inoculations, les élévations de pH ou de concentrations en nitrates plus progressives et des temps de cultures plus longs devraient également améliorer la capacité d'adaptation des communautés bactériennes des boues activées.

IV.1.2. Acclimation en réacteurs continus

Dans cette expérience, deux réacteurs ont été conduits en continu afin d'optimiser le procédé d'acclimation des cultures et de réaliser des élévations plus « douces » de pH ou de concentration en nitrates. Une première culture a été acclimatée à des pH de plus en plus alcalins. La deuxième culture a été acclimatée aux concentrations élevées en nitrates.

Démarche expérimentale :

Les boues activées ont été cultivées sur du lixiviat de ciment, cette fois additionné de 20 mM d'acétate, et 10 mM de nitrates. Dans la culture acclimatée au pH alcalin le pH de la culture a été élevé de 8,5 jusqu'à 11,8. Le pH a été élevé par une régulation automatique du pH dans le bioréacteur via une pompe à NaOH. Ce système permettait d'utiliser du lixiviat de ciment pur sans ajouter de tampon carbonates. Dans la culture acclimatée aux concentrations élevées en nitrates, la concentration a été augmentée de 10 mM à 750 mM dans le bioréacteur. L'acclimation pour les deux cultures a duré 125 jours. Le protocole de l'expérience est présenté dans la Figure 49.

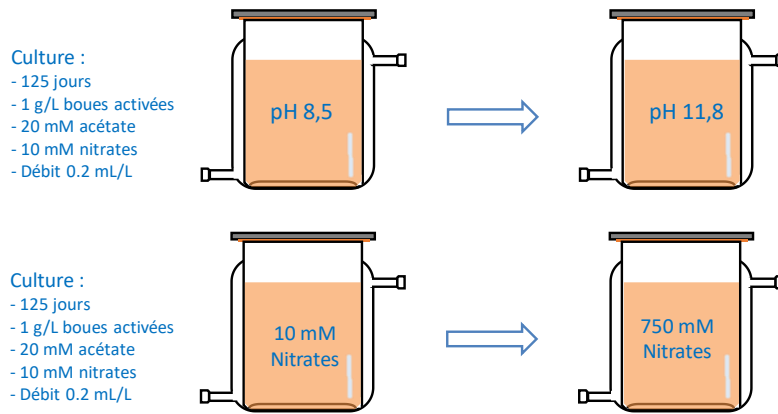


Figure 49 : Protocole expérimental d'acclimation des inocula de boues activées à des élévations de pH 8,5 à pH 11,8 ou de concentrations en nitrates de 10 à 750 mM.

IV.1.2.1. Acclimation des boues activées à des pH progressivement alcalins

Globalement la culture a été suivie en continu, mais deux périodes de batch (du jour 72 au jour 86 puis du jour 92 à la fin de l'expérience) ont été aménagées afin de pouvoir observer des cinétiques quantifiables de réduction des nitrates. Les deux périodes de batch sont identifiées par des rectangles en pointillés dans la Figure 50.



Figure 50 : Influence de l'élévation du pH de 8,5 à 11,2 en réacteur continu sur les évolutions du pH et de la DO (A), des concentrations en nitrates et nitrites (B), des concentrations en nitrates et nitrites réduites (C). Conditions expérimentales : un bioréacteur continu, lixiviat de ciment, bactéries issues de boues activées, 20 mM d'acétate, 10 mM de nitrates.

Dans la Figure 50 (A) sont illustrées l'élévation progressive du pH et l'évolution de la DO au cours de l'expérience. Le suivi de l'acétate n'est pas représenté car il n'apporte pas grand-chose étant donné qu'il est apporté en continu par le milieu d'alimentation. Les périodes remarquables de l'expérience concernant le changement du pH sont consignées dans le Tableau 18. Un problème technique notable est survenu au jour 41. Un dysfonctionnement du système de régulation du pH a fait brutalement monter le pH à 11,8. Au bout d'une dizaine d'heures, le pH du bioréacteur a ensuite été manuellement diminué à pH 10,0.

Tableau 18 : Périodes remarquables de l'évolution du pH pendant l'acclimatation des boues activées à des pH alcalins en réacteur continu.

Temps (jours)	Evolution du pH
0 - 40	Elévation progressive de 9,5 à 10,8
41	Pic de pH à 11,8
41 - 72	Elévation progressive de 10,0 à 11,2
72-86	Batch : pH maintenu à 10,7
86-93	pH maintenu à 10,9
93-110	Batch : pH maintenu à 10,9
110-125	Batch : pH non régulé

A partir du jour 110, la régulation du pH a été stoppée et le pH a diminué progressivement de 10,9 à 9,8 en 20 jours. Cette diminution de pH est certainement liée à l'activité dénitrifiante des bactéries. Comme cela a été explicité dans la section III.2.1 les bactéries hétérotrophes sont capables d'acidifier le pH au cours de la dénitrification. Ceci impliquerait que les bactéries aient continué à réduire les nitrates et les nitrites jusqu'à la fin de l'expérience.

Du jour 0 au jour 40, la DO avait tendance à se maintenir autour de 0,1. A partir du jour 41 et jusqu'au jour 72, la DO a diminué à 0,05. Pendant la première phase de batch la DO s'est élevée jusqu'à 0,15. Pendant la deuxième phase batch, la DO, d'abord stable, a diminué à partir du jour 110. La densité cellulaire a donc augmenté dans le bioréacteur au cours de la première phase de batch durant laquelle le pH était maintenu à 10,7. D'après ces résultats, les boues activées seraient donc capables de croître à pH 10,7. Elles seraient capables également de survivre au moins plusieurs heures à pH 11,8. Concernant la deuxième phase de batch, après la diminution de pH à partir du jour 110, il est surprenant de constater que la DO chute. Une hypothèse peut être avancée, à partir des résultats d'une autre étude réalisée également avec des boues activées acclimatées à pH 11,5. Ces mêmes boues activées ont ensuite servi à inoculer trois cultures à pH 7,5, 9,0 et 10,5 [37]. Plus le pH était faible plus la réduction des nitrates était ralentie et plus les nitrites s'accumulaient. L'activité des boues activées déjà adaptées à un pH alcalin était alors ralentie à des pH plus faibles. Il semblerait donc que dans le bioréacteur, les boues activées aient été adaptées avec succès au pH alcalin. En conséquence, la baisse de pH postérieure, certainement trop rapide, a probablement provoqué une inhibition au moins temporaire de l'activité bactérienne.

Les graphiques (B) et (C) de la Figure 50 présentent respectivement l'évolution de la concentration en nitrates et en nitrites et les concentrations en nitrates et en nitrites réduites. Les concentrations en nitrates et en nitrites réduites sont calculées respectivement depuis les équations (43) et (44) en fonction de la concentration initiale en nitrates et des concentrations en nitrates et nitrites mesurées dans les cultures.

$$[\text{NO}_3^-]_{\text{réduite}} = [\text{NO}_3^-]_{\text{alimentation}} - [\text{NO}_3^-]_{\text{culture}} \quad (43)$$

$$[\text{NO}_2^-]_{\text{réduite}} = [\text{NO}_3^-]_{\text{réduite}} - [\text{NO}_2^-]_{\text{culture}} \quad (44)$$

Du jour 0 au jour 41, le pH était inférieur à 10,8, et 9,7 mM des nitrates étaient réduits au-delà du stade nitrites. Du jour 41 au jour 72, le pH a augmenté de 10,0 à 11,2. La réduction des nitrites a d'abord été inhibée, les nitrites ont commencé à s'accumuler dans le milieu réactionnel. Puis dans un second temps, la réduction des nitrates a été inhibée. Ce n'est qu'à partir du jour 72, pendant les périodes de batch qu'il y a eu un regain d'activité de réduction des nitrates jusqu'au jour 120 où 4,5 mM des nitrates et 2 mM des nitrites étaient réduits. Comme déjà évoqué lors de l'interprétation des courbes d'évolution de la DO, le dernier jour, une diminution de la réduction des nitrites a été observée : la concentration en nitrites réduite est passée de 2 mM à 1,5 mM. Il y aurait donc bien eu une inhibition de l'activité bactérienne liée à la diminution du pH importante les derniers jours.

En conclusion, d'après l'ensemble des résultats expérimentaux, les boues activées sont capables de réduire les nitrates sans inhibition particulière jusqu'à pH 10,8 avec un débit continu de 0,2 mL/min soit une cinétique de réduction des nitrates de 2,88 mM/j. De plus, aucune accumulation des nitrites n'est enregistrée. En période batch à pH 10,9, une réduction des nitrates a été observée. Les cinétiques de réduction des nitrates évaluées lors de la première et de la deuxième phase de batch étaient respectivement de 0,14 et 0,10 mL/j. Les cinétiques de réduction des nitrates sont donc fortement impactées quand les cultures sont confrontées à des pH alcalins.

En outre, la réduction des nitrites est fortement dépendante du pH. Plusieurs auteurs ont observé que la réduction des nitrites était fortement ralentie par les pH alcalins [77,130]. Certains auteurs expliquent cela par une compétition entre les réductases exacerbée par le pH alcalin [73,74]. D'autres ont indiqué que la réduction des nitrites était l'étape clé qui générerait l'alcalinité lors de la dénitrification [26]. Ainsi à pH alcalin, le ralentissement des réductions de nitrites serait un moyen pour les cellules bactériennes d'éviter d'augmenter encore plus le pH.

Les boues activées sont aussi capables de résister en état de dormance à une élévation transitoire de pH au moins jusqu'à pH 11,8 pendant quelques heures. Elles ont ralenti leur activité à pH 11,8, puis une fois le pH redescendu, elles ont repris la réduction des nitrates.

IV.1.2.2. Acclimatation des boues activées à des concentrations élevées de nitrates

Dans cette deuxième culture, la concentration en nitrates a été progressivement augmentée de 10 à 750 mM. Le bioréacteur a principalement été alimenté en continu, trois périodes batch ont tout de même été mises en place : des jours 23 à 27, 77 à 86, et 100 à 125. Les périodes sont représentées par des rectangles pointillés sur les graphiques de la Figure 51. L'acétate était ajouté à 20 mM dans le milieu d'alimentation il était donc limitant, des ajouts ponctuels d'acétates étaient réalisés si l'acétate venait à manquer. L'acétate n'est pas représenté, comme expliqué dans l'expérience IV.1.1.2, quand la concentration en nitrates est très élevée, l'analyse de l'acétate devient peu fiable.

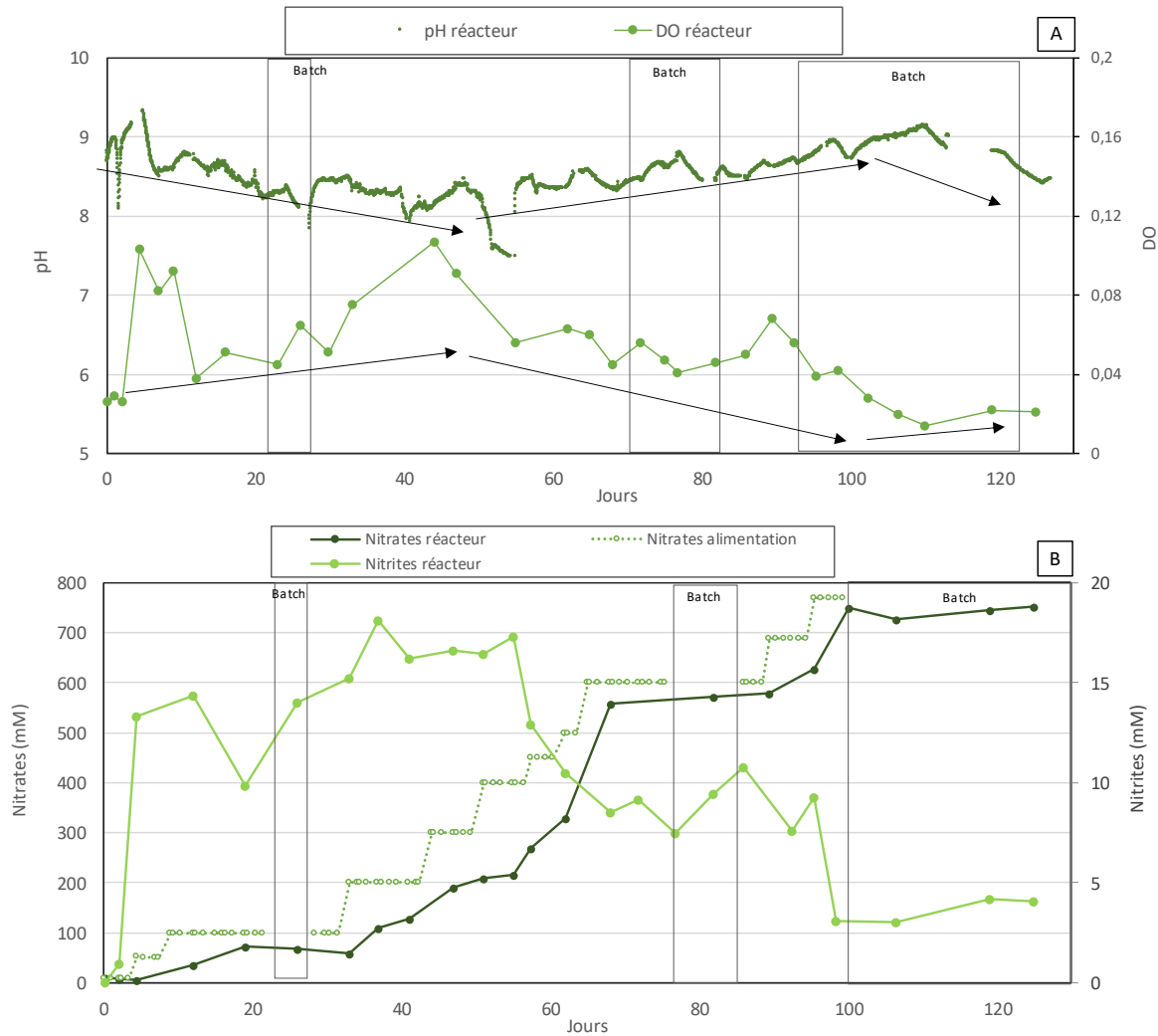


Figure 51 : Influence de l'élévation de la concentration en nitrates de 10 à 750 mM en réacteur continu sur les évolutions du pH et de la DO (A), et des concentrations en nitrates et nitrites (B). Conditions expérimentales : un bioréacteur continu, lixiviat de ciment, bactéries issues de boues activées, 20 mM d'acétate, pH 8-9.

Les suivis du pH et de la DO dans le bioréacteur sont présentés dans la Figure 51 (A). Du jour 0 au jour 50, le pH a progressivement diminué de 9,0 à 8,0. Puis, du jour 50 au jour 110, le pH a ré-augmenté à 9,0. Enfin à partir du jour 110, le pH s'est de nouveau mis à diminuer (pH = 8,4 en fin d'expérience). Ces trois tendances sont schématisées par des flèches noires sur la Figure 51 (A). Les diminutions de pH semblent liées à l'activité bactérienne, plus précisément l'oxydation de l'acétate en CO_2 . En revanche, il semblerait que du jour 50 au jour 110 le pH a augmenté. Ceci serait lié alors au ralentissement de l'activité bactérienne. En effet, le pH du bioréacteur aurait alors augmenté sous l'influence du pH du milieu d'alimentation très alcalin, environ à pH 11,3.

La DO suit une tendance opposée à celle du pH. Du jour 0 au jour 44, la DO a augmenté globalement de 0,03 à 0,11. Du jour 44 au jour au jour 110, la DO a diminué constamment de 0,11 à 0,01. Enfin, les deux dernières phases de batch ont entraîné une légère augmentation de la DO. Les évolutions de la DO sont aussi schématisées par des flèches sur le graphique. Ces résultats sont cohérents avec les interprétations de l'activité bactérienne réalisées à partir de l'évolution du pH et du taux de lessivage dans le bioréacteur. Le taux de croissance des bactéries était d'abord supérieur au taux de lessivage induit par l'alimentation en continu du bioréacteur jusqu'au jour 44. Après le jour 44, la croissance bactérienne est devenue plus lente que le taux de lessivage et la DO diminue. Enfin dans les derniers jours, à partir du jour 110, la population bactérienne augmentait de nouveau quand l'alimentation en

continu a été stoppée. Chaque période batch a été s'accompagnée d'une diminution de pH et d'une augmentation de la DO.

Les évolutions des concentrations en nitrates dans le bioréacteur et dans le milieu d'alimentation ainsi que celle des nitrites produits dans le bioréacteur sont illustrées dans la Figure 51 (B). Du jour 0 au jour 55, la concentration en nitrates a augmenté progressivement de 10 mM à 400 mM dans l'alimentation et de 10 mM à 215 mM dans le bioréacteur. Du jour 55 au jour 100, la concentration en nitrates a augmenté jusqu'à 780 mM dans l'alimentation et 750 mM dans le bioréacteur. En parallèle, la concentration en nitrites a globalement augmenté de 0 à 18 mM du jour 0 au jour 55. Puis elle a ensuite diminué du jour 55 au jour 100 jusqu'à 3 mM. Chaque période de batch s'est accompagnée d'une légère élévation de la concentration en nitrites.

A partir de la Figure 51 (B), l'activité bactérienne peut être interprété en tenant compte de : (i) l'évolution de la concentration en nitrites, et (ii) le ΔC entre la concentration en nitrates dans le bioréacteur et celle dans le milieu d'alimentation. En effet, si l'activité bactérienne est élevée, la réduction des nitrates dans le bioréacteur est importante. En conséquence, la concentration en nitrates dans le bioréacteur est beaucoup plus faible que la concentration en nitrates dans le milieu d'alimentation.

Les évolutions de la concentration en nitrites peuvent, elles, provenir d'un changement de cinétique de réduction des nitrates ou/et des nitrites. A ceci s'ajoute un taux de lessivage des nitrites constant avec un débit de 0,2 mL/min induit par l'alimentation et le soutirage continu. Pour les concentrations en nitrates supérieures à 200 mM dans le bioréacteur, l'hypothèse a été faite en accord avec les expériences précédentes, que la diminution de la concentration en nitrites était essentiellement liée au ralentissement de la réduction des nitrates. En se basant sur l'évolution de la concentration en nitrites dans le bioréacteur, l'activité bactérienne a semblé basculer au jour 55. A ce moment précis, la concentration en nitrates dans le bioréacteur était légèrement supérieure à 200 mM, et il y avait une différence de concentration (ΔC) en nitrates de près de 200 mM entre l'alimentation et le bioréacteur (différence de 46 %). Au jour 68, pour une concentration en nitrates de 600 mM dans l'alimentation et 560 mM dans le réacteur, le ΔC n'était plus que de 40 mM (différence de 8 %), et la concentration en nitrites est passée de 18 à 9 mM, l'activité des bactéries était très ralentie. A partir du jour 77, pendant les deux phases de batch, la concentration en nitrites a augmenté à chaque fois de quelques mM indiquant donc que des cellules bactériennes étaient toujours en vie et qu'elles maintenaient a minima une faible activité de réduction des nitrates en nitrites. La variation correspondante de la concentration en nitrates n'a pas pu être identifiée. En effet, la consommation des nitrates n'était pas quantifiable car le ΔC correspondant à quelques mM était négligeable dans la gamme de concentrations en nitrates étudiée (600 à 800 mM).

D'après l'ensemble des résultats présentés, les bactéries issues de boues activées ont eu une croissance et une activité de réduction des nitrates relativement préservées pour des concentrations en nitrates jusqu'à 400 mM dans l'alimentation et 200 mM dans le bioréacteur. Les périodes de batch ont aussi montré que les boues activées avaient été capables de maintenir une croissance et une activité de réduction des nitrates très faibles jusqu'à la concentration de 750 mM en nitrates.

Conclusions :

La méthode d'acclimatation par des bioréacteurs alimentés en continu a permis d'adapter les bactéries issues des boues activées à des concentrations en nitrates de 200 mM ou des pH de 10,9. Par ailleurs les boues activées ont survécu à 750 mM de nitrates ou pH 11,8. Cependant, cette méthode d'acclimatation nécessitait d'appliquer des périodes batch dès lors que les pH ou les concentrations en nitrates étaient très élevés afin de pouvoir observer la réduction des nitrates ou l'évolution de la

DO liée à la croissance. De plus, il n'a pas été possible de mesurer avec précision une cinétique de réduction des nitrates lorsque la concentration en nitrates augmentait continuellement.

Une nouvelle méthode d'acclimatation a donc été mise en place : l'acclimatation en réacteurs discontinus séquentiels. Ainsi, les bioréacteurs sont conduits en batch, et, ponctuellement, après une étape de décantation de la biomasse cellulaire, une partie du surnageant peu concentré en biomasse est remplacée par du milieu frais avec une concentration en nitrates ou un pH plus élevé et une nouvelle période batch est initiée. Cette méthode a été élaborée d'après le retour d'expérience des deux précédentes méthodes d'acclimatation :

- Le suivi en batch des bioréacteurs permettait de suivre les cinétiques de réduction des nitrates et d'éviter le lessivage des cultures par l'alimentation continue.
- La quantité de biomasse initiale a été augmentée, généralement les cultures étaient inoculées par 1 g/L de boues activées.
- Le système de réacteur discontinu séquentiel avec la décantation de la biomasse avait pour but de minimiser les pertes de biomasse par lessivage ou ré-inoculations.
- Le temps de culture a été allongé d'après celui des cultures continues, c'est-à-dire entre 100 et 200 jours.

IV.1.3. Acclimatation en réacteurs discontinus séquentiels à des concentrations élevées en nitrates (50-400 mM) dans trois cultures à pH 9, 10 et 11

Trois réacteurs discontinus séquentiels parallèle avec trois pH différents ont été suivis. L'objectif était de déterminer les seuils de tolérance en présence d'acétate des boues activées aux concentrations en nitrates élevées en fonction du pH. Les résultats de cette méthode d'acclimatation ont été comparés à ceux des réacteurs batch successifs et des réacteurs continus. Des gammes de concentration en nitrates de 50 à 400 mM et de pH de 9 à 11 ont été testées et les cinétiques de réduction des nitrates ont été évaluées dans ces gammes. L'acétate était maintenu régulièrement à une concentration de 20 mM.

Démarche expérimentale :

Trois précultures de 20 jours à pH 9, 10 et 11 ont été utilisées pour inoculer trois cultures conduites pendant 108 jours aux mêmes pH. Le milieu de culture était du lixiviat de ciment additionné de 20 mM d'acétate, 50 mM de carbonates et des concentrations en nitrates progressivement élevées de 50 à 400 mM. La Figure 52 schématise le protocole d'inoculation de l'expérience.

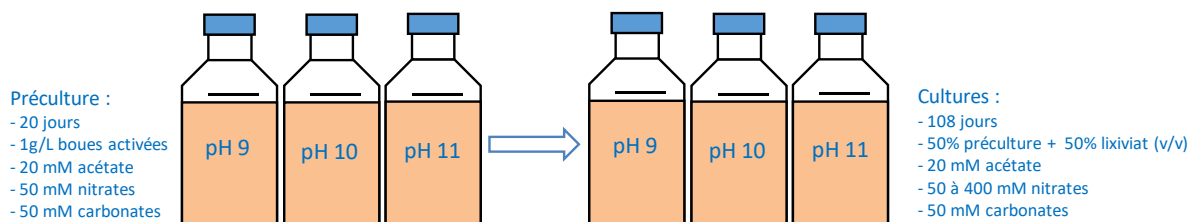


Figure 52 : Protocole expérimental d'acclimatation en réacteurs séquentiels des inocula de boues activées à des concentrations en nitrates de 50 à 400 mM à trois pH 9, 10 et 11.

Résultats :

La Figure 53 présente le suivi du pH, de la DO à 600 nm puis des concentrations en nitrates et nitrites. Dans le suivi des concentrations en nitrates et nitrites, la période batch à 50 mM en nitrates a été séparée (graphique (C)) des deux autres périodes batch (graphique (D)) pour améliorer la lisibilité des courbes. Le pH a été ajusté à pH 9, 10 et 11 à chaque ajout de milieu mais aussi le jour 2 de l'expérience.

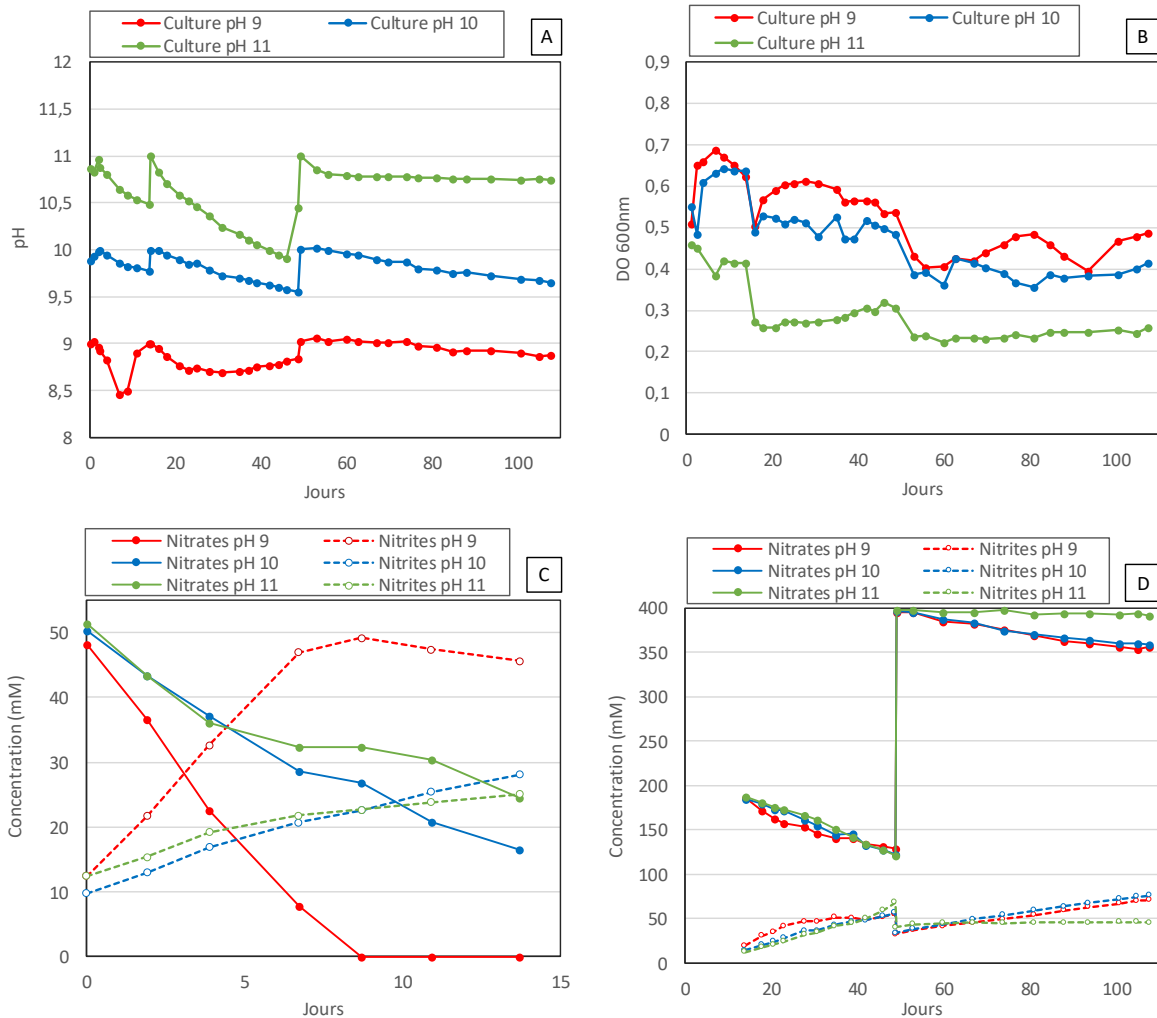


Figure 53 : Influence de l'élévation de la concentration en nitrates de 50 à 400 mM dans trois bioréacteurs séquentiels à pH 9, 10 et 11 sur les évolutions du pH (A), de la DO (B), des concentrations en nitrates et nitrites du jour 0 au jour 14 (C), des concentrations en nitrates et nitrites du jour 14 au jour 108 (D). Conditions expérimentales: trois bioréacteurs batch séquentiels, lixiviat de ciment, bactéries pré-acclimatées issues de boues activées, 20 mM d'acétate.

Le pH a diminué dans toutes les cultures quel que soit le pH de la culture Cf Figure 53 (A). Dans cette expérience, les milieux des cultures à pH 9 et à pH 10 se sont acidifiés car la dénitrification était incomplète. Les nitrites se sont accumulés dans toutes les périodes batch, en conséquence la réduction des nitrates a provoqué l'acidification des milieux des cultures à pH 9 et 10, Cf §III.2.1. Cependant, dans la culture à pH 9, entre le jour 9 et le jour 14, tous les nitrates ont été éliminés et les nitrites étaient les seuls accepteurs d'électrons, en conséquence le milieu s'est alcalinisé de pH 8,5 à 9,0.

La DO a atteint des valeurs élevées entre les jours 0 et 14 respectivement 0,69, 0,64 et 0,45 pour les cultures à pH 9, 10 et 11. Pendant le reste de l'expérience, la DO était plus basse d'environ 0.2 abs dans la culture à pH 11. Dans les cultures à pH 9 et à pH 10, les valeurs de DO étaient globalement proches. Pendant la période batch à 400 mM en nitrates, la DO s'est maintenue à 0,40, 0,36 et 0,22

respectivement pour les cultures à pH 9, 10 et 11. Il n'y a pas eu de de perte importante de biomasse malgré la concentration élevée en nitrates (400 mM).

Tableau 19 : Cinétiques de réductions des nitrates maximales (mM/j) des périodes batch dans l'expérience d'acclimatation des boues activées à des concentrations en nitrates de 50 à 400 mM en réacteur discontinus à pH 9, 10 et 11, avec 20 mM d'acétate.

	Batch (50 mM)	Batch (200 mM)	Batch (400 mM)
Culture à pH 9	5,4	1,7	0,7
Culture à pH 10	2,4	1,9	0,6
Culture à pH 11	1,9	1,8	0,1

Les cinétiques maximales de réduction des nitrates des trois cultures sont présentées dans le Tableau 19. Les concentrations en nitrates et en nitrites réduites sont présentées dans la Figure 54. Elles sont calculées d'après les équations (45) et (46), en fonction des concentrations initiales en nitrates et nitrites de chaque période batch et des concentrations en nitrates et nitrites mesurées dans les cultures au cours du temps.

$$[\text{NO}_3^-]_{\text{réduite}} = [\text{NO}_3^-]_{\text{initiale}} - [\text{NO}_3^-]_{\text{culture}} \quad (45)$$

$$\begin{aligned} [\text{NO}_2^-]_{\text{réduite}} &= [\text{NO}_2^-]_{\text{produite}} - [\text{NO}_2^-]_{\text{accumulée}} \\ &= [\text{NO}_3^-]_{\text{réduite}} - ([\text{NO}_2^-]_{\text{culture}} - [\text{NO}_2^-]_{\text{initiale}}) \end{aligned} \quad (46)$$

Dans la période batch à 50 mM de nitrates, la réduction des nitrates était supérieure dans la culture à pH 9 par rapport aux deux autres cultures à pH plus élevé. La cinétique maximale de réduction était deux fois plus élevée et 48 mM de nitrates étaient réduits en 9 jours. En revanche les nitrites se sont fortement accumulés, jusqu'à 48 mM. Il y aurait donc eu un développement des bactéries « *nitrate respiring* » dans ces conditions favorables (50 mM, pH 9). Il en a résulté des cinétiques élevées de réductions des nitrates, une DO élevée et une accumulation importante de nitrites. De manière opposée, dans les cultures à pH 10 et 11 avec les cinétiques de réduction des nitrates plus faibles et la réduction des nitrites plus importante, il y aurait eu une domination des bactéries « *true denitrifier* ». Des études ont rapporté des observations similaires sur la présence de deux types de populations se partageant la dénitrification [77,78,81]. Dans un premier temps, les bactéries appelées « *nitrate respiring bacteria* » réduisaient uniquement les nitrates sans pouvoir réduire les nitrites. Ces bactéries avaient des taux de croissance supérieurs au second groupe les « *true denitrifying bacteria* » [81]. Ces dernières étaient capables dans un second temps de réduire les nitrates et les nitrites jusqu'au stade diazote.

Dans la période batch à 200 mM de nitrates, les réductions des nitrates et des nitrites étaient similaires entre les trois réacteurs. De plus, dans la culture à pH 9, la réduction des nitrates a été ralentie tandis que la proportion de nitrites réduite a fortement augmenté. Les bactéries respirant les nitrates n'étaient probablement plus dominantes dans la culture à pH 9. Dans les trois cultures à pH 9, 10 et 11 les nitrates et les nitrites ont été réduits selon des cinétiques équivalentes par le biais de bactéries « *true denitrifier* » qui sont plus tolérantes aux concentrations élevées en nitrates. La capacité d'acidifier le pH a même permis aux bactéries de la culture à pH 11 d'être aussi rapides que celles des cultures à pH 9 et 10. Dans la culture à pH 11 le milieu s'est acidifié fortement de pH 11,0 à 9,9.

Dans la période à 400 mM, la réduction des nitrates s'est faite de manière très lente et les nitrites produits n'étaient plus réduits. Ces résultats sont similaires à ceux de l'expérience III.3.2 dans laquelle la bactérie « *true denitrifier* » *P. denitrificans* a été cultivée avec 380 mM en nitrates. Ainsi à 400 mM en nitrates, les bactéries « *true denitrifier* » étaient ralenties par la concentration très élevée en

nitrate et la réduction des nitrites était stoppée, ici par un mécanisme intracellulaire. L'équilibre entre les nitrates et les nitrites est contrôlé au niveau intracellulaire par une compétition entre les réductases des nitrates et des nitrites [72,73,75,180]. Dans la culture à pH 11, les bactéries étaient ralenties par la combinaison du pH élevé et de la concentration élevée en nitrates. Le pH 11 et la concentration en nitrates de 400 mM combinés constituent les valeurs seuils à partir desquels les bactéries ne sont plus capables de réduire correctement les nitrates.

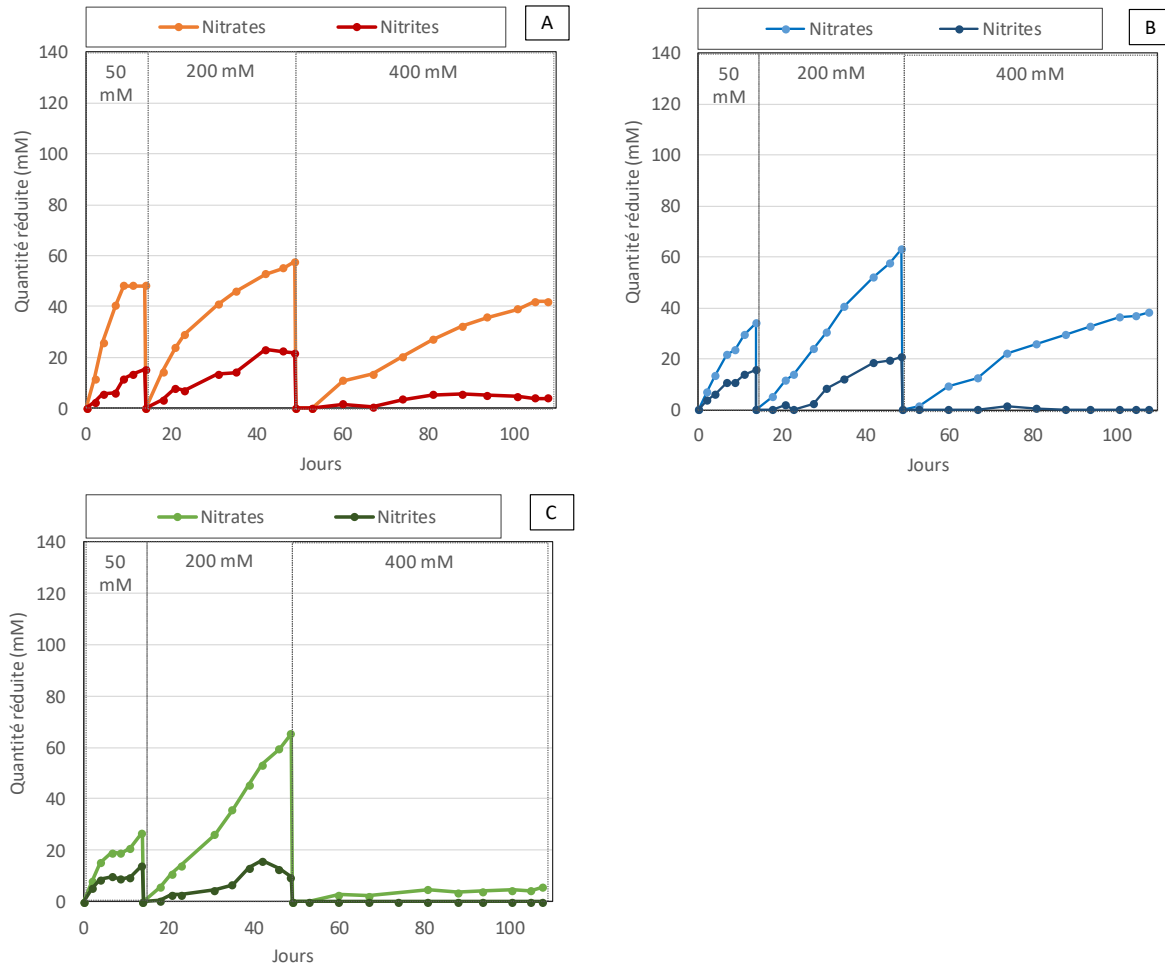


Figure 54 : Influence de l'élévation de la concentration en nitrates de 50 à 400 mM sur les évolutions des concentrations en nitrates et en nitrites réduites dans les bioréacteurs à pH 9 (A), à pH 10 (B), et à pH 11 (C). Conditions expérimentales : trois bioréacteurs batch séquentiels, lixiviat de ciment, bactéries pré-acclimatées issues de boues activées, 20 mM d'acétate.

Conclusions :

La méthode d'acclimatation avec les réacteurs discontinus séquentiels a permis d'observer la réduction des nitrates malgré la combinaison d'un pH élevé et d'une concentration élevée en nitrates. Les bactéries issues de boues activées ont été capables de maintenir une réduction faible des nitrates à 400 mM de nitrates et pH 11. L'expérimentation sur des cultures dénitrifiantes combinant pH élevés et concentrations en nitrates élevées est encore un champ d'investigation inexploité. C'est donc la première observation de cultures encore actives à pH 11 et 400 mM de nitrates. La réduction des nitrates était toujours fonctionnelle et relativement peu ralentie à 200 mM de nitrates quel que soit le pH. L'acidification du milieu lors de la dénitrification avec acétate a eu un impact majeur sur le pH : à pH 11 et 200 mM le milieu s'est acidifié jusqu'à pH 9,9 malgré la présence de 50 mM de carbonates. Cette acidification a permis à la culture à pH 11 de maintenir une réduction des nitrates importante jusqu'à 200 mM en nitrates.

Contrairement aux observations de plusieurs études [26,77], la réduction des nitrites était peu dépendante du pH initial. L'accumulation des nitrites était affectée en premier lieu par la vitesse à laquelle les nitrates étaient réduits. L'accumulation des nitrites serait causée essentiellement, par une population bactérienne de type « *nitrate respiring* » réduisant les nitrates très rapidement. Dans les périodes batch > 50 mM de nitrates, les nitrates et les nitrites étaient réduits par des bactéries de type « *true denitrifier* ». Cette dernière catégorie de population semble plus tolérante aux pH et concentrations en nitrates élevés.

IV.1.4. Conclusions de la comparaison des trois méthodes d'acclimations

Avec la méthode d'acclimation par réacteurs batch successifs, en 26 jours le pH a été augmenté graduellement de 8,5 à 11 ou la concentration en nitrates de 40 à 380 mM. Les bactéries issues de boues activées ont pu réduire les nitrates à pH 10,5 ou à 380 mM de nitrates. La méthode d'acclimation en réacteur continu a permis de réaliser une acclimation plus « douce » en utilisant un débit de 0,2 mL/min et un temps de rétention hydraulique de 8 jours. Le pH a été augmenté progressivement et en plusieurs étapes de 8,5 à 10,9 en 93 jours. La concentration en nitrates a été augmentée progressivement de 10 à 750 mM en 100 jours. Les bactéries issues de boues activées ont pu réduire une quantité importante de nitrates jusqu'à pH 10,9 ou 200 mM de nitrates et elles ont survécu à pH 11,8 ou 750 mM de nitrates. Cependant l'alimentation continue a dû être stoppée en fin d'expérience pour éviter le lessivage de la biomasse et pouvoir observer les cinétiques de réduction des nitrates. Finalement la méthode d'acclimation en réacteur discontinu séquentiel a été testée. Le pH a été fixé à 9, 10 et 11 dans trois cultures distinctes et la concentration en nitrates a été graduellement augmentée de 50 à 400 mM en 49 jours. Par ailleurs, des quantités de biomasse plus élevées (1 g/L de boues activées) ont été utilisées dans l'inoculum. Dans ces conditions expérimentales, les bactéries issues de boues activées ont pu maintenir une réduction des nitrates à 400 mM et pH 11. La méthode d'acclimation en réacteurs discontinus séquentiels a donc été utilisée dans toutes les expériences suivantes. Cette méthode a permis d'observer la réduction des nitrates et des nitrites malgré la combinaison d'un pH et d'une concentration en nitrates élevés dans le milieu de culture. Dans toutes les expériences suivantes le pH a été fixé dans les cultures alors que la concentration en nitrates était progressivement élevée. Ce choix a été motivé par le fait que le pH a un impact prédominant sur la dénitrification et inversement. En fixant le pH, il a été possible d'observer l'évolution du pH lors de la dénitrification en présence d'acétate ou de dihydrogène, ou en présence de ciment ou d'acier.

IV.2. Comparaison de l'apport de nitrates et ou de nitrites sous forme de NaNO_3 , NaNO_2 et KNO_3

Lorsque des concentrations élevées en nitrates sont ajoutées dans les milieux de culture, les quantités de contre-ions ajoutés avec les nitrates sont aussi élevées. Un contre-ion est l'ion (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} ...) qui accompagne un autre ion de charge opposée (NO_3^- , NO_2^- ...). L'effet des contre-ions ne fait pas consensus dans la bibliographie. Des auteurs ont observé des ralentissements de l'activité bactérienne lorsque les concentrations en Na^+ augmentaient [9,89]. Francis et Hatcher [9] ont montré que lorsque trois contre-ions (NH_4^+ , Na^+ , Ca^{2+}) étaient ajoutés avec les nitrates, la cinétique de dénitrification était plus élevée lorsque les nitrates étaient ajoutés sous forme NH_4NO_3 . D'autres études ont rapporté des concentrations limites en NaCl plutôt élevées : 1,2 M [91], 1 M [90] et 4,25 M [45]. Alquier [17] et coll.,

préconisaient l'utilisation de NaNO_3 pour ajouter les nitrates dans les cultures dénitrifiantes dans le contexte de stockage de déchets radioactifs, dans ce même contexte, les cations Na^+ , K^+ , Ca^{2+} sont attendus en quantités non négligeables.

Dans cette expérience le focus a été fait sur le Na^+ et le K^+ . Le Ca^{2+} (pourtant intéressant car divalent) n'a pas pu être testé pour des raisons opératoires : à pH élevé, le calcium précipite facilement avec les carbonates. Deux cultures alimentées en NaNO_3 et en KNO_3 ont donc été comparées. Une troisième culture alimentée en NaNO_2 a permis d'évaluer l'effet de concentrations élevées en nitrites sur les bactéries dénitrifiantes. En effet dans l'expérience précédente d'acclimatation des boues activées élevées à des concentrations en nitrates de 50 à 400 mM § IV.1.3, les nitrites se sont accumulés jusqu'à 80 mM. Cependant quand les concentrations en nitrates sont très élevées, il est difficile d'évaluer l'effet direct de l'accumulation des nitrites sur les bactéries. Pour rappel, les nitrites sont décrits comme des inhibiteurs voire des agents toxiques pour les cellules bactériennes [47,48,76,82,84]. Les concentrations maximales en nitrites tolérées par les bactéries peuvent dans certains cas ne pas dépasser des dizaines de mM. A l'opposé Hartop et coll. ont montré que *P. denitrificans* pouvait tolérer 140 mM de nitrites en milieu aérobie [86].

Démarche expérimentale :

Les boues activées ont été inoculées dans une préculture de 10 jours, puis la biomasse de la préculture a servi d'inoculum pour trois cultures de 144 jours. Le milieu de culture était alimenté régulièrement avec 20 mM d'acétate. Les concentrations en nitrates ou nitrites initialement à 50 mM ont été progressivement élevées puis diminuées à 100, 200, 150 et 50 mM respectivement les jours 20, 40, 100 et 130. Le pH était ajusté à pH 9,5 et tamponné par 50 mM de carbonates. Le protocole d'inoculation de l'expérience est présenté dans la Figure 55.

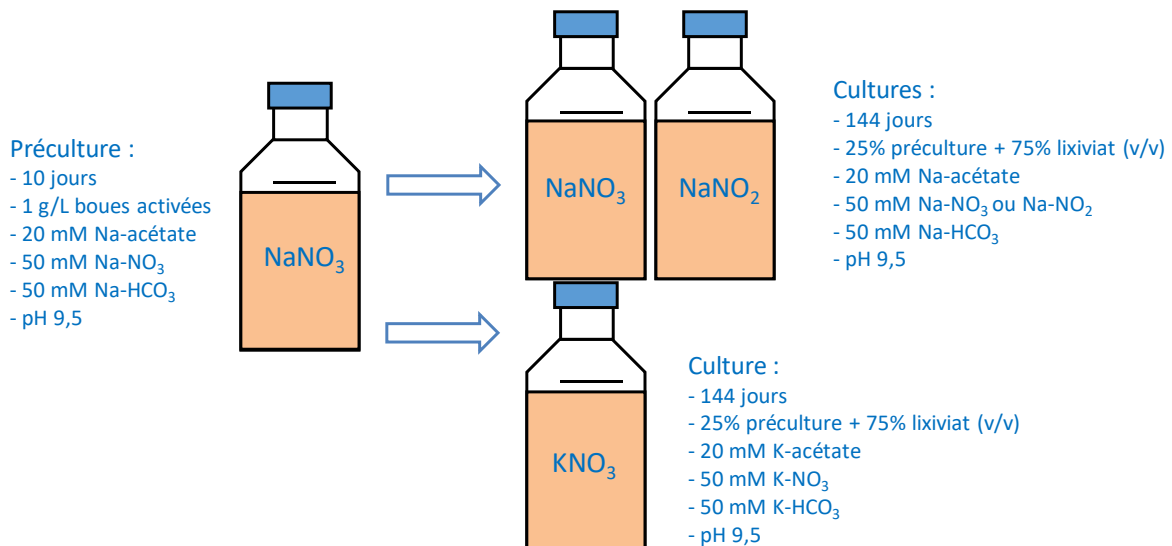


Figure 55 : Protocole de l'expérience d'élévation des concentrations en NaNO_3 , NaNO_2 et KNO_3 de 50 à 200 mM dans trois cultures hétérotrophes inoculées avec des échantillons de boues activées.

Résultats :

Pour les cultures avec NaNO_3 et NaNO_2 tous les ajouts des composés carbonates, acétate et ions hydroxyde se sont accompagnés également de l'ajout de Na^+ car ce cation a été utilisé comme contre-ion pour ces trois composés. Inversement pour le réacteur avec KNO_3 , le contre-ion était le K^+ .

L'objectif était d'avoir des cultures uniquement alimentées en Na^+ ou en K^+ pour discerner plus facilement l'impact de l'un ou l'autre cation. Le suivi du pH, de la DO, et des concentrations en nitrates et nitrites sont présentés dans la Figure 56.

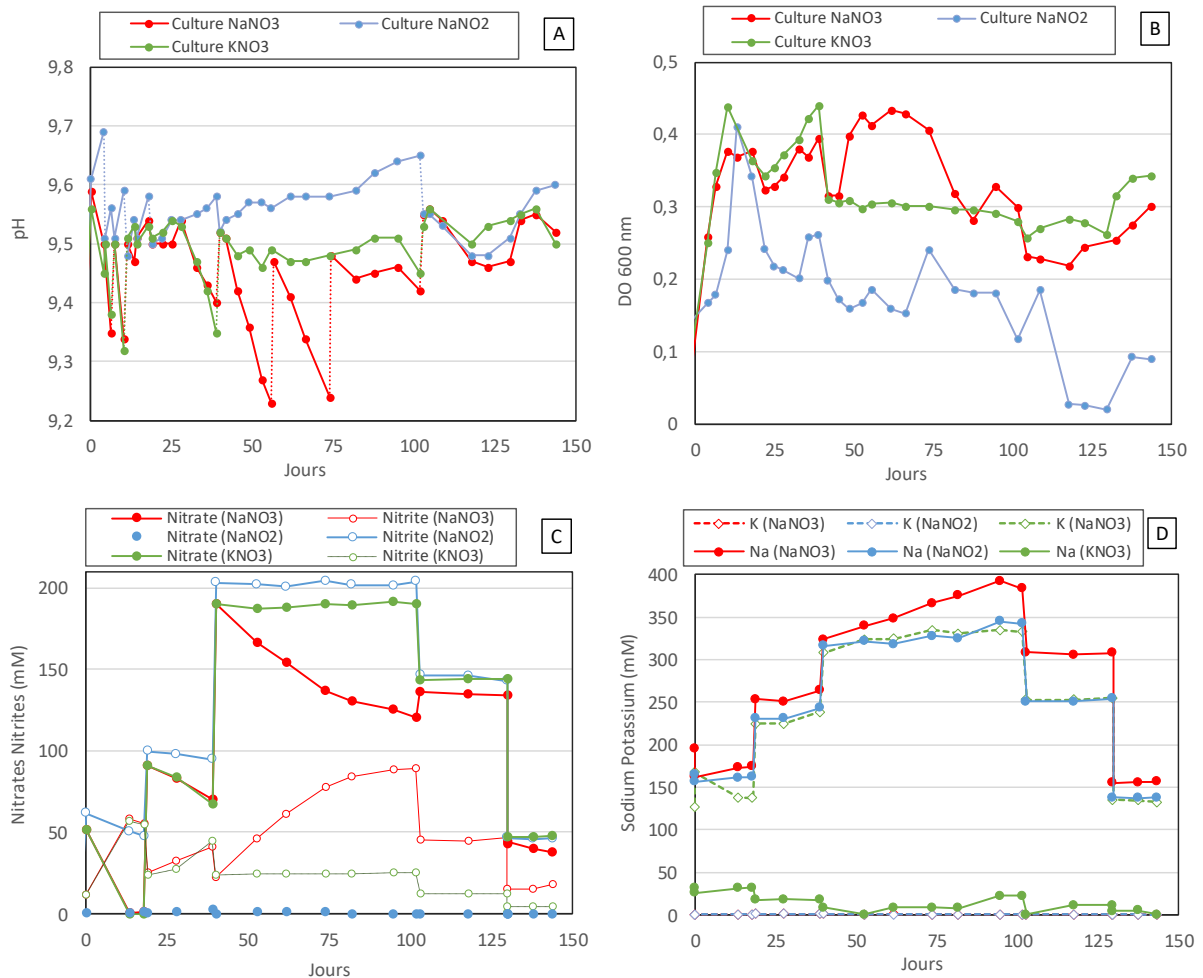


Figure 56 : Effet de l'élévation des concentrations en NaNO_3 , NaNO_2 et KNO_3 de 50 à 200 mM sur les évolutions du pH (A) de la DO (B), des concentrations en nitrates et nitrites (C) et des concentrations en Na et K (D). Conditions expérimentales : trois bioréacteurs batch séquentiels, lixiviat de ciment, bactéries pré-acclimatées issues de boues activées, 20 mM d'acétate, pH 9,5.

Le pH a été régulièrement ajusté à pH 9,5, les ajustements sont représentés par les pointillés, Figure 56 (A). Jusqu'au jour 40, des diminutions de pH ont été enregistrées dans les cultures avec NaNO_3 et KNO_3 , l'évolution du pH dans ces deux cultures était quasi-identique. Du jour 40 au jour 100, seul le milieu de la culture avec NaNO_3 s'est acidifié alors que le pH de la culture avec KNO_3 est resté constant. Au contraire, dans la culture avec NaNO_2 du jour 0 au jour 100, le pH a montré une augmentation. Sachant que dans les cultures avec NaNO_3 et KNO_3 les nitrites n'ont quasiment pas été réduits, il est normal que la réduction des nitrates ait causé cette acidification. Inversement, la réduction des nitrites a alcalinisé le pH de la culture avec NaNO_2 . Ces résultats sont en accord avec les conclusions de la discussion sur le pH de la section III.2.1. D'après cette discussion, pendant la réduction des nitrates en nitrites, la production de CO_2 et la production d' OH^- sont tels que le pH s'acidifie quel que soit le pH initial de la culture. En revanche, pendant la réduction des nitrites en diazote, le pH tend vers 11. La Figure 56 (B) présente l'évolution de la DO.

La DO était perturbée ponctuellement par les ajouts de milieu, ce qui s'est traduit par des augmentations momentanées de DO, Figure 56 (B). En particulier dans la culture avec NaNO_2 l'ajout de milieu provoquait une augmentation de DO, puis des précipités se formaient sur les bords du réacteur ce qui diminuait la DO rapidement. Globalement, la DO dans la culture avec NaNO_2 était plus faible que dans les deux autres cultures, les nitrites ont donc entraîné une croissance bactérienne plus faible. Ce phénomène a déjà été observé dans une étude qui de manière similaire a comparé une culture alimentée en nitrates avec une culture alimentée en nitrites [81]. Plusieurs explications peuvent être apportées. Premièrement les nitrites ont été décrits dans plusieurs études comme inhibiteurs de l'activité bactérienne (phosphorylations oxydatives, croissance, transport de proline, etc.) [46]. Deuxièmement, il est possible qu'en présence de nitrates, la DO supérieure soit liée à la présence de bactéries de type « *nitrate respiring* » qui sont incapables de réduire les nitrites, donc qui sont absentes de la culture avec NaNO_2 . Dans cette dernière, il n'y aurait que des bactéries « *true dénitrifiantes* », ces bactéries sont capables de réduire les nitrites mais ont des taux de croissance inférieurs aux bactéries « *nitrate respiring* » [77,78,81]. Les cultures avec NaNO_3 et KNO_3 ont une DO similaire jusqu'au jour 40. Entre le jour 40 et le jour 100, seule la DO de la culture NaNO_3 a augmenté. Comme pour le pH, les évolutions de la DO des cultures avec NaNO_3 et KNO_3 sont quasi-identiques jusqu'au jour 40 où la concentration en nitrates augmente à 200 mM.

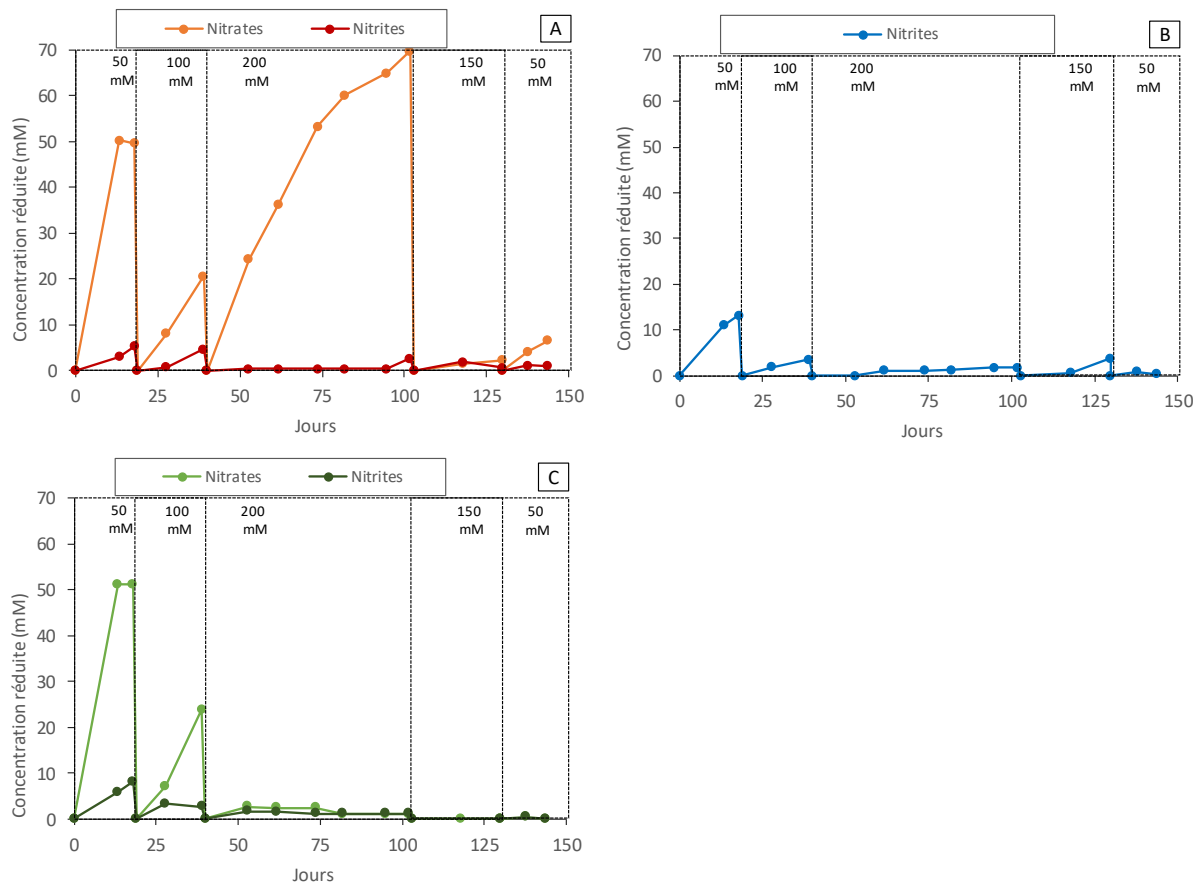


Figure 57 : Effet de l'élévation des concentrations en NaNO_3 , NaNO_2 et KNO_3 de 50 à 200 mM sur les évolutions des concentrations en nitrates et en nitrites réduites, dans les bioréacteurs avec NaNO_3 (A), avec NaNO_2 (B), et avec KNO_3 (C). Conditions expérimentales : trois bioréacteurs batch séquentiels, lixiviat de ciment, bactéries pré-acclimatées issues de boues activées, 20 mM d'acétate, pH 9,5.

Dans la Figure 56 (C), sont présentées les évolutions des concentrations en nitrates et en nitrites. Dans la Figure 57, sont présentées les évolutions des concentrations en nitrates et en nitrites réduites.

Calculées d'après les équations (45) et (46). Les cinétiques de réduction des nitrates des cultures avec NaNO_3 et KNO_3 , et la réduction des nitrites de la culture avec NaNO_2 sont présentées dans le Tableau 20.

Tableau 20 : Cinétiques de réduction des nitrates ou des nitrites (mM/j) des cultures NaNO_3 , NaNO_2 , KNO_3 lors des différentes périodes batch.

Batch [NO_3^-] ou [NO_2^-]	Jour 0 à 20 (50 mM)	Jour 20 à 40 (100 mM)	Jour 40 à 100 (200 mM)	Jour 100 à 130 (150 mM)	Jour 130 à 144 (50 mM)
Culture NaNO_3	3,8	1,4	1,1	0	0,4
Culture KNO_3	3,8	1,2	0	0	0
Culture NaNO_2	0,8	0,3	0	0,1	0

Les cultures avec NaNO_3 et KNO_3 ont eu des cinétiques de réduction des nitrates et des nitrites identiques jusqu'au jour 40 à 200 mM de nitrates. A partir du jour 40, dans la culture avec KNO_3 les réductions des nitrates et des nitrites se sont arrêtées. Seule la culture avec NaNO_3 a continué à réduire des nitrates, mais la réduction s'est arrêtée au stade nitrites. Dans la culture avec NaNO_3 , entre les jours 40 et 100, la quantité de nitrates réduits et la DO ont atteint des valeurs importantes tandis que les nitrites n'étaient pas réduits. Ces résultats indiquent que les bactéries « *nitrate respiring* » étaient dominantes dans la culture. En revanche à partir du jour 100, la réduction des nitrates était complètement stoppée. Ce blocage était probablement causé par l'accumulation de nitrites très importante qui a atteint jusqu'à 90 mM entre les jours 40 et 100. En effet dès le jour 75 à 80 mM de nitrites, la DO a chuté et la réduction des nitrates a ralenti jusqu'à atteindre un plateau. Il semblerait qu'il y ait eu un remaniement de la population bactérienne en faveur des bactéries « *true denitrifier* » plus tolérantes aux concentrations élevées en nitrites. Finalement, la croissance et la réduction des nitrates n'ont repris qu'à partir du jour 130, quand la concentration en nitrites a été suffisamment diminuée. Ces résultats indiquent que les bactéries « *nitrate respiring* » sont capables de croître et de réduire les nitrates avec des cinétiques très élevées au point que l'accumulation des nitrites concomitante finisse par provoquer l'effondrement des communautés bactériennes.

Dans la culture avec NaNO_2 , la réduction des nitrites était faible mais s'est maintenue jusqu'à 100 mM de nitrites. A 200 mM de nitrites, la réduction était complètement stoppée. La concentration en nitrites maximale tolérable par les bactéries de types « *true denitrifier* » est donc comprise entre 100 mM et 200 mM de nitrites. Les bactéries « *true denitrifier* » sont donc plus tolérantes aux nitrites que les bactéries « *nitrate respiring* », ce qui n'est pas étonnant car ces dernières sont incapables de réduire les nitrites. En comparaison, généralement les valeurs maximales de nitrites tolérées par les bactéries sont de l'ordre de quelques dizaines de mM de nitrites. Une étude a cependant rapporté une tolérance de *P. denitrificans* (une bactérie « *true denitrifier* ») à 140 mM de nitrites, mais cette étude a été réalisée en présence d'oxygène [86]. La respiration bactérienne était aérobie, cette étude a donc évalué la tolérance et non la réactivité de *P. denitrificans* vis-à-vis de concentrations élevées en nitrites.

Le suivi des concentrations en ions K^+ et Na^+ dans les trois bioréacteurs est présenté dans la Figure 56 (D). Comme les ajouts des carbonates, acétate et ions hydroxyde se sont accompagnés également de l'ajout de Na^+ ou de K^+ les ratios molaires Na/NO_3 et K/NO_3 ne sont pas égaux à 1. A noter que d'autres cations comme le magnésium ou le calcium ont été détectés par HPIC mais leurs concentrations étaient constantes et négligeables, leurs impacts éventuels sur l'activité bactérienne ont été écartés.

A partir du jour 40, la concentration en K^+ a atteint 300 mM dans la culture avec KNO_3 , la croissance et la réduction des nitrates a été stoppée. En revanche, dans la culture avec NaNO_3 la croissance et les réductions de nitrates ont continué à 300 mM de Na^+ . Le potassium à 300 mM semblait donc agir

comme inhibiteur de la croissance bactérienne et de la réduction de nitrates. De petits ajouts de Na^+ dans la culture avec KNO_3 au jour 60 (10 mM) et au jour 90 (20 mM) ont montré que l'inhibition n'était pas liée à un manque de sodium. En fin d'expérience, la concentration en K^+ a été diminuée jusqu'à 150 mM mais la réduction des nitrates n'a pas repris. Pourtant, d'après la DO qui s'est maintenue puis qui a augmenté en fin d'expérience, et le pH qui n'a pas diminué, il semblerait qu'il n'y ait pas eu de lyses cellulaires. Le K^+ à concentration élevée semble avoir eu un effet inhibiteur temporaire sans être toxique pour les cellules. L'inhibition du K^+ sur les bactéries est difficilement explicable car le K^+ est un cation omniprésent et indispensable pour l'activité bactérienne [208–211]. Il est impliqué notamment dans la régulation de la concentration osmotique cellulaire, la régulation du pH, l'expression génétique, et l'activation d'enzymes cellulaires [209,211]. De nombreux systèmes de régulations et canaux maintiennent une concentration très élevée de K^+ dans les cellules, il semblerait même que ce soit le cation le plus concentré dans les cellules [208,209]. Il a été observé des concentrations intracellulaires très élevées en K^+ , allant de 100 à 600 mM [209]. En conséquence, les gradients de K^+ peuvent être très élevés. Des auteurs ont observé une concentration interne de K^+ 106 fois supérieure à la concentration externe [211]. Il semblerait donc qu'une des principales fonctions du K^+ soit de maintenir la pression de turgescence des bactéries en contrôlant la concentration osmotique cellulaire. La pression de turgescence est la pression appliquée par l'eau dans la cellule bactérienne contre la paroi de la cellule, elle donne sa forme à la cellule et est directement liée à l'osmolarité à l'intérieur de la cellule. Le K^+ interviendrait par exemple dans la croissance cellulaire en maintenant une osmolarité élevée permettant l'influx d'eau par osmose ce qui permet alors d'accroître le volume cellulaire [210]. D'après le mode d'action du K^+ , une hypothèse envisageable expliquant l'inhibition bactérienne à forte concentration en K^+ , serait la diminution du gradient K^+ . A cause de la concentration trop élevée en K^+ à l'extérieur des cellules, les bactéries ne seraient plus capables de maintenir une osmolarité suffisante par rapport à l'extérieur, donc les bactéries ne seraient plus capables de contrôler leur pression de turgescence. Les cellules perdraient alors de l'eau à cause de l'osmose, le volume des cellules diminuerait à l'intérieur des parois. Les cellules entreraient en état de plasmolyse, ce qui *in fine* perturberait l'activité des cellules.

Dans la culture avec NaNO_3 , pendant la période du jour 40 au jour 100, la concentration en Na^+ a augmenté exactement de 320 mM à 390 mM. Ceci s'explique par les ajouts réguliers de Na-acétate ou de NaOH pour maintenir respectivement la concentration d'acétate à 20 mM et le pH à 9,5. Au total, 25 mM d'acétate et environ 5 mL de NaOH (10 M) ont été ajoutés, soit environ 75 mM de Na^+ . En complément, il est possible que des relargages de Na^+ soit liés à de la lyse cellulaire. En effet, du jour 62 au jour 82, la DO a chuté de 0,43 à 0,28.

Pour approfondir la compréhension des résultats, la population bactérienne du consortium de boues activées a été analysée en fin d'expérience par séquençage. La méthode est décrite dans le paragraphe II.3.1.2. La Figure 58 présente la distribution des communautés bactériennes des trois cultures au jour 100. Dans certains cas, le genre est donné à la place de l'espèce car l'espèce n'a pas pu être identifiée. Chaque espèce ou genre dominant est représenté en % de la population totale. Seules les espèces représentant plus de 3% de la population totale des cultures ont été indiquées. Ce choix empirique a permis d'éviter de surcharger le graphique. Les espèces minoritaires ont été classées dans la section Other/No Hit comprenant aussi les séquences ADN qui sont inconnues de la base de données ou écartées par des tests statistiques.

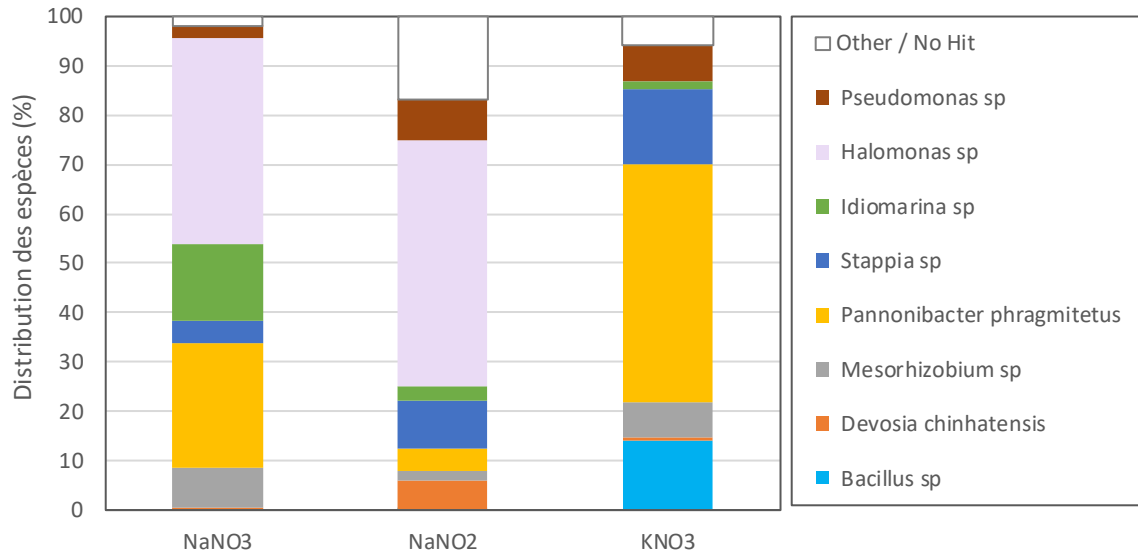


Figure 58 : Effet de l'élévation des concentrations en NaNO_3 , NaNO_2 et KNO_3 de 50 à 200 mM sur la distribution des espèces bactériennes au jour 100. Conditions expérimentales : trois bioréacteurs batch séquentiels, lixiviat de ciment, bactéries pré-acclimatées issues de boues activées, 20 mM d'acétate, pH 9,5.

La culture NaNO_3 était composée de 42% de *Halomonas sp.* qui est un genre de bactérie dénitrifiante de type « *true denitrifier* » hétérotrophe et halo-alcalophile [23,145]. La deuxième espèce la plus représentée était *Pannonibacter phragmitetus* avec 25%. C'est une bactérie décrite comme dénitrifiante, hétérotrophe, et alcalophile [212,213]. Pour le reste, il y avait 15% de *Idiomarina sp.* qui est un genre de bactérie de type « *nitrate respiring* », hétérotrophe, et est capable de vivre de pH 8,0 à 9,5 [214]. Il y avait 8% de *Mesorhizobium sp.* dont certaines espèces peuvent réduire nitrates et nitrites en hétérotrophie [215,216]. Enfin, il y avait 5 % de *Stappia sp.* qui appartient à un genre dénitrifiant et halophile [217,218]. Sans surprise, les bactéries isolées étaient dénitrifiantes et hétérotrophes, certaines étaient alcalophiles, d'autres halophiles, certaines halo-alcalophiles. Il est notable qu'une majorité des bactéries étaient identifiées comme « *true denitrifier* ».

La culture avec NaNO_2 était composée majoritairement de 50% de *Halomonas sp.*. Pour le reste il y avait 10 % de *Stappia sp.*, 8% de *Pseudomonas sp.*, et 5% de *Pannonibacter phragmitetus*. *Pseudomonas sp.* appartient à un genre dénitrifiant mixotrophe et neutrophile [219]. Le profil de la communauté bactérienne était similaire à celui de la culture avec NaNO_3 . Ceci confirme qu'il y avait une domination des bactéries « *true denitrifier* ».

La culture KNO_3 était composée de 48% de *Pannonibacter phragmitetus*. Elle contenait aussi 15 % de *Stappia sp.*, 14% de *Bacillus sp.*, 7% de *Mesorhizobium sp.* et 7% de *Pseudomonas sp.*. Le genre *Bacillus sp.* est décrit comme dénitrifiant, hétérotrophe et halo-alcalophile [45,139]. Certaines espèces de *Bacillus sp.* sont décrites comme saprophytes : elles sont capables d'utiliser la matière organique d'autres bactéries mortes en libérant des enzymes digestives. *Bacillus subtilis* est par exemple capable de digérer la pectine de la paroi des cellules végétales en synthétisant diverses enzymes (pectine-lyase, pectate-lyase et polygalacturonase) [220]. Les polysaccharides de la pectine sont hydrolysés jusqu'au monosaccharides puis assimilés par les bactéries. Au cours de la thèse, *Bacillus sp.* a été observée plusieurs fois dans des cultures dont l'activité était fortement inhibée et dans lesquelles des lyses cellulaires étaient observées. La présence de *Bacillus sp.* pourrait donc être un indicateur d'une culture non fonctionnelle qui s'auto-digère. La deuxième grosse différence avec la culture avec NaNO_3 était l'absence du genre *Halomonas sp.* Des études antérieures ont montré qu'*Halomonas desiderata* est

capable de dénitrifier efficacement dans un contexte applicable au stockage de déchets radioactifs, c'est-à-dire à pH alcalin, en milieu cimentaire et en concentration élevée en sodium [21,221]. *Halomonas sp.* a donc été un élément moteur de la dénitrification dans les cultures avec NaNO_3 et NaNO_2 , elle était d'ailleurs majoritaire dans les deux cultures. Cependant, *Halomonas sp.* était absente de la culture avec KNO_3 . D'après ces éléments, une hypothèse peut être avancée : *Halomonas sp.* pourrait être sensible aux concentrations élevées de K^+ et l'inhibition de cette bactérie par le K^+ aurait conduit au ralentissement général de la dénitrification.

Conclusions :

Cette expérience a permis de montrer que les boues activées étaient capables de maintenir une réduction faible des nitrites jusqu'à une concentration de 100 mM en présence de 20 mM d'acétate. La concentration maximale de nitrites ainsi tolérée par les boues activées, est supérieure à celles plus généralement renseignées dans les études réalisées avec des consortia microbiens. Les concentrations maximales en nitrites sont classiquement de l'ordre de dizaines de mM [46,47].

Par ailleurs l'utilisation du Na^+ est préférable pour les ajouts de nitrates car il n'a pas entraîné d'inhibition de la dénitrification lorsque des quantités élevées de NaNO_3 étaient ajoutées. A l'inverse, l'apport de 300 mM de K^+ a bloqué complètement la dénitrification. Il est difficile d'expliquer l'inhibition par le K^+ car c'est un cation omniprésent et indispensable pour l'activité bactérienne [208–211]. Il serait notamment le cation le plus concentré à l'intérieur des cellules [208,209]. Cependant, une hypothèse est envisageable, le K^+ est très concentré dans la cellule afin maintenir un gradient très élevé avec l'extérieur, le K^+ est ainsi fortement impliqué dans l'homéostasie de l'osmolarité cellulaire [209,211]. En conséquence, les concentrations très élevées de K^+ dans le milieu de culture pourraient perturber l'équilibre de l'osmolarité entre le milieu de culture et le milieu interne des cellules. Ces dernières perdraient alors de l'eau par osmose et leur volume diminuerait. Au final, ce déséquilibre peut par exemple bloquer la croissance cellulaire [210].

A la fin du batch à 200 mM en nitrates ou nitrites, les populations bactériennes des cultures avec NaNO_3 et NaNO_2 étaient relativement similaires. Elles étaient composées en majorité du genre *Halomonas sp.* qui fait partie du type « *true denitrifier* ». La réduction des nitrites est donc assurée par les bactéries « *true denitrifier* ». Dans la culture avec NaNO_3 , les bactéries de type « *nitrate respiring* » ont dominé la culture jusqu'à ce que l'accumulation des nitrites atteigne environ 80 mM. Il y a eu alors un remaniement de la population bactérienne en faveur des bactéries « *true denitrifier* » qui a été confirmé par l'analyse de la population bactérienne à la fin du batch à 200 mM. Il semblerait que les bactéries « *nitrate respiring* » sont capables de croître et de réduire les nitrates avec des cinétiques très élevées au point que l'accumulation des nitrites concomitante finisse par complètement inhiber les communautés bactériennes « *nitrate respiring* ».

En résumé, cette expérience a permis de confirmer que l'utilisation de Na^+ est préférable pour augmenter les concentrations en nitrates. Il a aussi été montré que les bactéries de type « *true denitrifier* » sont capables de tolérer des concentrations en nitrites plus élevées que ce qui était attendu. Dans les expériences de la thèse, les nitrites ne devraient donc a priori pas poser trop de difficultés aux bactéries s'ils ne dépassent pas des concentrations de 100 mM.

IV.3. Dénitrification à pH hyperalcalins (pH 11,5 et 12)

L'objectif de cette expérience était de déterminer la survie des boues activées dans des milieux tamponnés par les carbonates à pH très élevé soit pH 11,5 et 12. Très peu d'études ont rapporté une activité bactérienne dénitrifiante dans des milieux tamponnés à des pH supérieurs à 11 [19–21,33]. Malgré tout, en présence d'acétate la dénitrification peut acidifier le milieu, l'adaptation des bactéries à ces pH est donc théoriquement possible.

Démarche expérimentale :

Une préculture de 5 jours à pH 10 a permis d'inoculer deux cultures batch à pH 11,5 et 12 suivies pendant 234 jours. Le milieu des cultures était du lixiviat de ciment additionné de 20 mM d'acétate, 50 mM de carbonates et de 50 mM de nitrates. Le protocole de l'expérience est présenté dans la Figure 59.

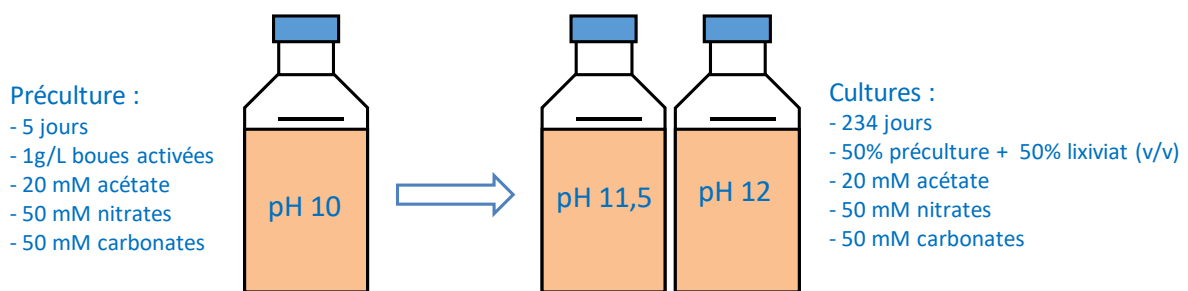


Figure 59 : Protocole de l'expérience à pH très alcalin avec deux cultures hétérotrophes à pH 11,5 et 12,0.

Résultats :

Dans la Figure 60 sont présentées les évolutions du pH, de la DO à 600 nm, des concentrations en nitrates et nitrites et le suivi des quantités de nitrates et de nitrites réduites.

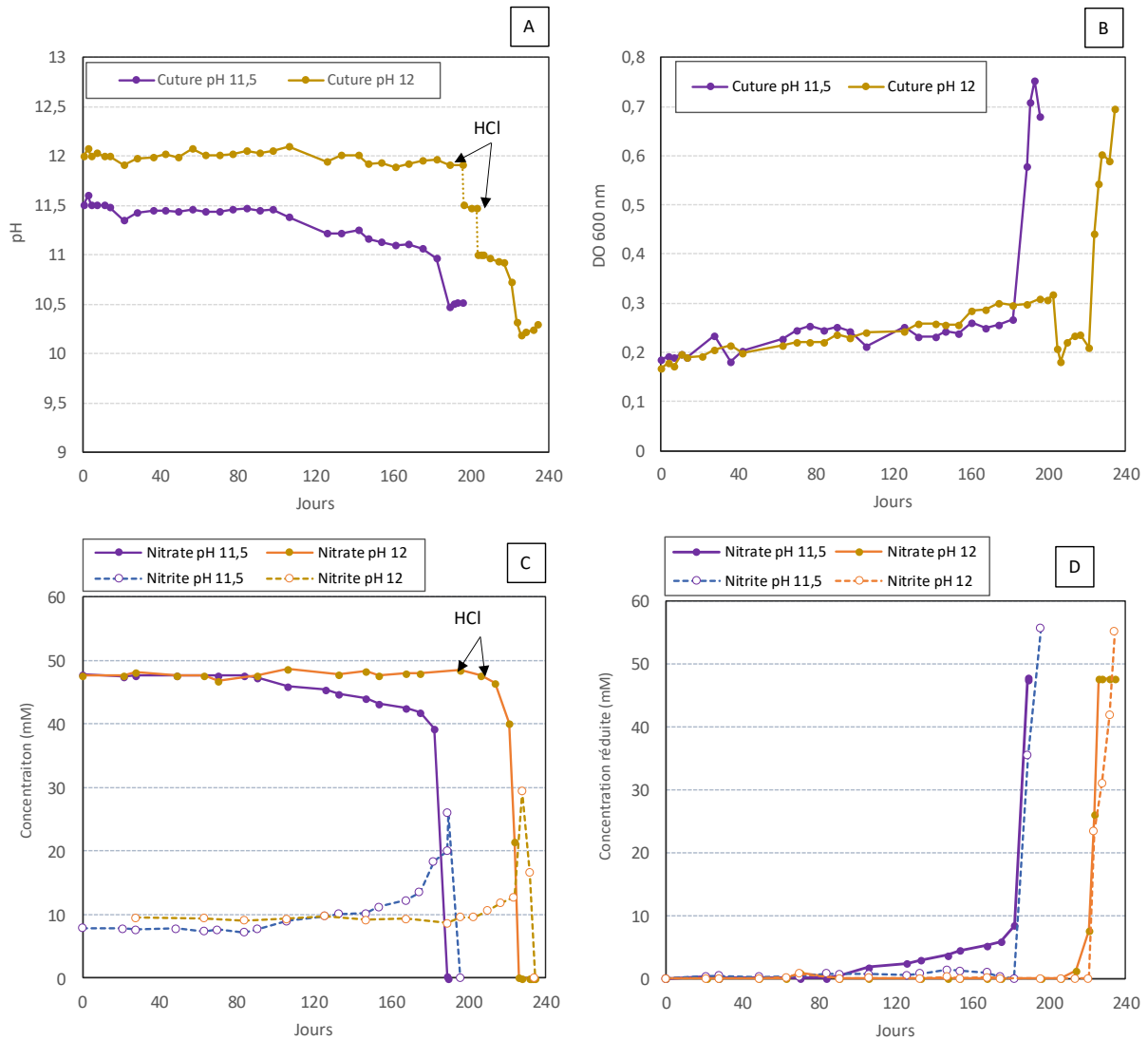


Figure 60 : Influence de pH initiaux très alcalins 11,5 et 12,0 sur les évolutions du pH (A), de la DO (B), des concentrations en nitrates et nitrites (C), et des concentrations en nitrates et en nitrites réduites (D). Conditions expérimentales : deux bioréacteurs batch, lixiviat de ciment, bactéries pré-acclimatées issues de boues activées, 20 mM d'acétate, 50 mM de nitrates.

Dans la culture à pH initial 11,5 le pH était d'abord constant puis il a diminué jusqu'à pH 10,5 du jour 98 au jour 234. Dans la culture à pH initial 12, le pH est resté constant. Dans cette même culture, aux jours 196 et 203, deux ajouts d'HCl ont permis d'acidifier manuellement le milieu à pH 11,0, les sauts de pH sont représentés par des pointillés, puis le pH a diminué à pH 10,3 sans intervention extérieure. En résumé, dans la culture à pH initial 11,5, le pH a diminué naturellement sous l'effet de l'activité bactérienne. Dans la culture à pH initial 12, après une acidification manuelle à pH 11, le pH a également diminué sous l'effet de l'activité bactérienne. Les bactéries semblent donc avoir survécu à ces pH extrêmes. Par ailleurs, cette expérience confirme les prédictions des calculs théoriques de l'évolution du pH lors de la dénitrification du paragraphe III.2.1. En effet, pour 50 mM de nitrates complètement réduits (voir Figure 60 (C)) les pH théoriques de la culture à pH initial 11,5 et de la culture à pH initial 12 (acidifiée ensuite à pH 11) seraient respectivement 10,5 et 10,4. Les pH finaux expérimentaux étaient 10,5 et 10,3, ces valeurs étaient donc très proches des prédictions. Cette expérience permet de conforter la robustesse du modèle prédictif du pH. L'oxydation de l'acétate en CO₂ concomitante à la dénitrification a permis d'acidifier le milieu. Le mécanisme d'acidification est plus amplement

détaillé dans la section III.2.1. Par ailleurs, d'après la concordance avec le modèle prédictif du pH, l'évolution du pH correspondait à une dénitrification jusqu'au stade diazote. La dénitrification était donc théoriquement totale.

D'après le suivi de la DO, la croissance bactérienne était d'abord lente, puis elle s'est accélérée avec deux pics de DO à 0,75, au jour 193, et à 0,7 au jour 230 respectivement pour les cultures à pH initial 11,5 et 12. Ces valeurs de DO sont élevées et sont comparables aux valeurs maximales de DO enregistrées dans les expériences précédentes en culture hétérotrophes de boues activées. Les boues activées se sont donc bien adaptées au pH alcalin.

Dans la Figure 60 (C) est présenté le suivi des concentrations en nitrates et nitrites. Dans la Figure 60 (D) sont présentées les concentrations de nitrates et de nitrites réduites, calculées d'après la différence entre les concentrations initiales en nitrates et en nitrites. La concentration en nitrites qui a été réduite était supérieure à 50 mM car dans les deux cultures l'inoculum a apporté 10 mM de nitrites, Figure 60 (C). Les cinétiques de réductions des nitrates étaient étroitement liées au pH des cultures. Par exemple, trois périodes dans l'évolution de la réduction des nitrates de la culture à pH initial 11,5 pouvaient être distinguées. Du jour 0 au jour 91, à pH 11,5, les nitrates n'étaient pas réduits. Du jour 91 au jour 182, de pH 11,5 à pH 11 les nitrates étaient réduits à 0,1 mM/J. Et enfin, du jour 182 au jour 196 (fin de la culture), le pH était devenu inférieur à 11 et la cinétique de réduction des nitrates atteignait 3,0 mM/J. De même, dans la culture à pH initial 12, la réduction des nitrates a démarré quand le pH a été manuellement descendu à 11 au jour 203. La cinétique de réduction des nitrates a alors atteint 3,9 mM/J. Les nitrites étaient quant à eux réduits dans les deux cultures avec quelques jours de latence par rapport aux nitrates. Les cinétiques de réduction des nitrites étaient élevées, respectivement de 4,0 mM/J et 4,2 mM/J dans les cultures à pH initial 11,5 et 12.

Malgré le pH très élevé et la présence du tampon carbonates, dans la culture à pH initial 11,5, les bactéries ont réussi à initier la réduction des nitrates après 98 jours. Cette réduction des nitrates était faible mais suffisante pour acidifier lentement le pH. Au jour 182, le pH a atteint 11,0, la réduction des nitrates et la croissance bactérienne se sont accélérées : en 20 jours, les nitrates ont été complètement dénitrifiés. Dans la culture à pH initial 12 les bactéries ont survécu pendant 196 jours dans ces conditions extrêmes. Cependant, il a fallu une acidification manuelle pour permettre l'activation des bactéries. Une fois le milieu acidifié à pH 11, la croissance bactérienne et la dénitrification ont démarré, les nitrates ont été complètement réduits en 20 jours aussi. En présence d'acétate, le pH 11 est une valeur seuil au-delà de laquelle la réduction des nitrates est très ralentie. En dessous de cette valeur de pH, la réduction des nitrates s'accélère fortement. Les cinétiques de réduction des nitrites élevées constatées suggèrent que les bactéries majoritaires dans les cultures étaient du type « *true denitrifier* ». En effet, dans les expériences précédentes Cf § IV.1.3 et IV.2, il a été observé que les bactéries « *true denitrifier* » étaient plus tolérantes aux concentrations en nitrates et aux pH élevés. De plus, lorsque les bactéries de type « *nitrate respiring* » prolifèrent, la réduction des nitrates est largement supérieure à la réduction des nitrites qui s'accumulent jusqu'à ce qu'un remaniement de la population ne donne l'avantage aux bactéries « *true denitrifier* ».

Conclusions :

Peu d'études ont observé de l'activité dans des cultures dénitrifiantes à pH supérieur à 11. Par exemple, deux études ont testés pH 10, 11 et 12 sur des cultures dénitrifiantes et n'ont pas observé d'activité bactérienne à pH 12 [33,34]. Les études qui ont observé de la dénitrification bactérienne à pH supérieur à 11 sont plutôt rares [19,37]. De plus, le pH annoncé dans les études est souvent celui du milieu d'alimentation et non celui du milieu de culture. L'expérience présentée ci-dessus est donc une des rares observations de la dénitrification bactérienne dans un milieu de culture à pH 11,5. Cette expérience a nécessité un temps de culture très long (234 jours) mais apporte de précieuses

informations sur le comportement des bactéries dénitrifiantes à pH hyperalcalin en hétérotrophie. Les boues activées ont commencé à réduire lentement les nitrates à pH 11,5. Ce qui a conduit à l'acidification progressive du milieu de culture puis l'accélération de la réduction des nitrates. Par ailleurs les boues activées ont survécu pendant 200 jours à pH 12 et après une acidification manuelle à pH 11, la réduction des nitrates et des nitrites s'est initiée. D'après ces résultats, en présence d'acétate, au-dessus de pH 11,5 la réduction des nitrates est stoppée. Entre pH 11,5 et 11,0, les cinétiques de croissance et de réduction des nitrates sont lentes (0,1 mM/J). Enfin, en dessous de pH 11,0, les cinétiques de croissances et de réduction des nitrates s'accélèrent (3,9 mM/J). Il y a donc une valeur seuil du pH à 11,0. Comme expliqué dans la section 5.1, une attention particulière doit être portée sur le contrôle du pH, car en dépit de la présence de 50 mM de carbonates, la dénitrification des nitrates en diazote a conduit à l'acidification de pH 11,5 à pH 10,5.

IV.4. Transition d'un donneur d'électrons organique (acétate) vers un donneur d'électrons inorganique (H₂)

Dans cette expérience les boues activées ont été acclimatées progressivement à l'utilisation du dihydrogène comme donneur d'électrons. Le premier objectif était de confirmer que les boues activées pouvaient s'adapter au dihydrogène comme seul donneur d'électrons. Le deuxième objectif était d'avoir un premier aperçu en hydrogénotrophie des gammes de pH et de concentrations en nitrates dans lesquelles les boues activées pouvaient réduire les nitrates.

Démarche expérimentale :

Trois bioréacteurs discontinus ont été saturés en dihydrogène par un flux constant (100 H₂, 1 bar). De l'acétate (20 mM) a cependant été ajouté le premier jour des cultures. Par la suite, les ajouts de milieu étaient dépourvus d'acétate. Une fois en hydrogénotrophie les pH ont été progressivement élevés à 9, 10 et 11 dans les trois cultures. Le protocole de l'expérience est présenté dans la Figure 61.

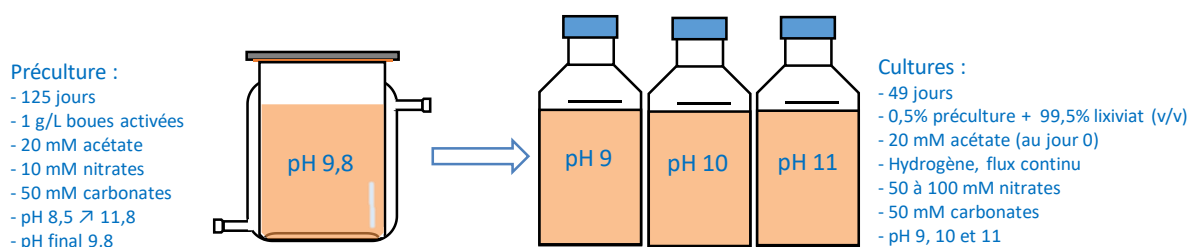


Figure 61 : Protocole expérimental schématisant la transition de l'acétate à l'hydrogène comme donneur d'électrons dans trois cultures inoculées à partir de boues activées à pH 9, 10 et 11.

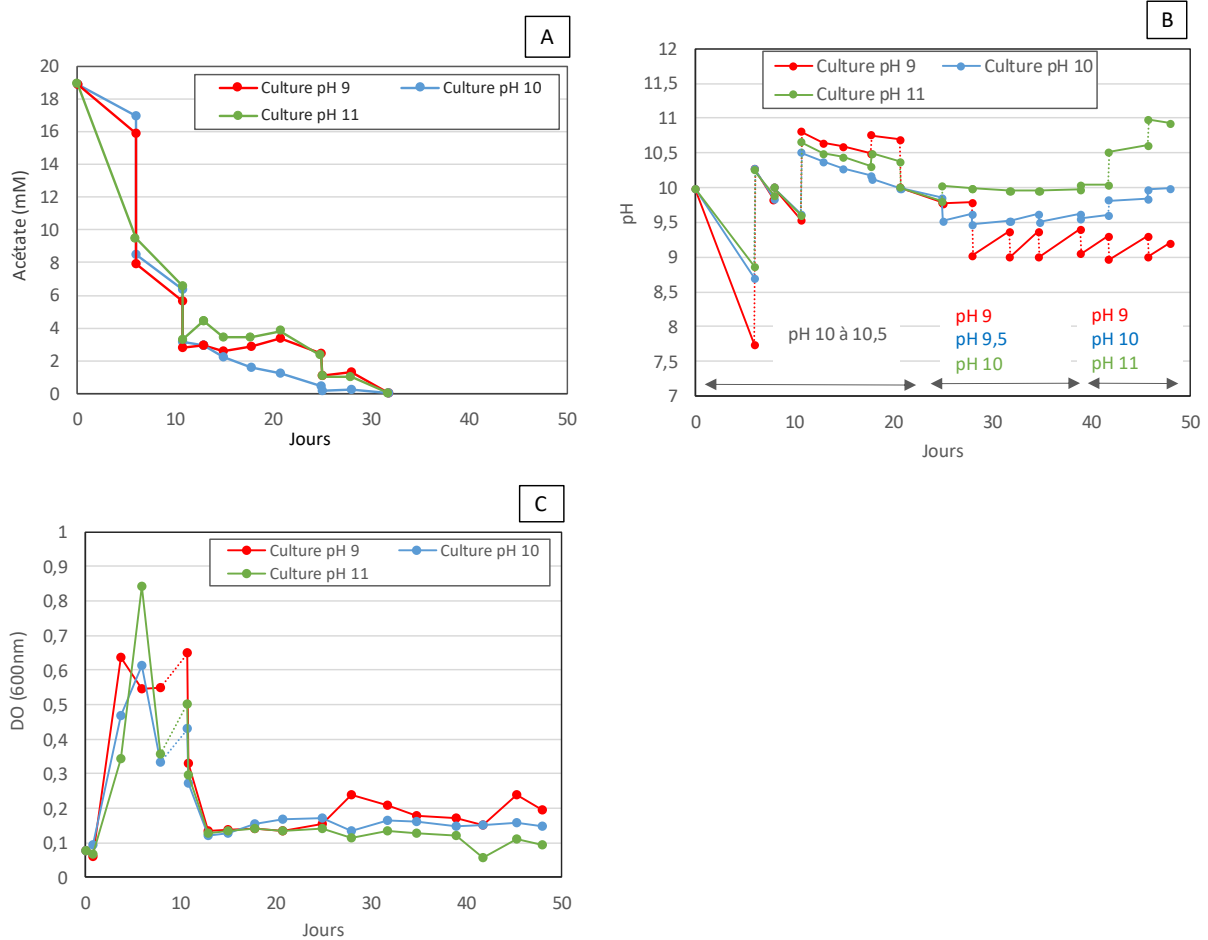


Figure 62 : Influence de la transition de l'acétate à l'hydrogène sur les évolutions de la concentration en acétate (A), du pH (B), de la DO (C) dans trois cultures à pH 9, 10 et 11. Conditions expérimentales : trois bioréacteurs batch séquentiels, lixiviat de ciment, bactéries pré-acclimatées issues de boues activées, 50 à 100 mM de nitrates, 20 mM d'acétate ajouté uniquement au jour 0, et 1 bar de 100% d'H₂.

L'évolution de la concentration en acétate est présentée sur la Figure 62 (A). La consommation de l'acétate par les bactéries, associée à la dilution progressive du milieu de culture par des ajouts successifs de lixiviat de ciment les jours 6, 11, 25 et 39, ont permis de diminuer la concentration en acétate. A partir du jour 25, la quantité d'acétate du milieu réactionnel est devenue inférieure à 1 mM et était alors considérée comme négligeable en comparaison des 50 mM en nitrates. Le dihydrogène apporté continuellement est donc devenu la source d'électrons unique pour la réaction catalysée par les bactéries.

L'évolution du pH des milieux réactionnels dans chaque réacteur est présentée dans la Figure 62 (B). Les sauts de pH, visibles sur les courbes en pointillés, sont dus à des ajustements de pH réalisés manuellement à l'aide de solutions concentrées de 10 M de NaOH ou 10 M de HCl. Du jour 0 au jour 25, les trois cultures avaient le même pH. Le pH était progressivement augmenté de pH 10 à pH 10,8. Du jour 25 au jour 49, lorsque l'acétate était limitant et que le dihydrogène était le seul donneur d'électrons, le pH a pris des valeurs différentes dans les trois cultures. Progressivement, le pH a été ajusté à pH 9, 10 et 11 dans les trois cultures.

Entre les sauts de pH liés aux ajustements manuels de pH, deux évolutions de pH différentes étaient visibles lorsque le donneur d'électrons est l'acétate ou le dihydrogène. Ainsi, du jour 0 au jour 25, en hétérotrophie, le milieu des trois cultures avait tendance à s'acidifier fortement du fait de la réduction des nitrates en nitrites et de l'oxydation concomitante de l'acétate. Comme cela est discuté plus en

détails dans la section III.2, l'oxydation de l'acétate libre du CO_2 qui peut conduire à l'acidification du milieu en fonction du pH initial et de l'avancement de la dénitrification. Entre les jours 0 et 25, les nitrites n'ont quasiment pas été réduits, c'est pourquoi le milieu s'acidifiait fortement dans les trois cultures. A partir du jour 25, un changement radical était visible, le milieu de culture ne s'acidifiait plus. En revanche, dans la culture à pH 9 et la culture à pH 10 des élévations de pH ont été enregistrées. Les élévations de pH les plus importantes étaient dans la culture à pH 9. En absence d'acétate, il n'y avait pas de production de CO_2 donc la dénitrification et plus précisément la réduction des nitrites provoquait l'alcalinisation du milieu. De plus, comme cela a été discuté dans la section III.2.1, si du carbone minéral est assimilé par les bactéries, le pH sera d'autant plus élevé. Cette expérience illustre très bien l'évolution du pH différente en fonction du type de donneur d'électrons, acétate ou dihydrogène.

L'évolution de la DO à 600 nm dans les bioréacteurs est présentée sur la Figure 62 (C). Du jour 0 au jour 11, malgré la dilution du milieu au jour 6, la DO oscillait entre 0,30 et 0,85. Après une nouvelle dilution du milieu au jour 11, la DO s'est stabilisée entre 0,1 et 0,2 jusqu'au jour 25. Cette baisse marquée de DO était certainement due à la transition vers le métabolisme hydrogénotrophe dans une gamme de pH relativement élevée de 10 à 10,8. A partir du jour 25, la DO s'est différenciée entre les bioréacteurs avec une DO moyenne de 0,20, 0,15 et 0,1 respectivement pour les cultures à pH 9, 10 et 11. En hydrogénotropie, la DO était directement impactée par les élévations de pH : plus le pH était élevé plus la DO diminuait. En effet, les bactéries dénitrifiantes hydrogénotropes ne peuvent pas diminuer le pH, et l'assimilation de carbone inorganique nécessaire à la croissance alcalinise le milieu de culture. La croissance des bactéries hydrogénotropes pourrait donc être bloquée par l'influence directe du pH sur leur métabolisme. Un contrôle génétique est aussi envisageable car les bactéries possèdent des systèmes de détection du pH [201]. Pour éviter des élévations de pH trop extrêmes, la croissance des bactéries pourrait donc être bloquée par un contrôle génétique. En conclusion, la croissance bactérienne était plus élevée en présence d'acétate qu'en présence de dihydrogène. En présence de dihydrogène seul, la croissance des bactéries pourrait être ralentie par la solubilité limitée du dihydrogène (0,74 mM à 30°C et 1 bar) ou la nécessité d'assimiler du carbone minéral. De plus, la croissance des bactéries hydrogénotropes était sensible au pH alcalin.

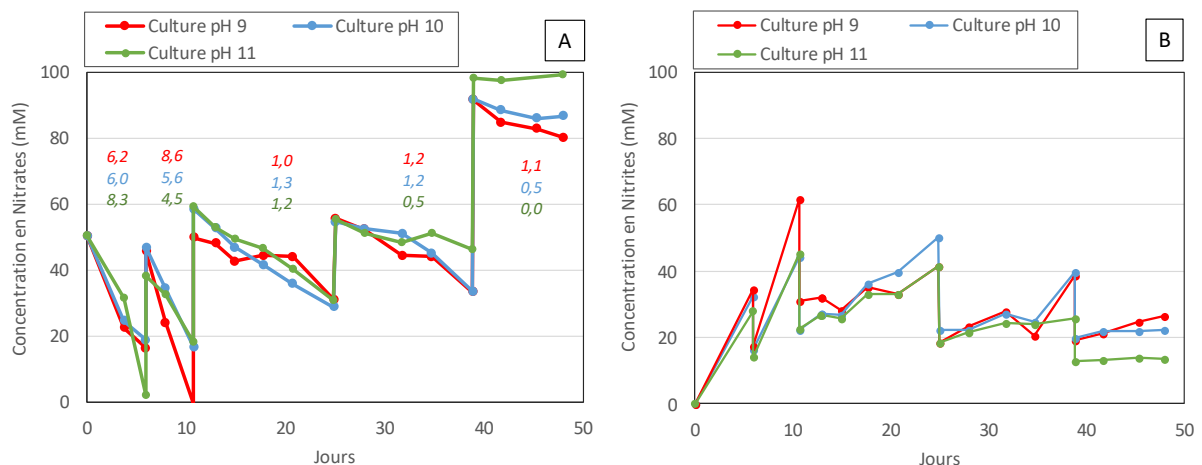


Figure 63 : Influence de la transition de l'acétate à l'hydrogène sur les évolutions de la concentration en nitrates (A), de la concentration en nitrites (B) dans trois cultures à pH 9, 10 et 11. Conditions expérimentales : trois bioréacteurs batch séquentiels, lixiviat de ciment, bactéries pré-acclimatées issues de boues activées, 50 à 100 mM de nitrates, 20 mM d'acétate ajouté uniquement au jour 0, et 1 bar de 100% d' H_2 .

La Figure 63 (A) présente l'évolution des concentrations en nitrates dans chaque bioréacteur. La concentration en nitrates a été augmentée à 100 mM en nitrates le jour 39. Les cinétiques de réduction

des nitrates (mM/j) de chaque culture sont indiquées au-dessus des courbes. Les 10 premiers jours, le pH initial compris entre 10.0 et 10,5 et la présence d'acétate ont conduit à une réduction rapide des nitrates : entre 4,3 et 8,6 mM/j. Du jour 10 au jour 25, la réduction des nitrates a été ralentie (1,3 mM/j au maximum). Ceci peut s'expliquer par une transition vers une utilisation majoritaire du dihydrogène qui se serait déjà amorcée. A partir du jour 25, en conditions hydrogénotrophique, la réduction des nitrates était pH-dépendante, elle était stoppée dans le bioréacteur dont le pH a été fixé à 11. La limite maximale de pH autorisant une activité des bactéries dénitrifiantes hydrogénotrophes se situait donc entre pH 10,5 et pH 11. L'explication la plus probable serait un impact direct du pH sur le métabolisme des bactéries. Sans possibilité d'acidifier leur milieu, les bactéries hydrogénotrophes seraient davantage sensibles au pH alcalin que les bactéries hétérotrophes. En effet, les pH alcalins peuvent avoir plusieurs effets sur l'activité bactérienne qu'elle soit hétérotrophe ou hydrogénotrophe :

- Ralentir l'activité des protéines ou même dénaturer les protéines [141,144,152].
- Perturber les gradients de protons au travers de la membrane bactérienne. Les gradients de protons sont utilisés pour la synthèse d'ATP ou l'absorption de nutriments [45,133]. Par ailleurs, plus le pH extérieur serait élevé plus la régulation du pH interne serait difficile et coûteuse en énergie pour les bactéries [53,133,140].
- Ralentir les réductases, ces dernières consomment des protons lorsqu'elles réduisent les nitrates et les autres intermédiaires azotés de la dénitrification [63]. Même si les hydrogénases peuvent produire des protons en oxydant le dihydrogène, les concentrations en protons plus faibles à proximité des réductases à pH plus alcalin pourraient les ralentir.
- Perturber les échanges entre les réductases et les transporteurs d'électrons de la chaîne respiratoire. En effet, l'activité de ces derniers semble influencée par le pH [73,74].

Cependant, les bactéries hétérotrophes, elles, ont la possibilité d'acidifier leur milieu via l'oxydation de la matière organique et donc de limiter ces effets néfastes.

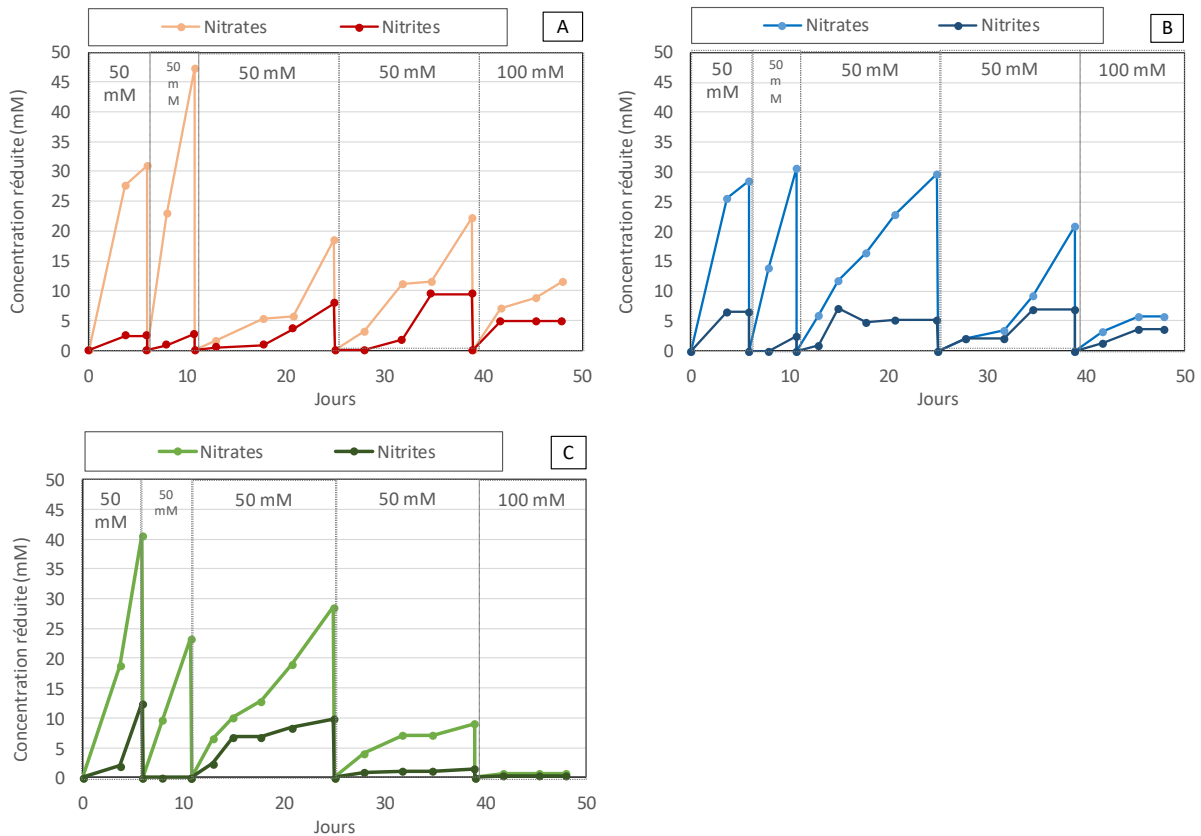


Figure 64 : Influence de la transition de l'acétate à l'hydrogène sur les évolutions des concentrations en nitrates et en nitrites réduites de la culture à pH 9 (A), de la culture pH 10 (B) et de la culture pH 11 (C). Conditions expérimentales : trois bioréacteurs batch séquentiels, lixiviat de ciment, bactéries pré-acclimatées issues de boues activées, 50 à 100 mM de nitrates, 20 mM d'acétate ajouté uniquement au jour 0, et 1 bar de 100% d' H_2 .

La Figure 63 (B) présente l'évolution de la concentration en nitrites dans les trois bioréacteurs. La Figure 64 présente l'évolution des concentrations en nitrates et nitrites réduites calculées d'après les équations (45) et (46). Pendant les deux premières périodes batch en présence d'acétate, les nitrates étaient rapidement réduits, la DO était élevée et les nitrites se sont accumulés. Du jour 0 au jour 10, il semblerait donc que les bactéries « *nitrate respiring* » dominaient la population bactérienne. Au fur et à mesure de l'amenuisement de l'acétate, la réduction des nitrates ralentissait et la proportion de nitrites réduite augmentait. Ceci indique qu'il y a eu un remplacement dans la population bactérienne des bactéries « *nitrate respiring* » par des bactéries de types « *true denitrifier* ».

Il est donc possible de distinguer trois évolutions différentes des réductions de nitrates et de nitrites. Premièrement, du jour 0 au jour 11, l'acétate n'était pas limitant et la réduction des nitrates était très rapide tandis que la réduction de nitrites était faible. En conséquence l'accumulation en nitrites était très importante, jusqu'à 40 mM en nitrites sont accumulés. Les mêmes types de résultat ont été observés dans les expériences précédentes de ce chapitre. Quand le pH et la concentration en nitrates sont respectivement inférieurs ou égaux à 10 et 200 mM, les bactéries « *nitrate respiring* » peuvent proliférer ce qui résulte par une réduction très rapide des nitrates, l'accumulation élevée de nitrites et une DO élevée. Ces bactéries ont un taux de croissance supérieur aux bactéries « *true denitrifier* » [81], mais elles semblent moins tolérantes aux pH alcalin ou aux concentrations élevées en nitrates. C'est pourquoi elles dominent la population tant que les conditions de culture restent favorables. Deuxièmement, du jour 11 au jour 25, l'acétate est devenu négligeable, la communauté bactérienne a dû opérer une transition de métabolisme de l'acétate vers le dihydrogène. Pour faciliter cette transition le pH a été manuellement descendu de pH 10,8 à pH 10,0. Dans cette période la réduction

des nitrates était ralentie et la DO n'a plus atteint de valeurs élevées. Cependant, la proportion de nitrites réduite a augmenté. Dans cette phase la population bactérienne s'est rééquilibrée en faveur des bactéries de types « *true denitrifier* ». Troisièmement, du jour 25 au jour 48, il n'y avait plus d'acétate ; le métabolisme hydrogénotrophe était dominant. Dans cette période, la réduction des nitrates était étroitement liée au pH. Comme explicité ci-dessus, en hydrogénotrophie sans possibilité d'acidifier le milieu, le pH alcalin a ralenti le métabolisme bactérien. Par ailleurs, la proportion de nitrites réduite était plus importante, et la DO restait faible. Il semblerait donc que les bactéries « *true denitrifier* » étaient majoritaires dans la culture. Ceci impliquerait que les bactéries hydrogénotrophes soient du type « *true denitrifier* » plutôt que « *nitrate respiring* ». A noter que dans le cas de la culture à pH 11, qui était ajustée à pH 10 entre le jour 25 et 39, une réduction de 10 mM de nitrates a été observée. Cependant, les nitrites n'ont pas été réduits et la DO est restée constante. En conséquence le pH de la culture est resté constant à pH 10. Ceci confirme la conclusion des calculs prédictifs d'évolution du pH en hydrogénotrophie. L'alcalinisation du milieu est liée à la réduction des nitrites et l'assimilation de carbone minéral (essentiellement pour la croissance cellulaire). Sans croissance cellulaire et sans réduction des nitrites, le pH peut donc théoriquement rester constant.

Conclusions :

Les boues activées ont pu s'adapter au métabolisme hydrogénotrophe. Dans la première phase de l'expérience en présence d'acétate, les boues activées ont été capables de réduire les nitrates sans difficulté à pH 10,8 et 50 mM en nitrates. Dans la deuxième phase avec le dihydrogène seul, les bactéries hydrogénotrophes ont réduit les nitrates et les nitrites jusqu'à pH 10,5 et 50 mM de nitrates. A notre connaissance, c'est la première fois que des telles gammes de pH et de concentrations en nitrates combinées ont été testées avec des cultures hydrogénotrophes dénitrifiantes. Cette expérience permet d'apporter un premier aperçu des gammes de pH et de concentrations nitrates tolérées par les bactéries hydrogénotrophes.

Cependant, la transition de l'utilisation d'un donneur d'électrons organique vers l'utilisation du dihydrogène s'est accompagnée d'une diminution de la croissance bactérienne et de la vitesse de réduction des nitrates. Ces résultats expérimentaux confirment que les cinétiques de réduction des nitrates sont lentes et globalement comprises entre 0,1 et 100 mM/J en hydrogénotrophie. Ces ralentissements de la croissance bactérienne et des cinétiques de réductions des nitrates peuvent s'expliquer par la solubilité limitée du dihydrogène et la nécessité des bactéries hydrogénotrophes d'assimiler du carbone minéral pour leur croissance.

De plus la transition de l'acétate vers le dihydrogène de cette expérience a parfaitement illustré le changement de l'évolution du pH en fonction du donneur d'électrons. En effet, la dénitrification avec acétate ou dihydrogène impacte le pH d'une manière différente. En présence d'acétate, celui-ci s'oxyde en CO₂ ce qui permet d'acidifier le milieu de culture. En revanche, avec dihydrogène il n'y a pas de production de CO₂. Le pH augmente lors de la réduction des nitrites, ou de l'assimilation de carbone minéral. En conséquence dans la première période de cette expérience en présence d'acétate le pH diminuait, puis inversement avec le dihydrogène le pH restait soit constant soit augmentait.

IV.5. Conclusions du chapitre

Les procédés d'acclimatation ont été progressivement optimisés en comparant successivement trois méthodes d'acclimatation : des bioréacteurs batch inoculés successivement, des bioréacteurs alimentés en continu et enfin des bioréacteurs discontinus séquentiels. En utilisant des réacteurs discontinus séquentiels, il a été possible d'observer des réductions de nitrates et de nitrites dans des gammes de pH et de concentrations en nitrates élevées, jusque-là inexplorées. En effet les bactéries issues de boues activées ont pu réduire les nitrates et les nitrites à pH 11,5 et 50 mM de nitrates ou pH 11 et 400 mM de nitrates. Par ailleurs les bactéries ont pu survivre en état dormance ou avec une activité ralentie à pH 9 et 750 mM de nitrates ou pH 12 et 50 mM de nitrates. La Figure 65 récapitule les gammes de pH et de concentrations en nitrates dans lesquelles les bactéries ont pu maintenir leur activité et réduire les nitrates et les gammes dans lesquelles les bactéries ont survécu.

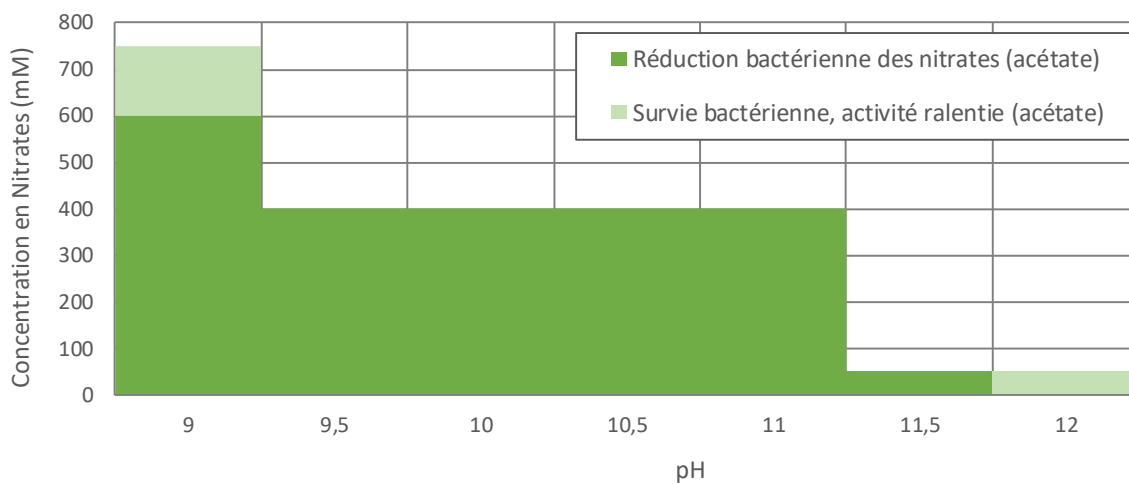


Figure 65 : Synthèse des résultats des cultures hétérotrophes, gammes de pH et de concentrations en nitrates dans lesquelles les bactéries issues de boues activées ont pu réduire les nitrates ou survivre avec une activité ralentie.

Dans les alvéoles de stockage des déchets radioactifs, les gammes de pH et de concentrations en nitrates attendues sont respectivement de pH 9 à 13 et de l'ordre 10 à 1000 mM de nitrates. Les résultats des cultures de bactéries issues de boues activées hétérotrophes suggèrent donc que les bactéries sont capables réduire les nitrates dans une partie des gammes de pH et de concentrations en nitrates attendues dans le contexte du stockage de déchets radioactifs.

Par ailleurs il a été montré qu'en présence d'acétate et malgré la présence de 50 mM de carbonates, les bactéries ont la capacité d'acidifier leur milieu en oxydant l'acétate en CO_2 . Ces acidifications pourraient avoir un impact non négligeable dans le contexte de stockage des déchets radioactifs. En effet, il est envisageable que dans des zones riches en matière organique, des acidifications du milieu par la dénitrification hétérotrophe permettent aux bactéries de proliférer malgré le pH initialement très alcalin imposé par la structure en ciment des alvéoles de stockage.

Dans ce type de communauté bactérienne, l'équilibre entre la réduction des nitrates et des nitrites semble étroitement lié la population bactérienne [77,78,81]. Dans des conditions favorables de pH et de concentrations en nitrates (jusqu'à pH 10 et jusqu'à 200 mM en nitrates), les bactéries de type « *nitrate respiring* » peuvent proliférer. Ce type de bactéries à croissance rapide devient rapidement dominante sans pouvoir réduire les nitrites [81]. En conséquence, des DO élevées, des réductions rapides de nitrates et des accumulations importantes de nitrites sont généralement observées dans

les cultures. En revanche ce type de bactérie semble moins tolérant aux concentrations de nitrates et aux pH plus élevés. En fin de culture, quand le pH ou la concentration en nitrates deviennent trop élevés les bactéries tolérantes de type « *true denitrifier* » deviennent majoritaires. Ces bactéries sont capables de réduire nitrates et nitrites et ont des taux de croissance plus lents. En conséquence dans les cultures, la DO est moins élevée et la proportion de nitrites réduite augmente.

Par ailleurs dans le cadre de l'expérimentation en culture bactérienne avec des concentrations élevées en nitrates deux paramètres prépondérants ont été étudiés : l'effet des concentrations élevées du contre-ion ajouté avec les nitrates, et l'effet des concentrations élevées en nitrites. Premièrement, il a été montré que le contre ion, utilisé dans les sels de nitrates, a un impact non négligeable sur l'activité bactérienne. Le sodium était mieux toléré par les bactéries issues de boues activées à des concentrations élevées. En effet, les bactéries n'ont toléré le potassium que jusqu'à 250 mM alors que le sodium a été toléré jusqu'à 400 mM. Deuxièmement, des concentrations importantes en nitrites ont été tolérées par les bactéries, jusqu'à 100 mM. Plusieurs études en revanche avaient rapporté un effet inhibiteur voir toxique des nitrites pour des concentrations de l'ordre de dizaines de mM [46,47]. Les bactéries qui ont été identifiées dans la culture à 100 mM de nitrites sont de types « *true denitrifier* ». Ces bactéries sont capables de réduire les nitrites c'est pourquoi elles ont pu tolérer des concentrations si élevées en nitrites. En revanche dans des cultures où les bactéries « *nitrate respiring* » sont dominantes, des concentrations en nitrites aussi élevées pourraient fortement ralentir l'activité bactérienne.

Enfin, les bactéries issues de boues activées ont pu s'acclimater à l'utilisation du dihydrogène seul. Les bactéries issues de boues activées en présence de dihydrogène ont pu réduire nitrates et nitrites jusqu'à pH 10,5 et 50 mM. Cependant, la transition de l'utilisation d'un donneur d'électrons organique vers l'utilisation du dihydrogène s'est accompagnée d'une diminution de la croissance bactérienne et de la vitesse de réduction des nitrates. Ces ralentissements peuvent s'expliquer par la solubilité limitée du dihydrogène et la nécessité des bactéries hydrogénotrophes d'assimiler du carbone minéral pour leur croissance. De plus les bactéries hydrogénotrophes étaient encore plus sensibles au pH alcalin, il n'a pas été observé d'activité à pH 11. Cette sensibilité accrue au pH alcalin peut s'expliquer par l'impossibilité des bactéries hydrogénotrophes à acidifier le milieu. Dans le chapitre suivant, la dénitrification hydrogénotrophe sera étudiée plus en détail en présence de boues activées.

Chapitre V :

**DENITRIFICATION HYDROGENOTROPHE AVEC UN CONSORTIUM
BACTERIEN**

Table des matières :

V.1.	Elévation de la concentration en nitrates (10-550 mM) à pH alcalin	144
V.1.1.	Elévation de la concentration en nitrates (10-100 mM) à pH 9, 10 et 11.....	145
V.1.2.	Elévation de la concentration en nitrates (50-150 mM) à pH 9, 10 et 10,5.....	151
V.1.3.	Elévation de la concentration en nitrates (200-550 mM) à pH 9, 10 et 11.....	154
V.1.4.	Conclusion des expériences d'élévations de la concentration en nitrates en hydrogénotrophie	157
V.2.	Dénitrification à pH hyper alcalin (pH 11,5 et 12).....	158
V.3.	Dénitrification avec des pressions élevées de dihydrogène (1 à 10 bars)	162
V.3.1.	Autoclaves pressurisés	162
V.3.2.	Dénitrification à 1, 2 et 4 bars de dihydrogène à pH 9	163
V.3.3.	Dénitrification à 10 bars de dihydrogène et pH 9 ou pH 11.....	165
V.4.	Conclusions du chapitre	168

Le chapitre précédent a montré que les microorganismes enrichis à partir de boues activées réduisaient les nitrates jusqu'à pH 11 et 400 mM de nitrates (ou pH 11,5 et 50 mM) en présence d'acétate. Il a aussi été montré que la transition du donneur d'électrons de l'acétate vers le dihydrogène a causé le ralentissement de la croissance cellulaire et les cinétiques de réduction des nitrates. Ce chapitre est dédié à l'étude de la dénitrification en présence de dihydrogène par le biais d'une communauté bactérienne, elle aussi provenant de boues activées d'une station d'épuration des eaux usées domestiques. Le milieu de culture était du lixiviat de ciment.

L'objectif de ce chapitre est d'évaluer, en présence du dihydrogène et sans matière organique les seuils de tolérance des boues activées ainsi que les cinétiques de réduction des nitrates dans des gammes de pH et de concentrations en nitrates élevés.

Pour cela des bioréacteurs discontinus séquentiels, similaires au chapitre précédent, ont été utilisés pour réaliser des acclimations à des concentrations en nitrates progressivement élevées selon trois pH (9, 10 et 11). Une attention particulière a été portée sur ces expériences d'acclimation car il a été montré qu'avec le dihydrogène les bactéries sont plus sensibles aux pH alcalins et probablement aux concentrations élevées en nitrates qu'avec l'acétate. C'est pourquoi, trois expériences d'acclimation ont été nécessaires pour évaluer une échelle large de concentrations en nitrates de 10 à 550 mM.

Ensuite, une expérience réalisée par le biais de deux réacteurs batch a permis d'évaluer l'impact de pH hyperalcalins sur les cultures hydrogénotrophes de bactéries issues de boues activées. Deux cultures à pH 11,5 et 12 ont été alimentées avec une concentration initiale de 50 mM en nitrates. Cette dernière expérience a nécessité un temps long (190 jours) afin d'observer l'activité dénitrifiante dans ces conditions très élevées de pH.

Dans la dernière partie de ce chapitre, des pressions élevées de 20 à 100 bars d'un mélange gazeux de 90% argon 10 % dihydrogène ont été appliquées dans des bioréacteurs adaptés, des autoclaves. L'objectif était d'évaluer l'effet de pressions élevées de dihydrogène sur les bactéries. Pour ce faire, une série de deux expériences a permis de comparer l'effet de quatre pressions totales (1, 20, 40 et 100 bars) sur des cultures de bactéries issues de boues activées alimentées par 10 mM de nitrates. Ce type d'expérimentations visait à répondre à la problématique de l'existence de poches de gaz et de suppressions de dihydrogène dans l'enceinte de stockage des déchets radioactifs.

V.1. Elévation de la concentration en nitrates (10-550 mM) à pH alcalin

L'objectif de cette série de trois d'expériences est de déterminer en présence de dihydrogène quelles sont les valeurs maximales de pH et de concentrations en nitrates tolérées par les boues activées. Pour cela trois expériences en bioréacteurs discontinus séquentiels ont permis de réaliser des élévations progressives de nitrates (de 10 à 550 mM) selon trois pH (de 9 à 11).

Démarche expérimentale :

L'hydrogénotrophie a été maintenue par un flux continu de dihydrogène (100% H₂, 1 bar). Pour chaque expérience, trois précultures ont d'abord permis d'acclimer les boues activées à l'hydrogénotrophie et aux pH alcalins. Les précultures ont ensuite été utilisées pour inoculer les cultures dans lesquelles les concentrations en nitrates ont été augmentées. Le temps des précultures variait entre 10 et 50 jours et le temps des cultures variait entre 60 et 160 jours selon l'expérience. Le protocole de l'inoculation des trois expériences est schématisé dans la Figure 66.

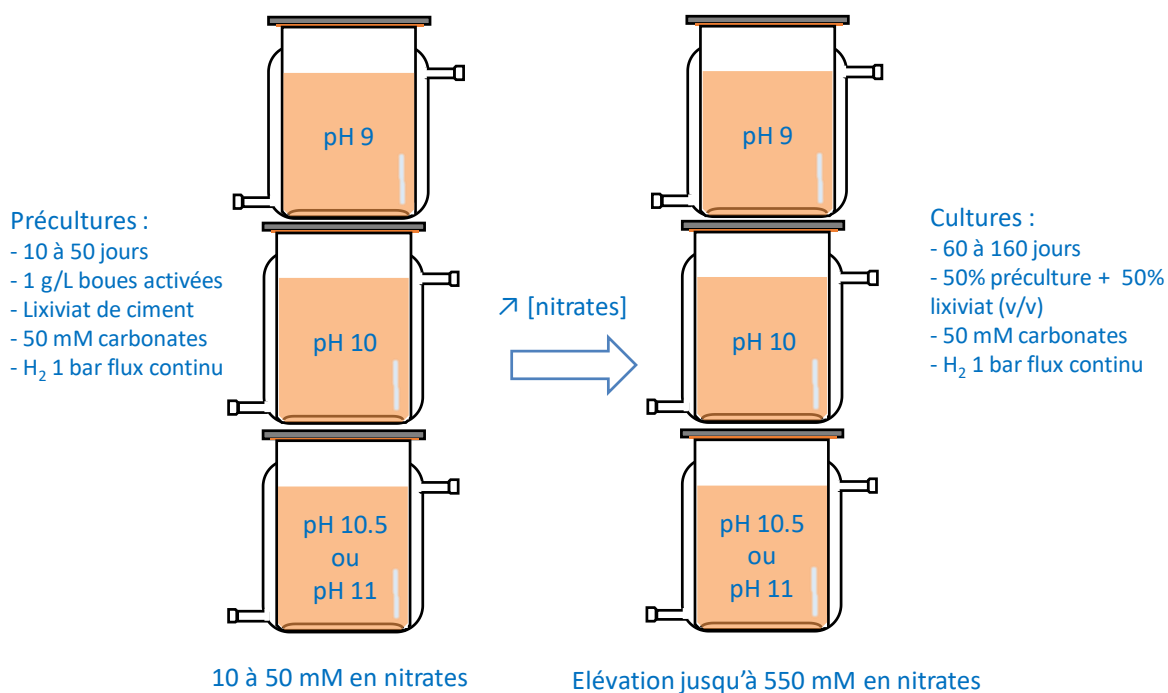


Figure 66 : Protocole expérimental d'acclimation à des concentrations élevées de 10 à 550 mM de nitrates de cultures hydrogénotrophes inoculées à partir de boues activées.

V.1.1. Elévation de la concentration en nitrates (10-100 mM) à pH 9, 10 et 11

Trois cultures de boues activées à pH 9, 10 et 11 conduites en hydrogénotrophie ont suivi une augmentation de 10 à 100 mM de nitrates. L'expérience a duré 85 jours, la concentration en nitrates a été augmentée à 50 et 100 mM respectivement le jour 5 et le jour 20. Dans la culture à pH 11 et uniquement dans celle-ci, le 75^{ème}, jour 20mM d'acétate a été ajouté afin de vérifier si les boues étaient encore actives. Une photographie de chaque bioréacteur prise au jour 50 est présentée dans la Figure 67. Le pH, la DO à 600 nm et le suivi des concentrations en nitrates et de nitrites sont présentés sur la Figure 68.

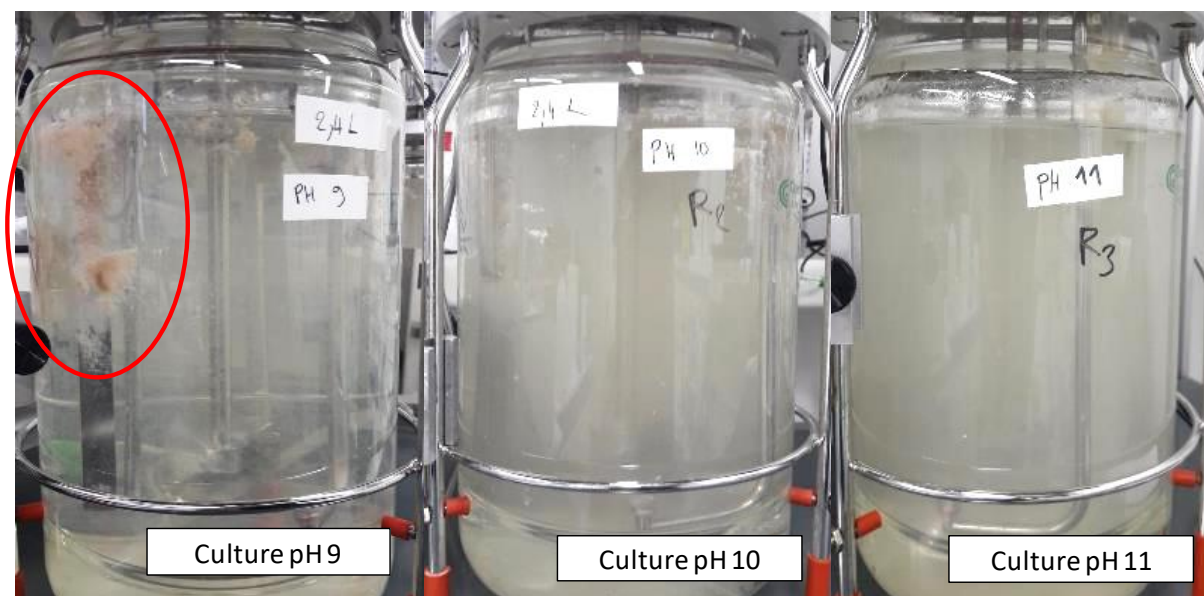


Figure 67 : Photographie au jour 50 des trois bioréacteurs lors de l'élévation de 10 à 100 mM de nitrates en hydrogénotrophie.

Les photographies de la Figure 67 permettent d'illustrer l'aspect de cultures conduites en hydrogénotrophie à 100 mM de nitrates. Les cultures présentaient une coloration blanc/jaune pâle. La culture conduite à pH 9 avait un aspect différent des deux autres cultures. De la matière composée probablement de précipités et de biomasse s'est amassée sur les parois du réacteur (mis en évidence par le cercle rouge). En conséquence, le milieu liquide était moins trouble que dans les deux autres réacteurs. Il est difficile d'expliquer pourquoi dans cette culture en particulier du biofilm s'est déposé, car dans les autres cultures à pH 9 de cette série d'expériences les conditions étaient similaires et il n'y a pas eu de formation de biofilm. La seule différence avec les autres cultures à pH 9 de ce lot d'expérience était l'inoculum. Comme cela a été discuté dans la section II.1.1, la composition des boues activées de la station d'épuration peut légèrement varier au cours du temps. Une hypothèse plausible serait qu'une espèce particulière de bactéries présentes dans l'inoculum aurait favorisé la formation de floccs bactériens seulement à pH 9. Dans une étude il a été montré que l'ajout d'une bactérie spécialiste de la dégradation de la matière organique dans un inoculum dénitrifiant a conduit à des associations symbiotiques sous formes de floccs sphériques, ce qui a accéléré la dénitrification [222].

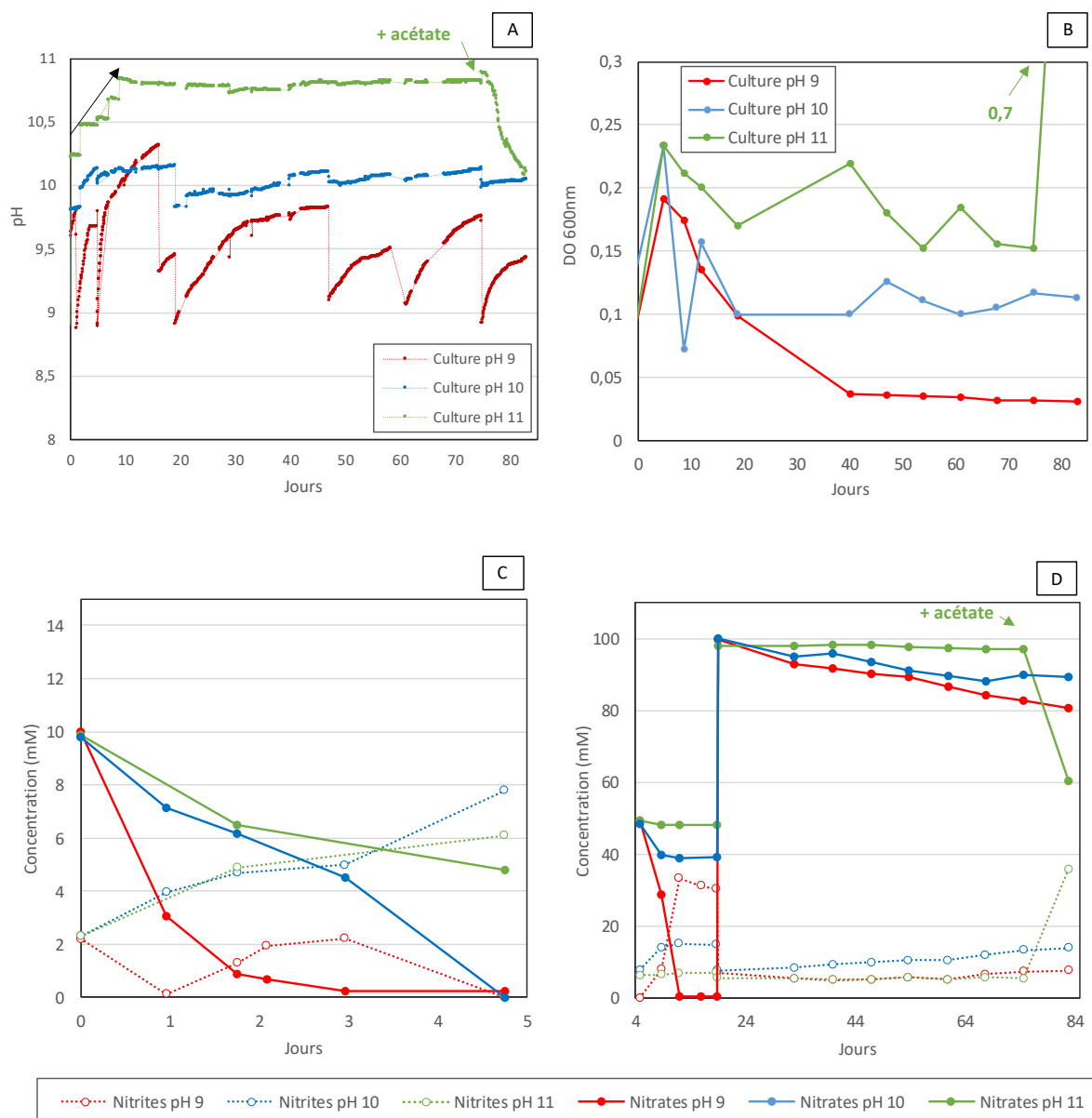


Figure 68 : Influence de l'élévation de la concentration en nitrates de 10 à 100 mM sur les évolutions du pH (A), de la DO (B), des concentrations en nitrates et nitrites du jour 0 au jour 5 (C), des concentrations en nitrates et nitrites du jour 5 au jour 85 (D). Conditions expérimentales: trois bioréacteurs séquentiels à pH 9, 10 et 11, bactéries pré-acclimatées issues de boues activées, lixiviat de ciment, 1 bar de 100% d' H_2 .

Le suivi continu du pH est présenté sur la Figure 68 (A), les pointillés illustrent les sauts de pH dus à des ajustements manuels de celui-ci. Dans la culture à pH 9, le pH a augmenté de manière importante des acidifications régulières étaient nécessaires. Les élévations de pH étaient supérieures à celles prédites par les calculs théoriques, car ceux-ci ne prennent pas en compte l'alcalinisation du milieu liée à l'assimilation de carbone minéral. Les élévations du pH étaient dues en partie à l'assimilation de carbone minéral il y a donc bien eu une croissance cellulaire. Pour la culture à pH 10, le pH s'élevait aussi mais les élévations de pH étaient moins marquées. Ceci peut s'expliquer par la quantité de nitrates dénitrifiés plus élevée ou la croissance cellulaire moins importante. Dans la culture à pH 11, l'élévation du pH observée les 10 premiers jours était due à une élévation manuelle du pH, signalée par une flèche sur le graphique. En revanche entre les jours 10 et 75 le pH n'a pas varié. Enfin après l'ajout d'acétate le jour 75, le pH a diminué brusquement jusqu'à 10,1 en 10 jours. La culture à pH 11

a très bien illustré l'effet antagoniste des donneurs d'électrons acétate et dihydrogène comme donneurs d'électrons sur l'évolution du pH. Comme expliqué dans la section III.2, l'oxydation de l'acétate produit du CO₂ qui a la capacité de modifier l'équilibre des carbonates et d'acidifier le pH. De plus, la croissance cellulaire se fait en assimilant l'acétate ce qui ne perturbe pas l'équilibre des carbonates.

Le suivi de la DO est présenté sur la Figure 68 (B). Comme discuté à partir des photographies de la Figure 67, dans la culture à pH 9, des flocons de matière avaient tendance à se déposer sur les parois du bioréacteur, ce qui a diminué la DO du milieu liquide. Pour les cultures à pH 10 et 11, la DO était comprise entre 0,10 et 0,25. La DO des cultures n'a pas chuté, ce qui indique qu'il n'y a pas eu de lyses cellulaires. Ceci est confirmé par le pic de DO à 0,7 dans la culture à pH 11 lorsque l'acétate est ajouté, les bactéries n'étaient pas mortes mais plutôt en état de dormance avec une activité ralentie.

Les graphiques (C) et (D) de la Figure 68 présentent les concentrations en nitrates et en nitrites dans chaque culture. Afin d'améliorer la lisibilité, le suivi des concentrations de la période batch à 10 mM de nitrates a été séparé des deux autres périodes batch à 50 et 100 mM. Les cinétiques maximales de réductions des nitrates à 10, 50 et 100 mM sont représentées dans le Tableau 21. Les concentrations en nitrates et en nitrites réduits sont présentées dans la Figure 69. Elles sont calculées d'après les équations (47) et (48), en fonction des concentrations initiales en nitrates et en nitrites de chaque période batch et des concentrations en nitrates et en nitrites mesurées dans les cultures. La concentration initiale en nitrites au début des périodes batch doit être prise en compte car elle n'est pas toujours nulle.

$$[\text{NO}_3^-]_{\text{réduite}} = [\text{NO}_3^-]_{\text{initiale}} - [\text{NO}_3^-]_{\text{culture}} \quad (47)$$

$$\begin{aligned} [\text{NO}_2^-]_{\text{réduite}} &= [\text{NO}_2^-]_{\text{produite}} - [\text{NO}_2^-]_{\text{accumulée}} \\ &= [\text{NO}_3^-]_{\text{réduite}} - ([\text{NO}_2^-]_{\text{culture}} - [\text{NO}_2^-]_{\text{initiale}}) \end{aligned} \quad (48)$$

Tableau 21 : Cinétiques de réduction maximales des nitrates (en mM/j) de chaque culture hydrogénotrophe en fonction de la concentration en nitrates à pH 9, 10 et 11.

	Batch : 10 mM	Batch : 50 mM	Batch : 100 mM
Culture à pH 9	7,1	6,9	0,3
Culture à pH 10	2,9	2,2	0,2
Culture à pH 11	1,7	0,2	0 puis 5 avec l'acétate

Le pH a eu un effet prépondérant sur la réduction des nitrates. A 10 mM ou 50 mM de nitrates, La cinétique de réduction des nitrates était plus élevée à pH 9 qu'à pH 10. Mais à 100 mM de nitrates, les cinétiques de réduction max des nitrates étaient ralenties et comparables entre la culture à pH 9 et à pH 10. Il semblerait donc, que la valeur seuil au-dessus de laquelle la réduction des nitrates est fortement ralentie indépendamment du pH de la culture soit comprise entre 50 et 100 mM de nitrates. Dans la culture à pH 11, il y a eu une faible réduction des nitrates dans la première période batch. Dans les périodes à 50 et 100 mM de nitrates la réduction des nitrates était négligeable puis nulle jusqu'à l'ajout d'acétate. Directement après l'ajout d'acétate, il y a eu une élévation de la DO et une réduction des nitrates et des nitrites. Cette culture illustre bien qu'en présence du dihydrogène comme unique donneur d'électrons les boues activées, sans possibilité d'acidifier leur milieu, sont inhibées à pH élevé. Cette observation a déjà été rapportée plusieurs fois dans la bibliographie, les gammes de pH généralement utilisées sont comprises entre pH 7,0 et pH 8,6 [39,130,223]. Les auteurs expliquent la sensibilité accrue des bactéries hydrogénotrophes au pH alcalin par le fait que la nitrite réductase est inhibée ou que le pH alcalin entraîne la précipitation de nutriments nécessaires aux bactéries, ce qui

les rend ainsi moins biodisponibles [32,130]. Mais ces explications sont insuffisantes car en théorie la réduction à minima des nitrates serait possible puisqu'elle n'alcalinise pas le pH. Face au manque d'explications provenant de la bibliographie, deux hypothèses ont été avancées pour expliquer pourquoi la dénitrification hydrogénotrophe était totalement inhibée alors que la dénitrification hétérotrophe a pu s'initier sans problèmes. Premièrement, l'activité métabolique des bactéries (hétérotrophes ou hydrogénotrophes) serait bloquée à pH 11 et l'impossibilité d'acidifier le pH en hydrogénotropie inhiberait l'activité des microorganismes. Deuxièmement, à pH alcalin chez les bactéries hydrogénotrophes, il existerait un contrôle métabolique ou génétique bloquant l'activité des bactéries, les faisant entrer en état de dormance pour éviter l'alcalinisation produite par la réduction des nitrites ou l'assimilation de carbone minéral.

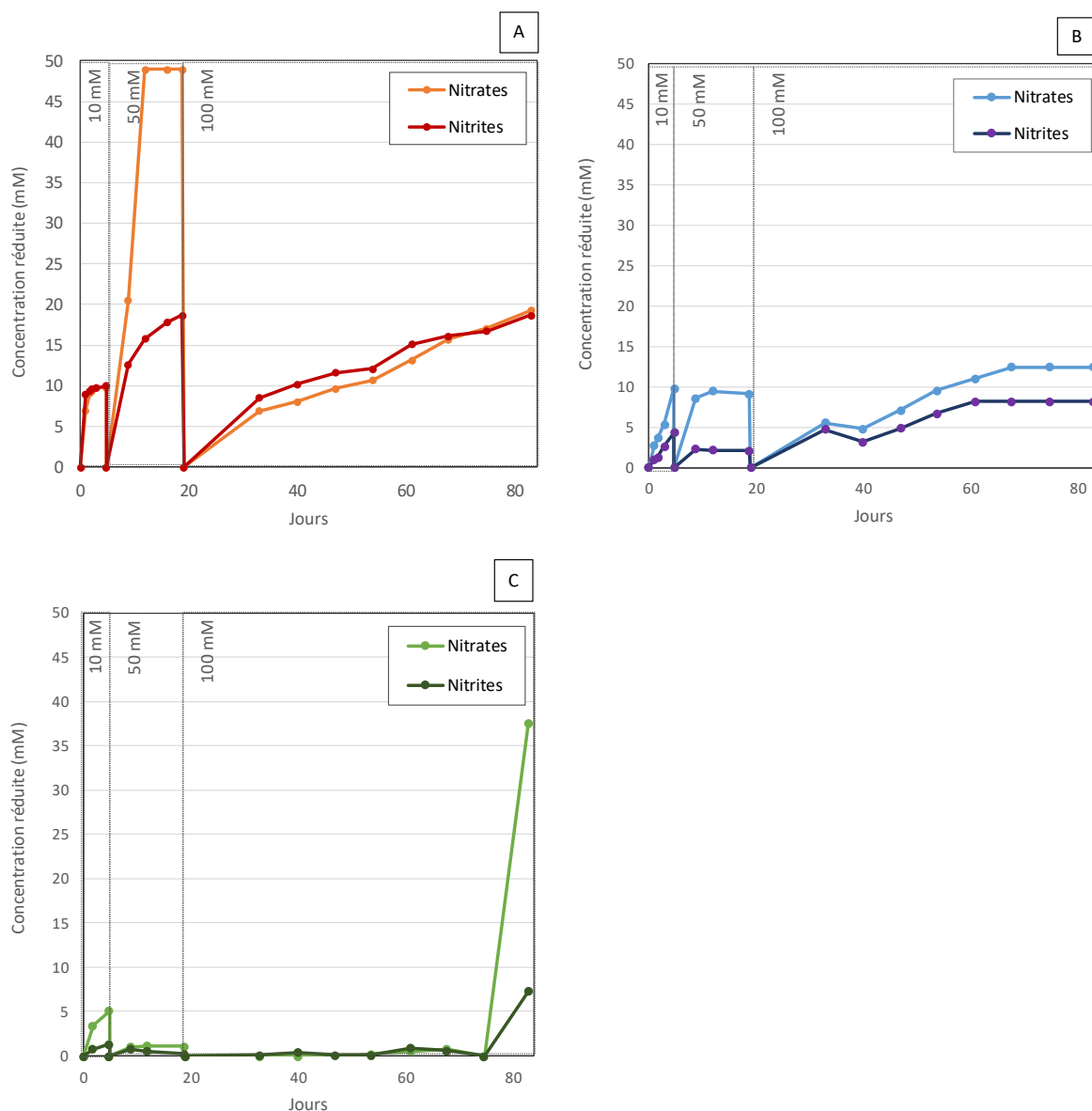


Figure 69 : Influence de l'élévation de la concentration en nitrates de 10 à 100 mM sur les évolutions des concentrations en nitrates et nitrites réduites, de la culture à pH 9 (A), de la culture à pH 10 (B), de la culture à pH 11 (C). Conditions expérimentales : trois bioréacteurs séquentiels à pH 9, 10 et 11, bactéries pré-acclimatées issues boues activées, lixiviat de ciment, 1 bar de 100% d'H₂.

Par ailleurs, dans la culture à pH 9 dans la période à 50 mM, les nitrates ont été réduits rapidement tandis que les nitrites se sont fortement accumulés, ceci indiquerait une prolifération de bactéries

« *nitrate respiring* ». A l'inverse à 100 mM de nitrates, tous les nitrites ont été réduits malgré la concentration plus élevée en nitrates. L'explication la plus probable est un remaniement de la population bactérienne, les bactéries « *true denitrifier* » étaient devenues dominantes. En effet, dans les cultures inoculées par consortium les équilibres nitrates/nitrites sont généralement expliqués par l'équilibre entre les bactéries « *nitrate respiring* » qui ne réduisent que les nitrates en nitrites et les « *true denitrifier* » capables de réduire les nitrates et les nitrites jusqu'au stade diazote [77,78,81].

La population bactérienne en fin d'expérience a été analysée par séquençage ADN, afin de connaître la distribution des espèces et des phyla dans les populations de chaque culture. Les résultats sont présentés dans la Figure 70. Seules les espèces représentant plus de 3 % des espèces totales dans les cultures ont été indiquées, pour éviter de surcharger la figure. Les espèces minoritaires ont été classées dans la section Other/No Hit comprenant aussi les séquences ADN qui sont inconnues de la base de données ou écartées par des tests statistiques.

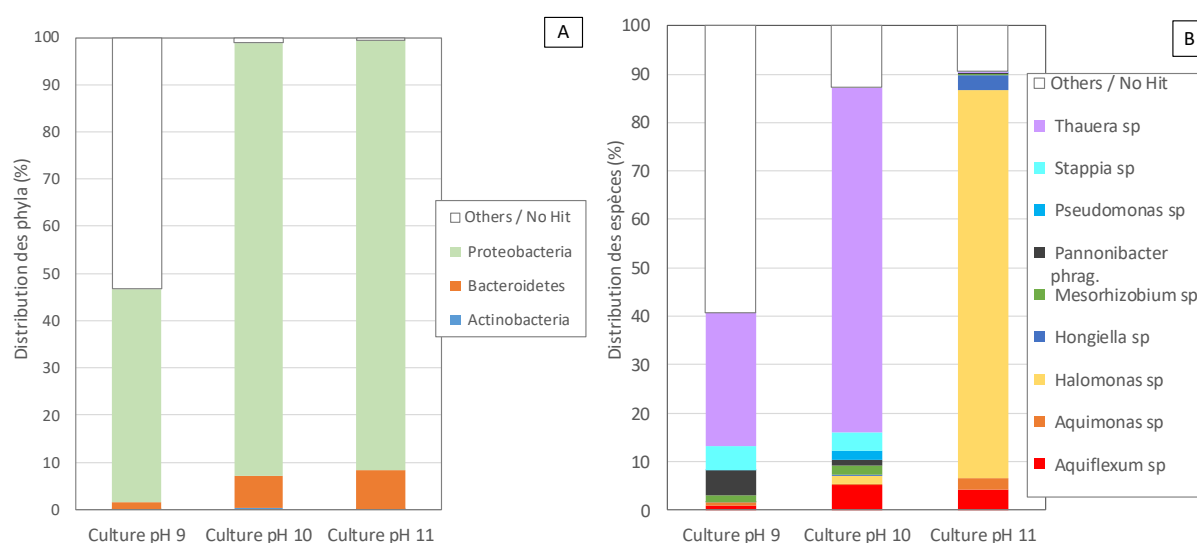


Figure 70 : Influence du pH sur la distribution des phyla (A) et des espèces bactériennes (B) en fin de l'expérience d'élévation de la concentration en nitrates de 10 à 100 mM. Conditions expérimentales : trois bioréacteurs séquentiels à pH 9, 10 et 11, bactéries pré-acclimatées issues de boues activées, lixiviat de ciment, 1 bar de 100% d' H_2 .

Dans la culture à pH 9, le phylum majoritaire était *Proteobacteria*, et près de la moitié des séquences n'étaient pas classées. Si au niveau du phylum les séquences n'étaient pas identifiables, il semblerait que le matériel génétique séquencé n'appartenait pas à un génome bactérien mais plutôt aux matrices de protection des biofilms (ou EPS) visibles sur la Figure 67. En conséquence, toujours dans la même culture la distribution des espèces était majoritairement composée de séquences non classées. L'espèce identifiée la plus représentée était du genre *Thauera sp.* avec 30%. Plusieurs espèces *Thauera sp.* sont capables de dénitrifier à pH neutre en hydrogénotropie [224,225]. Les deux autres espèces relativement bien représentées *Pannonibacter phragmitetus* (5%) et *Stappia sp.* (5%) n'ont pas été décrites comme capables d'utiliser le dihydrogène. Ce sont des bactéries hétérotrophes décrites respectivement comme alcalophile [212,213] et halophile [217,218]. Des espèces hétérotrophes étaient donc présentes malgré le milieu strictement minéral. Trois explications sont possibles : (i) les bactéries hydrogénotrophes ont produit de la matière organique utilisée par les bactéries hétérotrophes [226], (ii) des transferts génétiques horizontaux ont permis aux bactéries hétérotrophes d'acquérir la capacité à utiliser le dihydrogène [227], (iii) les bactéries hétérotrophes n'ont pas encore été totalement caractérisées elles seraient en fait capable d'utiliser le dihydrogène.

Dans la culture à pH 10, l'espèce majoritaire avec 70% était aussi du genre *Thauera*. Pour le reste, il y avait 5 % de *Aquiflexum sp.* qui est capable de dénitrifier en hétérotrophie et à pH alcalin [228,229], et il y avait 3,5 % de *Stappia sp.* Comme dans la culture à pH 9, il y avait une espèce hydrogénotrophe dominante *Thauera sp.* qui cohabitait avec des espèces strictement hétérotrophes moins représentées.

Dans la culture à pH 11 l'espèce majoritaire à 80 % faisait partie du genre *Halomonas sp.* dont plusieurs espèces ont été identifiées comme dénitrifiantes, hétérotrophes, et halo-alcalophile [23,145]. Les autres genres qui ont été identifiés, *Aquiflexum sp.*, *Aquimonas sp.* et *Hongiella sp.*, ont aussi été décrits comme hétérotrophes. Dans ce réacteur l'ajout d'acétate a fortement impacté la population bactérienne après 6 jours. Outre la composition de la population, la DO s'est aussi élevée à 0,7. Cet exemple illustre bien que dans ces conditions de pH et de concentrations élevées en nitrates, les bactéries hétérotrophes ont un avantage sur les bactéries hydrogénotrophes. Les bactéries hydrogénotrophes sont particulièrement limitées par leur incapacité à acidifier le pH lorsque celui-ci est très alcalin.

Conclusions :

Cette expérience a montré que les boues sont capables de dénitrifier en hydrogénotrophie jusqu'à pH 10 et 100 mM de nitrates, ou jusqu'à pH 11 et 10 mM de nitrates. Elle a aussi montré que les valeurs maximales de pH et de concentration en nitrates tolérées par les bactéries hydrogénotrophes sont inférieures à celles des bactéries hétérotrophes. En effet, en fin d'expérience la culture à pH 11 et 100 mM en nitrates ne montrait plus de signe d'activité. Après l'ajout d'acétate, la réduction des nitrates s'est immédiatement initiée et la DO a atteint des valeurs élevées. Après 6 jours, la population bactérienne était composée essentiellement de bactéries hétérotrophes.

Par ailleurs, dans les cultures à pH 9 et pH 10 même si la bactérie majoritaire était hydrogénotrophe, il existait des bactéries hétérotrophes minoritaires. Ceci peut s'expliquer par des coopérations entre les bactéries hydrogénotrophes et les bactéries hétérotrophes alcalophiles ou halophiles. Par exemple, les bactéries hétérotrophes pourraient acidifier légèrement le pH, en utilisant la biomasse produite par les bactéries hydrogénotrophes. Par ailleurs, il n'est pas impossible que les bactéries identifiées comme hétérotrophes soient en fait capables d'utiliser le dihydrogène, soit par transfert génétique, soit car elles n'ont pas encore été bien caractérisées.

Bien que les auteurs s'accordent à dire que la dénitrification hydrogénotrophe est plus sensible aux pH élevés et aux concentrations en nitrates élevées [32,223], les aspects mécanistiques de cette sensibilité n'ont pas été clairement définis. Des hypothèses peuvent être avancées, comme explicité ci-dessus, l'activité métabolique des bactéries serait bloquée à pH 11 sans possibilité d'acidifier le pH pour les bactéries hydrogénotrophes ou il existerait un contrôle génétique bloquant l'activité des bactéries hydrogénotrophes pour éviter d'alcaliniser encore plus le pH.

V.1.2. Elévation de la concentration en nitrates (50-150 mM) à pH 9, 10 et 10,5

Cette expérience, est basée sur le même modèle que l'expérience précédente. Cependant, les concentrations en nitrates testées sont plus élevées (de 50 à 150 mM) et les pH maintenus dans les trois cultures sont pH 9, 10 et 10,5. L'expérience a duré 163 jours, la concentration en nitrates dans les réacteurs initialement à 50 mM a été ajustée à 150 mM, puis 100 mM respectivement les jours 28 et

97. La diminution de la concentration en nitrates de 150 à 100 mM a été tentée dans l'idée de relancer l'activité bactérienne.

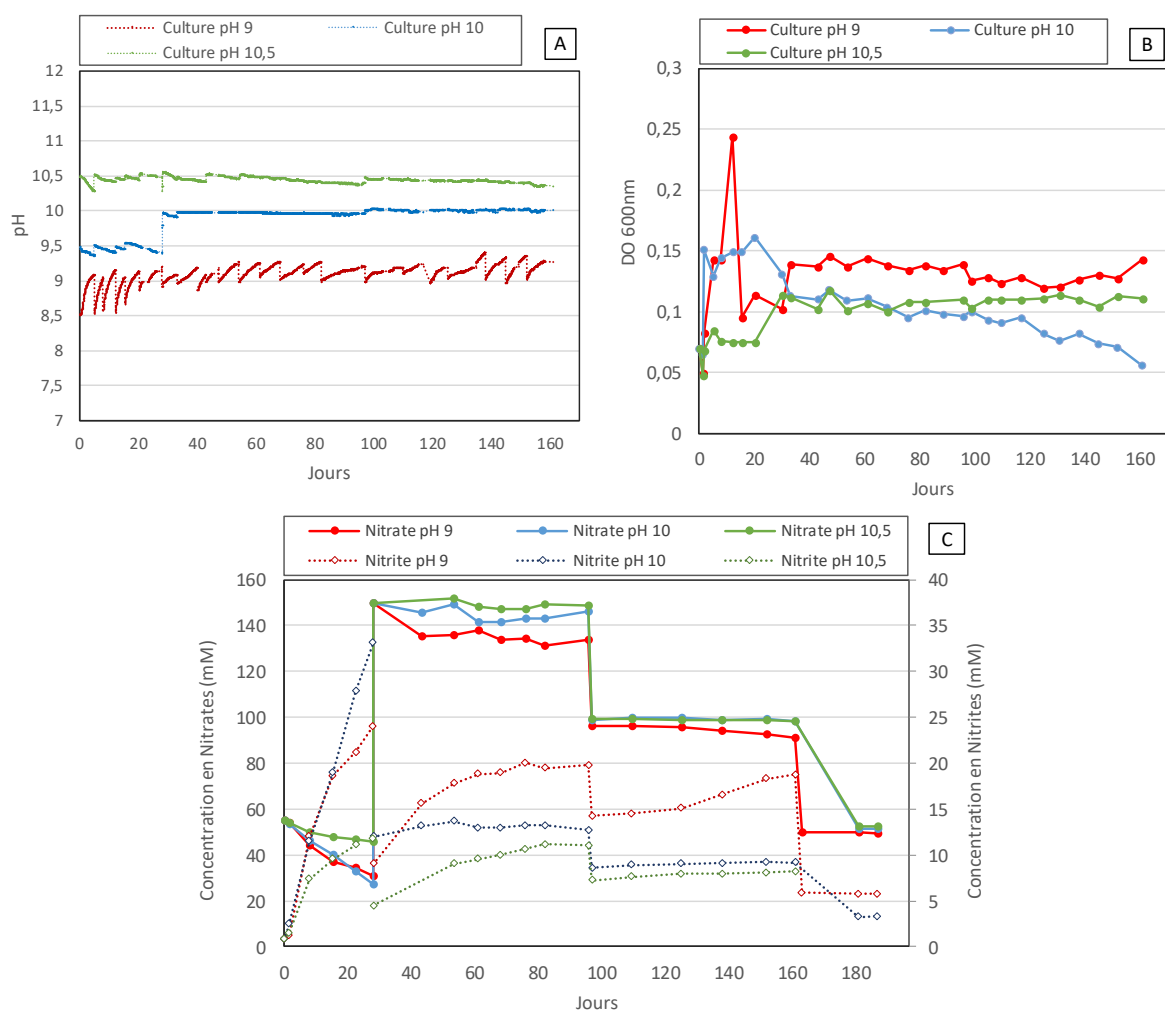


Figure 71 : Influence de l'élévation de 50 à 150 mM de la concentration en nitrates sur les évolutions du pH (A), de la DO (B), des concentrations en nitrates et nitrites (C). Conditions expérimentales : trois bioréacteurs séquentiels à pH 9, 10 et 10,5, bactéries pré-acclimatées issues de boues activées, lixiviat de ciment, 1 bar de 100% d'H₂.

Dans la culture à pH 9 des élévations de pH ont été enregistrées pendant toute l'expérience, Figure 71 (A). Des ajustements manuels de pH, visibles par les sauts de pH en pointillés, ont été effectués pour maintenir le pH à 9. Dans les cultures à pH 10 et à pH 10,5 du jour 0 au jour 28, il y a eu de légères baisses de pH. Ces acidifications sont dues à des restes d'acétate (environ 2 mM) provenant de l'inoculum. Dans ces mêmes cultures le pH est resté constant du jour 28 au jour 63. L'évolution du pH indique qu'il y a une activité dans la culture à pH 9 quel que soit la concentration en nitrates. En revanche dans les cultures à pH 9 et 10 il ne semble pas y avoir eu d'activité dénitrifiante à 150 mM puis à 100 mM de nitrates.

La DO des trois réacteurs oscillait entre 0.05 et 0,15, Figure 71 (B). Ces valeurs de DO étaient comparables aux valeurs obtenues dans l'expérience précédente. Il y a eu un pic à 0,25 de DO dans la culture à pH 9 le jour 12, lié probablement à une croissance importante à 50 mM. Dans les bioréacteurs à pH 10 et à pH 10,5 la DO s'est maintenue relativement stable jusqu'au jour 100, à partir duquel la DO dans le bioréacteur à pH 10 a diminué de 0,10 à 0.05. Dans la période batch à 100 mM, des lyses cellulaires pourrait expliquer cette perte de densité cellulaire.

Les concentrations en nitrates et en nitrites sont présentées sur la Figure 71 (C). Les cinétiques de réductions des nitrates maximales en mM/j sont présentées dans le Tableau 22. Et les concentrations en nitrates et en nitrites réduites pendant chaque période batch, calculées d'après les équations (47) et (48), sont présentées dans la Figure 72.

Tableau 22 : Cinétiques de réduction maximales des nitrates (en mM/j) de chaque culture en fonction de la concentration en nitrates. Expérience d'élévation de la concentration en nitrates (50, 150 puis 100 mM) dans des cultures hydrogénotropes (100% H₂, 1 bar) de boues activées à pH 9, 10 et 11.

	Batch : 50 mM	Batch : 150 mM	Batch : 100 mM
Culture à pH 9	0,87	0,35	0,13
Culture à pH 10	0,98	0,25	0
Culture à pH 11	0,36	0,1	0

Les boues activées ont pu réduire en hydrogénotrophie les nitrates à pH 10.0 et 150 mM de nitrates ou pH 10,5 et 50 mM de nitrates. Les seuils de tolérance des bactéries en hydrogénotrophie déterminées à pH 10 et 100 mM de nitrates dans l'expérience précédente ont été précisées. Les cinétiques de réduction des nitrates étaient plus faibles que celles obtenues dans l'expérience précédente. De même la concentration de nitrates réduite est plus faible. Dans l'expérience précédente la période batch à 10 mM de nitrates a probablement permis aux bactéries de mieux s'adapter par la suite à 50 mM de nitrates.

De manière globale dans les trois cultures à 50 mM en nitrates, les nitrates étaient réduits alors que les nitrites n'ont pas du tout été réduits. Ceci indiquerait encore une fois la présence de bactéries de type « *nitrate respiring* ». En revanche, dans la période batch à 150 mM, malgré les concentrations en nitrates plus élevées, la proportion de nitrites réduits a augmenté dans les cultures à pH 9 et à pH 10. Il y aurait donc eu un remplacement de la population bactérienne « *nitrate respiring* » par les bactéries « *true denitrifier* » qui sont plus tolérantes aux concentrations en nitrates élevées. La perte de DO, légère dans la culture à pH 9, et très prononcée dans la culture à pH 10, confirmerait cette hypothèse. Enfin dans la période à 100 mM, malgré la baisse de la concentration en nitrates, l'activité n'a repris que tardivement dans la culture à pH 9. Dans la culture à pH 10 et la culture à pH 10,5, un temps de culture plus long aurait peut-être permis d'observer le retour de l'activité bactérienne. Ceci indique que malgré l'étape de décantation chaque changement de milieu était une étape stressante pour les bactéries.

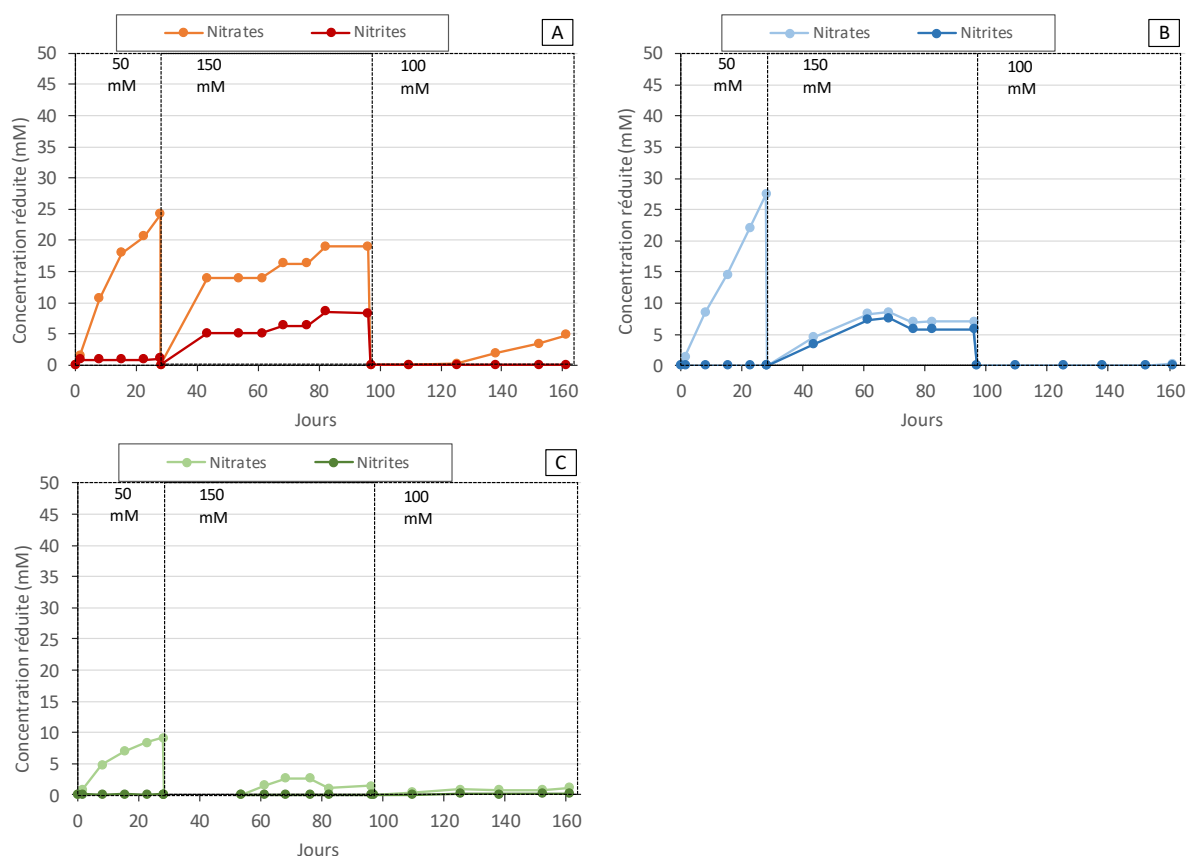


Figure 72 : Influence de l'élévation de 50 à 150 mM de la concentration en nitrates sur les concentrations en nitrates et en nitrites réduites de la culture à pH 9 (A), à pH 10 (B), et à pH 10,5 (C). Conditions expérimentales : trois bioréacteurs séquentiels à pH 9, 10 et 10,5, bactéries pré-acclimatées issues de boues activées, lixiviat de ciment, 1 bar de 100% d' H_2 .

Conclusions :

Les boues activées ont pu maintenir la réduction des nitrates jusqu'à pH 10.0 et 150 mM de nitrates, ou à pH 10,5 et 50 mM. Comme dans l'expérience précédente il semblerait que des bactéries du type « *nitrate respiring* » sont capables d'utiliser le dihydrogène comme donneur d'électrons jusqu'à 50 mM de nitrates. Cependant dès lors que la concentration en nitrates a dépassé 50 mM, la population bactérienne a été modifiée, les bactéries « *true denitrifier* » plus tolérantes sont devenues dominantes. En conséquence, malgré la concentration en nitrate plus élevée (150 mM) la proportion de nitrites réduits était plus élevée.

V.1.3. Elévation de la concentration en nitrates (200-550 mM) à pH 9, 10 et 11

Dans cette expérience, basée sur le même modèle que les deux expériences précédentes la gamme de concentration testée est plus élevée de 200 à 550 mM de nitrates. L'expérience a duré 61 jours avec des précultures de 50 jours, la concentration en nitrates a été augmentée à 550 puis diminuée à 400 mM respectivement les jours 20 et 40. La diminution de la concentration en nitrates de 550 à 400 mM a été tentée dans l'idée de relancer l'activité bactérienne. Quatre jours avant le terme des expériences (jour 57), 20 mM d'acétate ont été ajoutés pour relancer l'activité bactérienne.

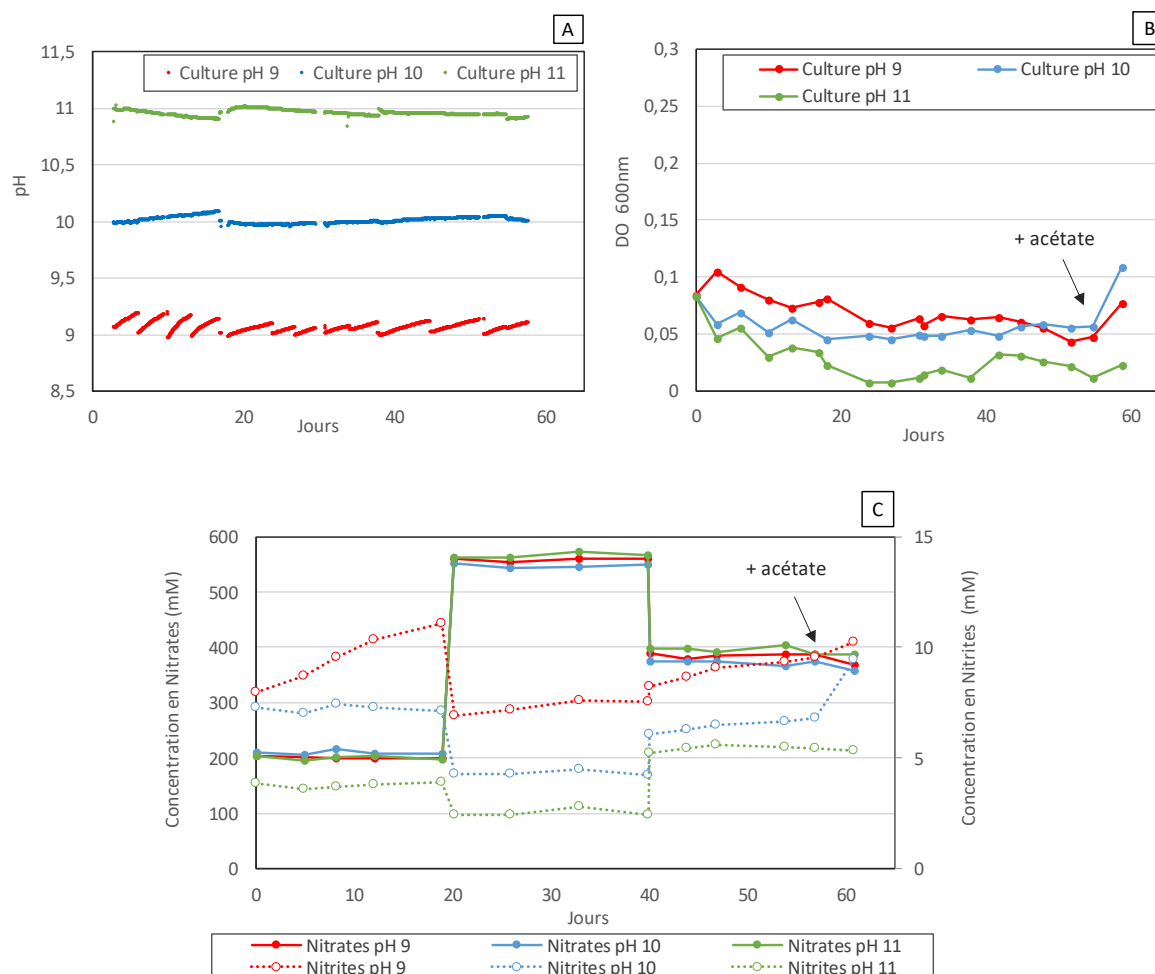


Figure 73 : Influence de l'élévation de 200 à 550 mM suivie d'une diminution à 400 mM de la concentration en nitrates sur les évolutions du pH (A), de la DO (B), des concentrations en nitrates et nitrites (C). Conditions expérimentales : trois bioréacteurs séquentiels à pH 9, 10 et 11, bactéries pré-acclimatées issues de boues activées, lixiviat de ciment, 1 bar de 100% d' H_2 .

Le suivi du pH dans les trois bioréacteurs est présenté dans la Figure 73 (A). Dans le réacteur à pH 9, le pH augmentait sensiblement (0.05 unité de pH / jour) pendant les 20 premiers jours, probablement du fait de l'activité bactérienne. A partir du jour 20, le pH s'élevait de façon moins rapide (0.02 unité de pH / jours). Dans les cultures à pH 10, et 11 le pH est resté stable. Malheureusement, une panne sur la console de mesure du pH a empêché l'enregistrement dans les derniers jours lorsque l'acétate est ajouté.

L'évolution de la DO est présentée dans la Figure 73 (B). La DO ne dépassait pas 0,1 avec le dihydrogène sans acétate. Comparées à celles des expériences précédentes les valeurs de DO étaient plus faibles. De manière générale, la DO diminuait dans les trois bioréacteurs. L'ajout d'acétate, dans les derniers jours d'expérience, a permis d'observer une augmentation de la DO dans les trois cultures. Il semblerait donc l'activité bactérienne était très ralentie dans les cultures, cependant les bactéries n'étaient pas mortes mais en état de dormance puisque l'ajout d'acétate a immédiatement provoqué un regain de croissance cellulaire.

Les concentrations en nitrates et de nitrites sont présentées sur la Figure 73 (C). Les cinétiques de réductions des nitrates maximales en mM/j sont présentées dans le Tableau 23. Et les concentrations en nitrates et en nitrites réduites pendant chaque période batch, calculées d'après les équations (47) et (48), sont présentées dans la Figure 74.

Tableau 23 : Cinétiques de réduction maximales des nitrates de chaque culture en fonction de la concentration en nitrates (en mM/j). Expérience d'élévation de la concentration en nitrates (200, 550 puis 400 mM) dans des cultures hydrogénotrophes (100% H₂, 1 bar) de boues activées à pH 9, 10 et 11.

	Batch : 200 mM	Batch : 550 mM	Batch : 400 mM	+ Acétate
Culture à pH 9	0,21	0.00	0.00	4,87
Culture à pH 10	0,15	0.00	0.00	4,07
Culture à pH 11	0.00	0.00	0.00	2,39

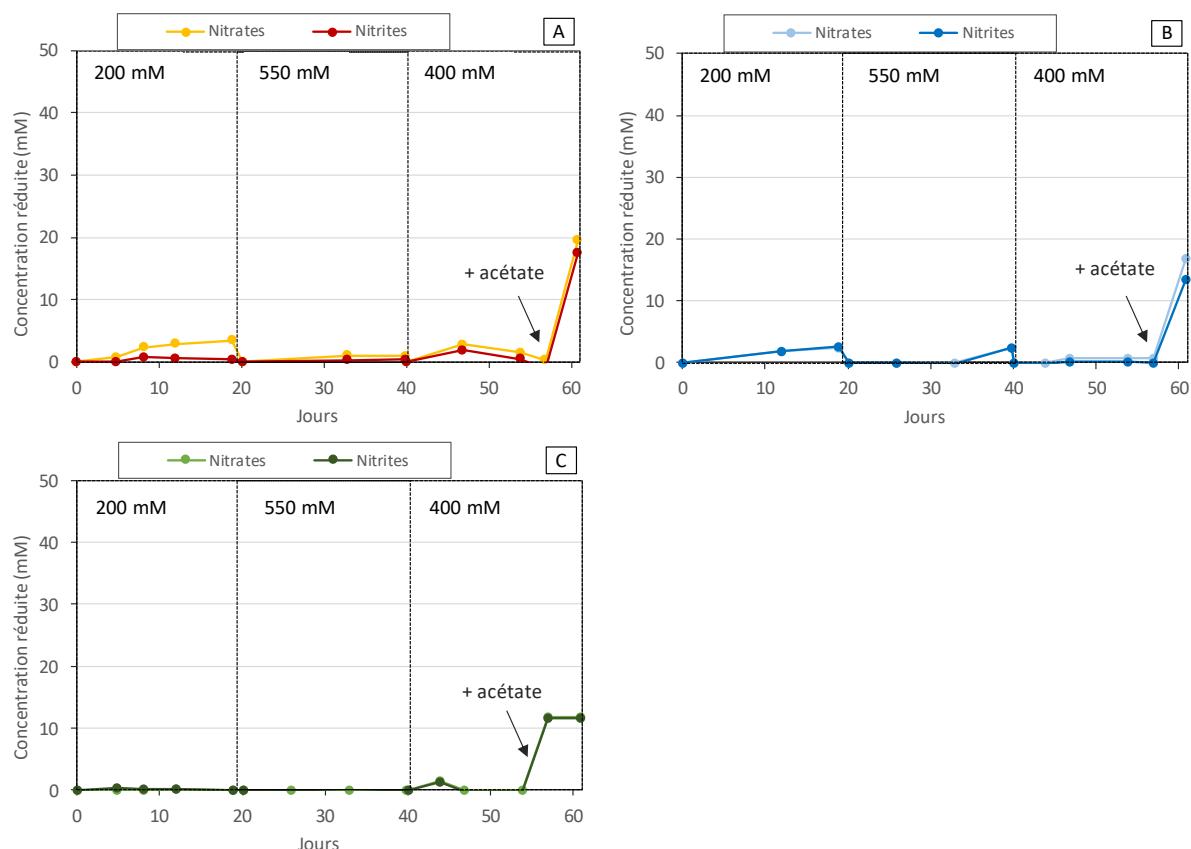


Figure 74 : Influence de l'élévation de 200 à 550 mM suivie d'une diminution à 400 mM de la concentration en nitrates sur les concentrations en nitrates et en nitrites réduites de la culture à pH 9 (A), à pH 10 (B), et à pH 11 (C). Conditions expérimentales : trois bioréacteurs séquentiels à pH 9, 10 et 11, bactéries pré-acclimatées issues de boues activées, lixiviat de ciment, 1 bar de 100% d'H₂.

Les concentrations en nitrates réduites étaient très faibles comparées aux concentrations en nitrates ajoutées, ces résultats doivent donc être nuancés car des dilutions importantes des échantillons étaient nécessaires. Dans la période à 200 mM de nitrates, une légère réduction des nitrates a été observée dans les cultures à pH 9 et pH 10. Mais par la suite aucune activité bactérienne ne peut être confirmée à 550 mM et 400 mM de nitrates. C'est uniquement à partir du jour 57, quand l'acétate a été ajouté qu'il y a eu une réduction marquée des nitrates et des nitrites (entre 10 et 20 mM) avec une cinétique relativement élevée dans les trois cultures de pH 9 à pH 11. Les bactéries semblaient donc être en dormance à partir de 200 mM de nitrates. Elles ont survécu inactives en attendant un environnement plus favorable comme l'ajout d'acétate.

Conclusions :

Les bactéries hydrogénotrophes ont pu maintenir une activité très faible pH 10 et 200 mM de nitrates. A 550 mM et 400 mM aucune activité n'a été observé en hydrogénotrophie. En revanche, l'ajout d'acétate dans la période à 400 mM de nitrates a permis aux bactéries de relancer rapidement leur activité. Les bactéries hydrogénotrophes sont donc capables d'utiliser le dihydrogène ou la matière organique, elles sont appelées mixotrophes. De plus cette expérience montre encore une fois que les bactéries sont beaucoup plus tolérantes au pH alcalin et aux concentrations élevées en nitrates en présence d'acétate. Avec le dihydrogène seul, la solubilité faible du dihydrogène, l'assimilation du carbone minéral et l'impossibilité d'acidifier le pH expliquent pourquoi les bactéries sont plus facilement inhibées.

V.1.4. Conclusion des expériences d'élévations de la concentration en nitrates en hydrogénotrophie

Cette série d'expériences a permis de déterminer les valeurs maximales de pH et de concentrations en nitrates tolérées par les boues activées en hydrogénotrophie. Les bactéries ont pu réduire les nitrates jusqu'à pH 10 et 200 mM en nitrates ou jusqu'à pH 11 et 10 mM en nitrates. Par ailleurs les boues activées ont pu survivre inactives à une concentration de 550 mM en nitrates et à pH 11. L'ajout d'acétate a permis de relancer la croissance et les réductions des nitrates à 400 mM et à pH 11. Les bactéries sont donc capables de survivre en état de dormance quand les conditions sont trop défavorables. Une modification de leur environnement comme l'arrivée de matière organique permet ensuite de les réactiver. Ce type de comportement est extrapolable au contexte des déchets radioactifs dans lequel les bactéries pourraient survivre en état de dormance.

Pour la première fois, des concentrations en nitrates et des pH très élevés ont été testés simultanément sur des bactéries dénitrifiantes hydrogénotrophes. Ces expériences ont donc permis de fournir des données intéressantes quant aux valeurs maximales de pH et de concentrations en nitrates tolérées par les bactéries. Les valeurs maximales tolérées par les bactéries hydrogénotrophes étaient inférieures à celle des bactéries hétérotrophes. Les aspects mécanistiques expliquant pourquoi les bactéries sont plus sensibles au pH alcalin ou aux concentrations élevées de nitrates n'ont pas été clairement définis. Des hypothèses peuvent être avancées : l'activité métabolique des bactéries hydrogénotrophes serait bloquée à pH 11 par l'impossibilité d'acidifier le pH ou il existerait un contrôle métabolique et /ou génétique bloquant l'activité des bactéries hydrogénotrophes pour éviter d'alcaliniser encore plus le milieu. La solubilité faible du dihydrogène, la dépense énergétique liée à l'assimilation du carbone minéral peuvent aussi ralentir fortement les bactéries hydrogénotrophes.

Par ailleurs, d'après le profil de réduction des nitrates et nitrites, des bactéries « *nitrate respiring* » ont proliféré jusqu'à pH 10 et 50 mM en nitrates. En effet, dans cette gamme de pH et de concentration en nitrates, la réduction des nitrates était rapide et les nitrites s'accumulaient fortement. Cependant, au-dessus de ces valeurs seuils, la proportion de nitrites réduits était plus élevée, il y avait un renversement de la population en faveur des bactéries « *true denitrifier* » plus tolérantes. De plus, des bactéries identifiées comme hétérotrophes ont été isolées à la fin des cultures. Plusieurs explications sont possibles, (i) ces bactéries ont utilisé la biomasse générée par les bactéries hydrogénotrophes, (ii) ces bactéries ont acquis la capacité à utiliser le dihydrogène par des transferts horizontaux de gènes avec des bactéries hydrogénotrophes [227], (iii) ces bactéries étaient capables d'utiliser le dihydrogène mais n'ont pas encore été complètement caractérisées.

V.2. Dénitrification à pH hyper alcalin (pH 11,5 et 12)

L'objectif de cette expérience était de déterminer en présence de dihydrogène l'effet de pH hyperalcalins à pH 11,5 et 12 sur l'activité des boues activées. A notre connaissance, il n'y a pas eu d'études qui ont testé ces pH très alcalins sur des cultures dénitrifiantes hydrogénotropes. Il était peu probable que l'activité bactérienne soit observée à pH 11,5 ou 12, car les bactéries hydrogénotropes sont incapables d'acidifier leur milieu.

Démarche expérimentale :

Une préculture de 10 jours a servi à inoculer deux cultures batch à pH 11,5 et pH 12 suivies pendant 186 jours. Le protocole de l'inoculation de l'expérience est présenté dans la Figure 75.

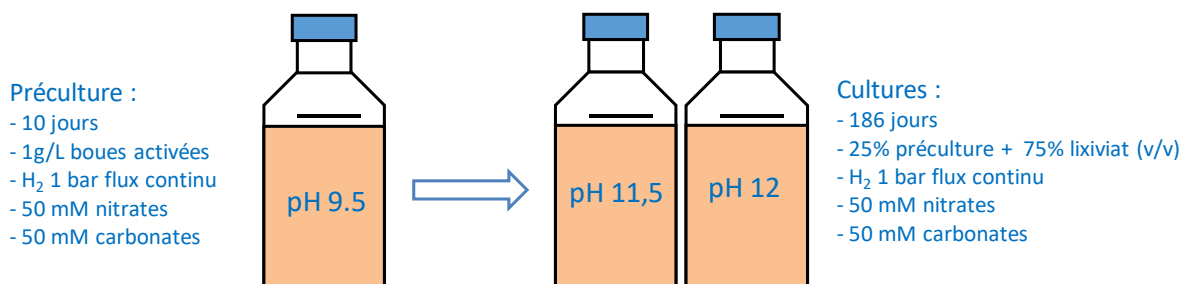


Figure 75 : Protocole de l'expérience à pH très alcalin avec deux cultures hydrogénotropes à pH 11,5 et 12,0.

Résultats :

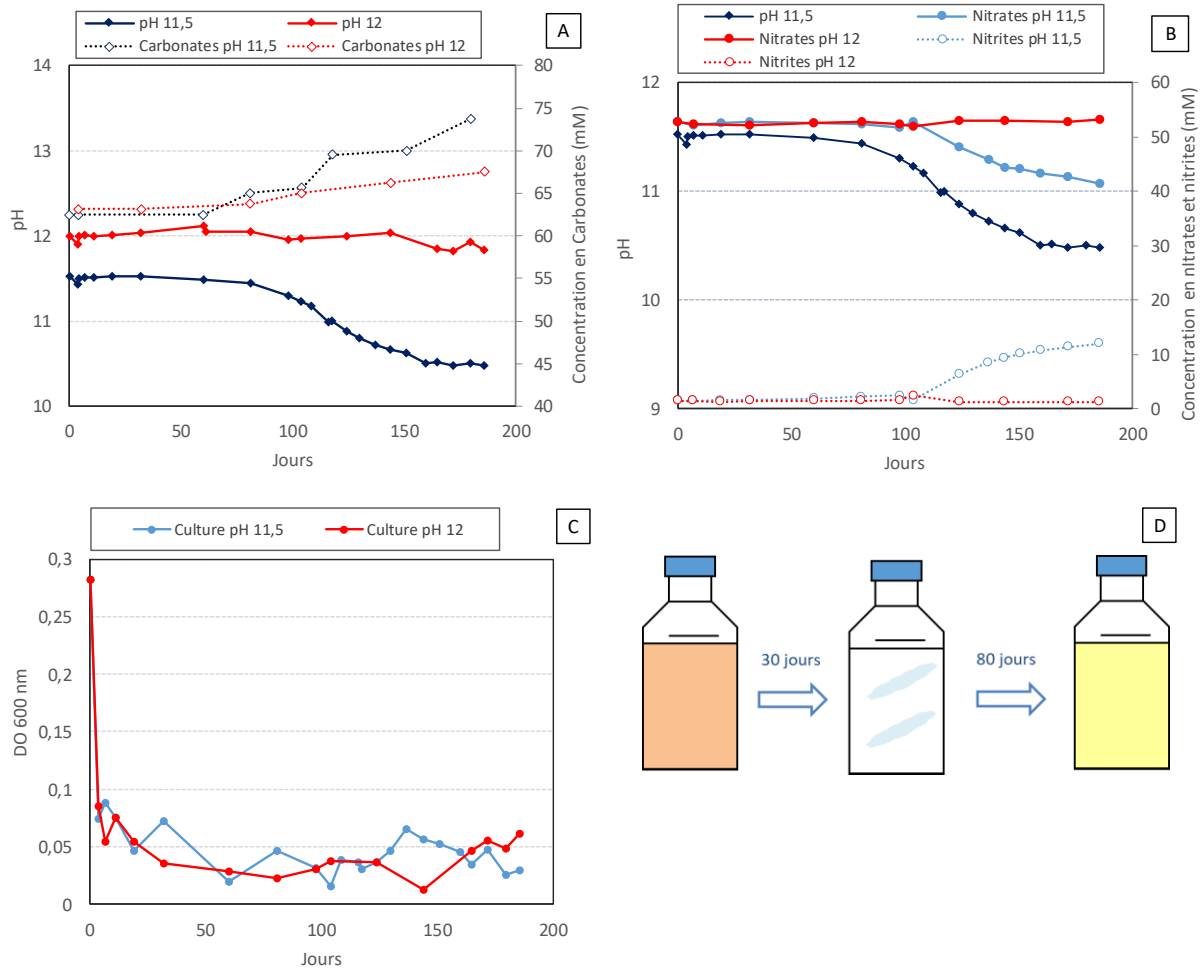


Figure 76 : Influence des pH très alcalins 11,5 et 12,0 sur les évolutions du pH et de la concentration en carbonates (A), des concentrations en nitrates et nitrites (B), de la DO (C). Représentation schématique de l'évolution de l'aspect visuel de la culture à pH 11,5 (D). Conditions expérimentales : deux bioréacteurs batch, bactéries pré-acclimatées issues de boues activées, lixiviat de ciment, 50 mM de nitrates, 1 bar de 100% d'H₂.

Les évolutions du pH et de la concentration totale en carbonate soluble ($\text{HCO}_3^- + \text{CO}_3^{2-}$) des deux cultures sont représentées sur la Figure 76 (A). Dans la culture à pH 11,5, le pH a diminué de 11,5 à 10,5 du jour 80 au jour 186, tandis que les carbonates ont augmenté de 11,3 mM dans la même période. Dans la culture à pH 12,0, le pH était relativement constant jusqu'au jour 144, après il a diminué légèrement à pH 11,8, les carbonates ont augmenté de 3,7 mM. Cette diminution du pH associée à l'élévation de la concentration en carbonate était surprenante dans des cultures hydrogénotropes. En effet, la dénitrification bactérienne hydrogénotrophe conduit normalement à l'alcalinisation du milieu. De plus, si les bactéries se multiplient, l'assimilation de carbone minéral devrait diminuer la concentration totale en carbonate et alcalinise le milieu. De multiples vérifications ont été effectuées, les réacteurs étaient bien hermétiques à l'air extérieur, et saturés par un flux continu de dihydrogène. L'augmentation des carbonates au sein de la culture était a priori plutôt la conséquence d'un métabolisme hétérotrophe avec la production CO_2 via l'oxydation de carbone organique. L'explication la plus probable est que le carbone organique venait des bactéries dans la culture. Des lyses bactériennes auraient libéré des protons intracellulaires et du carbone organique. Des bactéries hétérotrophes survivantes auraient oxydé la matière organique en carbonate ce qui justifierait l'élévation de la concentration en carbonate constatée et l'acidification du milieu.

La Figure 76 (B) présente l'évolution des concentrations en nitrates et nitrites dans chacun des deux bioréacteurs. La Figure 77 présente les concentrations en nitrates et en nitrites réduites calculées d'après les équations (47) et (48). Dans la culture à pH 11,5, une réduction de 11,4 mM de nitrates (20% des nitrates initiaux) a démarré à partir du moment où la culture a atteint pH 11,3. La réduction s'est cependant arrêtée au stade des nitrites, Figure 77 (A). Il y a donc bien eu une réduction de nitrates, ce qui conforte l'hypothèse de l'émergence d'un métabolisme de dénitrification hétérotrophe acidifiant le pH lors de la réduction des nitrates. Dans la culture à pH 12 en revanche les nitrates n'ont pas été réduits.

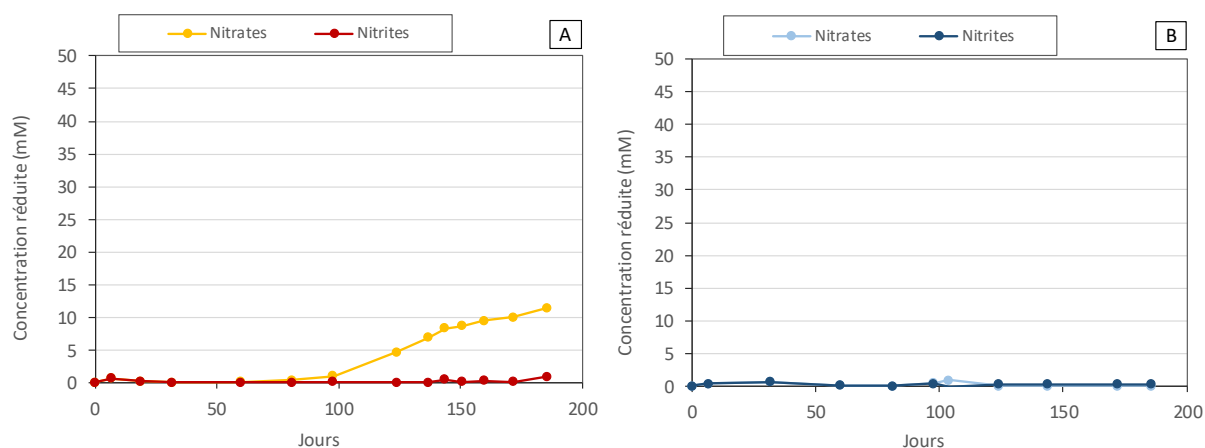


Figure 77 : Influence des pH très alcalins 11,5 et 12,0 sur les évolutions des concentrations en nitrates et en nitrites réduites de la culture à pH 11,5 (A), et de la culture à pH 12,0 (B). Conditions expérimentales : deux bioréacteurs batch, bactéries pré-acclimatées issues de boues activées, lixiviat de ciment, 50 mM de nitrates, 1 bar de 100% d'H₂.

L'évolution de la DO dans les deux bioréacteurs est présentée dans la Figure 76 (C). Dans les deux cultures, la DO est très rapidement descendue en dessous de 0,10, puis elle est restée globalement en dessous de 0,05. Le schéma de la Figure 76 (D) est inspiré d'observations directes sur le bioréacteur à pH 11,5. La culture est devenue transparente avec quelques dépôts blancs sur les parois. Puis au bout d'un certain temps, la culture s'est colorée en jaune pâle. Une explication possible serait la lyse cellulaire d'un volume important de la biomasse puis la recolonisation du milieu de culture. Ceci tend à confirmer qu'un métabolisme hétérotrophe s'est mis en place à partir de la biomasse de cellules lysées. Dans le réacteur à pH 12, la culture est aussi devenue transparente mais la couleur jaune n'est pas apparue. La culture à pH 12 aurait peut-être suivi les mêmes évolutions que la culture à pH 11,5 avec un temps plus long de culture.

Dans la Figure 78, est présentée la composition des espèces de la population bactérienne à la fin des deux cultures. Seules les espèces représentant plus de 3 % des espèces totales dans les cultures ont été indiquées pour éviter de surcharger le graphique. Les espèces minoritaires ont été classées dans la section Other/No Hit comprenant aussi les séquences ADN qui sont inconnues de la base de données ou écartées par des tests statistiques.

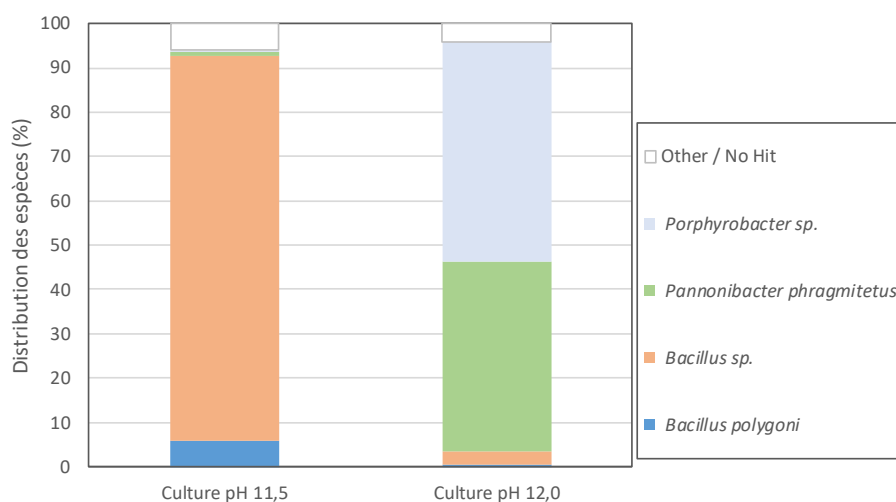


Figure 78 : Influence des pH très alcalins 11,5 et 12,0 sur la distribution des espèces bactériennes en fin d'expérience. Conditions expérimentales : deux bioréacteurs batch, bactéries pré-acclimatées issues de boues activées de station d'épuration des eaux usées domestiques, lixiviat de ciment, 50 mM de nitrates, 1 bar de 100% d'H₂.

Dans la culture à pH 11,5, la population bactérienne était composée à 93 % de *Bacillus sp.* Le genre *Bacillus* est décrit comme dénitrifiant, saprophyte, hétérotrophe, halo-alcalophile [45,139]. Les bactéries saprophytes sont capables d'utiliser la matière organique d'autres bactéries en libérant des enzymes digestives. En revanche il n'y avait pas de bactéries hydrogénotrophes, ceci corrobore donc les conclusions précédentes.

Dans la culture à pH 12, les résultats doivent être nuancés car la densité cellulaire était très faible (milieu limpide), il fallut centrifuger la culture entière pour obtenir suffisamment de biomasse à analyser. Néanmoins, il y avait 50% de *Porphyrobacter sp.* qui a été caractérisé comme hétérotrophe, halophile [230,231]. Il y avait 42% de *Pannonibacter phragmitetus* qui est une bactérie hétérotrophe, alcalophile [212,213]. Enfin il y avait 3 % de *Bacillus sp.* Dans la culture à pH 12, il n'y avait pas non plus de bactéries caractérisées comme hydrogénotrophes, mais cela n'est pas surprenant car les nitrates n'ont pas été réduits. Les bactéries qui ont survécu ont probablement dégradé la biomasse d'autres bactéries en utilisant des processus fermentaires.

Conclusions :

Malgré le pH supérieur à 11 et l'absence de matière organique dans le milieu d'alimentation (mise à part environ 0,25 g/L de boues activées), les nitrates ont été réduits dans la culture à pH initial 11,5. Il est même envisageable d'après l'aspect des courbes que dans la culture à pH 12, les bactéries suivent le même comportement avec un temps plus long. Cependant, si les bactéries ont réussi à réduire les nitrates avec un pH initial de 11,5 c'est par l'intermédiaire d'un métabolisme hétérotrophe. Par des enzymes digestives *Bacillus sp.* a provoqué la lyse d'autres cellules et oxydé cette source de matière organique. En conséquence, une première acidification est observée dans la culture. Une fois le pH 11,3 atteint, la réduction des nitrates en nitrites s'est initiée ce qui a aussi contribué à acidifier le pH jusqu'à pH 10,5. Dans cette gamme de pH et de concentration en nitrates, les bactéries hydrogénotrophes pourraient théoriquement se développer dans un second temps. Les bactéries ont donc trouvé une solution pour se développer et finalement utiliser les nitrates dans un environnement initialement hydrogénotrophe et trop alcalin qui rendait impossible la dénitrification. Cependant, le métabolisme hétérotrophe était finalement dépendant de la quantité de biomasse initialement ajoutée.

V.3. Dénitrification avec des pressions élevées de dihydrogène (1 à 10 bars)

Dans les alvéoles de stockage des déchets radioactifs, du dihydrogène peut se former par hydrolyse de l'eau ou corrosion des aciers. Dans les alvéoles hermétiques le dihydrogène pourrait s'accumuler et générer des pressions élevées. Un environnement avec des pressions élevées peut sembler restrictif pour les bactéries. Cependant des pressions élevées de dihydrogène augmenterait sa solubilité d'après la loi d'Henry. La dénitrification hydrogénotrophe est limitée par la faible solubilité du dihydrogène : 0,74 mM à 30°C, augmenter la solubilité du dihydrogène pourrait donc avoir des effets bénéfiques pour la dénitrification hydrogénotrophe. Par exemple une étude a alimenté des bioréacteurs en continu avec 1 mM de nitrates. En comparant deux pressions partielles de dihydrogène différentes, $P_{H_2} = 0,4$ bars (1,5 bars totaux) et $P_{H_2} = 1,3$ bars (3 bars totaux) les cinétiques de réductions des nitrates étaient respectivement 42 et 170 mM/j [127]. L'objectif de ce lot de deux expériences était donc d'évaluer l'effet de pressions élevées de dihydrogène de 1 à 10 bars pour des pressions totales de 1 à 100 bars sur des cultures dénitrifiantes hydrogénotropes de boues activées. Ces expériences ont été réalisées avec la collaboration de l'ISTerre qui possède les réacteurs pouvant maintenir des pressions très élevées, les autoclaves.

V.3.1. Autoclaves pressurisés

Le laboratoire de l'ISTerre possède deux autoclaves de 200mL et 450 mL. Les autoclaves ont été pressurisés par une bouteille de 200 bars contenant un mélange 90% Ar 10 % H₂, le montage des autoclaves est présenté dans la Figure 79. Après chaque échantillonnage, l'autoclave perdait une légère pression (10% de la pression totale environ), l'autoclave était re-pressurisé une fois par jour.

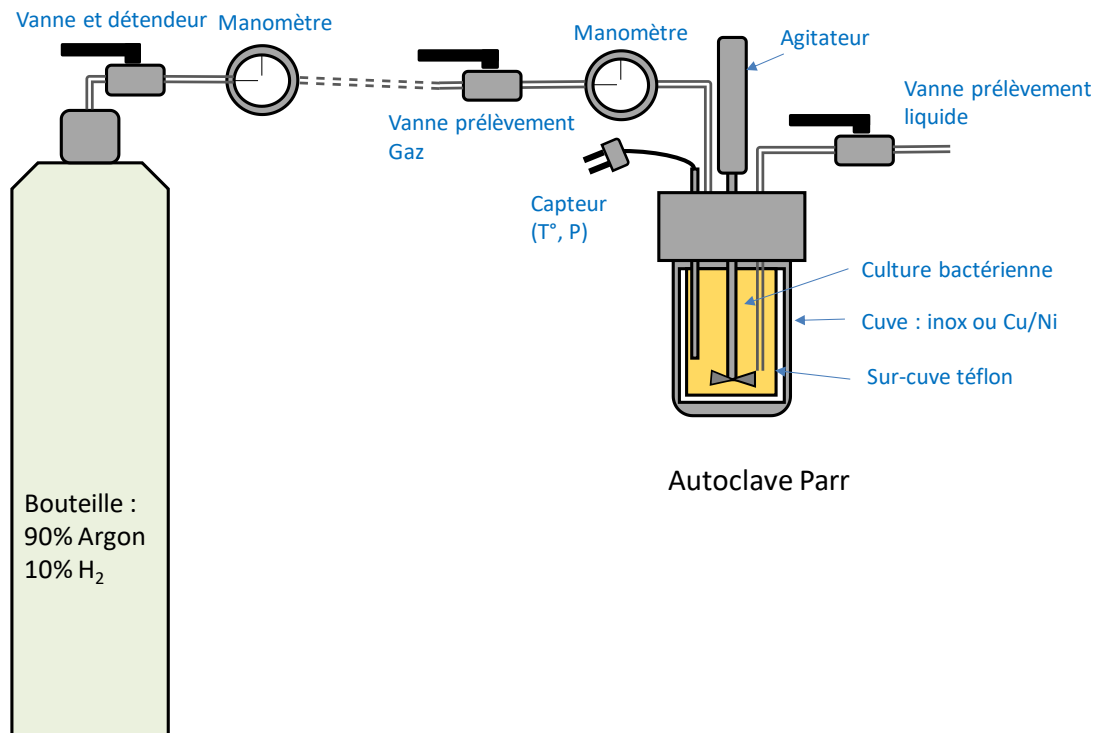


Figure 79 : Schéma d'un autoclave (ou réacteur pressurisé) relié à une bouteille de gaz contenant un mélange 90% Ar 10 % H₂.

V.3.2. Dénitrification à 1, 2 et 4 bars de dihydrogène à pH 9

L'objectif de cette expérience est de comparer trois pressions partielles de dihydrogène, 1, 2 et 4 bars. Deux cultures en autoclaves à 2 et 4 bars d' H_2 (20 bars et 40 bars totaux) ont été comparées avec une culture réalisée en bouteille saturée par un flux continu d' H_2 à 1 bar.

Démarche expérimentale :

Une préculture de 5 jours a été centrifugée, le culot ensuite a servi à inoculer la culture contrôle à 1 bar (100 % H_2), la culture à 20 bars (90 % Ar, 10 % H_2) et la culture à 40 bars (90 % Ar, 10 % H_2). La Figure 80 présente le protocole d'inoculation de l'expérience.

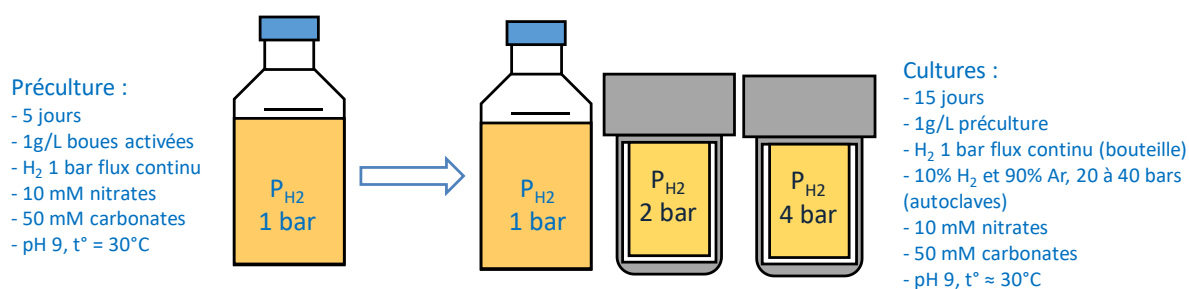


Figure 80 : Protocole des expériences réalisées à pression élevée c'est à dire à 1, 2 et 4 bars de dihydrogène.

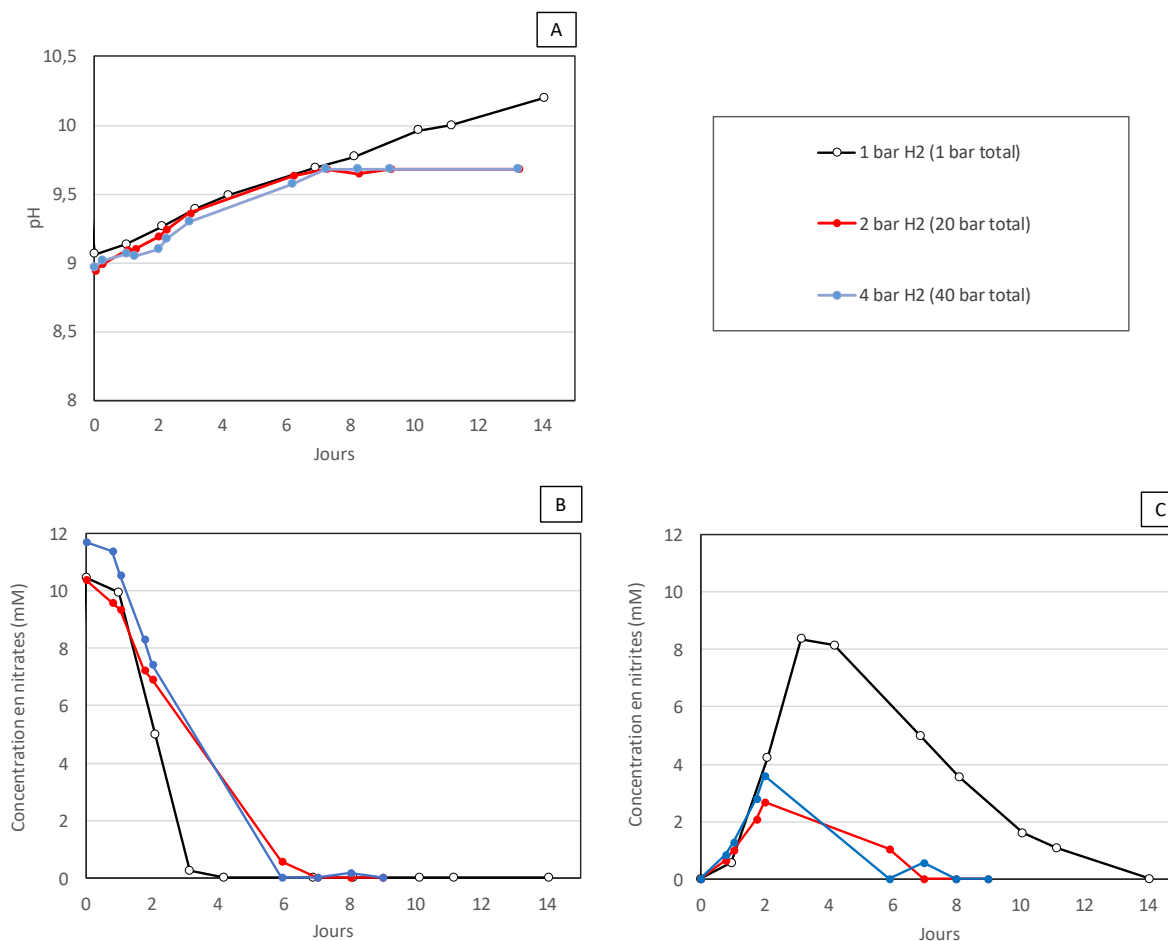
Résultats :


Figure 81 : Effet de la pression de dihydrogène à 1, 2 ou 4 bars sur les évolutions du pH (A), de la concentration en nitrates (B), de la concentration en nitrites (C). Conditions expérimentales : trois bioréacteurs batch, bactéries pré-acclimatées issues de boues activées, lixiviat de ciment, 10 mM de nitrates, 1 bar de 100% d'H₂, 20 et 40 bars de 90% d'Argon et 10% d'H₂, pH 9.

L'évolution du pH était similaire avec 2 ou 4 bars d'H₂, le pH final était 9,7, Figure 81 (A). En revanche avec 1 bar d'H₂, le pH s'est élevé jusqu'à 10,2. D'après les calculs théoriques du pH du paragraphe III.2.1, pour 10 mM de nitrates réduits en diazote en hydrogénotrophie et un pH initial 9,0, le pH final théorique serait 9,8. Ce pH théorique est très proche de celui des cultures à 2 ou 4 bars d'H₂. Comme les calculs de pH théoriques ne prennent pas en compte l'alcalinisation par l'assimilation de carbone minéral, il est probable que dans ces deux cultures il y ait eu très peu de croissance cellulaire. La différence de pH entre les trois cultures pourrait donc s'expliquer par la croissance cellulaire plus conséquente dans la culture à 1 bar d'H₂. La pression élevée de 20 à 40 bars aurait donc limité la croissance bactérienne.

Les évolutions des concentrations en nitrates et nitrites sont présentées respectivement dans la Figure 81 (C) et la Figure 81 (B). A 1 bar d'H₂, les nitrates ont été réduits en 3 jours avec une cinétique de réduction max de 4,4 mM/j. Dans les cultures à 2 et 4 bars d'H₂, les nitrates ont été réduits en 6 jours avec des cinétiques maximales respectives de 1,8 et 2,0 mM/j. La réduction des nitrates était donc ralentie par les pressions élevées de 20 et 40 bars appliquées sur les cultures. Les pressions élevées peuvent affecter de plusieurs manières l'activité bactérienne [232,233]. Les pressions élevées peuvent conduire notamment à : la dénaturation des protéines [234], l'arrêt des systèmes de transport de substrats et d'ions notamment les transporteurs de Na⁺ et K⁺ [235,236], la déformation de la

membrane plasmique et de la cellule [237]. D'ailleurs, l'endommagement de la membrane plasmique et la perte de la perméabilité sélective annulent la capacité des bactéries à contrôler leur pH interne [236,237]. En conséquence la croissance bactérienne peut être sévèrement inhibée [237,238]. Cependant les bactéries semblent pouvoir résister à des pressions largement supérieures à celles testées dans cette expérience. Les bactéries seraient capables de résister à des pressions de l'ordre de milliers de bars [232,233]. Par exemple *P. denitrificans* pourrait survivre jusqu'à 3000 bars [236]. En revanche, les nitrites étaient réduits plus rapidement dans les cultures à 2, et 4 bars d'H₂. Les pressions élevées de dihydrogène permettraient donc d'accélérer la réduction des nitrites. Ceci peut s'expliquer par la solubilité plus élevée du dihydrogène. La loi d'Henry s'exprime de la manière suivante $K_{H_2} = P_{H_2} / [H_2]$. Avec K_{H_2} la constante d'Henry égale à 1351 pour le dihydrogène à 30°C. En conséquence pour les pressions de dihydrogène de 1, 2 et 4 bars la quantité de dihydrogène dissoute est respectivement 0,74, 1,48 et 2,96 mM. La solubilité augmentée du dihydrogène aurait donc permis aux bactéries de type « *true denitrifier* » de réduire nitrates et nitrites quasiment à la même vitesse.

Conclusions :

Les pressions élevées de dihydrogène ont permis d'augmenter la solubilité du dihydrogène. La réduction des nitrites a été accélérée. Finalement, les nitrates et les nitrites ont été totalement réduits en 7 et 8 jours respectivement à 2 et 4 bars de dihydrogène (20 et 40 bars totaux) tandis qu'ils ont été réduits en 14 jours à 1 bar de dihydrogène (1 bar total). La biodisponibilité du dihydrogène aurait donc un impact prépondérant sur la dénitrification hydrogénotrophe. En revanche les pressions totales élevées jusqu'à 40 bars ont ralenti la réduction des nitrates et probablement la croissance cellulaire.

V.3.3. Dénitrification à 10 bars de dihydrogène et pH 9 ou pH 11

L'objectif de cette expérience était de comparer deux cultures à 10 bars de dihydrogène (100 bars totaux) à deux pH différents, pH 9 et 11. Il s'agissait d'évaluer si les pressions élevées en dihydrogène pourraient avoir un effet bénéfique sur la sensibilité des cultures hydrogénotrophes au pH alcalin.

Démarche expérimentale :

Une préculture de 5 jours a été centrifugée, le culot ensuite a servi à inoculer deux cultures à 100 bars (90 % Ar, 10 % H₂) à pH 9 ou pH 11. La Figure 82 présente le protocole d'inoculation de l'expérience.

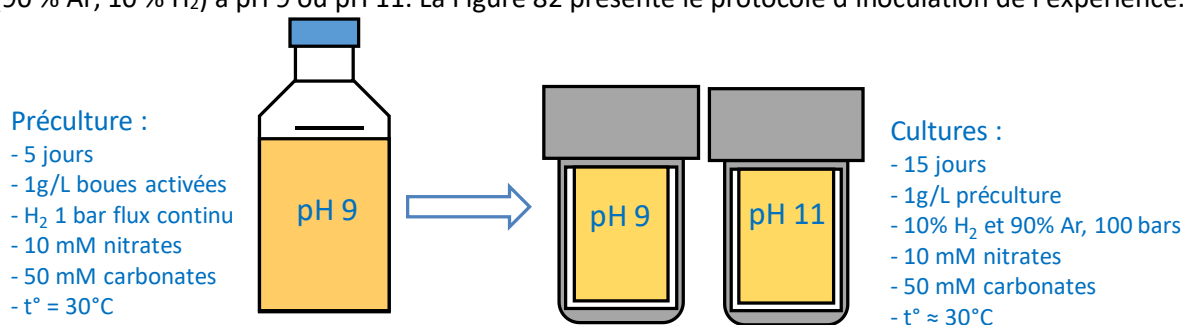


Figure 82 : Protocole de l'expérience avec deux cultures hydrogénotrophes pressurisées à 10 bars de dihydrogène à pH 9 ou 11.

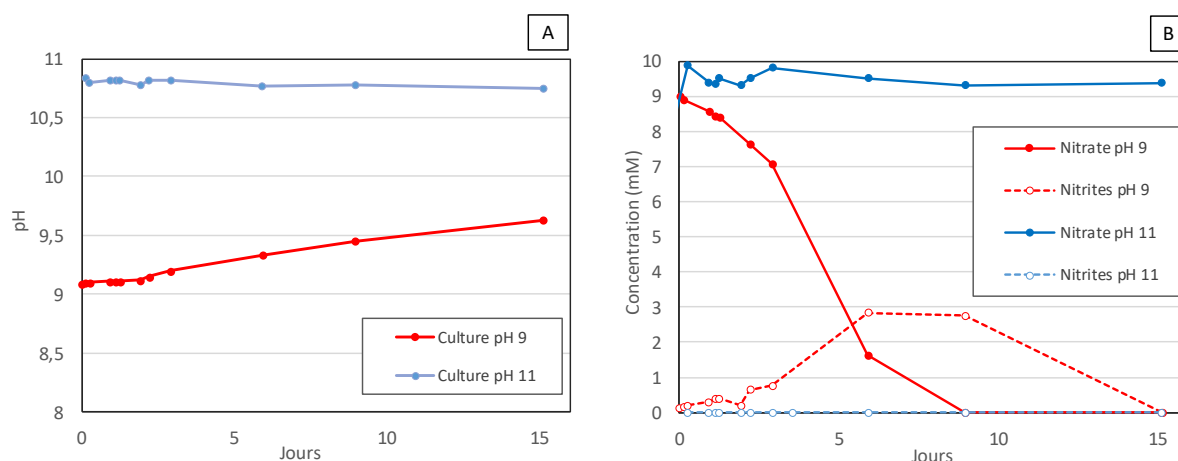
Résultats :


Figure 83 : Effet du pH initial, fixé à 9 ou 11, à pression élevées d'H₂ sur les évolutions du pH (A), des concentrations en nitrates et en nitrites (B). Conditions expérimentales : deux bioréacteurs batch, bactéries pré-acclimatées issues de boues activées, lixiviat de ciment, 10 mM de nitrates, 100 bars de 90% d'Argon et 10% d'H₂.

Le suivi du pH est présenté dans la Figure 83 (A), le suivi des concentrations en nitrates et en nitrites est présenté dans la Figure 83 (B). Le pH est resté constant dans la culture à pH 11. Dans la culture à pH 9 le pH s'est élevé à 9,6. Cette valeur proche de la valeur de pH théorique (Cf § III.2.1) indique que les nitrites ont été bien réduits mais que la croissance bactérienne était faible voire nulle. Dans la culture à pH 11 il n'y a pas eu de réductions de nitrates. Les bactéries n'étaient donc pas capables de réduire les nitrates à pH 11,0 même avec une pression plus élevée d'H₂. L'amélioration de la biodisponibilité du H₂ ne permet donc pas d'améliorer la résistance des bactéries hydrogénotrophes au pH alcalin. Dans la culture à pH 9 les nitrates ont été consommés en 9 jours, les nitrites ont été réduits en 15 jours. Les bactéries étaient donc capables de réduire les nitrates à 100 bars en hydrogénotrophie. Cependant la pression de 100 bars a ralenti le métabolisme des boues activées puisque les nitrates et les nitrites ont été réduits en 15 jours.

La Figure 84 présente les proportions de nitrates et de nitrites réduites dans les quatre cultures à pH 9 et à 1, 2, 4 et 10 bars d'H₂, calculées d'après les équations (49) et (50). Le Tableau 24, présente les cinétiques maximales de réductions des nitrates et les accumulations maximales de nitrites dans les quatre cultures à 1, 2, 4 et 10 bars de dihydrogène.

$$\% \text{NO}_3^- \text{réduit} = \frac{[\text{NO}_3^-]_{\text{initial}} - [\text{NO}_3^-]_{\text{finale}}}{[\text{NO}_3^-]_{\text{initiale}}} \quad (49)$$

$$\% \text{NO}_2^- \text{réduit} = \frac{[\text{NO}_2^-]_{\text{produite}} + [\text{NO}_2^-]_{\text{initiale}} - [\text{NO}_2^-]_{\text{finale}}}{[\text{NO}_3^-]_{\text{initiale}}} \quad (50)$$

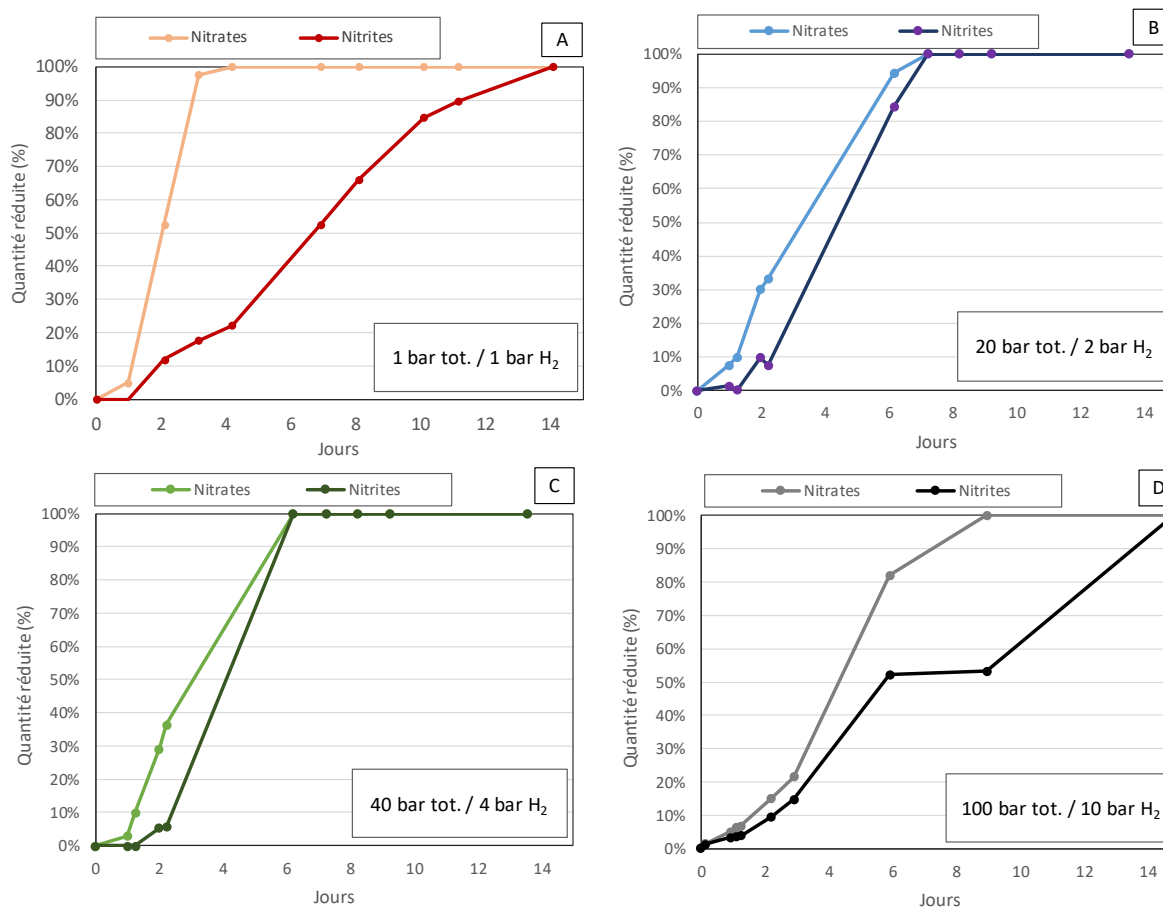


Figure 84 : Effet de pressions élevées croissantes d'H₂ de 1 à et 10 bars sur les évolutions des proportions de nitrates et de nitrites réduits dans les bioréacteurs à 1 bar d'H₂ (A), à 2 bars d'H₂ (B), à 4 bars d'H₂ (C) et à 10 bars d'H₂ (D). Conditions expérimentales : quatre bioréacteurs batch, bactéries issues de boues activées, lixiviat de ciment, 10 mM de nitrates, 1 bar de 100% d'H₂ ou 20, 40 et 100 bars de 90% d'Argon et 10% d'H₂, pH 9.

La cinétique de réduction maximale des nitrates était 8,4 mM/j à 1 bar de dihydrogène et l'accumulation des nitrites a atteint 8,4 mM. Entre 2 et 10 bars de dihydrogène les cinétiques de réductions maximales de nitrates étaient similaires entre 1,8 et 2,0 mM/j et les accumulations de nitrites maximales étaient comprises entre 2,8 et 3,6 mM. A 10 bars de dihydrogène il y a eu un temps de latence de 3 jours avant que les nitrates ne soient réduits. Ce temps de latence pourrait être dû à l'adaptation plus lente des bactéries à la pression totale de 100 bars. Pour rappel les pressions élevées peuvent perturber de nombreux processus microbiens [232,233]. Par ailleurs à 2 et 4 bars d'H₂ la réduction des nitrites était accélérée. Les pressions élevées en dihydrogène permettent donc d'accélérer la réduction des nitrites. Mais en contrepartie les pressions totales élevées ralentissent l'activité métabolique et notamment la réduction des nitrates. Par ailleurs, il existe une valeur maximale de pression entre 40 et 100 bars à partir de laquelle la réduction des nitrites serait aussi ralentie par la pression trop élevée.

Tableau 24 : Comparaison des cinétiques maximales de réductions des nitrates et des accumulations maximales de nitrites dans les cultures hydrogénotrophes de boues activées à pH 9 et à 1, 2, 4 et 10 bars de dihydrogène.

P _{H₂}	1 bar	2 bars	4 bars	10 bars
Réduction des nitrates (mM/j)	4,4	1,8	2,0	1,8
Accumulation des nitrites (mM)	8,4	2,8	3,6	2,8

Conclusions :

Les pressions élevées de dihydrogène ne constituent pas forcément un frein au métabolisme de la dénitrification, dans une certaine mesure, elles accélèrent la réduction des nitrites, et de manière globale la dénitrification. En effet, en améliorant la solubilité du dihydrogène, celui-ci est plus accessible pour les bactéries. Cependant lorsque les pressions totales sont trop élevées la réduction des nitrates, la réduction des nitrites et probablement la croissance bactérienne sont ralenties en fonction de la pression totale exercée. A 100 bars totaux, les réductions des nitrates et des nitrites étaient ralenties par rapport au contrôle avec 1 bar de dihydrogène. Les bactéries seraient donc capables de résister et de dénitrifier à des pressions élevées dans l'enceinte de stockage des déchets radioactifs. Dans certains cas, les bactéries peuvent même survivre jusqu'à des pressions de plusieurs milliers de bars c'est le cas de *P. denitrificans* qui a toléré jusqu'à 3000 bars [237]. C'est une donnée utile à considérer dans les scénarios prédictifs de l'Andra concernant l'activité des microorganismes dans le contexte de stockage des déchets radioactifs.

V.4. Conclusions du chapitre

Un consortium bactérien issu de boues activées a pu réduire les nitrates en hydrogénotropie jusqu'à pH 11 et 10 mM de nitrates ou à pH 10 et 200 mM de nitrates. La Figure 85 permet de synthétiser les gammes de concentrations en nitrates et de pH dans lesquelles les nitrates ont été réduits. En hydrogénotropie, les bactéries sont moins tolérantes aux gammes de pH et de concentrations en nitrates élevées. Ceci peut s'expliquer par la solubilité faible du dihydrogène qui le rend moins disponible que l'acétate, la nécessité d'assimiler du carbone minéral qui un processus énergivore, ou encore par l'inévitable alcalinisation du milieu provoquée par la dénitrification.

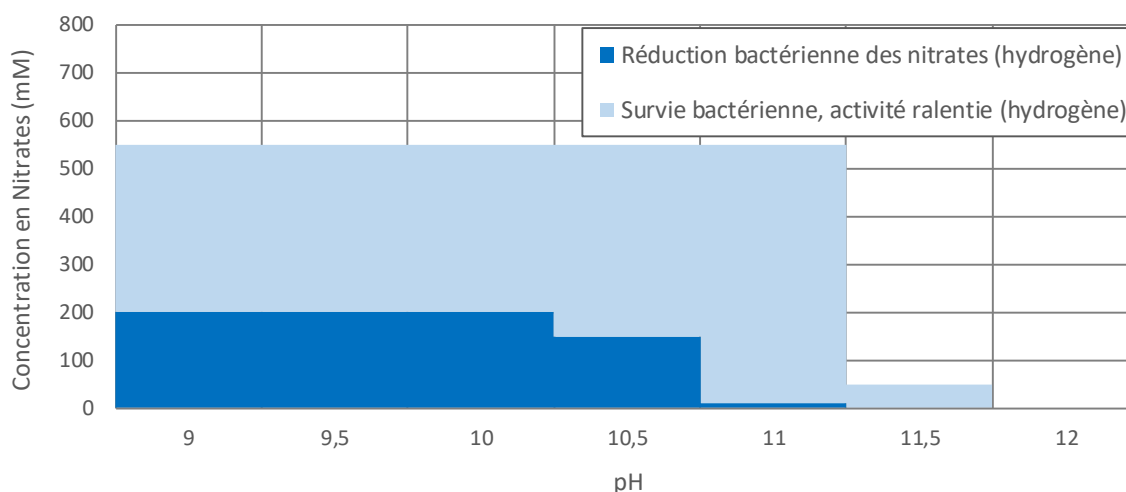


Figure 85 : Synthèse des gammes de pH et de concentrations en nitrates dans lesquelles les bactéries issues de boues activées ont pu réduire les nitrates ou survivre avec une activité ralentie en condition hydrogénotrophe.

Des pH très alcalins de 11,5 et 12 ont été imposés à des cultures hydrogénotropes. Dans la culture au pH initial de 11,5 les bactéries ont pu s'adapter et acidifier le pH mais par le biais du métabolisme hétérotrophe. Des bactéries du genre *Bacillus* ont vraisemblablement libéré des enzymes digestives et consommé la matière organique d'autres cellules pour acidifier le pH et réduire les nitrates. Finalement le pH s'est acidifié jusqu'à 10,5 et 20% des nitrates ont été réduits. Cependant la réduction des nitrates

était dépendant de la quantité de biomasse ajoutée initialement et pouvant être oxydée par *Bacillus sp.*

Dans les cultures hydrogénotrophes généralement, la population bactérienne était composée majoritairement par une espèce hydrogénotrophe appartenant au genre *Thauera sp.* Cependant, il y avait aussi des bactéries minoritaires (5 à 10 %) hétérotrophes, alcalophiles ou halophiles. Les bactéries hétérotrophes pourraient utiliser la biomasse générée par les bactéries hydrogénotrophes. Il se pourrait que les bactéries hétérotrophes alcalophiles permettent à toute la population bactérienne de mieux résister au pH alcalin. Une autre explication envisageable est que les bactéries hétérotrophes aient acquis la capacité à utiliser le dihydrogène par des transferts horizontaux de gènes avec les bactéries hydrogénotrophes. Ce type d'échange de gènes a déjà été caractérisé [227]. Par ailleurs, comme dans les cultures hétérotrophes, il semblerait que la population bactérienne hydrogénotrophe soit composée de bactéries « *nitrate respiring* » qui réduisent les seulement les nitrates et provoquent des accumulations de nitrites, et de bactéries « *true denitrifier* » capables de réduire nitrates et nitrites en diazote. Les bactéries « *nitrate respiring* » ont des taux de croissance supérieurs mais ne peuvent proliférer que jusqu'à pH 10.0 ou 50 mM en nitrates en hydrogénotrophie.

Enfin des pressions élevées en dihydrogène de 1 à 10 bars (1 bars à 100 bars totaux) ont été testées car de fortes pressions de dihydrogène sont attendues dans les alvéoles de stockage. La dénitrification est possible malgré les pressions élevées imposées. Dans une certaine mesure, elles accélèrent la réduction des nitrites. En effet, en améliorant la biodisponibilité du dihydrogène, celui-ci devient plus accessible pour les bactéries dénitrifiantes. Cependant, si les pressions totales sont trop élevées elles peuvent inhiber l'activité de bactérienne. En conséquence, le métabolisme bactérien est ralenti en fonction de la pression totale exercée. La pression maximale tolérée par les bactéries serait comprise entre 40 et 100 bars, à 100 bars la dénitrification était ralentie. Les bactéries seraient donc capables de résister et de dénitrifier à des pressions élevées dans l'enceinte de stockage des déchets radioactifs.

Chapitre VI :

**DENITRIFICATION AVEC UN CONSORTIUM BACTERIEN EN
SYSTEME SOLIDE-LIQUIDE AVEC ACIER ET PATE DE CIMENT
SOLIDES**

Table des matières :

VI.1. Dénitrification hydrogénotrophe en présence de ciment	174
VI.1.1. Incorporation de pâtes de ciment vieilli, en présence de 100 à 200 mM en nitrates.	175
VI.1.2. Incorporation de pâtes de ciment frais, en présence de 50 à 150 mM en nitrates....	179
VI.2. Dénitrification en présence d'acier d'armatures à béton armé.....	184
VI.2.1. Incorporation d'acier d'armatures dans des cultures hydrogénotrophes	184
VI.2.1. Incorporation d'acier d'armature à béton dans des cultures hétérotrophes.....	189
VI.3. Dénitrification mixotrophe en présence d'acier et ciment solides.....	194
VI.4. Conclusions du chapitre	203

Dans les chapitres précédents, la réduction microbienne des nitrates a été étudiée avec des concentrations élevées en nitrates et des pH élevés en phase liquide. Dans ce chapitre, de l'acier solide et/ou de la pâte de ciment solide ont été ajoutés dans les cultures afin de se rapprocher des conditions réelles à proximité des déchets radioactifs. L'acier et/ou la pâte de ciment solides pourraient favoriser la formation de biofilm microbien et l'acier pourrait impacter la réduction microbienne des nitrates et des nitrites.

Comme dans les chapitres précédents, l'objectif était d'évaluer les seuils de tolérance des bactéries des boues activées confrontées à des concentrations en nitrates et des pH élevés, cette fois-ci en présence d'acier et de pâte de ciment solides. En parallèle, les cinétiques de réduction des nitrates et des nitrites ont été évaluées.

Dans une première série d'expériences, des pâtes de ciment ont été ajoutées dans des cultures de boues activées hydrogénéotrophes en bioréacteurs discontinus séquentiels. Les concentrations en nitrates et les pH ont été progressivement augmentés respectivement de 50 à 200 mM de nitrates et de pH 9,5 à 10,2.

Dans un second temps, de l'acier solide a été ajouté dans des cultures de boues activées hydrogénéotrophes conduites en batch à pH 9 avec 10 mM de nitrates. Puis, l'acier a été ajouté dans des cultures de boues activées hétérotrophes ajustées à pH 9 et conduites en bioréacteurs discontinus séquentiels, dans lesquels la concentration en nitrates a été progressivement élevée de 50 à 400 mM.

Dans une expérience finale, trois cultures de boues activées ont été menées en présence d'acier, de ciment, et en mixotrophie avec acétate et dihydrogène simultanément dans des bioréacteurs discontinus séquentiels. Dans une culture à pH 9 un flux continu de $N_2(g)$ a permis d'obtenir un ciel gazeux à 1 bar 100% de N_2 . Dans les deux autres cultures à pH 9 et 11, le ciel gazeux était saturé en dihydrogène, 1 bar, 100 % de $H_2(g)$, ces deux dernières cultures contenaient donc simultanément l'acétate et le dihydrogène comme donneurs d'électrons. La concentration en nitrates a été progressivement augmentée de 50 à 400 mM.

VI.1. Dénitrification hydrogénéotrophe en présence de ciment

Le matériau cimentaire a été ajouté sous forme de pâtes de ciment de CEM V. Il s'agit d'un type de ciment (ciments aux laitiers et aux cendres) utilisé par l'Andra. Des études antérieures réalisées au LMDC et au LGC ont déjà expérimenté l'effet de l'ajout de pâte de CEM V avec un ratio de 60 cm^2/L dans des cultures dénitrifiantes hétérotrophes en présence d'acétate [21–23]. L'espèce *Halomonas desiderata* [21,23] ou bien un sédiment provenant d'un écosystème aquatique à pH basique [22] ont été inoculés dans du lixiviat de ciment additionné d'environ 10 mM d'acétate et de nitrates. Le pH a été ajusté entre pH 9 et pH 11 [21–23]. Ces études ont conclu que les bactéries pouvaient se déposer et former du biofilm sur les surfaces du ciment solide, et que le ciment relâchait des ions OH^- qui alcalinisait le pH, surtout en début d'expérience.

En conséquence, cette section expérimentale a été focalisée sur le métabolisme hydrogénéotrophe. Deux expériences ont été réalisées en présence de pâtes de ciment dans des cultures dénitrifiantes alimentées en dihydrogène, avec des concentrations élevées en nitrates (50 à 200 mM) et des pH élevés (pH 9,5 à 10,2). Dans la première expérience le ciment a été « vieilli » artificiellement, par immersion dans l'eau plusieurs semaines puis stockage à l'air libre pendant 1 an. L'objectif était de se rapprocher de la situation de stockage dans laquelle la structure en béton sera en contact avec l'air

pendant la phase d'exploitation et avec l'eau après la fermeture et la resaturation des alvéoles. Dans la deuxième expérience, des pâtes de ciment « frais » ont été ajoutées dans les bioréacteurs. Ces pâtes de ciment étaient conservées dans une solution saline (concentrée en Na et K à pH 13,3).

VI.1.1. Incorporation de pâtes de ciment vieilli, en présence de 100 à 200 mM en nitrates.

Cette expérience avait pour objectif d'évaluer l'impact de pâtes de ciment vieilli sur l'activité dénitrifiante de boues activées hydrogénotrophes. L'étape de vieillissement des pâtes de ciment devait atténuer les relâchements en OH^- et donc l'effet alcalinisant du pH.

Démarche expérimentale :

Les deux réacteurs ont été inoculés par 50 % de lixiviat et 50 % d'une préculture de 24 jours. Le matériau cimentaire a été ajouté dans une culture sous forme de 9 pâtes de ciment triangulaires, avec un ratio de $160 \text{ cm}^2/\text{L}$. La concentration initiale en nitrates de 100 mM a été élevée à 200 mM le jour 21 tandis que le pH a été élevé de 9,5 à 10,2.

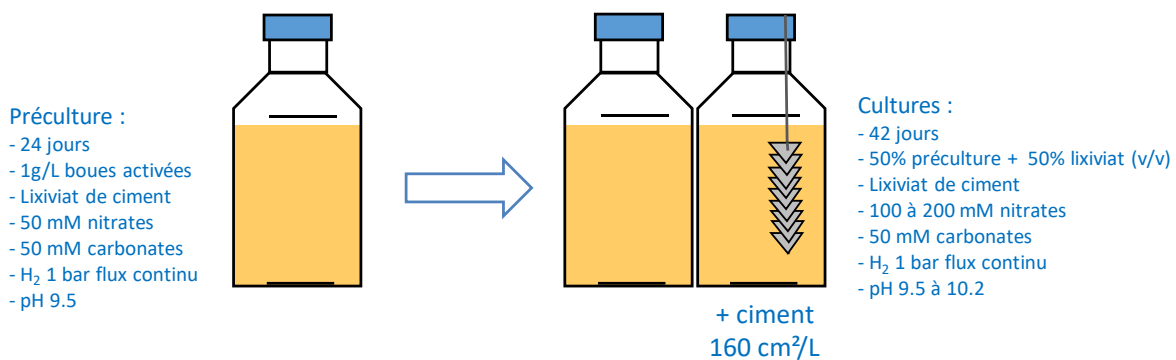


Figure 86 : Protocole de l'expérience d'insertion de pâtes de ciment vieilli dans des cultures hydrogénotrophes.

Résultats :

La Figure 87 (A) présente l'évolution du pH. La Figure 87 (B) présente l'évolution des concentrations en nitrates et en nitrites. L'évolution de la DO à 600 nm n'a pas été présentée car l'ajout de pâte de ciment a perturbé l'analyse de la DO. En effet, la matière en suspension se déposait à la surface du ciment. Ceci est visible sur la photographie des bioréacteurs présentée sur la Figure 87 (C)

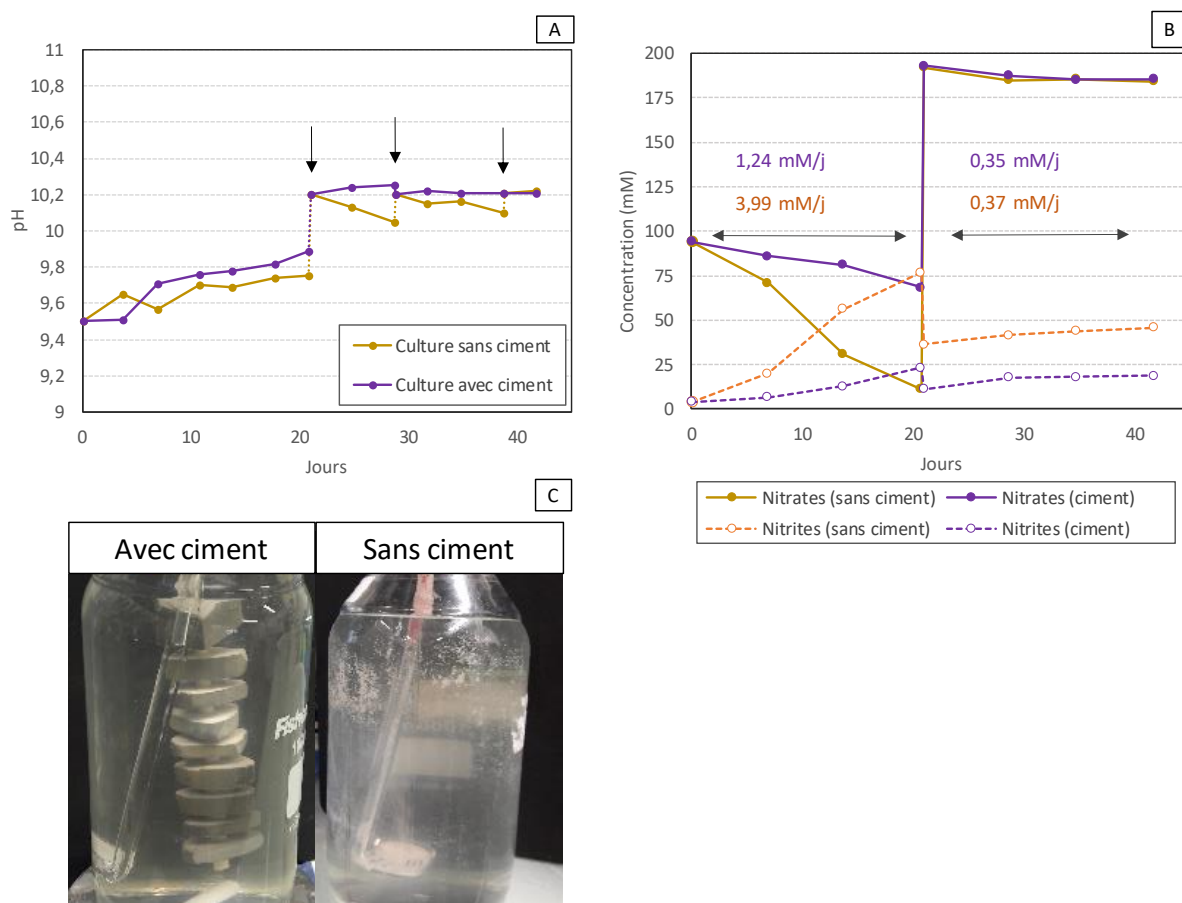


Figure 87 : Effet de l'ajout ou non de pâtes de ciment vieilli sur les évolutions du pH (A), des concentrations en nitrates et en nitrites (B). Photographie des deux bioréacteurs, avec et sans pâtes de ciment vieilli, prise au jour 42 (C). Conditions expérimentales : deux bioréacteurs séquentiels, bactéries pré-acclimatées issues de boues activées, lixiviat de ciment, 100 à 200 mM de nitrates, 0 ou 160 cm²/L de pâte de ciment vieilli, 1 bar de 100% d'H₂, pH 9,5 à 10,2.

Les ajustements manuels de pH effectués dans les cultures sont représentés par des flèches dans la Figure 87 (A). Le pH était légèrement plus élevé dans le bioréacteur contenant les pâtes de ciment qui ont relâché des ions OH⁻. Du jour 0 au jour 20, le pH s'est élevé dans les deux cultures avec ou sans ciment. En hydrogénéotrophie, la réduction des nitrites et la consommation de CO₂ pour la croissance bactérienne sont les deux principales causes de l'alcalinisation du milieu. A partir du jour 20, à pH 10,2 et 200 mM en nitrates, les conditions étaient trop extrêmes pour les bactéries. Le pH est resté stable dans la culture avec ciment, ce qui peut s'expliquer par le ralentissement du relâchement des ions OH⁻ et de l'activité bactérienne. Dans la culture sans ciment, le milieu s'est acidifié ce qui surprenant dans une culture hydrogénéotrophe dans laquelle la dénitrification ne peut qu'augmenter le pH. En effet, dans le chapitre précédent dédié à l'hydrogénéotrophie, la seule expérience où le pH a diminué était une culture dans laquelle un métabolisme hétérotrophe s'était installé en utilisant la biomasse de cellules mortes (Cf V.2). Le même type de phénomène pourrait s'être développé dans la culture sans ciment à partir du jour 21 à pH 10,2 et 200 mM en nitrates.

L'évolution des concentrations en nitrates et en nitrites dans les deux bioréacteurs et les cinétiques maximales de réduction des nitrates sont présentées dans la Figure 87 (B). La Figure 88 présente l'évolution des concentrations en nitrates et en nitrites réduites. Elles sont calculées d'après les

équations (51) et (52), en fonction des concentrations initiales en nitrates et en nitrites de chaque période batch et des concentrations en nitrates et en nitrites mesurées dans les cultures.

$$[\text{NO}_3^-]_{\text{réduite}} = [\text{NO}_3^-]_{\text{initiale}} - [\text{NO}_3^-]_{\text{culture}} \quad (51)$$

$$\begin{aligned} \text{NO}_2^-]_{\text{réduite}} &= [\text{NO}_3^-]_{\text{réduite}} - [\text{NO}_2^-]_{\text{accumulée}} \\ &= [\text{NO}_3^-]_{\text{réduite}} - ([\text{NO}_2^-]_{\text{culture}} - [\text{NO}_2^-]_{\text{initiale}}) \end{aligned} \quad (52)$$

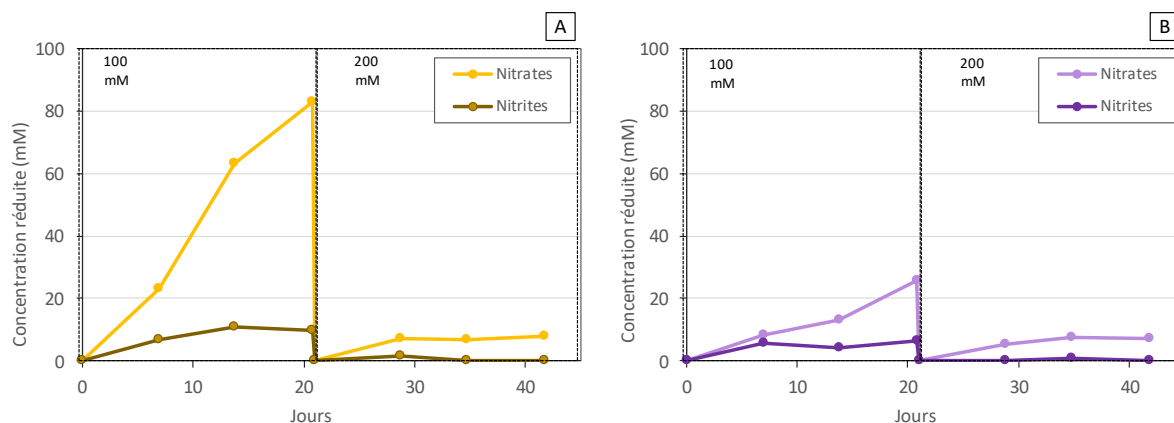


Figure 88 : Comparaison de l'effet de l'ajout ou non de pâtes de ciment vieilli sur les évolutions des concentrations en nitrates et en nitrites réduites des cultures sans pâtes de ciment (A), et avec pâtes de ciment (B). Conditions expérimentales : deux bioréacteurs séquentiels, bactéries pré-acclimatées issues de boues activées, lixiviat de ciment, 100 à 200 mM de nitrates, 0 ou 160 cm²/L de pâte de ciment vieilli, 1 bar de 100% d'H₂, pH 9,5 à 10,2.

Dans la culture sans pâtes de ciment, à pH 9,5 et 100 mM de nitrates, la réduction des nitrates était élevée, 83 mM de nitrates ont été réduits avec une cinétique maximale de 3,99 mM/j. Cependant seulement 11 mM de nitrites ont été réduits. La réduction importante des nitrates et l'accumulation importante des nitrites sont des indicateurs de la domination des bactéries « *nitrate respiring* ». En hydrogénéotrophie, les bactéries « *nitrate respiring* » pourraient donc tolérer jusqu'à 100 mM de nitrates. Dans la culture avec les pâtes de ciment, seulement 26 mM de nitrates ont été réduits avec une cinétique maximale 1,24 mM/j et l'accumulation des nitrites était moins importante. Ces résultats indiquent que dans cette culture les bactéries « *true denitrifier* » étaient dominantes. A pH 10,2 et 200 mM de nitrates, les deux cultures ont réduit la même quantité de nitrates avec une cinétique lente similaire, malgré les grosses disparités observées dans la période batch précédente et malgré la présence ou l'absence de ciment. La différence entre les cinétiques de réduction des nitrates du jour 0 au jour 21 serait donc due à la présence de bactéries « *nitrate respiring* » actives uniquement dans la culture sans pâte de ciment. Ces bactéries moins tolérantes auraient été remplacées par des bactéries « *true denitrifier* » à 200 mM de nitrates et à pH 10,2. Cette dégradation de la biomasse aurait causé les acidifications du milieu. Finalement entre le jour 21 et le jour 42, dans les deux cultures, la population était composée majoritairement de bactéries « *true denitrifier* » et les nitrates étaient réduits à la même vitesse.

La surface des pâtes de ciment vieilli a été observée au MEB, après avoir éliminé les dépôts faiblement accrochés. A partir de l'analyse des électrons rétrodiffusés (back-scattered electrons = BSE), la composition chimique relative de la surface des échantillons a été déterminée (Figure 89 (A) et (B)). Les teneurs massiques sont normalisées avec l'oxygène c'est pourquoi les éléments sont présentés sous formes d'oxydes. L'analyse chimique relative ne peut pas quantifier le carbone et l'azote qui ont des numéros atomiques trop faibles.

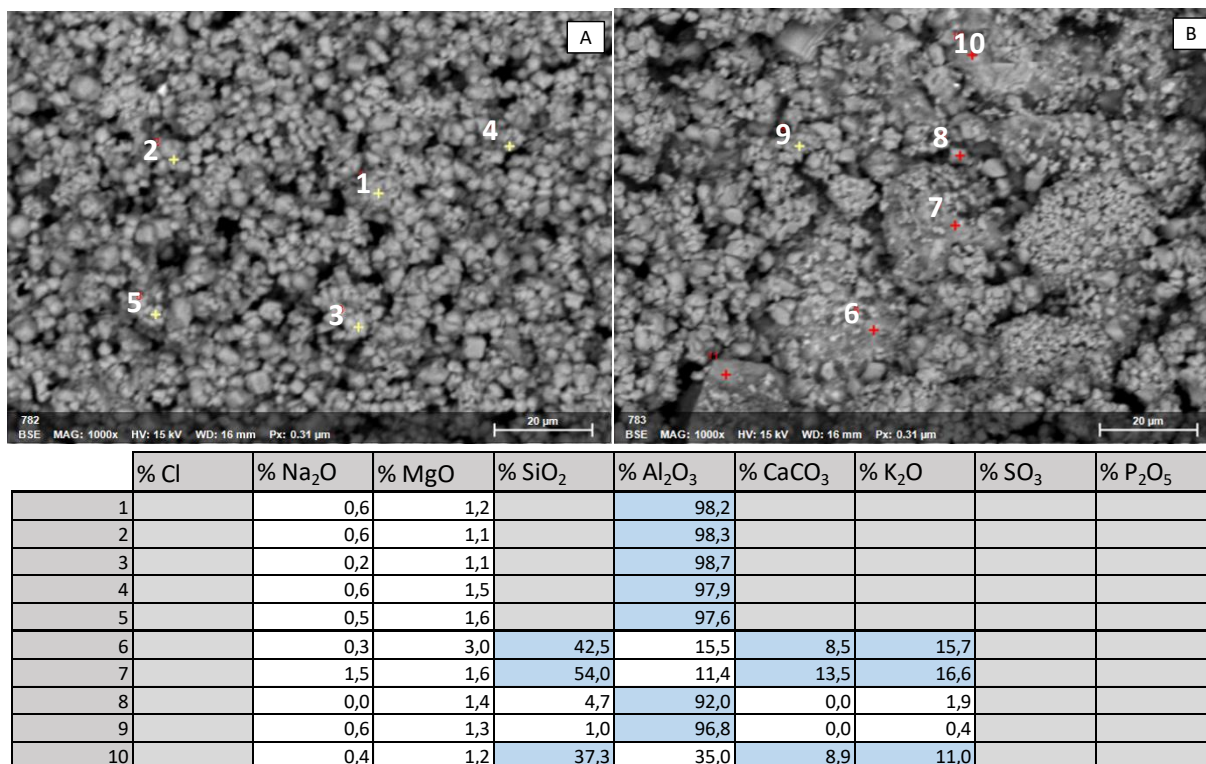


Figure 89 : (A) et (B) deux observations au MEB en SEI d'une pâte de ciment et tableau de la composition chimique des échantillons.

La topographie des observations était caractéristique d'un recouvrement par des cristaux de calcite (CaCO₃). Les analyses EDS sur de nombreux points confirment que la teneur en calcite était supérieure à 98 %. A d'autres endroits, les analyses montrent la présence des éléments Si, K, Ca et Al qui font partie des éléments majoritaires des matériaux cimentaires. Les pâtes de ciment étaient donc recouvertes de calcite dont la précipitation a pu être favorisée par le vieillissement du ciment puis son immersion dans une solution alcaline riche en carbonate. Le rinçage à l'eau puis le recouvrement par la calcite pourrait expliquer pourquoi il n'a pas été possible d'observer directement les bactéries. La présence de biofilm a donc été évaluée en prélevant des dépôts blancs sur le ciment. Ces dépôts ont ensuite été étalés sur une boîte de pétri. Après 7 jours, la boîte de pétri était complètement colonisée, Figure 90. La présence de bactéries dans les dépôts blancs sur les surfaces des pâtes de ciment a donc été confirmée.



Figure 90 : Photographie d'une boîte de Pétri 7 jours après avoir été inoculée à partir des dépôts sur les pâtes de ciment.

Conclusions :

La réduction microbienne hydrogénotrophe est possible à 200 mM de nitrates et pH 10,2 avec ou sans pâtes de ciment vieilli. Dans un premier temps à pH 9,5 et 100 mM, les pâtes de ciment vieilli ont causé une légère élévation de pH. Cette élévation de pH était probablement la cause de l'inhibition des bactéries « *nitrate respiring* ». En conséquence, la réduction des nitrates était plus lente comparée à la culture sans pâtes de ciment. Dans la culture sans pâtes de ciment, il semble que le pH légèrement plus faible ait permis à des bactéries « *nitrate respiring* » de dominer la population ce qui a résulté en des cinétiques de réduction des nitrates élevées et des accumulations en nitrites élevées. Cependant à pH 10,2 et 200 mM de nitrates, le pH et la concentration en nitrates trop élevés auraient conduit à la mort et la lyse cellulaire des bactéries « *nitrate respiring* » causant l'acidification du milieu par lyse cellulaire et libération de protons intracellulaires. Finalement à pH 10,2 et à 200 mM de nitrates, dans les deux cultures, la population bactérienne serait composée essentiellement de bactéries « *true dénitrifier* ». En conséquence, la réduction des nitrates était similaire dans les deux cultures. Des analyses supplémentaires ont montré qu'en fin d'expérience un mélange de précipités de calcite et de bactéries s'était déposé sur le ciment. La calcite était omniprésente sur les surfaces de ciment et a gêné l'observation des cellules bactériennes.

VI.1.2. Incorporation de pâtes de ciment frais, en présence de 50 à 150 mM en nitrates

Dans l'expérience précédente, les pâtes de ciment n'ont pas impacté directement la réduction des nitrates, mis à part l'alcalinisation légère du milieu. Une deuxième expérience a donc été mise en place avec un ratio de 270 cm²/L de pâtes de ciment non vieilli pour tenter d'approfondir les interactions entre les pâtes de ciment et la réduction des nitrates ou des nitrites. L'utilisation de pâte de ciment non vieillie devait permettre de fait de limiter la précipitation de calcite, et les élévations de pH attendues devaient être plus importantes.

Démarche expérimentale :

Cette expérience a été réalisée sans préculture préalable des inocula, les milieux de culture ont été inoculés directement avec 1 g/L de boues activées fraîchement collectées dans une station d'épuration. Le ciment frais a été ajouté dans une culture sous forme 3 pâtes de ciment cylindriques avec un ratio surface solide liquide de 270 cm²/L. Le ciment était fabriqué puis conservé directement dans une solution saline, concentrée en Na et K à pH 13,3. La concentration initiale de 50 mM de nitrates a été élevée à 100 mM et 150 mM les jours 14 et 70. Les mêmes jours le pH, initialement à 9,5, a été élevé à pH 9,8 puis 10,2.

- Cultures :**
- 92 jours
 - Pas de préculture
 - 1g/L boues activées
 - Lixiviât de ciment
 - 50 à 200 mM nitrates
 - 50 mM carbonates
 - H₂ 1 bar flux continu
 - pH 9.5 à 10.2



Figure 91 : Protocole de l'expérience d'insertion de pâtes de ciment frais dans des cultures de boues activées hydrogénotrophes.

Résultats :

La DO n'a pas été présentée car l'ajout de pâte de ciment dans les cultures a favorisé le dépôt de matière initialement en suspension sur la surface du ciment.

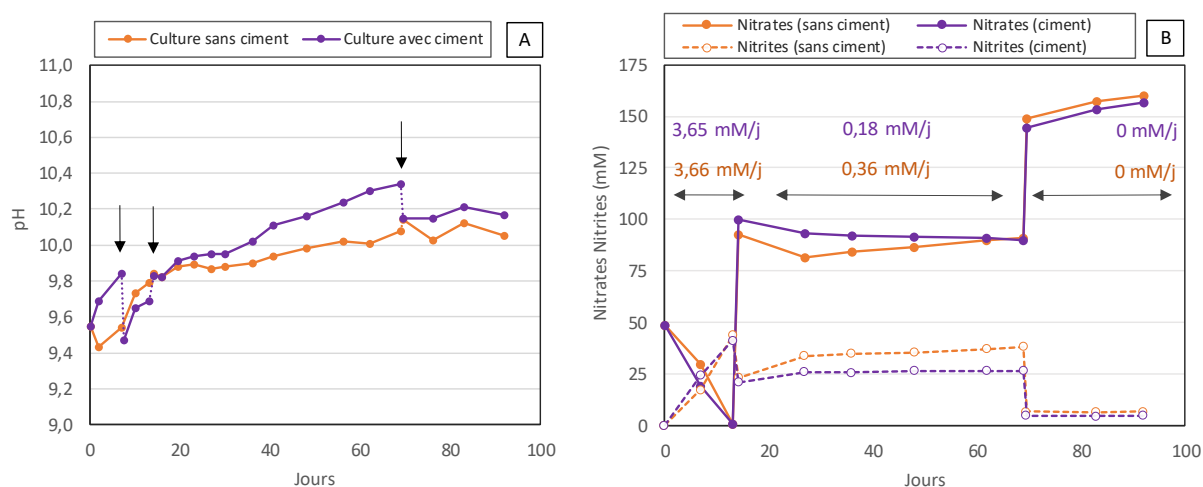


Figure 92 : Effet de l'ajout ou non de pâtes de ciment frais sur les évolutions du pH (A), des concentrations en nitrates et en nitrites (B). Conditions expérimentales : deux bioréacteurs séquentiels, lixiviat de ciment, bactéries issues de boues activées, 50 à 150 mM de nitrates, 270 cm²/L de pâte de ciment frais, 1 bar de 100% d'H₂, pH 9,5 à 10,2.

Trois ajustements de pH ont été réalisés dans la culture avec ciment, les jours 7, 14 et 70, ils sont représentés par des flèches Figure 92 (A). Le ciment étant frais, celui-ci a provoqué une élévation importante du pH dans les premiers jours de l'expérience. Le jour 7, il y avait une différence de 0,3 unité de pH entre les bioréacteurs avec et sans ciment. En parallèle, l'activité bactérienne a aussi augmenté le pH des deux cultures. Entre le jour 14 et le jour 70, le pH dans la culture sans ciment s'est élevé de 9,8 à 10,1. Cette élévation de pH était due à l'assimilation de carbone minéral ou à la réduction des nitrites en présence de dihydrogène.

Le suivi des concentrations en nitrates et nitrites est présenté dans la Figure 92 (B). L'évolution des concentrations en nitrates et en nitrites réduites par rapport à la concentration initiale en nitrates est présentée dans la Figure 93. Du jour 0 au jour 14, à pH 9,5 et 50 mM de nitrates il y avait très peu de différence entre les deux cultures que ce soit les cinétiques maximales de réduction des nitrates (respectivement 3,66 et 3,65 mM/j) ou la concentration en nitrates réduite (48 mM sur 50 mM dans les deux cas). La réduction des nitrates était rapide et les nitrites se sont accumulés ce qui indiquerait une domination des bactéries « *nitrate respiring* ». Le matériau cimentaire ne semble donc pas empêcher le développement bactéries « *nitrate respiring* ». Du jour 14 au jour 70, à pH 9,8 et 100 mM de nitrates, la réduction des nitrates était similaire entre les deux cultures (environ 10 mM) et la cinétique de réduction maximale était du même ordre de grandeur. Le profil de réduction des nitrates était comparable entre la culture avec ciment et sans ciment. Enfin à pH 10,2 et 150 mM de nitrates aucune réduction n'était observable dans les deux cultures. Ainsi, dans la culture avec ciment, malgré un pH plus élevé, la réduction de nitrates n'a pas été ralentie. La présence de ciment n'a pas eu d'effet significatif sur la réduction des nitrates ou des nitrites.

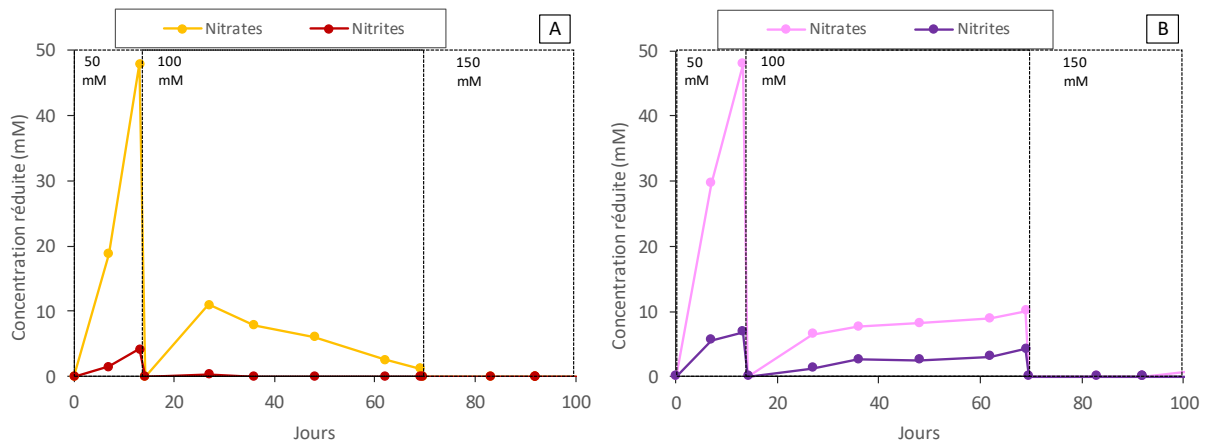


Figure 93 : Effet de l'ajout (A) ou non (B) de pâtes de ciment frais sur les évolutions des concentrations en nitrates et en nitrites réduites conditions expérimentales : deux bioréacteurs séquentiels, lixiviat de ciment, bactéries issues de boues activées, 50 à 150 mM de nitrates, 0 ou 270 cm²/L de pâte de ciment frais, 1 bar de 100% d'H₂, pH 9,5 à 10,2.

En fin d'expérience, les dépôts sur les pâtes de ciment ont été détachés par un rinçage à l'eau, puis déposés sur un filtre. Les observations au MEB des surfaces de pâtes de ciments et des surfaces des dépôts présents sur les filtres sont présentées dans la Figure 94. Les résultats d'analyses EDS des dépôts fixés sur le filtre sont donnés dans le tableau sous les observations MEB.

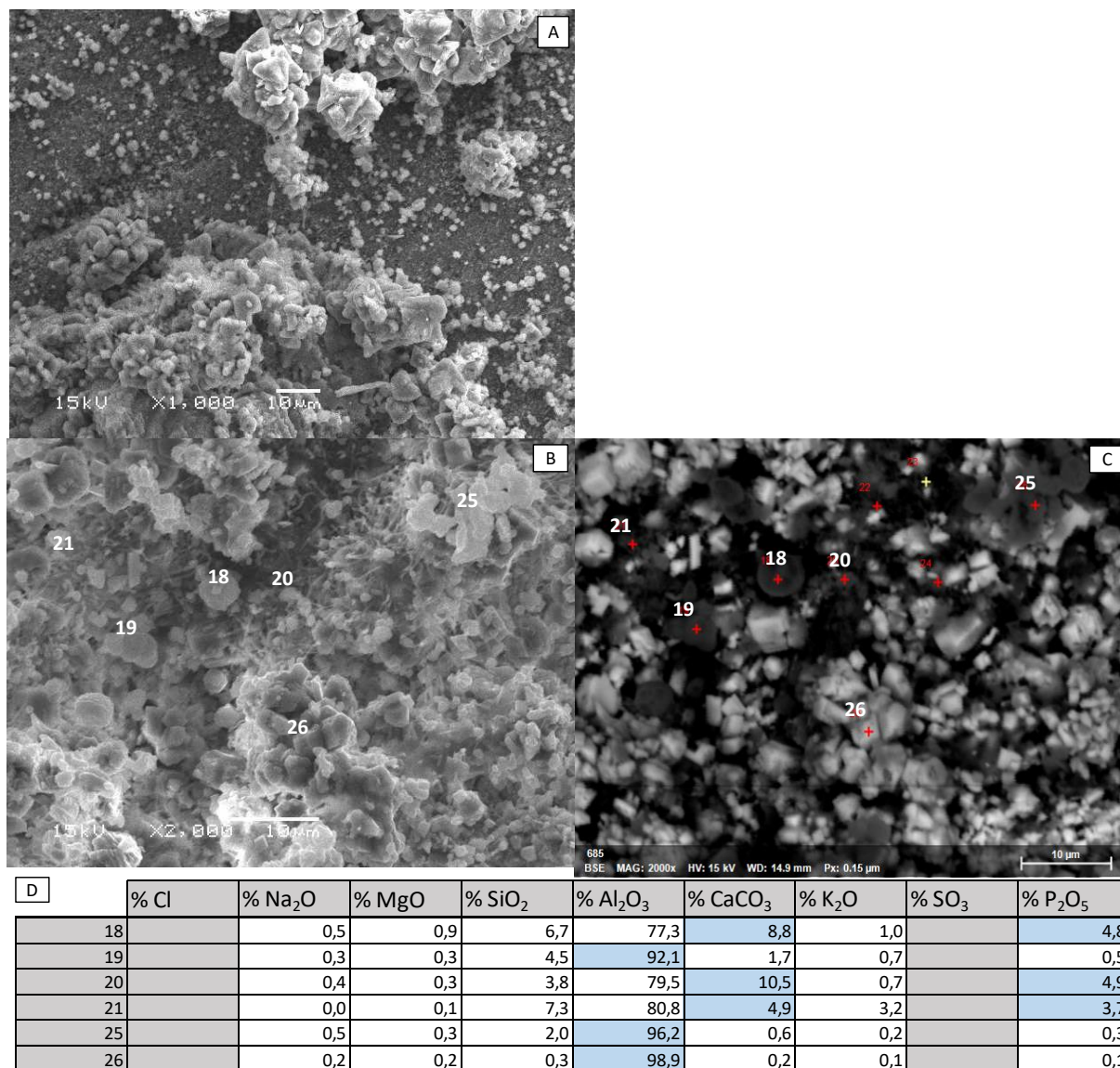


Figure 94 : (A) Observation MEB en SEI d'une pâte de ciment rincée à l'eau. Observation MEB en SEI (B) et en BSE (C) des dépôts fixés sur le filtre. (D) Tableau de la composition chimique des dépôts fixés sur le filtre.

Après le rinçage, la surface des pâtes de ciment était composée essentiellement de précipités de calcite. Il n'a pas été possible d'observer des bactéries dans ces conditions (Figure 94 (A)). Les dépôts sur le filtre étaient aussi composés en partie de calcite. Cependant, sur les points 18, 20 et 21 la teneur en calcite était plus faible. Et la teneur en phosphore (P₂O₅), comprise entre 1 et 5 %, dépassait les valeurs moyennes entre 0,1 à 0,3 %. Dans ces conditions, avec un milieu de culture synthétique dépourvu de phosphore, la présence de phosphore était probablement liée à la présence de matière organique. De plus, sur la Figure 94 (B), entre les points 20 et 25, des formes filamenteuses étaient visibles. Ces filaments pourraient être des bactéries ou de la matrice de biofilm. Des précipités de calcite étaient donc mélangés à de la calcite et de la matière organique. Les morceaux de biofilm étaient observés sur les filtres mais pas sur les pâtes de ciment lavées. Le biofilm serait donc faiblement attaché aux pâtes de ciment.

La Figure 95, présente la composition des espèces de la population bactérienne au jour 70, à 100 mM en nitrates et pH 9,8. Seules les espèces représentant plus de 3% des espèces totales dans les cultures

ont été indiquées, pour éviter de surcharger le graphique. Les espèces minoritaires ont été classées dans la section Other/No Hit comprenant aussi les séquences ADN qui sont inconnues de la base de données ou écartées par des tests statistiques.

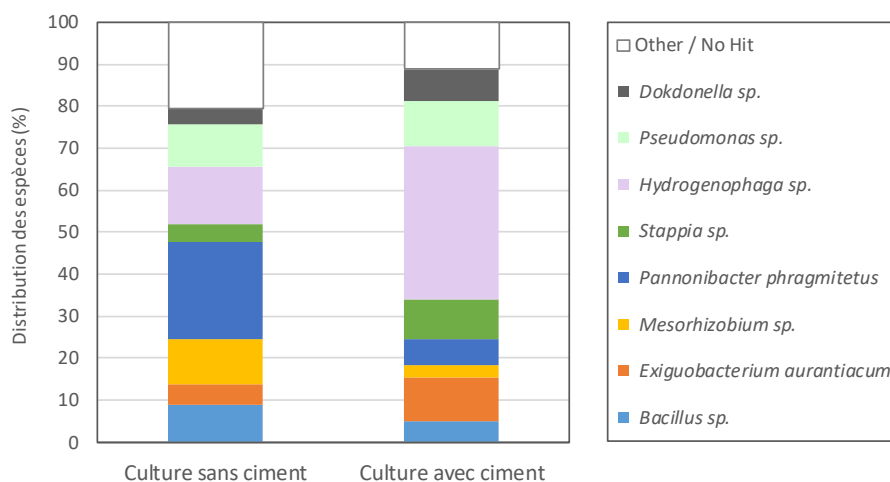


Figure 95 : Effet de l'ajout ou non de pâtes de ciment frais sur la distribution des espèces bactériennes au jour 70. Conditions expérimentales : deux bioréacteurs séquentiels, lixiviat de ciment, 50 à 150 mM de nitrates, 0 ou 270 cm²/L de pâte de ciment frais, 1 bar de 100% d'H₂, pH 9,5 à 10,2.

La population de la culture sans pâtes de ciment était composée de bactéries dénitrifiantes hétérotrophes dont 23 % de *Pannonibacter phragmitetus* qui est une bactérie alcalophile [212,213], 10 % de *Mesorhizobium sp.* [215,216], de 9 % de *Bacillus sp.* qui est halo-alcalophile [45,139] et 4% de *Stappia sp.* [217,218]. Il y avait aussi des bactéries hydrogénotrophes dont 14 % de *Hydrogenophaga sp.* [49,111], et 10 % de *Pseudomonas sp.* [219]. D'après la composition de la population, les bactéries hydrogénotrophes n'étaient pas majoritaires.

Dans la culture avec les pâtes de ciment la composition des espèces était identique mises à part les proportions qui variaient légèrement. Il y avait 6 % de *Pannonibacter phragmitetus*, 36 % de *Hydrogenophaga sp.*, 3 % de *Mesorhizobium sp.*, 11 % de *Pseudomonas sp.*, 5 % de *Bacillus sp.* et 9% de *Stappia sp.* L'insertion de pâtes de ciment frais n'a donc pas eu d'impact sur les communautés bactériennes. Ceci tend à confirmer l'hypothèse selon laquelle les pâtes de ciment n'ont pas eu un impact significatif sur l'évolution des communautés bactériennes ni sur la réduction des nitrates.

D'après la proportion élevée de bactéries hétérotrophes malgré l'absence d'acétate, les bactéries hétérotrophes utiliseraient la biomasse produite par les bactéries hydrogénotrophes pour réduire les nitrates. Il est même possible que le genre *Bacillus sp.* ait produit des enzymes digestives pour utiliser la matière organique des autres cellules. En contrepartie les bactéries hétérotrophes permettraient de mieux résister au pH alcalin par exemple en acidifiant le pH. Vasiliadou et coll. ont aussi isolé des bactéries hétérotrophes à partir de cultures hydrogénotrophes inoculées avec des boues activées [125]. Selon eux, il existerait des bactéries acétogènes qui ont fourni la matière organique sous forme d'acétate aux bactéries hétérotrophes. Une autre explication envisageable est que les bactéries hétérotrophes aient acquis la capacité à utiliser le dihydrogène par des transferts horizontaux de gènes avec les bactéries hydrogénotrophes [227].

Conclusions :

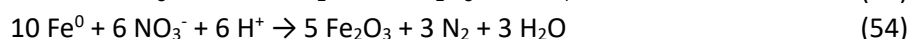
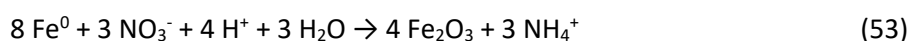
L'ajout de pâtes de ciment frais avec un ratio de 270 cm²/L a provoqué des élévations de pH supérieures par rapport à l'ajout de ciment vieilli avec un ratio de 160 cm²/L. Malgré cette élévation de pH, la réduction des nitrates et la composition des communautés bactériennes étaient similaires avec ou sans pâtes de ciment frais. Les bactéries ont pu réduire les nitrates en hydrogénéotrophie et en présence de ciment jusqu'à 200 mM de nitrates et pH 10,2. L'influence du ciment frais ou vieilli sur l'activité bactérienne hydrogénéotrophe semble donc relativement faible mise à part l'alcalinisation du milieu de culture. Ces conclusions confirment celles des études antérieures, réalisées au LGC et LDMC, ayant évalué l'effet du ciment solide sur des cultures bactériennes dénitrifiantes en présence d'acétate [21–23].

Les communautés bactériennes étaient composées de bactéries hydrogénéotrophes mais aussi d'une proportion importante de bactéries hétérotrophes. Il est possible qu'il y ait eu des coopérations entre les bactéries. Les bactéries hydrogénéotrophes produiraient de la biomasse pour les bactéries hétérotrophes. Il est aussi possible que des transferts géniques horizontaux aient permis aux bactéries hétérotrophes d'acquérir la capacité à utiliser l'hydrogène.

VI.2. Dénitrification en présence d'acier d'armatures à béton armé

De l'acier sera présent dans les alvéoles de stockage des déchets radioactifs, notamment sous la forme d'armatures dans le béton armé des alvéoles ou dans les conteneurs des déchets. L'acier peut influencer de nombreuses manières la réduction bactérienne des nitrates :

- Le Fe⁰ et le Fe²⁺ peuvent servir de donneurs d'électrons pour réduire les nitrates de manière abiotique [18,166–168], et/ou en présence de bactéries [154,176,178] comme illustré dans les réactions (53) et (54).
- Les bactéries réductrices du fer pourraient réduire le Fe³⁺ en Fe²⁺ en utilisant l'acétate ou le dihydrogène comme donneur d'électrons (réaction (55)) [33,34,159].
- Certains oxydes/hydroxydes de fer comme la magnétite (Fe₃O₄) ont une bonne conductivité électronique et peuvent servir de catalyseur surfacique pour la réduction bactérienne des nitrates [156,181].



L'objectif de ces expériences était donc d'avoir une idée plus précise de l'effet de l'acier sur la réduction microbienne des nitrates dans un contexte comparable à celui du stockage des déchets radioactifs. De l'acier d'armature de béton armé très oxydé en surface a été ajouté dans des cultures dénitrifiantes en présence de dihydrogène puis en présence d'acétate.

VI.2.1. Incorporation d'acier d'armatures dans des cultures hydrogénéotrophes

Dans un premier temps, l'effet de la présence d'acier d'armature a été testé dans des cultures strictement hydrogénéotrophes.

Démarche expérimentale :

La biomasse d'une préculture de 5 jours a été utilisée pour inoculer deux réacteurs batch suivis pendant 14 jours. Dans une culture, 4 portions d'armature haute adhérence E500 ont été ajoutées avec un ratio de 130 cm²/L, calculé selon la méthode indiquée dans le chapitre II.2.2.2. Un contrôle abiotique avec acier a été suivi en parallèle pendant 35 jours. Celui-ci était dépourvu de donneur d'électrons de type acétate ou dihydrogène pour limiter le développement bactérien.

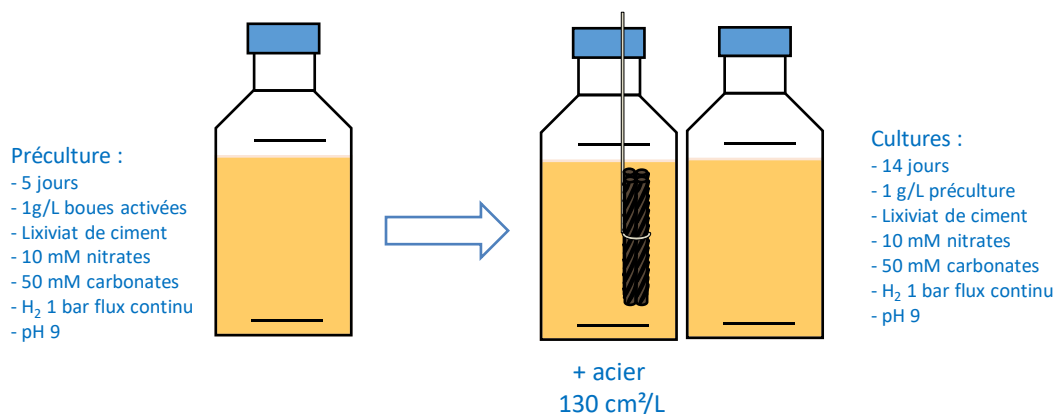


Figure 96 : Protocole de l'expérience avec ajout d'acier d'armature à béton dans des cultures hydrogénéotrophes.

Résultats :

Les résultats d'analyse du pH et de la DO, de la concentration en carbonates dissous ([CO₃²⁻] + [HCO₃⁻]) et des concentrations en nitrates et nitrites sont présentés dans la Figure 97. La culture avec acier a été arrêtée plus tôt que la culture sans acier car les nitrites ont été consommés plus rapidement.

Par ailleurs, dans cette expérience des analyses ponctuelles de la concentration en NH₄⁺ ont été effectuées. Il n'y a pas eu de production de NH₄⁺ (le seuil de détection du kit NH₄⁺/NH₃ était 1 µM).

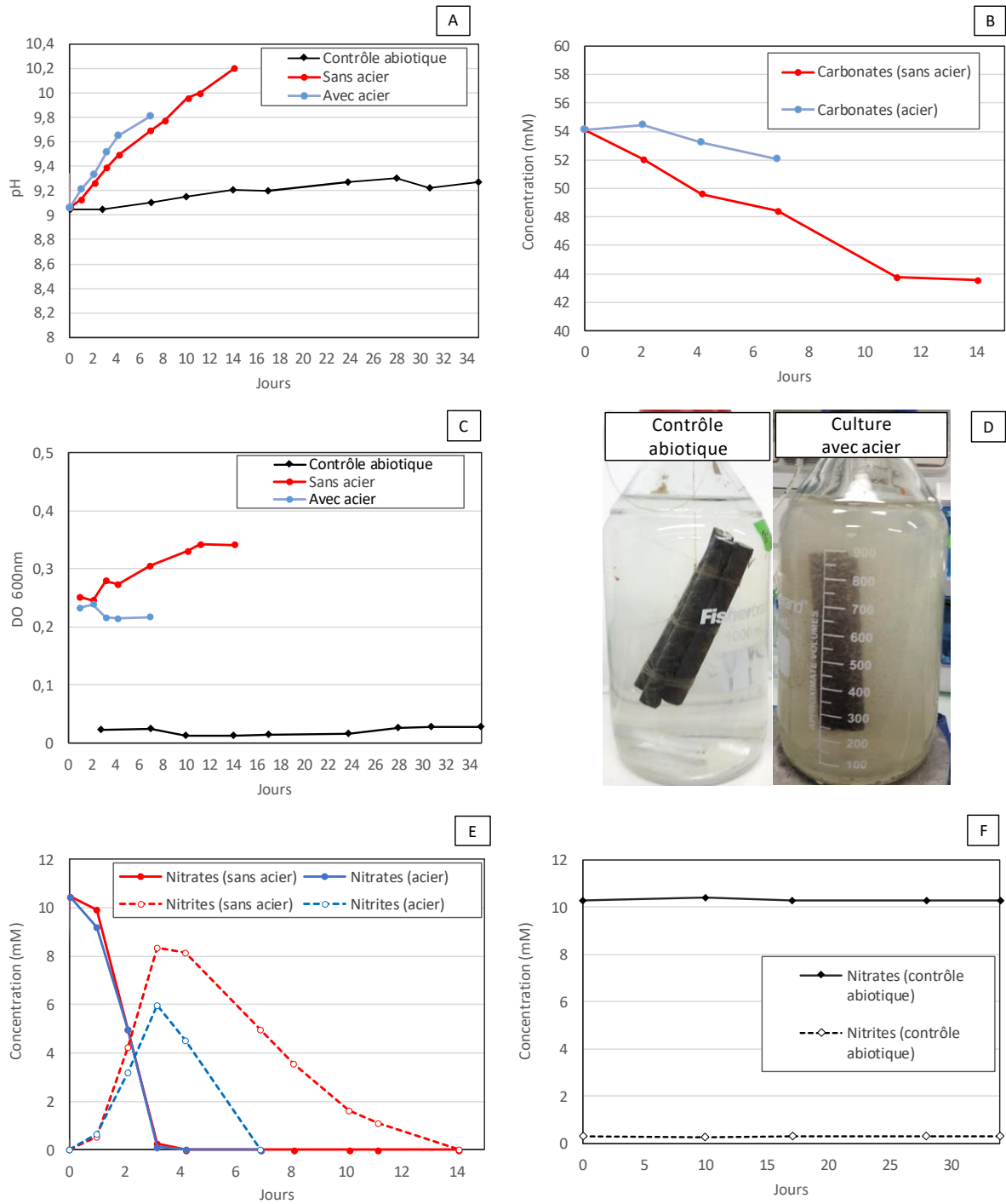


Figure 97 : Comparaison d'un contrôle abiotique avec acier et de deux cultures bactériennes avec ou sans acier. Effet de l'ajout ou non d'acier sur les évolutions du pH (A), de la concentration en carbonates (B), de la DO (C), des concentrations en nitrates et en nitrites dans les cultures bactériennes (E), des concentrations en nitrates et en nitrites dans le contrôle abiotique (F). (D) Photographie de la culture avec acier au jour 14 et du contrôle abiotique au jour 35. Conditions expérimentales : trois réacteurs batch, absence de bactéries ou bactéries pré-acclimatées issues de boues activées, lixiviat de ciment, 10 mM de nitrates, 0 ou 130 cm²/L d'acier d'armature, 1 bar de 100% d'H₂, pH 9.

Le pH a augmenté dans les trois réacteurs plus ou moins rapidement. Les cultures bactériennes sans acier, avec acier et le contrôle abiotique avaient un pH final respectif de 10,2 et 9,8 et 9,3. Dans le contrôle abiotique, l'acier a causé l'alcalinisation du milieu possiblement par la solubilisation de Fe^{3+} par exemple via la réaction $FeOOH + H_2O \leftrightarrow Fe^{3+} + 3 OH^-$. Cependant dans les cultures bactériennes, le pH final en présence d'acier était plus faible que le pH final sans acier. Cette différence de pH peut s'expliquer par le suivi des carbonates. En présence d'acier, la concentration des carbonates a diminué légèrement de 54,1 mM à 52,0 mM. Dans la culture sans acier, la concentration des carbonates a diminué de manière importante de 54,1 mM à 43,6 mM. Il y a donc eu une consommation marquée de carbonates dans la culture sans acier, vraisemblablement causée par la croissance bactérienne. A l'inverse la consommation de carbonate et donc la croissance cellulaire était faible dans la culture avec acier. Dans la culture sans acier, la consommation supérieure de carbonates a donc provoqué l'alcalinisation supérieure du milieu.

Cette hypothèse a été validée par le suivi de la DO. En effet dans la culture sans acier, la DO a augmenté de 0,25 à 0,35, il y a bien eu une croissance bactérienne. Dans la culture bactérienne avec acier la DO est restée stable autour de 0,22. Il n'y a donc pas eu de croissance cellulaire dans la culture avec acier. Dans le contrôle abiotique, la DO est restée négligeable.

Par ailleurs, cette expérience permet de valider les calculs de pH théorique (Cf III.2.1), qui pour mémoire ne prennent pas en compte l'alcalinisation causée par la croissance cellulaire. Dans ces conditions, le pH théorique final serait 9,8 soit exactement le pH final de la culture avec acier.

La consommation des nitrates était similaire avec ou sans acier. En revanche, la cinétique de réduction des nitrites était différente. Les nitrites étaient totalement réduits en 7 jours avec acier et en 14 jours sans acier. Dans la culture abiotique, la concentration en nitrates est restée constante et la concentration en nitrites est restée négligeable. Sans bactéries, l'acier seul n'a eu aucun impact sur la réduction des nitrates. Ceci s'expliquerait par le pH 9 trop alcalin dans le contrôle abiotique. En effet, les couches d'oxyhydroxydes de fer à la surface de l'acier sont stables à pH alcalin et bloquent les réactions d'oxydoréduction avec le fer. La réduction abiotique des nitrates par le fer a été observée seulement à pH acide [18,166,167] ou avec des nanoparticules et des poudres de fer [172,173].

Des analyses de la population bactérienne sont présentées dans la Figure 98. Les analyses ont été effectuées le jour 4, puis en fin de batch les jours 7 et 14 respectivement pour les cultures avec et sans acier. Le jour 4 a été sélectionné, car, à ce moment, les nitrates ont été entièrement consommés et les nitrites sont devenus les accepteurs d'électrons prédominants. Les bactéries minoritaires ont été classées dans la section Other/No Hit comprenant aussi les séquences ADN qui sont inconnues de la base de données ou écartées par des tests statistiques.

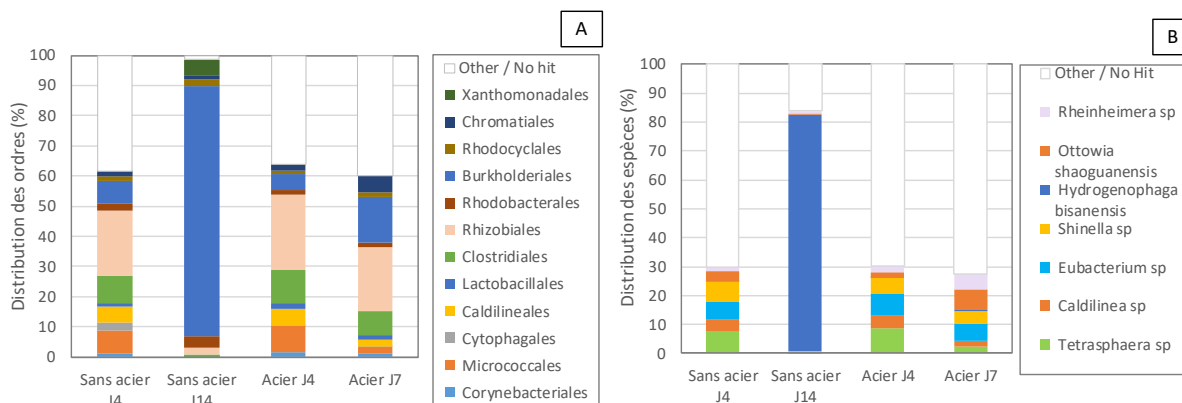


Figure 98 : Effet de l'ajout ou non d'acier d'armature sur la distribution des ordres bactériens (A), et des espèces bactériennes (B). Conditions expérimentales : deux bioréacteurs batch, bactéries pré-acclimatées issues de boues activées, lixiviat de ciment, 10 mM de nitrates, 0 ou 130 cm²/L d'acier d'armature, 1 bar de 100% d'H₂, pH 9.

La composition au niveau des ordres bactériens était identique dans les deux cultures au jour 4. Elle est restée stable dans la culture avec acier en fin de culture. Cependant à la fin de l'expérience, dans la culture sans acier, la communauté bactérienne a beaucoup évolué, un seul ordre, celui des *Burkholderiales*, est devenu largement majoritaire.

Dans la culture sans acier au jour 4, la communauté bactérienne était composée de bactéries dénitrifiantes hétérotrophes, comprenant 8 % de *Tetrasphaera sp.* [239], 7% de *Shinella sp.* [240,241] et de bactéries hydrogénéotrophes avec 6% de *Eubacterium sp.* [242]. Une grosse proportion (70 %) des séquences ADN était non identifiée. Ceci peut s'expliquer par le fait que l'inoculum initial, les boues activées, était composé en moyenne de 60 % de séquences non identifiées. Il est possible aussi que des bactéries hydrogénéotrophes n'aient pas encore été recensées dans la base de données. Au jour 14, la population bactérienne était composée à 82 % de *Hydrogenophaga bisanensis* qui est une espèce hydrogénéotrophe [49,111]. Dans la culture avec acier au jour 4, la composition de la communauté bactérienne était très proche de la communauté bactérienne sans acier avec 8 % de *Tetrasphaera sp.*, 7% de *Eubacterium sp.* et 6% de *Shinella sp.* et n'a quasiment pas évolué au jour 7.

Que ce soit en fonction de l'ordre ou de l'espèce, la communauté bactérienne est restée stable en présence d'acier, alors qu'elle a évolué dans la culture sans acier à partir du moment où il ne restait plus que les nitrites à réduire. Ce résultat est très important et a permis de valider l'hypothèse selon laquelle dans une communauté bactérienne dénitrifiante, il existe deux types de populations bactériennes, les bactéries « *nitrate respiring* » et les « *true dénitrifier* ». En effet, dans la culture sans acier, tant que les nitrates étaient présents ils ont été réduits par les bactéries « *nitrate respiring* ». A partir du jour 4, quand il ne restait que les nitrites à réduire, il y a eu un remplacement de la communauté de départ par une seule espèce « *true dénitrifier* » qui a ensuite réduit les nitrites en 14 jours. Cette transition de la communauté bactérienne qui a été supposée dans plusieurs expériences précédentes a donc été directement mise en évidence ici.

Au contraire, en présence d'acier, lorsque seuls les nitrites étaient disponibles, il n'y a eu aucun changement significatif dans la population bactérienne. La population bactérienne n'a donc pas eu besoin de s'adapter pour réduire les nitrites ou les nitrites ont été réduits de manière abiotique par le fer. L'hypothèse selon laquelle les nitrites ne sont pas réduits par les bactéries mais par le fer a déjà été relayée [154,176,177,179]. Dans des cultures dénitrifiantes en présence de fer, les bactéries réduiraient les nitrates en nitrites en utilisant l'acétate ou le dihydrogène tandis que les nitrites

seraient réduits chimiquement par le fer. En effet, d'après le Tableau 2, le potentiel standard du couple nitrites/diazote est supérieur à celui du couple nitrates/diazote. D'un point de vue thermodynamique la réduction des nitrites par le fer est donc avantagée [153]. En revanche les nitrites sont considérés comme inhibiteurs parfois toxiques pour les bactéries [46,85], ils ralentissent donc l'activité bactérienne. Il est donc possible qu'en présence de bactéries, les nitrates soient réduits rapidement par les bactéries en utilisant un donneur d'électrons additionnel comme le dihydrogène. En parallèle, le fer réduirait les nitrites, permettant d'éviter les accumulations néfastes pour les bactéries.

Une autre hypothèse peut être apportée : plusieurs études ont montré que des oxyhydroxydes de fer dont la magnétite, la lépidocrocite, l'hématite ou encore la goethite, pouvaient catalyser la réduction des nitrates ou des nitrites par le Fe^0 ou le Fe^{2+} [156–158,175,181,182]. Il est envisageable que les oxyhydroxydes de fer aient permis à des bactéries de type « *nitrate respiring* » de réduire les nitrites. Cependant, cette dernière hypothèse n'est pas entièrement satisfaisante car l'effet catalytique du fer devrait aussi accélérer la réduction des nitrates.

Conclusions :

L'ajout d'acier a donc multiplié par deux la cinétique de réduction des nitrites. En parallèle la communauté bactérienne a très peu évolué en présence d'acier. Deux hypothèses sont envisageables. Premièrement les bactéries auraient réduit les nitrates en nitrites, tandis que l'acier aurait réduit de manière abiotique les nitrites plus rapidement que ne l'auraient fait les bactéries [154,176,177,179]. Deuxièmement, l'acier aurait servi de catalyseur pour la réduction biotique des nitrites [156–158,175,181,182], et permis aux bactéries de réduire les nitrites sans avoir recours aux bactéries « *true dénitrifier* ».

L'analyse de la population bactérienne a permis de valider les hypothèses émises dans les expériences précédentes, à savoir qu'il existe deux types de populations bactériennes. Les bactéries « *nitrate respiring* » qui réduisent rapidement les nitrates mais pas les nitrites. Les bactéries « *true dénitrifier* » qui deviennent dominantes lorsque les nitrates sont épuisés ou les conditions expérimentales trop extrêmes. Ces bactéries sont capables de réduire les nitrites et de tolérer des concentrations en nitrates et des pH plus élevés.

VI.2.1. Incorporation d'acier d'armature à béton dans des cultures hétérotrophes

D'après l'expérience précédente le fer a accéléré la réduction des nitrites dans une culture hydrogénotrophe avec 10 mM de nitrates. L'objectif de cette expérience a été d'augmenter les concentrations en nitrates jusqu'à 400 mM afin d'évaluer l'effet de l'acier sur les cultures dénitrifiantes lorsque les concentrations en nitrates sont élevées. L'expérience a été réalisée dans des cultures hétérotrophes en présence d'acétate.

Démarche expérimentale :

La biomasse d'une préculture de 20 jours a servi d'inocula pour deux bioréacteurs discontinus séquentiels suivis pendant 94 jours. Dans une culture, des tiges d'acier d'armature ont été ajoutées avec un ratio de 130 cm²/L.

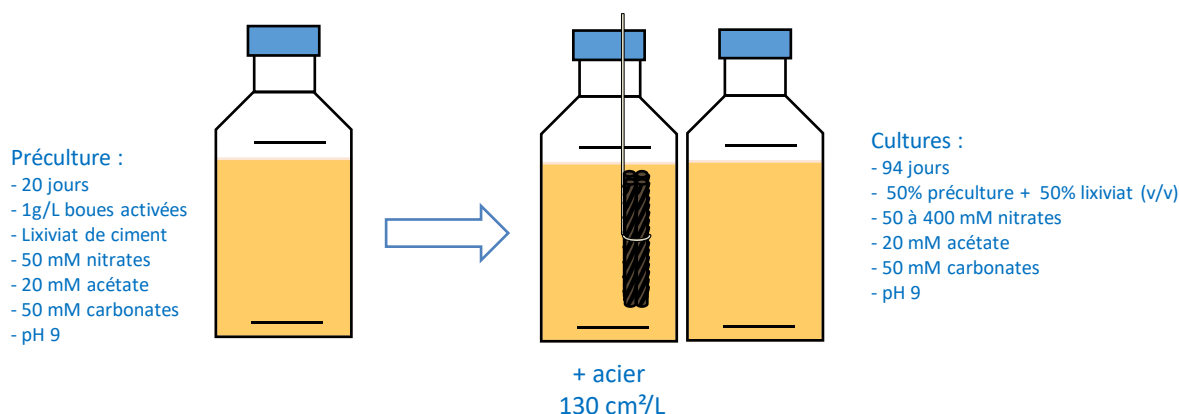


Figure 99 : Protocole de l'expérience avec ajout d'acier d'armature à béton dans des cultures hétérotrophes.

Résultats :

Des analyses par spectroscopie Raman ont permis d'analyser la composition des oxyhydroxydes de fer à la surface des tiges d'acier insérées dans la culture bactérienne. La Figure 100, présente des observations de tiges d'acier dans leur état initial au jour 0 et à la fin de l'expérience au jour 94.

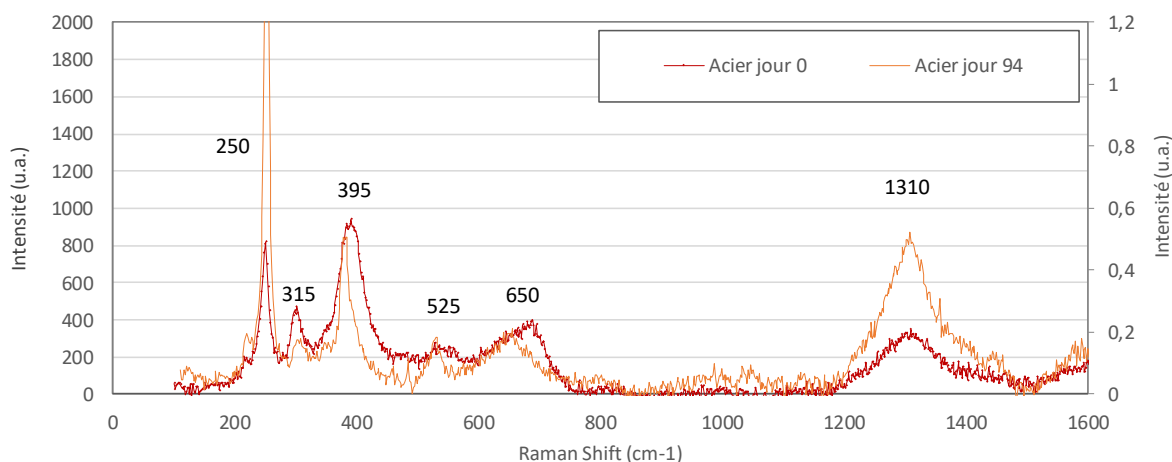


Figure 100 : Observation par spectroscopie Raman de la surface d'une tige d'acier extraite de la culture de la culture avec acier au jour 0 et 94.

Les positions des pics étaient identiques entre le jour 0 et le jour 94, la couche externe des tiges d'acier était donc globalement stable. Des phénomènes de corrosion plus localisés sont peut-être apparus mais la comparaison était difficile étant donné l'état initial déjà très corrodé des tiges d'acier. Les pics les plus prononcés étaient situés à 250, 315, 395, 525, 650 et 1310 cm⁻¹ avec le pic relativement le plus élevé positionné à 250 cm⁻¹. Les pics correspondraient à ceux de la lépidocrocite (γ -FeOOH) à 250, 350, 380, 530, 650 cm⁻¹. La présence de lépidocrocite n'est pas étonnante puisque c'est un oxyhydroxyde de Fe³⁺ fréquemment observé sur les couches d'acier oxydées [154,188]. Les tiges d'acier sont donc constituées d'une couche de Fe⁰ entourée d'une couche protectrice de γ -FeOOH.

Les résultats d'analyse du pH de la DO, du suivi des nitrates et des nitrites et des concentrations en nitrates et nitrites réduites sont présentés dans la Figure 101. Les jours 14 et 49 des ajouts de milieu ont été effectués, la concentration en nitrates a été élevée respectivement à 200 mM et 400 mM et le pH a été ajusté à pH 9.

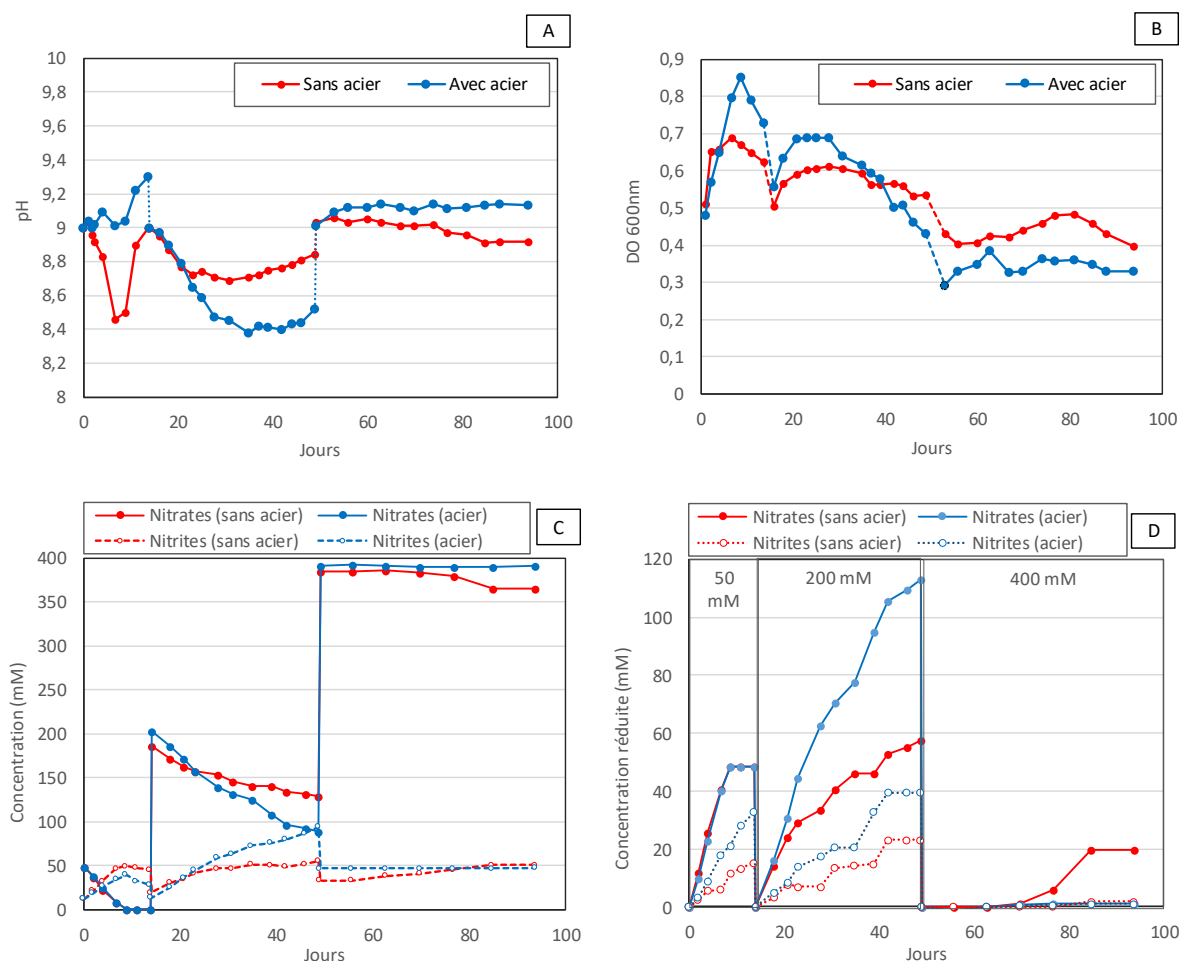


Figure 101 : Effet de l'ajout ou non d'acier d'armature sur les évolutions du pH (A), de la DO (B), des concentrations en nitrates et en nitrites (C), des concentrations en nitrates et en nitrites réduites (D). Conditions expérimentales : deux bioréacteurs séquentiels, bactéries pré-acclimatées issues de boues activées, lixiviat de ciment, 50 à 400 mM de nitrates, 0 ou 130 cm²/L d'acier d'armature, 20 mM d'acétate, pH 9.

L'acier solide a eu un effet sur le pH. Dans la culture avec acier, le pH était plus alcalin du jour 0 au jour 14, plus acide du jour 14 au jour 49, et à nouveau plus alcalin du jour 49 au jour 108, par rapport à la culture sans acier. Ces résultats peuvent s'expliquer par les cinétiques de réduction des nitrates et nitrites différentes entre les cultures avec acier ou sans acier. Du jour 0 au jour 14, la réduction des nitrates était identique avec ou sans acier. Cependant deux fois plus de nitrites étaient réduits avec acier, c'est pourquoi le pH était plus élevé dans la culture avec acier. Pour rappel, en présence d'acétate, la réduction des nitrates en nitrites acidifie le milieu alors que la réduction des nitrites en diazote fait tendre le pH vers 11. Entre le jour 14 et le jour 49, à 200 mM de nitrates, dans les cultures avec acier et sans acier, 110 mM et 60 mM de nitrates ont respectivement été réduits. Dans la culture avec acier, la concentration en nitrates réduite étant nettement supérieure, une acidification plus conséquente a été observée. Enfin, du jour 49 à 108, les réductions ont été stoppées dans la culture avec acier et le pH est resté relativement stable, tandis que dans la culture sans acier, 20 mM de nitrates ont été réduits après 30 jours et le pH a diminué.

Du jour 0 au jour 9, la DO a atteint 0,85. Jusqu'au jour 39, la DO était plus élevée dans la culture avec acier que dans la culture sans acier. De manière opposée à l'expérience précédente, la présence d'acier semble avoir accéléré la croissance bactérienne dans certaines périodes batch.

Dans le Tableau 25 sont présentées les cinétiques de réductions des nitrates et des nitrites en fonction des différentes périodes batch. Les cinétiques de réduction des nitrates et des nitrites de la culture avec acier étaient supérieures ou égales à celles de la culture sans acier jusqu'à 400 mM de nitrates.

Tableau 25 : Cinétiques de réduction des nitrates et des nitrites en mM/j de l'expérience avec des tiges d'acier dans des cultures bactériennes hétérotrophes avec 20 mM d'acétate, de 50 à 400 mM de nitrates à pH 9.

	Batch : 50 mM	Batch : 200 mM	Batch : 400 mM
	Cinétique maximale de réduction des nitrates (mM/j)		
Culture sans acier	5,4	1,6	1,2
Culture avec acier	5,4	7,5	0,0
	Cinétique maximale de réduction des nitrites (mM/j)		
Culture sans acier	1,1	0,8	0,0
Culture avec acier	2,3	1,4	0,0

L'acier semble avoir eu deux effets sur les cultures dénitrifiantes. Premièrement, la présence d'acier a stimulé la réduction des nitrites à partir du moment où les bactéries ont été actives. Deuxièmement, l'acier semble aussi avoir accéléré la réduction des nitrates mais seulement du jour 14 au jour 49 lorsque la concentration en nitrates était de 200 mM. Ce résultat pourrait s'expliquer par la nature des populations bactériennes. A 50 mM de nitrates, la réduction des nitrates selon une cinétique élevée indiquerait une prolifération de bactéries de type « *nitrate respiring* » dans les deux cultures, conduisant à peu ou pas de différences en présence ou absence d'acier. A 200 mM de nitrates, la réduction des nitrates est ralentie sans acier et accélérée avec acier. Il est probable qu'en présence d'acier les bactéries « *nitrate respiring* » aient été maintenues actives par l'acier tandis que sans acier la concentration en nitrates élevée aurait inhibé les bactéries « *nitrate respiring* ». En conséquence, dans la culture avec acier, du fait du maintien des bactéries « *nitrate respiring* » jusqu'à 100 mM, des nitrites se sont accumulés. Cette accumulation des nitrites aurait commencé à inhiber la population bactérienne comme l'indique la chute de DO à partir du jour 28. C'est pourquoi l'élévation finale à 400 mM nitrates a eu pour conséquence de stopper totalement les bactéries dans la culture avec acier. En revanche, dans la culture sans acier la population était probablement composée d'une proportion plus importante de bactéries « *true denitrifier* » qui ont pu s'adapter à la concentration de 400 mM de nitrates et les réduire nitrates après un temps de 30 jours de latence.

Par ailleurs des mesures de fer soluble (Fe^{2+} et Fe^{3+}) ont été réalisées en ICP. Les résultats n'ont pas détaillés car les valeurs mesurées étaient inférieures à la gamme étalon. En effet, à pH neutre voire alcalin, le Fe^{2+} et le Fe^{3+} précipitent. Jusqu'à 0,5 μM de fer soluble a été mesuré dans la culture hydrogénotrophe avec acier de l'expérience précédente et jusqu'à 3,5 μM de fer soluble a été mesuré dans la culture hétérotrophe avec acier. Une faible quantité de fer a donc été solubilisée dans ces cultures, malgré le pH alcalin.

Conclusions :

L'acier a accéléré la réduction des nitrites, mais aussi la réduction des nitrates dans certains cas. De plus, dans la culture hydrogénotrophe avec acier, les analyses de population ont montré que les bactéries « *nitrate respiring* » sont restées dominantes malgré la disparition des nitrates. Dans ce cas précis, il se pourrait que l'acier ait maintenu les bactéries « *nitrate respiring* » actives malgré la concentration élevée en nitrites alors que sans acier elles ont été inhibées.

D'après les résultats de l'expérience précédente, deux hypothèses avaient été avancées pour expliquer les effets de l'acier. Premièrement, les bactéries et l'acier se partagent les étapes de la dénitrification. Les bactéries ont réduit les nitrates en nitrites, tandis que l'acier réduit de manière abiotique les nitrites [154,176,177,179]. Les nitrites ont un potentiel standard d'oxydation plus élevé que les nitrates mais sont généralement des inhibiteurs pour les bactéries [46,85]. L'acier et les bactéries ont donc agi de manière synergique. Cependant, cette hypothèse n'explique pas pourquoi les nitrates ont aussi été réduits de manière plus rapide dans la culture hétérotrophe avec acier, ni comment l'acier qui était recouvert de lépidocrocite, un oxyde de Fe^{3+} , a pu réduire des quantités importantes de nitrites, ni pourquoi la réduction abiotique des nitrites s'est arrêtée à 400 mM de nitrates.

Deuxièmement, l'acier sert de catalyseur pour la réduction bactérienne des nitrates et des nitrites. Plusieurs oxyhydroxydes de fer peuvent servir de catalyseur à la réduction des nitrates ou des nitrites [156–158,175,181,182]. En particulier Sørensen et Thorling ont comparé la réduction de 200 μM de nitrites en présence de Fe^{2+} avec ou sans lépidocrocite à pH 8. Avec lépidocrocite, il y a eu une réduction de 50 μM ; Sans lépidocrocite, la réduction des nitrites était négligeable [157]. Cette hypothèse permet de justifier pourquoi l'acier n'a aucun effet sur la réduction des nitrates ou des nitrites quand l'activité bactérienne est arrêtée à 400 mM de nitrates. Elle permet aussi de justifier pourquoi la réduction des nitrates et la réduction des nitrites peuvent toutes deux être accélérées. Un exemple de mécanisme par catalyse surfacique a été proposé par Xu et coll. dans une expérience à pH neutre où la réduction des nitrates par le Fe^0 était catalysée par la magnétite Fe_3O_4 [156]. La Figure 102 illustre ce mécanisme. Un mécanisme surfacique similaire impliquant la lépidocrocite pourrait avoir eu lieu dans les cultures menées avec acier.

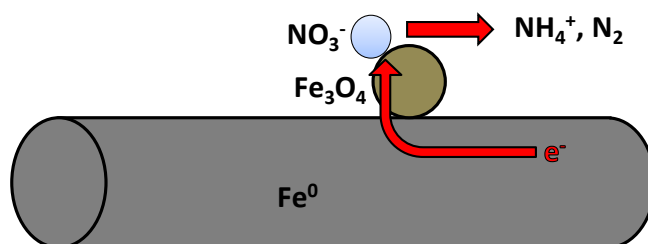


Figure 102 : Exemple de mécanisme de catalyse surfacique par un oxyde de fer, inspiré de [156] : catalyse de la magnétite lors de la réduction des nitrates par le Fe^0 .

Le parallèle peut être fait avec une nouvelle forme de dénitrification qui a récemment suscité de l'intérêt. Le principe est d'ajouter des médiateurs redox comme les quinones, les porphyrines ou les polyoxométallates dans des cultures dénitrifiantes [243–245]. Ces médiateurs, composés de noyaux métalliques comme le fer, améliorent les échanges d'électrons au sein de la chaîne respiratoire et diminuent l'énergie d'activation de la réduction des nitrates. En conséquence, la réduction des nitrates a été accélérée 2 fois [243] et 4 fois [244] et l'accumulation des nitrites a été réduite dans certains cas, l'ajout de polyoxométallates s'est aussi traduit par une population bactérienne plus diversifiée [244]. Dans une culture de boues activées, l'ajout de 1,25 mM d'hémine (porphyrine) a suffi à accélérer la réduction des nitrates de 7,8 mM/j à 15,4 mM/j [245]. Ces études montrent qu'un catalyseur organique ou inorganique (polyoxométallates) agissant sur la chaîne respiratoire peut conduire à des résultats comparables aux nôtres. Ceci tend à confirmer que le fer agirait comme un catalyseur sur la dénitrification.

VI.3. Dénitrification mixotrophe en présence d'acier et ciment solides

L'objectif de cette expérience était d'évaluer les cinétiques de réductions des nitrates en présence à la fois d'acétate et de dihydrogène comme donneur d'électrons et d'acier et de matériau cimentaire solide. Initialement trois bioréacteurs à pH 9, 10 et 11 ont été comparés. Puis dans un second temps deux bioréacteurs à pH 9 et 11 alimentés en acétate et en dihydrogène ont été comparés à un bioréacteur à pH 9 alimenté seulement en acétate. Cette modification du protocole expérimental avait pour objectif de mieux cerner l'effet du dihydrogène seul sur les cinétiques de réduction des nitrates. La concentration en nitrates a été progressivement élevée de 50 à 400 mM dans les trois bioréacteurs. En combinant le pH alcalin, avec la présence d'acétate, de dihydrogène, d'acier et de ciment, cette expérience visait à avoir une meilleure idée de la réduction bactérienne des nitrates dans un système proche d'une situation de stockage de déchets radioactifs.

Démarche expérimentale :

Trois précultures ajustées à pH 9, 10 et 11 ont servi d'inoculum pour trois cultures à pH 9, 10 et 11 suivies pendant 14 jours. Du jour 14 jusqu'au 108, la culture à pH 9 n'a plus été alimentée en dihydrogène mais en diazote, la culture à pH 10 a été ajustée à pH 9 et toujours alimentée en dihydrogène, enfin il n'y a eu aucun changement dans la culture à pH 11. La Figure 107 présente le protocole de l'expérience avec l'évolution des conditions expérimentales le jour 14. L'acier a été ajouté sous forme de portions d'aciers d'armature haute adhérence de nuance E500, avec un ratio 130 cm²/L. Le matériau cimentaire a été ajouté sous forme de pâtes de ciment frais avec un ratio 160 cm²/L. Dans cette expérience l'acier avait un aspect moins oxydé que dans les expériences précédentes.

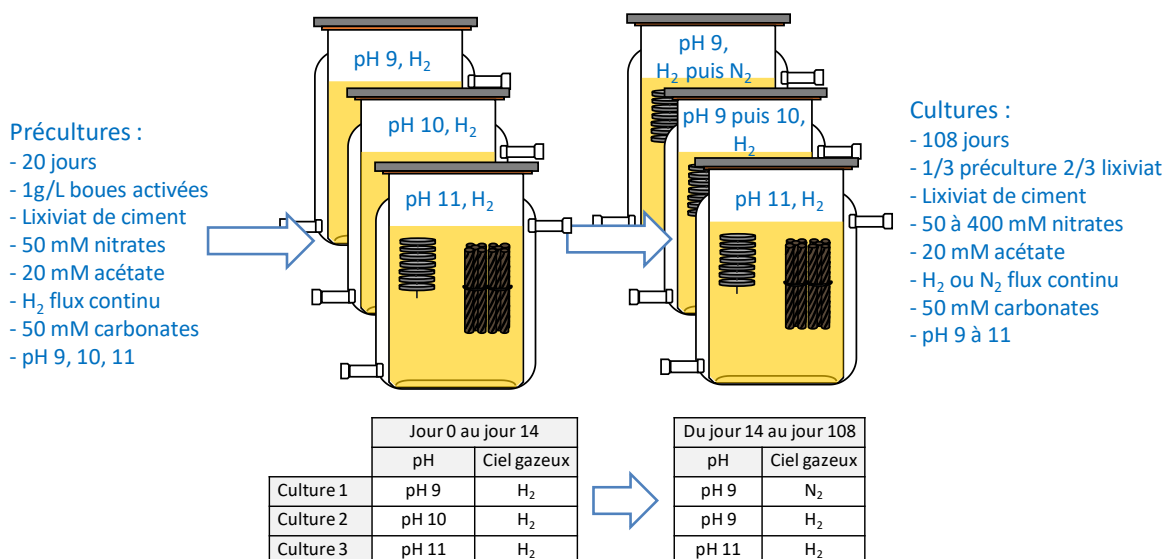


Figure 103 : Protocole de l'expérience avec ajout d'acier d'armature et de pâtes de ciment frais dans des cultures mixotrophiques.

Résultats :

Par soucis de clarté, les résultats des 14 premiers jours ont été séparés du reste. La Figure 104 présente le suivi du pH, des nitrates et des nitrites ainsi que les concentrations en nitrates et en nitrites réduites. Le suivi de la DO ne sera pas présenté car celui-ci est perturbé par l'ajout de pâtes de ciment.

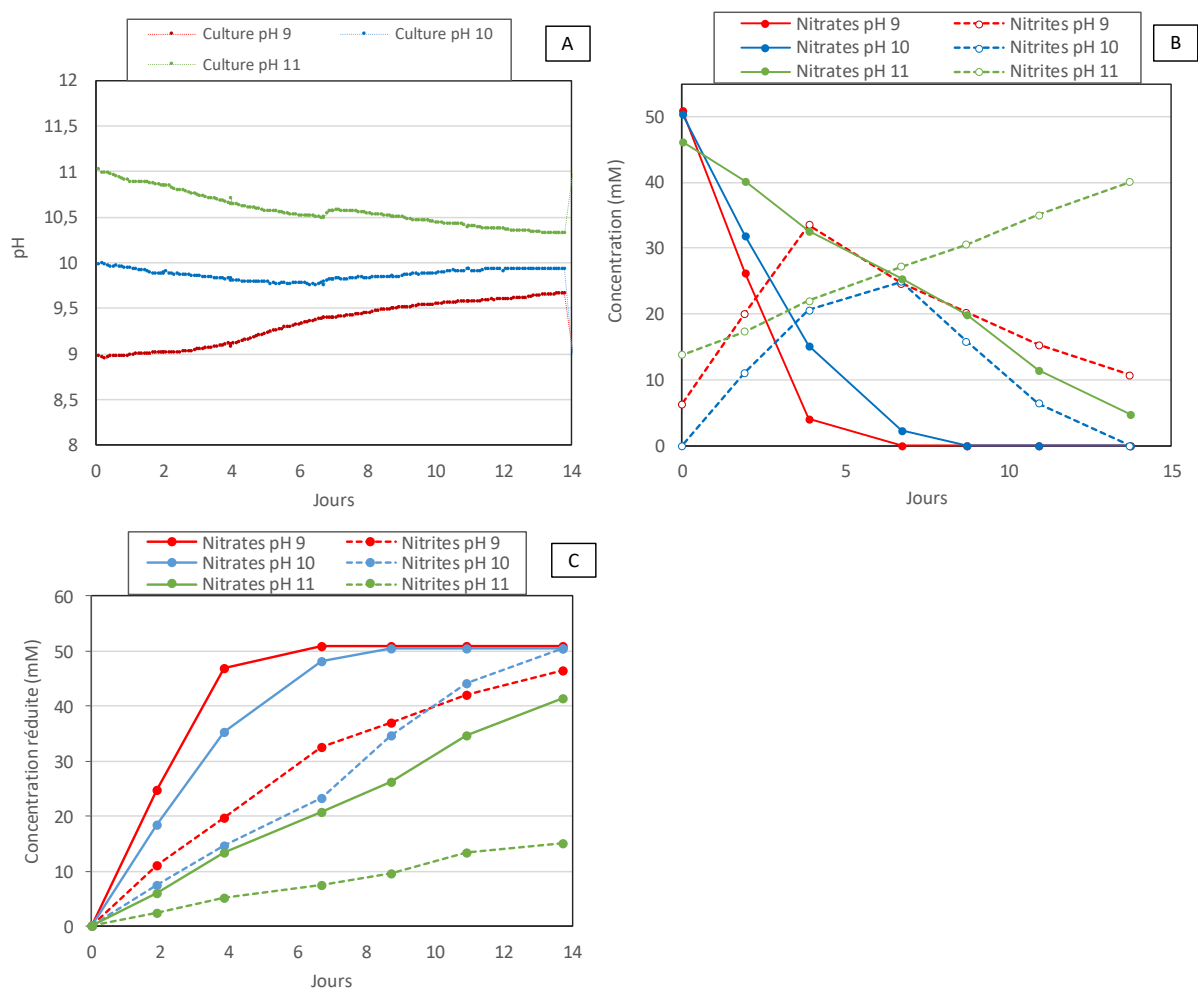


Figure 104 : Influence de l'élévation de 50 à 400 mM de la concentration en nitrates en présence d'acier d'armature et de pâte de ciment sur les évolutions du pH (A), des concentrations en nitrates et nitrites (B), et des concentrations en nitrates et en nitrites réduites (C). Suivi entre le jour 0 et le jour 14. Conditions expérimentales : trois bioréacteurs séquentiels à pH 9, 10 et 11, bactéries pré-acclimatées issues de boues activées, lixiviat de ciment, 20 mM d'acétate, 130 cm²/L d'acier d'armature, 160 cm²/L de pâte de ciment frais, 1 bar de 100% d'H₂.

Dans les trois réacteurs le pH tend vers 10.0. Dans la culture à pH 9, et dans la culture à pH 10, les pH finaux étaient 9,66 et 9,93. En théorie pour les mêmes pH initiaux, la dénitrification de 50 mM de nitrates avec acétate résulterait par des pH finaux théoriques de 9,68 et 9,97. Le pH suivait donc l'évolution du pH théorique lors de la dénitrification avec acétate. Ceci indiquerait que l'acétate est le donneur d'électrons qui était privilégié par les bactéries plutôt que le dihydrogène ou l'acier. Ceci n'est pas surprenant car le dihydrogène a une solubilité limitée, et l'acier était recouvert d'une couche protectrice d'hématite stable à pH alcalin, limitant les échanges d'électrons avec l'acier Figure 108. De manière générale, les cinétiques de réduction des nitrates et des nitrites étaient similaires dans les cultures à pH 9 et à pH 10 malgré la différence de pH. En revanche dans la culture à pH 11 seulement 40 mM de nitrates et 15 mM de nitrites ont été réduits sur les 50 mM de nitrates initiaux. Ce pH alcalin a entraîné le ralentissement de l'activité bactérienne malgré la concentration en nitrates relativement faible de 50 mM.

Pour mieux cerner l'effet du dihydrogène sur la réduction des nitrates en présence d'acétate, dans la suite de l'expérience dans une des trois cultures, le ciel gazeux a suivi une transition de 100 % de H₂ à

100% de N_2 . La Figure 105 présente le suivi du pH, ainsi que les concentrations en nitrates et en nitrites du jour 14 au jour 108. La Figure 106 présente les concentrations en nitrates et en nitrites réduites. A partir du jour 14, la culture à pH 9 (N_2) fonctionnait uniquement en hétérotrophie. Le jour 14 et le jour 49 la concentration en nitrates a été ajustée respectivement à 200 et à 400 mM. L'acidification ponctuelle dans le réacteur à pH 11 au jour 85 était due à une fuite et l'entrée de CO_2 atmosphérique, cette fuite a été réparée en une journée.

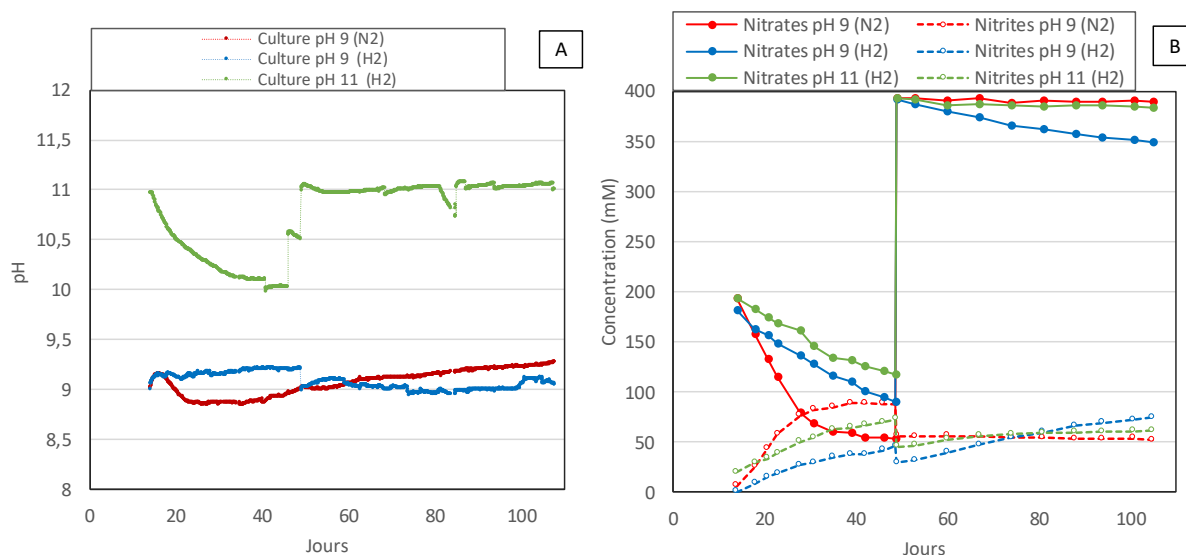


Figure 105 : Influence de l'élévation de 50 à 400 mM de la concentration en nitrates en présence d'acier d'armature et de pâte de ciment sur les évolutions du pH (A), et des concentrations en nitrates et nitrites (B). Suivi sur la deuxième partie de l'expérience entre le jour 14 et le jour 108. Conditions expérimentales: deux bioréacteurs séquentiels à pH 9 et 11 alimentés avec 1 bar de 100% d' H_2 , un bioréacteur séquentiel à pH 9 alimenté avec 1 bar de 100% de N_2 , bactéries pré-acclimatées issues de boues activées, lixiviat de ciment, 20 mM d'acétate, 130 cm^2/L d'acier d'armature, 160 cm^2/L de pâte de ciment frais.

L'évolution du pH peut être expliquée par l'évolution des concentrations en nitrates et nitrites réduites présentée dans la Figure 106. Du jour 14 au jour 49, la réduction des nitrates était largement supérieure dans la culture à pH 9 (N_2) que dans la culture à pH 9 (H_2), en conséquence le milieu a été plus acidifié. Dans la culture à pH 11 (H_2), la réduction de quantités de nitrates quatre fois plus élevée par rapport aux nitrites a provoqué l'acidification jusqu'à pH 10. Du jour 49 au jour 108, dans la culture à pH 9 (N_2), les réductions des nitrates et des nitrites ont toutes deux atteint 10 mM. Dans la culture à pH 9 (H_2), la réduction des nitrates a atteint 40 mM et la réduction des nitrites était nulle. La culture à pH 9 (H_2) s'est donc plus acidifiée. Dans la culture à pH 11 (H_2) la réduction des nitrates n'a pas dépassé 10 mM et le pH est resté constant. Dans cette dernière période, les pH mesurés dans les cultures à pH 9 (H_2) et à pH 11 (H_2) étaient plus alcalins que les pH théoriques obtenus par les calculs (Cf III.2.1). Par exemple, pour un pH initial de 11,0, la réduction de 10 mM de nitrates avec l'acétate résulte par un pH final théorique de 10,7. Il semble donc que le dihydrogène a été utilisé comme donneur d'électrons ou que l'acier et le béton ont alcalinisé le milieu. Cette alcalinisation n'était peut-être visible qu'à 400 mM de nitrates quand l'activité bactérienne était finalement ralentie.

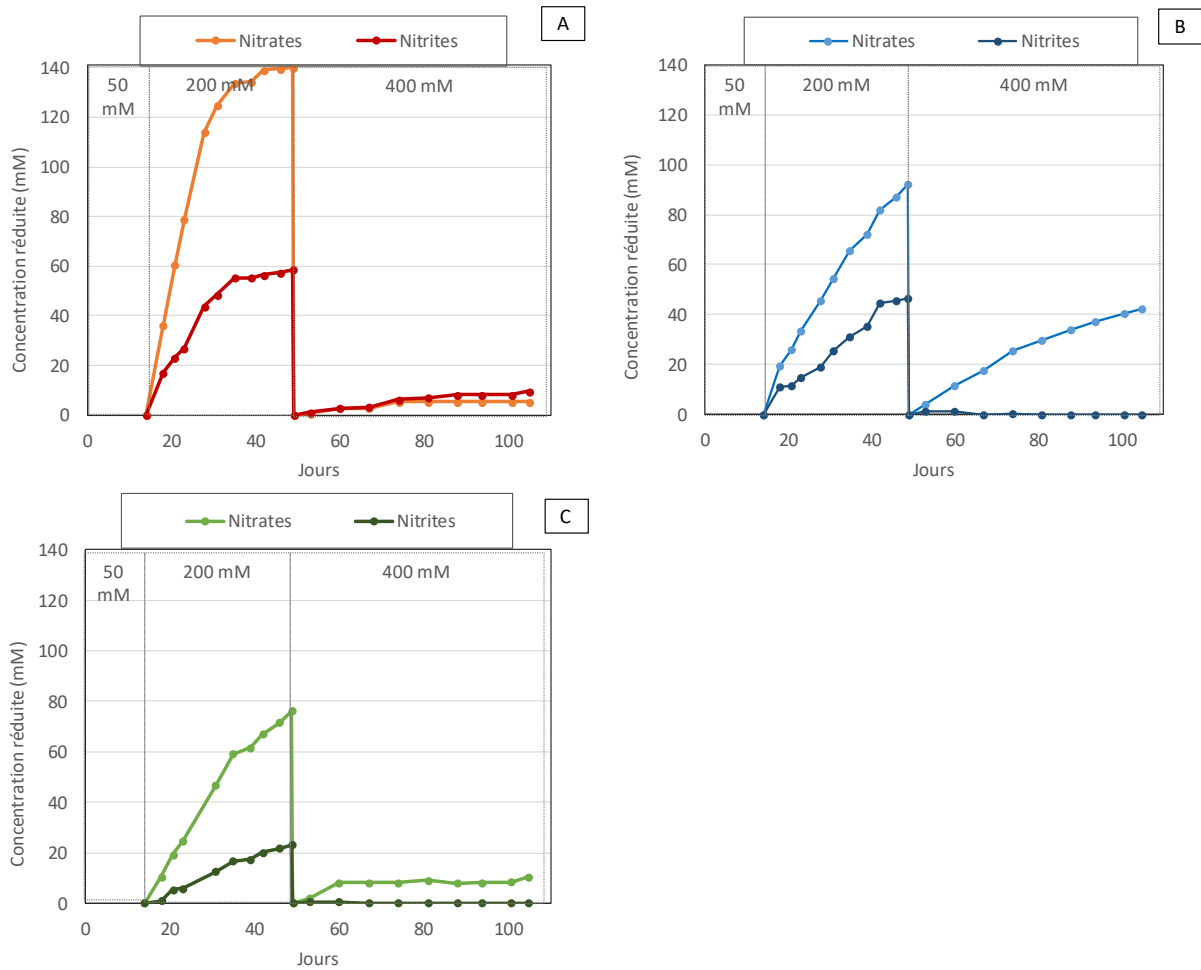


Figure 106 : Influence de l'élévation de 50 à 400 mM de la concentration en nitrates en présence d'acier d'armature et de pâtes ciment sur les évolutions des concentrations en nitrates et nitrites réduites de la culture à pH 9 avec N₂ (A), à pH 9 avec H₂ (B), à pH 11 avec H₂ (C). Suivi sur la deuxième partie de l'expérience entre le jour 14 et le jour 108. Conditions expérimentales : deux bioréacteurs séquentiels à pH 9 et 11 alimentés avec 1 bar de 100% d'H₂, un bioréacteur séquentiel à pH 9 alimenté avec 1 bar de 100% de N₂, bactéries pré-acclimatées issues de boues activées, lixiviat de ciment, 20 mM d'acétate, 130 cm²/L d'acier d'armature, 160 cm²/L de pâte de ciment frais.

Les cinétiques maximales de réduction des nitrates de l'expérience sont comparées dans le Tableau 26 avec celle d'une expérience similaire mais dont les cultures étaient dépourvues d'acier, de pâtes de ciment et de dihydrogène. Dans les cultures réalisées avec le même protocole expérimental et le même inoculum mais sans dihydrogène ni acier ni ciment (§IV.1.3), les cinétiques de réduction des nitrates étaient plus faibles jusqu'à 200 mM de nitrates. L'acier, la présence de supports solides et le dihydrogène ont donc accéléré la réduction des nitrates. Dans la culture à pH 9 (N₂) la réduction des nitrates était très élevée (149 mM) du jour 14 au jour 49 malgré l'arrêt de l'alimentation en dihydrogène. Ceci indiquerait que la réduction des nitrates serait stimulée en particulier par la présence d'acier.

Tableau 26 : Comparaison des cinétiques de réduction des nitrates en mM/j, entre des cultures alimentées avec 20 mM d'acétate en présence de dihydrogène d'acier et de ciment, et des cultures de alimentées avec 20 mM d'acétate en présence de diazote seulement.

	Batch 50 mM		Batch 200 mM	Batch 400 mM
20 mM d'acétate, H ₂ ou N ₂ , acier et ciment solides				
Culture à pH 9	11,6	⇒	Culture à pH 9 (N ₂)	7,5
Culture à pH 10	6,9	⇒	Culture à pH 9 (H ₂)	2,7
Culture à pH 11	3,0	⇒	Culture à pH 11 (H ₂)	2,2
20 mM d'acétate, N ₂				
Culture à pH 9	5,4		1,7	0,7
Culture à pH 10	2,4		1,9	0,6
Culture à pH 11	1,9		1,8	0,1

Du jour 14 au jour 49, la réduction des nitrates dans les cultures pH 9 (N₂), pH 9 (H₂) et pH 11 (H₂) a atteint respectivement 149, 92 et 76 mM sur les 200 mM de nitrates initiaux. Dans la culture à pH 9 (N₂), la cinétique de réduction des nitrates était très élevée et 149 mM de nitrates ont été réduits. Ceci indiquerait que des bactéries « *nitrate respiring* » ont proliféré. Dans la culture à pH 9 (H₂) (initialement à pH 10), la réduction des nitrates était plus lente que dans la culture à pH 9 (N₂). L'acidification trop brusque aurait donc ralenti l'activité bactérienne. Un phénomène similaire a été observé dans une culture de boues activées acclimatées à un pH alcalin puis confrontées à des pH plus acides, la réduction des nitrates a été ralentie [37]. Dans la culture à pH 11 initial (H₂), la réduction des nitrates était importante malgré le pH 11 et la concentration de 200 mM, l'activité bactérienne a certainement profité de l'acidification importante du milieu jusqu'à pH 10.

A 400 mM de nitrates, dans les cultures à pH 9 (N₂), pH 9 (H₂) et pH 11 (H₂), respectivement 5, 40 et 10 mM des nitrates initiaux ont été réduits. Malgré la présence d'acier, la concentration trop élevée en nitrates a ralenti la réduction des nitrates et des nitrites. La culture à pH 9 (N₂) était la plus ralentie. Une hypothèse envisageable est que durant la période batch à 200 mM de nitrates, la prolifération des bactéries respirant les nitrates a causé une accumulation massive des nitrites (100 mM). Finalement, les bactéries « *nitrate respiring* » intolérantes aux concentrations élevées en nitrites ont dû de surcroit s'adapter à 400 mM de nitrates. Au contraire, la culture pH 9 (H₂), qui avait une cinétique de réduction des nitrates plus lente à 200 mM de nitrates a pu réduire jusqu'à 40 mM de nitrates pendant la période à 400 mM de nitrates. La population bactérienne était probablement dominée par des bactéries de type « *true denitrifier* » qui ont supporté plus facilement l'augmentation à 400 mM de nitrates.

Les photos de la Figure 107 illustrent l'aspect des cylindres de pâtes de ciment CEM V et des tiges d'acier d'armature lors de l'ouverture des réacteurs jour 108. Des dépôts de matière de couleur orangée sont visibles sur les surfaces horizontales de l'acier et des pâtes de ciment. Ces dépôts étaient faiblement accrochés aux surfaces, un simple lavage à l'eau suffisait à les éliminer.

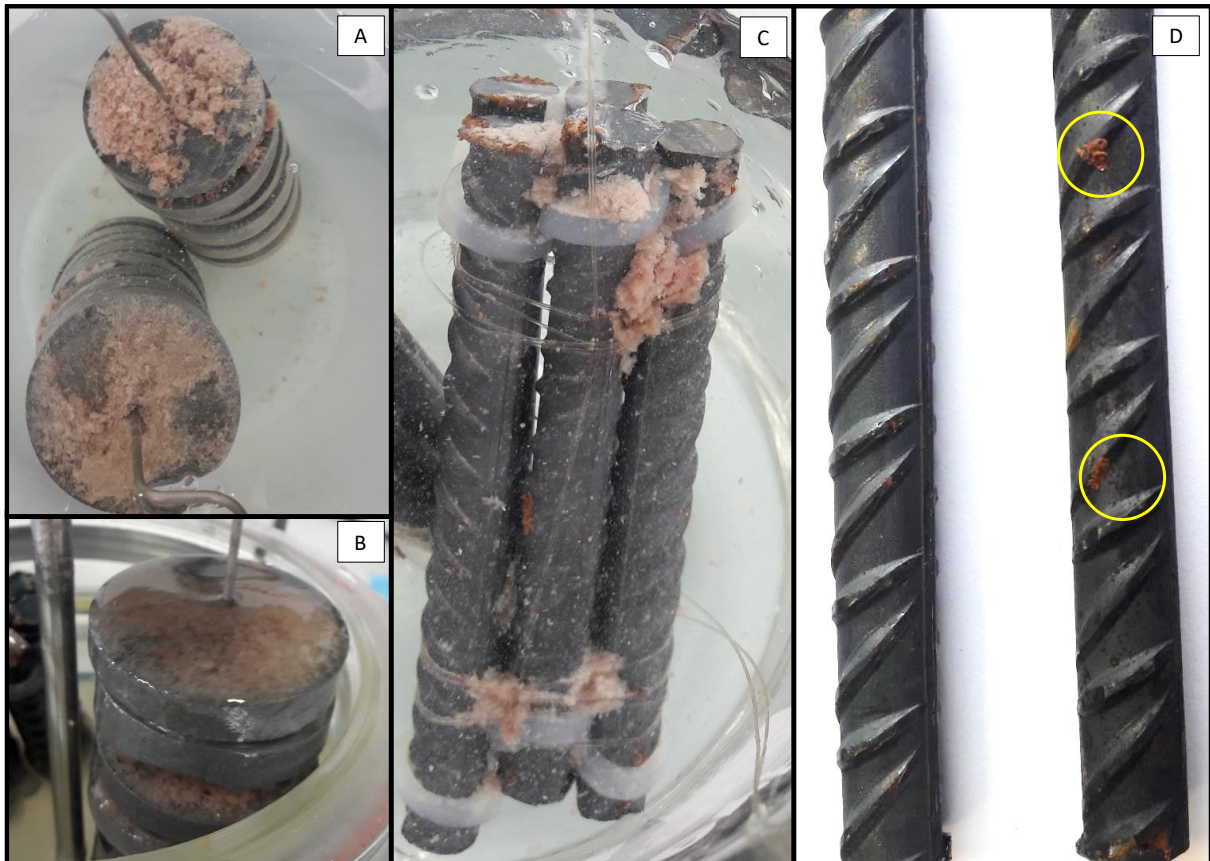


Figure 107 : (A) Photographie au jour 108 des pâtes de ciment de la culture à pH 9 avec N_2 et de la culture à pH 9 avec H_2 . (B) Photographie au jour 108 des pâtes de ciment de la culture à pH 11. (C) Photographie au jour 108 des tiges d'acier de la culture à pH 9 avec N_2 . (D) Photographie à gauche d'une tige d'acier non utilisée et à droite d'une tige d'acier extraite au jour 108 dans le réacteur à pH 9 avec H_2 . Expérience d'élévation de 50 à 400 mM de la concentration en nitrates en présence d'acier d'armature et de pâtes ciment.

Après rinçage à l'eau, les tiges d'acier de la culture pH 9 (H_2) au jour 0 et au jour 108 ont été comparées avec un spectre de l'hématite dans la Figure 108. Le spectre de l'hématite a été tiré de la base de donnée RRUFF spécialisée pour les analyses Raman. Les analyses Raman ont été effectuées sur plusieurs points de chaque tige, et les tiges d'acier des trois cultures ont été analysées, les résultats ne sont pas présentés car les résultats étaient similaires.

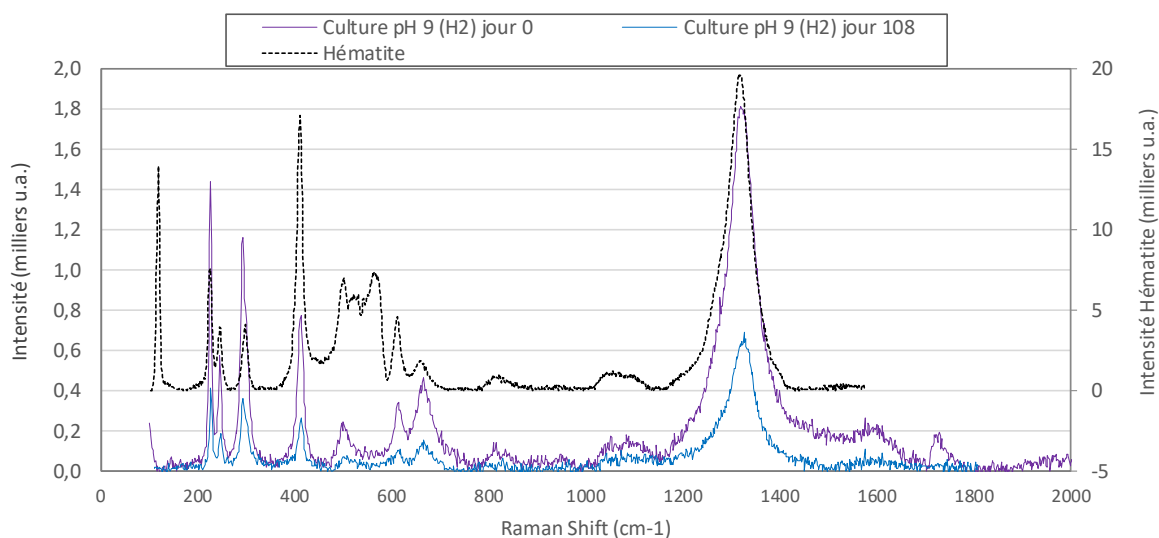


Figure 108 : Observation par spectroscopie Raman de la surface d'une tige d'acier extraite de la culture à pH 9 (H₂) entre le jour 0 et le jour 108.

Les pics des spectres de l'échantillon au jour 0 et au jour 108 avaient les mêmes positions. La couche protectrice d'oxyde de fer était donc restée globalement stable au cours du temps. D'après le spectre de l'hématite et les travaux d'Hanesch [188] et Oh [187] les principaux pics de l'hématite sont situés à **225, 245, 295, 412, 497, 612 et 1320 cm⁻¹** ce qui correspondait aux échantillons analysés. Autour de l'acier il y avait donc une couche externe d'hématite (Fe₂O₃). Des tâches de corrosion marquée étaient visibles sur les tiges d'acier, Figure 107 (D). Ces points de corrosion localisée ont été analysés par des analyses Raman qui sont présentées dans la Figure 109.

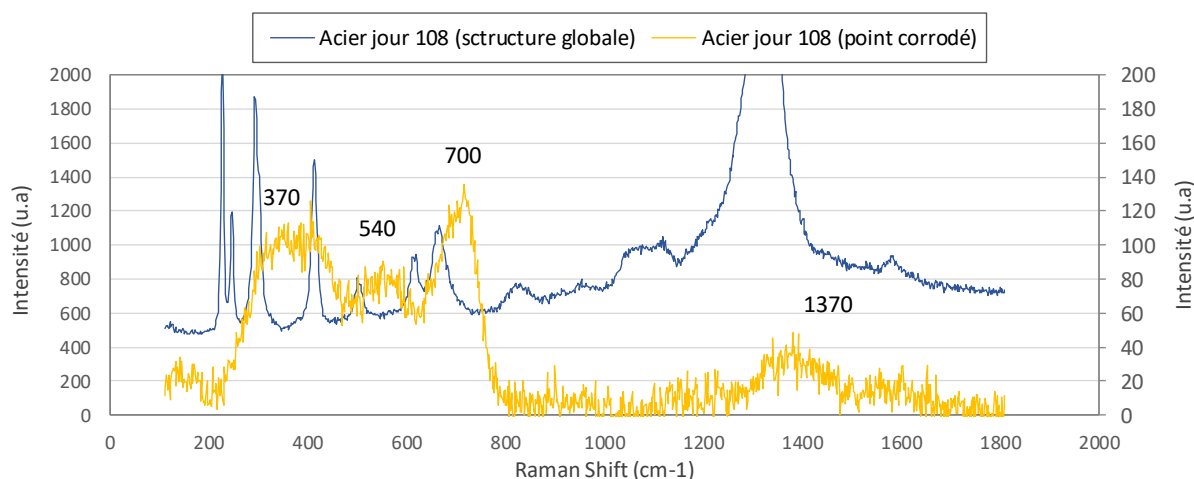


Figure 109 : Comparaison par spectroscopie Raman d'un point corrodé ou de la surface saine ou native (i.e. non corrodée) d'une tige d'acier extraite de la culture à pH 9 (H₂) au jour 108.

La composition des points de corrosion était différente. Les pics du spectre Raman étaient localisés à 370, 550, **700** et 1370 cm⁻¹. Ces pics correspondent aux pics de la Ferrihydrite (Fe₂O₃ · ½H₂O) localisés à 370, 510 et **710** cm⁻¹. D'un point de vue uniquement chimique la Ferrihydrite est composée des mêmes éléments. Elle diffère cependant par sa structure cristalline. Sans entrer dans les détails, l'hématite a une structure rhomboédrique formée de motifs de 2 pentaèdres inversés de Fe₂O₃. Tandis

que la ferrihydrite est un mélange complexe avec des nano-cristaux et des parties amorphes [246]. En conclusion, la composition de la couche protectrice externe des tiges d'acier est restée globalement stable au cours de l'expérience, malgré quelques points de corrosion. Il semble donc que les phénomènes de biocorrosion de l'acier étaient plutôt limités. Cela n'est pas surprenant car la couche d'hématite offre une protection à l'acier face à l'oxydation, elle peut théoriquement être réduite mais cette réaction n'est pas prépondérante en présence d'un accepteur d'électrons concurrent tel que les nitrates [33]. De plus, la dissolution de l'hématite en Fe^{3+} n'est pas favorable à pH alcalin.

La pâte de ciment a été observée et analysée au MEB et EDS. L'analyse des électrons rétrodiffusés (BSE) a permis d'obtenir une composition chimique quantitative relative. L'analyse des électrons secondaires (SEI) a permis d'illustrer la topographie des échantillons. La Figure 110, présente des analyses MEB des pâtes de ciment de la culture à pH 9 (H_2) dans laquelle les pâtes de ciment ont été extraites avec précaution pour éviter de perdre les dépôts de matières sur la surface. La Figure 111 présente un échantillon de pâte de ciment lavée à l'eau. Des analyses ont été effectuées sur les pâtes de ciment des deux autres cultures, les résultats étant similaires ils n'ont pas été présentés. Les compositions chimiques de plusieurs points sont présentées sous forme de tableau dans chaque figure.

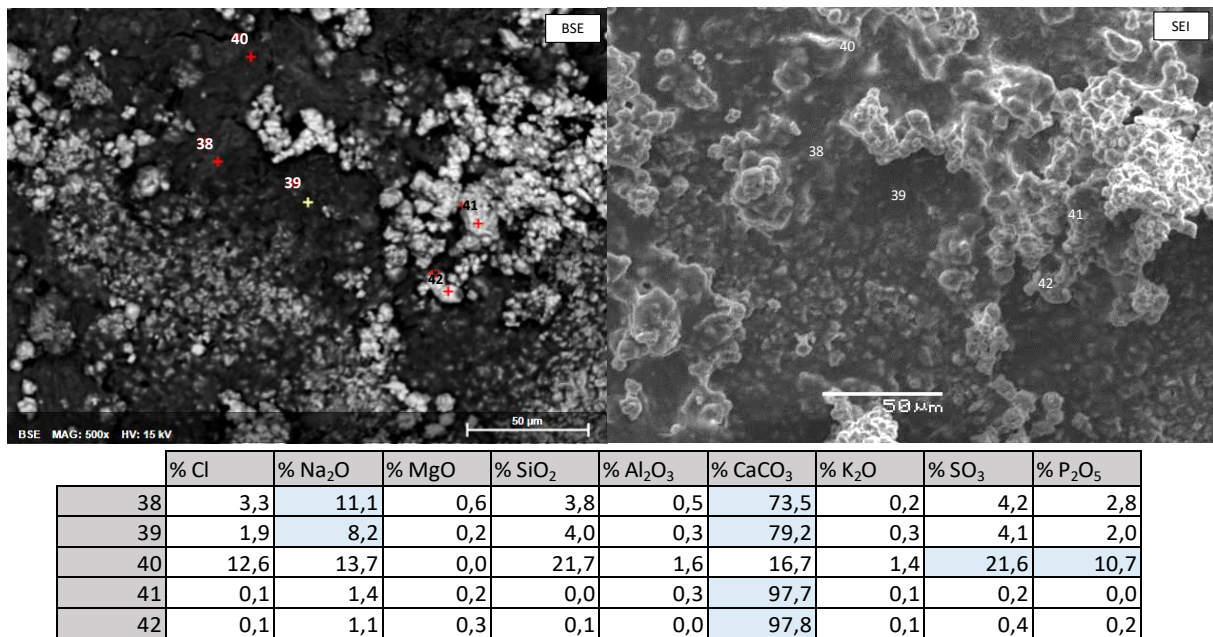


Figure 110 : Observation MEB en BSE et en SEI, et tableau de la composition chimique d'une pâte de ciment extraite au jour 108 de la culture à pH 9 (H_2).

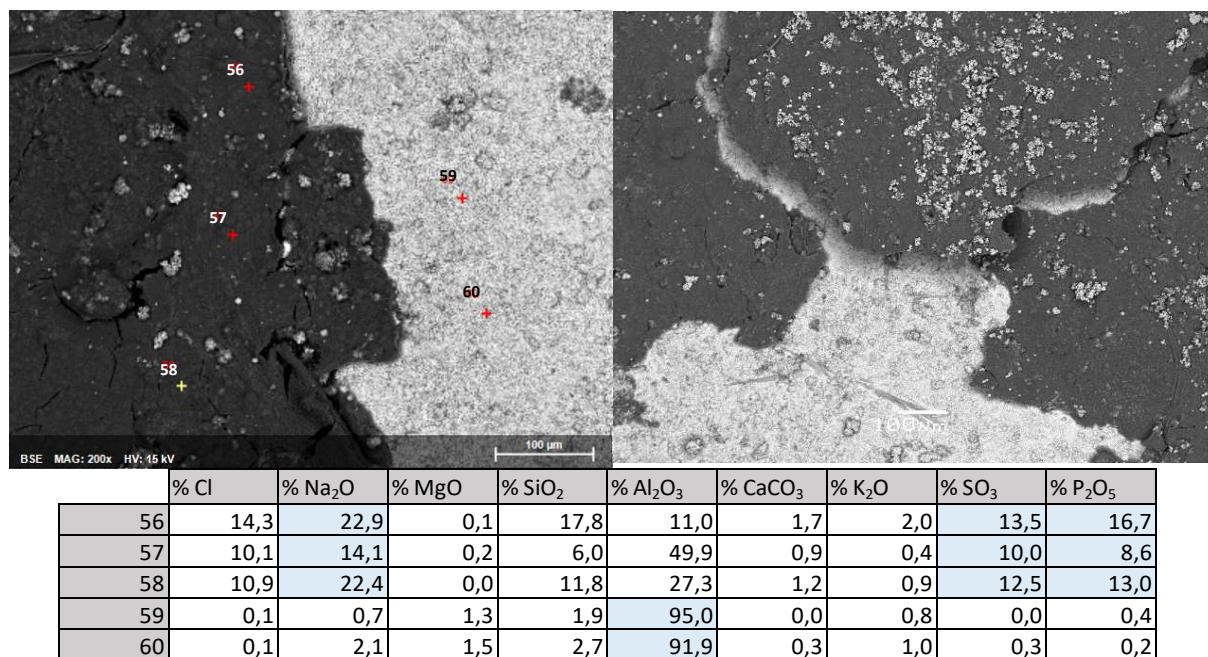


Figure 111 : Observation MEB en BSE et en ISE, et tableau de la composition chimique d'une pâte de ciment extraite au jour 108 de la culture à pH 9 (H₂), puis lavée à l'eau distillée.

Il n'a pas été possible d'observer directement des bactéries. Ceci peut s'expliquer par la densité cellulaire faible en fin d'expérience et la préparation des échantillons pour l'analyse MEB peut-être trop agressive. Cependant, sur toutes les observations de nombreux cristaux de calcite (niveau de gris intermédiaire) étaient imbriqués dans une phase amorphe (gris foncé) composée de Na₂O, SO₃ et P₂O₅ à des teneurs plus élevées que la moyenne. Par exemple 8 à 20 % de SO₃ et P₂O₅ ont été quantifiés alors que dans les zones où le ciment était lavé les teneurs en SO₃ et P₂O₅ ne dépassaient pas 0,5 %. Cette différence était probablement liée à la présence de matière organique, riche en soufre et en phosphore. Pour rappel avec cette méthode le carbone et l'azote ne peuvent pas être quantifiés. Sur la Figure 111, les observations ont été positionnées dans des zones où les dépôts de matière (niveau de gris élevé) se décollaient de la pâte de ciment (clair), la différence de composition chimique était caractéristique. Il y aurait donc en fin d'expérience à 400 mM de nitrates dans les dépôts de couleur orangée sur les surfaces de ciment, de la matière organique avec de la silice, des sels de sodium, de la calcite et du chlore.

Conclusions :

Dans ces conditions expérimentales en présence d'acétate, le dihydrogène n'a pas été utilisé par les bactéries. Le passage d'un ciel gazeux de 100 % de dihydrogène à 100 % de diazote dans le ciel gazeux de la culture à pH 9 (N₂) n'a pas provoqué de ralentissement de l'activité bactérienne. De plus, l'évolution du pH dans les cultures pendant les périodes batch à 50 mM puis 200 mM de nitrates était similaire à l'évolution du pH théorique lors de la réduction des nitrates par l'acétate. En présence d'acétate, le dihydrogène ne semble donc pas être utilisé. En revanche, la présence d'acier a fortement accéléré la réduction des nitrates et des nitrites. La cinétique maximale de réduction des nitrates 11,6 mM/j a été obtenue à pH 9 et 50 mM de nitrates. Pendant la période à 200 mM de nitrates jusqu'à 140 mM de nitrates ont été réduits à pH 9, et 80 mM de nitrates ont été réduits à pH 11 en seulement 35 jours. Deux hypothèses ont été avancées : premièrement, l'acier agirait comme donneur

d'électrons pour réduire les nitrites à la place des bactéries, deuxièmement, l'acier servirait de catalyseur aux réactions de la dénitrification bactérienne.

Cependant l'acier n'a pas permis d'améliorer la tolérance des bactéries aux concentrations en nitrates élevées. A 400 mM de nitrates, la réduction des nitrates dans les cultures avec acier n'était pas plus rapide que dans des cultures dépourvues d'acier. En conséquence, l'hypothèse la plus probable est que l'acier ait servi de catalyseur réactionnel pour les bactéries qui ont réduit les nitrates et les nitrites en utilisant l'acétate.

VI.4. Conclusions du chapitre

Le matériau cimentaire n'a pas eu un effet significatif sur les réductions bactériennes de nitrates et de nitrites, probablement car le milieu de culture était du lixiviat de ciment. Il a cependant causé des alcalinisations malgré la présence de 50 mM de tampon carbonates et en dépit du vieillissement artificiel du ciment. Cette alcalinisation a conduit dans un cas unique à l'inhibition du développement des bactéries de type « *nitrate respiring* ». Des dépôts de matière ont été constatés sur les surfaces des pâtes de ciment et dans une moindre mesure sur l'acier. Ces dépôts étaient probablement composés de bactéries et de différents précipités de calcite, silice et sels de sodium. Les bactéries étaient probablement organisées en biofilm.

En présence d'acétate, le dihydrogène n'a pas eu d'effet notable sur la réduction des nitrates. L'acétate était utilisé de préférence par les bactéries. Cela n'est pas surprenant car le dihydrogène a une solubilité faible, tandis que les cinétiques de réduction des nitrates sont plus élevées en présence d'acétate. De plus, le métabolisme hydrogénotrophe ne permet pas aux bactéries de tolérer des valeurs de pH et de concentrations en nitrates aussi élevées qu'avec l'acétate. Ceci s'explique en partie par le fait que dans un milieu initialement alcalin, la dénitrification hydrogénotrophe a tendance à alcaliniser le milieu, alors qu'en présence d'acétate la dénitrification fait baisser le pH vers 10.

L'acier quant à lui a accéléré fortement la réduction des nitrites que ce soit en hétérotrophie ou en hydrogénotrophie. L'acier a aussi accéléré la réduction des nitrates dans certains cas. En présence d'acétate à 200 mM de nitrates et d'acier, jusqu'à 140 mM de nitrates ont été réduits en 35 jours. A titre de comparaison, dans des expériences sans acier avec les mêmes conditions expérimentales seulement 60 mM des nitrates ont été réduits. Deux hypothèses ont été avancées pour expliquer cette stimulation de la réduction des nitrates et des nitrites par l'acier.

Premièrement, l'acier catalyserait la réduction bactérienne des nitrates et des nitrites par l'acétate ou le dihydrogène. Ceci expliquerait pourquoi l'acier n'accélère pas la réduction des nitrates ou des nitrites quand les bactéries sont inactives. De nombreux travaux ont rapporté que les oxyhydroxydes de fer pouvaient catalyser la réduction des nitrates ou des nitrites [156–158,175,181,182].

Deuxièmement, l'acier et les bactéries pourraient se partager les étapes de la dénitrification. Les bactéries réduiraient les nitrates en nitrites en utilisant l'acétate ou le dihydrogène, tandis que l'acier réduirait de manière abiotique les nitrites [154,176,177,179]. Plusieurs faits apportent néanmoins une contradiction à la deuxième hypothèse : la réduction des nitrates a aussi été accélérée, la réduction des nitrites était stoppée dès lors que l'activité bactérienne était stoppée, et enfin la couche externe d'oxyde de fer était globalement stable à pH alcalin, les capacités de réduction de l'acier étaient donc limitées.

Dans la Figure 112, différents mécanismes hypothétiques par lequel l'acier pourrait influencer l'activité bactérienne sont présentés. Des bactéries réductrices du fer pourraient libérer des oxyhydroxydes de fer en solution. Sur les zones où la couche protectrice de l'acier a été dissoute des bactéries oxydantes

du fer pourraient libérer des oxyhydroxydes de fer en solution. Ces oxyhydroxydes de fer en solution (ou les tiges d'acier directement) pourraient : (i) réduire les nitrites abiotiquement (hypothèse 2), (ii) servir de catalyseur à la dénitrification bactérienne (hypothèse 1), (iii) servir de nutriments aux bactéries dénitrifiantes.

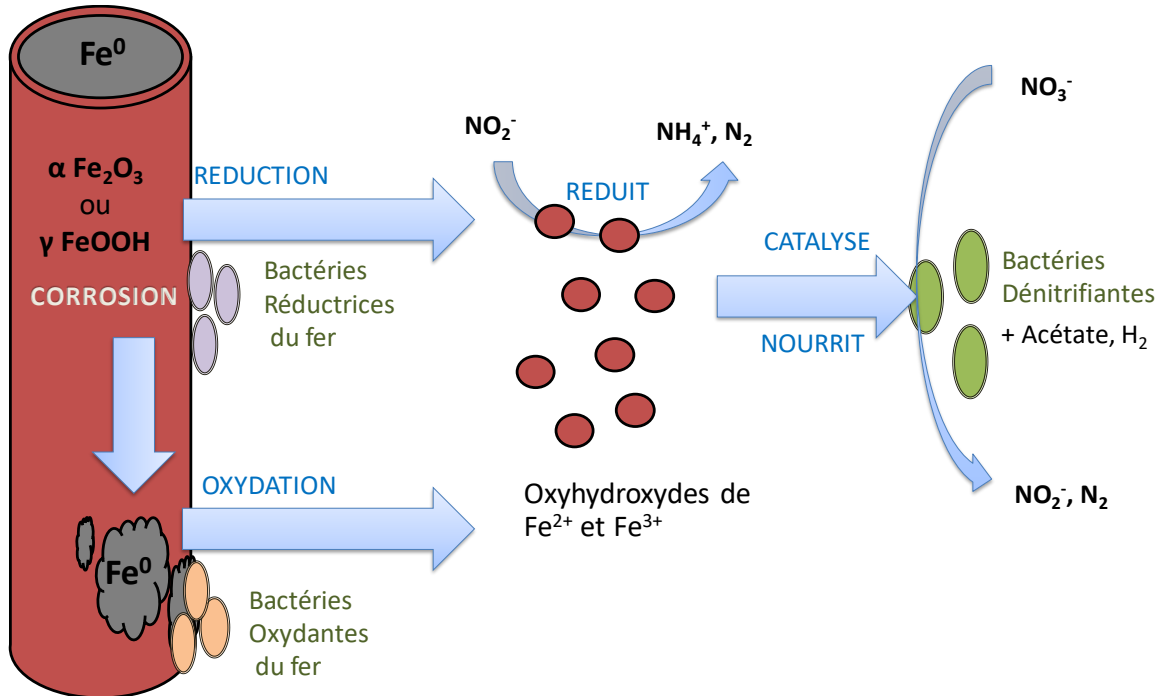


Figure 112 : Schéma de synthèse des différents mécanismes selon lesquels l'acier pourrait jouer un rôle dans la réduction des nitrates.

Ce chapitre a permis d'apporter un éclairage sur la réduction bactérienne des nitrates et des nitrites dans un contexte comparable à un stockage souterrain des déchets radioactifs. Sans bactéries, dans un domaine de pH cimentaire, ni l'acier ni l'acétate ni le dihydrogène ne pourraient réduire les nitrates. En revanche en présence de bactéries, d'acier, de ciment, de matière organique et de dihydrogène, la réduction des nitrates par l'acétate serait catalysée par les bactéries et l'acier. La dénitrification hétérotrophe provoquerait une acidification qui pourrait contrebalancer l'alcalinisation causée par le ciment. L'acier lui accélérerait grandement la réduction bactérienne des nitrates et des nitrites. L'acier n'agirait pas comme un donneur d'électrons dans la réduction des nitrates mais plutôt comme un catalyseur des réactions bactériennes de la dénitrification. Cependant l'accélération de la réduction des nitrates par l'acier pourrait provoquer des accumulations de nitrites importantes et inhibitrices de l'activité bactérienne.

CONCLUSION GENERALE

Dans les alvéoles de stockage après quelques milliers d'années les déchets radioactifs sont susceptibles de relâcher des nitrates (de 10 à 1000 mM) installant un environnement oxydant propice à la mobilité de certains radionucléides. Cependant, en présence de matière organique ou de dihydrogène, l'activité bactérienne pourrait réduire les nitrates en espèces azotées plus réduites par le processus de la dénitrification ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$). Les objectifs de la thèse étaient donc (i) évaluer la capacité des bactéries à survivre et réduire les nitrates dans les conditions physico-chimiques à proximité des déchets : c'est à dire en milieu cimentaire, à pH alcalin entre 9 et 13, en présence de concentrations de 10 à 1000 mM en nitrates et de 0 à 10 mM d'acides organiques, de dihydrogène, de matériaux cimentaires et d'acier. (ii) Il fallait aussi quantifier les cinétiques de réduction des nitrates dans les conditions précédemment décrites.

Pour répondre à ces objectifs, en premier lieu, l'étude bibliographique du **chapitre I** a été organisée autour des quatre conditions susceptibles d'avoir un effet sur l'activité bactérienne : le pH alcalin, la concentration en nitrates élevée, l'hydrogénotrophie et l'ajout d'acier et de pâte de ciment. L'étude bibliographique a permis d'éclaircir plusieurs points, en rapport avec les objectifs de la thèse :

- Le pH est un facteur prépondérant impactant fortement l'activité bactérienne. Les bactéries sont ralenties à $\text{pH} > 9,5$, et tolèrent des pH alcalins jusqu'à 11,5 et 12.
- Les bactéries peuvent tolérer des concentrations en nitrates de l'ordre de centaines de mM. Les concentrations élevées en nitrates causent des accumulations en nitrites importantes. Les nitrites pourraient inhiber l'activité bactérienne voir causer des morts cellulaires.
- En hydrogénotrophie, les bactéries sont ralenties, et moins à même de tolérer des pH alcalins. La dénitrification hydrogénotrophe est plus encline à causer des accumulations de nitrites.
- L'ajout de d'acier et de matrice cimentaire pourrait faciliter la formation de biofilm sur les surfaces. L'acier pourrait faciliter la réduction des nitrates et des nitrites par divers mécanismes. Le ciment pourrait alcaliniser le milieu de culture.
- La dénitrification bactérienne dans un environnement associant, pH alcalin et concentration en nitrates élevée ou même hydrogénotrophie a été très peu explorée.

D'après les études ayant exploré la bioréactivité des nitrates à pH alcalin ou avec une concentration élevée en nitrates, il était probable que les bactéries ne puissent pas survivre à la fois à des pH élevés et à des concentrations en nitrates élevées, qui plus est en hydrogénotrophie. **Dans le chapitre II**, la démarche expérimentale de la thèse a donc été de s'intéresser d'abord à des systèmes simples (espèce bactérienne pure *P. denitrificans*, milieu de culture synthétique, pH alcalins et concentrations en nitrates élevées testés séparément) et de complexifier progressivement les systèmes en se rapprochant des conditions réelles du stockage des déchets radioactifs (consortium bactérien, milieu cimentaire, concentrations en nitrates et pH élevés, ajout d'acier et de ciment solides). En conséquence, différents types de réacteurs ont été utilisés : des réacteurs batch, des réacteurs continus et des réacteurs discontinus séquentiels. L'étanchéité des réacteurs aux gaz a été vérifiée avec attention. Le pH a été contrôlé au moyen d'un tampon carbonate, de HCl et NaOH (10 M).

Dans le **chapitre III**, les premières expérimentations ont été effectuées avec la souche modèle *P. denitrificans*. Dans une première expérience, il a été montré que *P. denitrificans* pouvait réduire 10 mM de nitrates, jusqu'à pH 9 en hétérotrophie ou en hydrogénotrophie. La cinétique maximale de réduction des nitrates était plus élevée avec l'acétate (4 mM/j) qu'avec le dihydrogène (1,2 mM/j), vraisemblablement à cause de la faible solubilité du dihydrogène [60] et de la nécessité d'assimiler du carbone minéral [120–122]. L'évolution du pH lors de la dénitrification dans un milieu tamponné par les carbonates a ensuite été simulée par des calculs, ce qui a permis de comprendre l'évolution du pH différente selon le donneur d'électrons. Pour des quantités élevées de nitrates réduits, en présence

d'acétate, le pH tend vers 10, tandis qu'en présence de dihydrogène, le pH s'alcalinise indépendamment du pH initial. Ceci peut expliquer pourquoi, à pH supérieur à 10, la dénitrification est plus facilement inhibée en présence de dihydrogène [32,58]. Enfin, des procédures d'acclimatation en réacteurs batch successifs et continus ont été testées en présence d'acétate pour exposer progressivement *P. denitrificans* à des pH alcalins ou des concentrations en nitrates élevées. En réacteur batch inoculés successivement, *P. denitrificans* a réduit les nitrates jusqu'à pH 10,5 ou 380 mM de nitrates. En réacteur continu, le temps d'acclimatation supérieur et les élévations de pH plus douces ont permis à *P. denitrificans* de réduire les nitrates jusqu'à pH 10,8. *P. denitrificans* a donc pu réduire les nitrates avec de l'acétate ou du dihydrogène dans des gammes de pH et de concentration en nitrates inspirées du contexte de stockage de déchets radioactifs. Cependant, en concertation avec l'Andra, il a été choisi de travailler avec des communautés bactériennes plutôt qu'avec une espèce seule, pour se rapprocher du contexte de stockage des déchets radioactifs [11,12].

Dans le **chapitre IV**, la dénitrification hétérotrophe a été étudiée avec un consortium de boues activées. Trois procédures d'acclimatation ont été comparées : des réacteurs batch inoculés successivement, des réacteurs continus et des réacteurs discontinus séquentiels. Au maximum, les bactéries ont pu réduire les nitrates simultanément avec 400 mM de nitrates et pH 11 en réacteur discontinus séquentiels. Ensuite, une expérience a montré que la réduction des nitrates était possible à pH 11,5 et 50 mM de nitrates, mais pas à pH 12. Au fur et à mesure des expériences, des accumulations en nitrites de plus en plus élevées ont été observées (jusqu'à 100 mM), or les nitrites ont été décrits plusieurs fois comme toxiques pour les bactéries [47,76,82,84]. De plus, un nouveau facteur prépondérant sur l'activité bactérienne a été identifié. Les contre-ions des nitrates (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , etc.), ajoutés simultanément aux nitrates à une concentration élevée pouvaient avoir un impact important sur l'activité bactérienne [9]. Une expérience a donc comparé trois alimentations en NaNO_3 , NaNO_2 et KNO_3 . Les nitrites ont pu être tolérés jusqu'à 100 mM par les bactéries, ce qui était supérieur aux valeurs seuils rapportées dans la bibliographie, de l'ordre de 10 mM [36,46,82]. Par ailleurs, la culture alimentée en KNO_3 a été totalement inhibée à partir de 200 mM de KNO_3 . La concentration très élevée en potassium pourrait perturber la pression osmotique cellulaire [208–211]. Enfin une expérience a testé une transition de donneur d'électrons de l'acétate vers le dihydrogène. Il a été montré qu'en présence de dihydrogène, les bactéries issues de boues activées étaient inhibées par les pH alcalins et ralenties.

Dans le **chapitre V**, la dénitrification hydrogénotrophe a été étudiée avec des boues activées. Des expériences d'acclimations en réacteurs discontinus séquentiels ont montré que les bactéries ont pu réduire les nitrates jusqu'à pH 10 et 200 mM de nitrates. Les bactéries étaient inhibées par les pH supérieurs à 10,5. Une expérience a tout de même été réalisée sur deux cultures à pH 11,5 et 12. Les bactéries hydrogénotrophes n'ont pas survécu. En revanche, dans la culture à pH 11,5, des bactéries hétérotrophes ont utilisé la biomasse d'autres cellules pour réduire les nitrates tout en acidifiant le pH jusqu'à 10,5. Malgré l'environnement très désavantageux, les bactéries ont donc pu s'adapter. Cependant, le métabolisme hétérotrophe était limité par la quantité de biomasse initialement fournie par l'inoculum. Enfin dans une série d'expériences, des pressions élevées en dihydrogène de 1 à 10 bars (1 bars à 100 bars totaux) ont été comparées. La réduction des nitrites a été accélérée jusqu'à 4 bars de dihydrogène (40 bars totaux). Ceci peut s'expliquer par la biodisponibilité du dihydrogène augmentée par la pression plus élevée. Ces expériences ouvrent des perspectives de recherche intéressantes dans le contexte du stockage des déchets où des fortes pressions de dihydrogène sont susceptibles d'apparaître dans les alvéoles de stockage.

Dans le **Chapitre VI**, de l'acier d'armature et des pâtes de ciment CEM V ont été ajoutés dans des cultures de boues activées en présence d'acétate et/ou de dihydrogène. Premièrement, il a été montré qu'en hydrogénotrophie, les pâtes de ciment favorisaient des dépôts de matière sur leur surface, composés probablement de biofilm et de divers précipités. De plus les pâtes de ciment ont alcalinisé légèrement le milieu, elles n'ont cependant pas eu d'effet significatif sur la réduction des nitrates ou des nitrites. Ce sont les mêmes conclusions de travaux antérieurs ayant évalué l'effet de pâtes de ciment sur l'activité bactérienne en hétérotrophie [21–23]. Deuxièmement, des expériences avec de l'acier en hétérotrophie puis en hydrogénotrophie ont montré que l'acier a accéléré la réduction des nitrites, et dans certains cas, la réduction des nitrates. Deux hypothèses ont été avancées :

- L'acier et les bactéries se partageraient les étapes de la dénitrification. Les bactéries réduiraient les nitrates en nitrites en utilisant l'acétate ou le dihydrogène. Tandis que l'acier réduirait de manière abiotique les nitrites [154,176,177,179].
- L'acier faciliterait la réduction bactérienne des nitrates et des nitrites sans être impliqué comme donneur d'électrons. L'effet catalyseur des oxyhydroxydes de fer sur la réduction des nitrates et des nitrites ont été rapportés plusieurs fois [156–158,175,181,182].

Trois faits étaient contradictoires avec la première hypothèse : (i) la réduction des nitrates a aussi été accélérée, (ii) la réduction des nitrates et des nitrites était stoppée dès lors que l'activité bactérienne était stoppée, et (iii) l'acier était protégé par une couche d'oxyde de fer stable à pH alcalin rendant peu probable sa réactivité vis-à-vis des nitrites et/ou nitrates. La deuxième hypothèse est donc plus probable. Dans une expérience finale, de l'acier, du ciment, de l'acétate et du dihydrogène ont été ajoutés simultanément dans des réacteurs discontinus séquentiels. Les bactéries ont pu réduire les nitrates jusqu'à 400 mM de nitrates et pH 11. L'acétate était préférentiellement utilisé par les bactéries plutôt que le dihydrogène. Les cinétiques de réduction des nitrates et des nitrites ont été accélérées en présence d'acier.

Les chapitres III, IV, et V ont apportés de nouvelles connaissances sur les gammes de pH et de concentrations en nitrates tolérées par les bactéries dénitrifiantes, Figure 113. Les bactéries hydrogénotrophes sont actives dans des gammes de pH et de concentrations en nitrates moins élevées que les bactéries hétérotrophes.

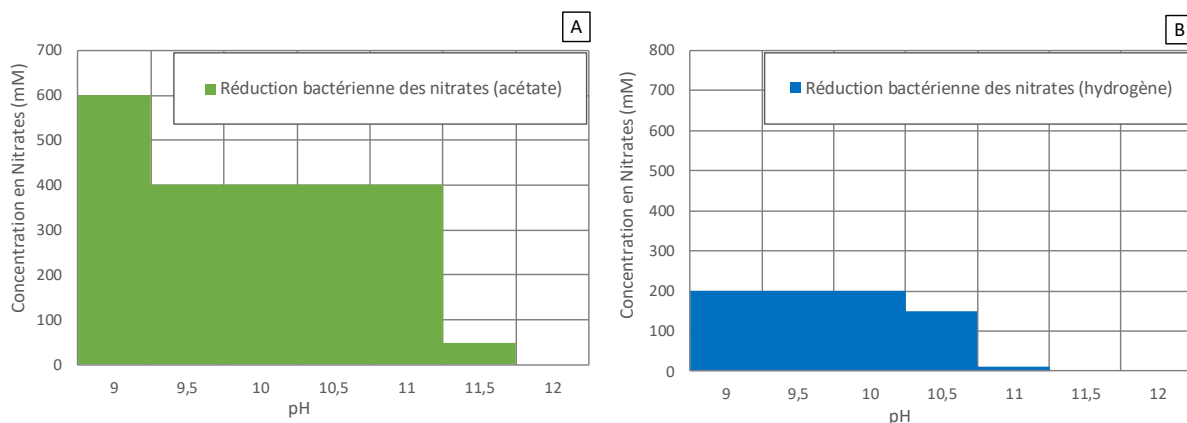


Figure 113 : Synthèse des gammes de pH et de concentrations en nitrates dans lesquelles les bactéries issues de boues activées ont pu réduire les nitrates ou survivre en présence (A) d'acétate, (B) de dihydrogène.

Le Tableau 27, synthétise les cinétiques maximales de réduction des nitrates, mesurées dans les différents chapitres de la thèse. Dans les cultures hydrogénotrophes, les cinétiques de réduction des nitrates étaient comparables à celles avec l'acétate, jusqu'à pH 10 et 50 mM. L'acier accélérât la réduction des nitrates jusqu'à pH 10 ou 200 mM de nitrates.

Conclusion générale

Tableau 27 : Synthèse des cinétiques maximales de réduction des nitrates en fonction du pH, de la concentration en nitrates, du donneur d'électrons acétate ou dihydrogène et de la présence d'acier.

pH Nitrates	9			10			11		
	Hydrogène	Acétate	Acétate (+ acier)	Hydrogène	Acétate	Acétate (+ acier)	Hydrogène	Acétate	Acétate (+ acier)
50 mM	6,9	5,4	11,6	2,2	2,4	6,9	0,2	3	3
200 mM	0,2	1,7	7,5	0,4	1,9	ND	0	1,8	2,2
400 mM	0	0,7	0,1	0	0,6	ND	0	0,1	0,2

L'objectif de la thèse était de fournir à l'Andra des données sur la bioréactivité des nitrates (cinétiques de réduction des nitrates et bornes de fonctionnement des bactéries), synthétisées dans la Figure 113 et le Tableau 27. Ces données ont été régulièrement transmises à l'Andra sous forme de rapports internes. *In fine* ces données seront intégrées à un modèle global du projet Cigéo. C'est pourquoi initialement, l'Andra avait besoin d'un balayage expérimental étendu des différentes conditions pouvant impacter la bioréactivité des nitrates.

Plus généralement, ce travail apporte un panel étendu d'expériences de dénitrification bactérienne en situation de pH alcalin et de concentrations élevées en nitrates. C'est une approche originale car la dénitrification bactérienne est généralement étudiée dans l'objectif d'optimiser le traitement des eaux usées. Les pH et les concentrations en nitrates testées n'excèdent généralement pas pH 9 et 10 mM de nitrates. Comme le montre la Figure 114, aucune étude n'avait exploré la dénitrification pour des pH supérieurs à 9 et des concentrations en nitrates supérieures à 120 mM. Les expériences réalisées dans le cadre de cette thèse, illustrées en vert dans la Figure 114, ont donc testé des gammes de pH et de concentrations en nitrates inédites : des concentrations en nitrates jusqu'à 750 mM et des pH jusqu'à 12. Ce travail est extrapolable à certains contextes industriels où les rejets en nitrates peuvent être très concentrés en nitrates et parfois alcalins : la production de fertilisants, le traitement de surface des métaux, la production d'explosif, etc. [42,43,92].

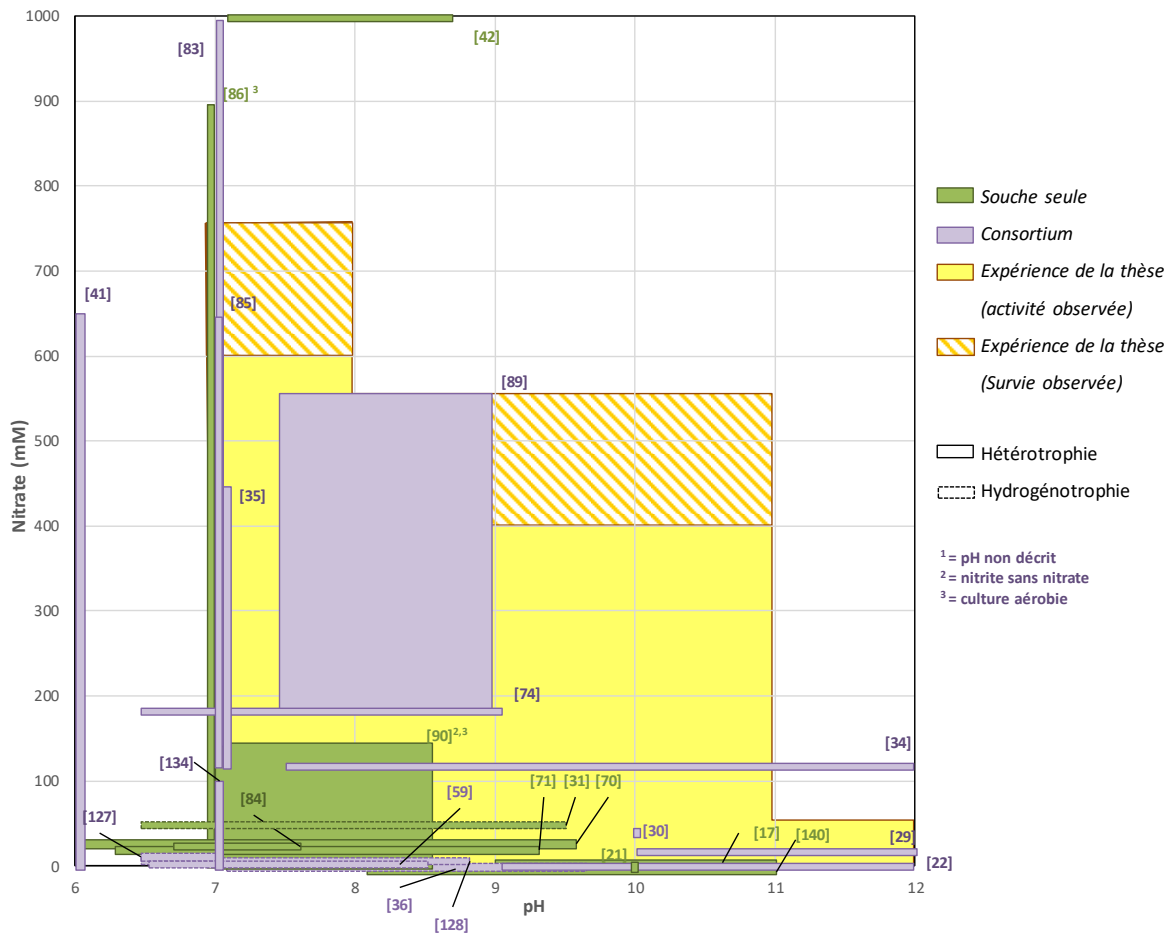


Figure 114 : Synthèses des gammes de pH et de concentrations en nitrates explorées dans la bibliographie et dans les travaux de la thèse.

Il aurait été intéressant d’approfondir les analyses de populations bactériennes avec des cultures bactériennes prélevées à différentes périodes de leur évolution afin de mieux identifier les transitions de population entre les bactéries « *nitrate respiring* » et « *true denitrifier* ». En effet, dans la quasi-totalité des expériences, la population bactérienne a seulement été caractérisée en fin d’expérience, afin de ne pas prélever de la biomasse déjà faiblement concentrée pendant l’expérience. De même il aurait été intéressant de prélever des échantillons de pâte cimentaire plus tôt dans les expériences quand les bactéries étaient actives pour observer plus facilement les biofilms. Il aurait aussi été intéressant de mieux caractériser les biofilms afin d’approfondir leur rôle dans la résistance à des pH et des concentrations en nitrates élevés. En effet, une grande partie des bactéries pourraient se développer en tant que biofilm sur l’acier et les matériaux cimentaires dans les alvéoles de stockage, l’impact des biofilms sur l’activité bactérienne pourrait être prépondérant.

Par ailleurs, ces travaux ont permis de soulever de nouveaux questionnements scientifiques intéressants pour l’Andra. Premièrement, les pressions élevées de dihydrogène sont attendues localement dans les alvéoles de stockage des déchets radioactifs. Elles peuvent accélérer la réduction des nitrites en raison de la plus forte biodisponibilité du dihydrogène (solubilité accrue). Mais d’un autre côté, les pressions élevées ont un impact négatif sur plusieurs processus microbiens [232,233,236–238]. Un approfondissement des mécanismes biochimiques sous-jacents serait intéressant. Deuxièmement, il a été observé de nombreuses fois des accumulations importantes de nitrites jusqu’à 100 mM. L’accumulation des nitrites pourraient avoir des conséquences néfastes sur

Conclusion générale

le développement bactérien et conduire dans certains cas à l'arrêt de la réduction des nitrates. Outre l'effet négatif sur les bactéries, les accumulations de nitrites sont susceptibles de créer un environnement oxydant néfaste à la stabilité des radionucléides. La réduction bactérienne des nitrites est donc un sujet pertinent à explorer.

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : (A) Répartition par secteur du volume de déchets radioactifs pris en charge par l'Andra fin 2017. (B) Répartition des volumes et niveaux de radioactivité fin 2016 selon le type de déchets, la signification des acronymes HA, MAVL, FAVL est indiquée dans le texte ci-dessus [2].....	7
Figure 2 : Schéma des installations en surface et en profondeur du site de stockage Cigéo [3].....	8
Figure 3 : Schéma d'une alvéole de stockage (A) et d'un conteneur (B) de déchets MAVL [3].....	9
Figure 4 : Représentation schématique de l'environnement aqueux à l'interface entre les alvéoles et les containers contenant les déchets radioactifs, après saturation en eau dans les alvéoles de stockage des déchets radioactifs.....	11
Figure 5 : Représentation schématique du cycle microbien de l'azote d'après [17,30].....	19
Figure 6 : Evolution de l'enthalpie libre de différents couples d'oxydants en fonction du pH [33].	21
Figure 7. Overview of the four steps of microbial denitrification.....	25
Figure 8. Schematic representation of the canonical respiratory chain of denitrification, inspired from [36,63,65].....	26
Figure 9. Schematic representation of the transcriptional regulation of the expression of genes encoding the different enzymes involved in denitrification in <i>P. denitrificans</i> [35,36].	26
Figure 10. Proportion of nitrite reduced and accumulated according to the initial nitrate concentration in bacterial cultures.....	29
Figure 11. The regulatory [NiFe] hydrogenase and membrane bound [NiFe] hydrogenase in <i>Ralstonia eutropha</i> , [95,97].....	31
Figure 12. Protective mechanisms of <i>Bacillus sp.</i> cultivated at pH 10.5, adapted from [133,139].	37
Figure 13. General literature overview of the experiments of bacterial denitrification conducted at alkaline pH and/or at high nitrate concentrations.	39
Figure 14 : Diagramme de Pourbaix du fer, domaine de stabilité du Fe ⁰ , Fe ²⁺ , Fe ³⁺ et de certains oxyhydroxydes de fer en fonction du potentiel d'oxydoréduction et du pH de la solution.	43
Figure 15 : Concentrations de OH (calculé d'après le pH), K, et Ca et dans un essai de lixiviation avec 0,5 mM d'acétate et 32,3 mM de nitrates [24].....	46
Figure 16 : Synthèse des facteurs environnementaux stimulant ou ralentissant la réduction bactérienne des nitrates et des nitrites.....	48
Figure 17 Protocoles de synthèse du lixiviat de ciment, en fonction des volumes de lixiviat à synthétiser.	55
Figure 18 : Evolutions du pH (A) et de la conductivité (B) d'un lixiviat de pâte de ciment aéré et d'un lixiviat de pâte de ciment désaéré (saturé au N ₂).	55
Figure 19 : Schémas et photographies de la verrerie utilisée pour les différents réacteurs.	58
Figure 20 : Protocole opératoire des réacteurs discontinus séquentiels. Exemple d'une culture acclimatée progressivement à des concentrations élevées en nitrates, comparaison avec une culture continue.....	59
Figure 21 : Circuit d'alimentation et de soutirage du milieu réactionnel d'un réacteur continu.	60
Figure 22 : Circuit de circulation des gaz vers le réacteur et le milieu d'alimentation.	61
Figure 23 : photographie de l'ensemble du montage des réacteurs continus.	61
Figure 24 : Représentation schématique avec cotes d'une alvéole de stockage et des colis de déchets MAVL.	63
Figure 25 : Schéma du montage des réacteurs à double enveloppe en présence d'acier et de ciment solides.....	63
Figure 26 : Gradient d'éluant utilisé pour l'HPIC : eau ultra pure additionnée de KOH, (A) première version du gradient, (B) version optimisée du gradient.....	67

Figure 27 : Comparaison des dosages de nitrates et de nitrites par analyse en HPIC ou en Kit sur 130 échantillons.	68
Figure 28 : Comparaison des dosages d'acétate par analyse en HPIC ou en Kit sur 70 échantillons. ..	69
Figure 29 : Protocole expérimental des réacteurs batch à pH 7, 8, 9 et 10 conduits en hydrogénotrophie, en hétérotrophie et des contrôles abiotiques.	74
Figure 30 : Evolution du pH (A) et de la DO (B) des contrôles abiotiques anaérobies à pH 7, 8, 9, et 10 et du contrôle abiotique aérobie à pH 10.	74
Figure 31 : Effet de différents pH initiaux 7, 8, 9 et 10 sur les évolutions du pH (A) et de la DO (B) en hétérotrophie. Conditions expérimentales : quatre bioréacteurs batch, <i>P. denitrificans</i> , milieu minéral, 20 mM d'acétate, 12 mM de nitrates.	75
Figure 32 : Effet de différents pH initiaux 7, 8, 9 et 10 sur l'évolution du pH (A) et de la DO (B) en hydrogénotrophie. Conditions expérimentales : quatre bioréacteurs batch, <i>P. denitrificans</i> , milieu minéral, 1 bar d'H ₂ , 12 mM de nitrates.	75
Figure 33 : Effet de différents pH initiaux 7, 8, 9 et 10 sur l'évolution des concentrations en nitrates (A) et en acétate (B) en hétérotrophie. Conditions expérimentales : quatre bioréacteurs batch, <i>P. denitrificans</i> , milieu minéral, 20 mM d'acétate, 12 mM de nitrates.	76
Figure 34 : Effet de différents pH initiaux 7, 8, 9 et 10 sur l'évolution des concentrations en nitrates (A) et en nitrites (B) en hydrogénotrophie. Conditions expérimentales : quatre bioréacteurs batch, <i>P. denitrificans</i> , milieu minéral, 1 bar de 100 % d'H ₂ , 12 mM de nitrates.	77
Figure 35 : Evolution du pH dans des cultures de <i>P. denitrificans</i> avec 20 mM d'acétate et 12 mM de nitrates dans un milieu minéral tamponné par 50 mM de carbonate, (A) expérience non détaillée dans le manuscrit, (B) expérience III.1.	78
Figure 36 : Diagramme de prédominance des espèces solubles de carbonates en fonction du pH (tracé d'après l'équation de Henderson-Hasselbalch).	79
Figure 37 : Courbes d'évolutions théoriques du pH d'une culture, en présence d'acétate non limitant et de 50 mM de carbonate, en fonction du pH initial et de la concentration en nitrates ou en nitrites réduite : (A) réduction des nitrates en diazote, (B) réduction des nitrates en nitrites, (C) réduction des nitrites en diazote.	82
Figure 38 : Courbes d'évolutions théoriques du pH d'une culture bactérienne dénitrifiante alimentée avec du dihydrogène en fonction du pH initial et de la concentration en nitrates réduite en diazote ou de la concentration en nitrites réduite en monoxyde d'azote.	84
Figure 39 : Evolutions du pH de cultures bactériennes en présence de formiate (A), oxalate (B), glutarate (C) et phtalate (D) en fonction du pH initial et de la concentration en nitrates réduite en diazote.	86
Figure 40: Effect of the pH increase on OD evolution and on acetate and nitrate consumption yields for <i>P. denitrificans</i> batch cultures without acclimation (A and B) and for <i>P. denitrificans</i> batch cultures with successive inoculations (C and D).	91
Figure 41: Effect of the pH increase on the evolutions of OD and pH (A), nitrate, nitrite, and acetate concentrations (B), acetate and nitrate consumption yield (C) for <i>P. denitrificans</i> cultivation in a continuous flow bioreactor.	92
Figure 42 : Protocole expérimental de l'acclimatation de <i>P. denitrificans</i> à des concentrations élevées en nitrates en réacteurs batch successifs.	97
Figure 43 : Influence de l'élévation de la concentration en nitrates de 40 à 760 mM dans des bioréacteurs batch successifs sur les évolutions du pH (A), de la DO (B), des % de nitrates non consommés (C), des % de nitrites accumulés (D). Conditions expérimentales : quatre bioréacteurs batch, <i>P. denitrificans</i> , milieu minéral, 20 mM d'acétate.	98
Figure 44 : Protocole expérimental des acclimatations des boues activées de pH 8,5 à pH 11,2 ou de 40 à 760 mM de nitrates en réacteurs batch successifs.	105

Figure 45 : Influence de l'élévation du pH de 8,5 à 11,2 dans des bioréacteurs batch successifs sur les évolutions du pH (A), et de la DO (B). Conditions expérimentales : quatre bioréacteurs batch, bactéries issues de boues activées, lixiviat de ciment, 9 mM d'acétate, 6 mM de nitrates.....	106
Figure 46 : Influence de l'élévation du pH de 8,5 à 11,2 dans des bioréacteurs batch successifs sur les évolutions des nitrates (A), des nitrites (B), de l'acétate (C). Conditions expérimentales : quatre bioréacteurs batch, bactéries issues de boues activées, lixiviat de ciment, 9 mM d'acétate, 6 mM de nitrates.	107
Figure 47 : Influence de l'élévation de la concentration en nitrates de 40 à 760 mM dans des bioréacteurs batch successifs sur les évolutions de pH (A) et de la DO (B). Conditions expérimentales : quatre bioréacteurs batch, bactéries issues de boues activées, lixiviat de ciment, 9 mM d'acétate.	108
Figure 48 : Influence de l'élévation de la concentration en nitrates de 40 à 760 mM dans des bioréacteurs batch successifs sur les évolutions des nitrates (en % des nitrates initiaux) (A), des nitrites en (% des nitrates initiaux) (B). Conditions expérimentales : 4 bioréacteurs batch, lixiviat de ciment, 9 mM d'acétate.	108
Figure 49 : Protocole expérimental d'acclimatation des inocula de boues activées à des élévations de pH 8,5 à pH 11,8 ou de concentrations en nitrates de 10 à 750 mM.	111
Figure 50 : Influence de l'élévation du pH de 8,5 à 11,2 en réacteur continu sur les évolutions du pH et de la DO (A), des concentrations en nitrates et nitrites (B), des concentrations en nitrates et nitrites réduites (C). Conditions expérimentales : un bioréacteur continu, lixiviat de ciment, bactéries issues de boues activées, 20 mM d'acétate, 10 mM de nitrates.....	112
Figure 51 : Influence de l'élévation de la concentration en nitrates de 10 à 750 mM en réacteur continu sur les évolutions du pH et de la DO (A), et des concentrations en nitrates et nitrites (B). Conditions expérimentales : un bioréacteur continu, lixiviat de ciment, bactéries issues de boues activées, 20 mM d'acétate, pH 8-9.	115
Figure 52 : Protocole expérimental d'acclimatation en réacteurs séquentiels des inocula de boues activées à des concentrations en nitrates de 50 à 400 mM à trois pH 9, 10 et 11.	117
Figure 53 : Influence de l'élévation de la concentration en nitrates de 50 à 400 mM dans trois bioréacteurs séquentiels à pH 9, 10 et 11 sur les évolutions du pH (A), de la DO (B), des concentrations en nitrates et nitrites du jour 0 au jour 14 (C), des concentrations en nitrates et nitrites du jour 14 au jour 108 (D). Conditions expérimentales: trois bioréacteurs batch séquentiels, lixiviat de ciment, bactéries pré-acclimatées issues de boues activées, 20 mM d'acétate.	118
Figure 54 : Influence de l'élévation de la concentration en nitrates de 50 à 400 mM sur les évolutions des concentrations en nitrates et en nitrites réduites dans les bioréacteurs à pH 9 (A), à pH 10 (B), et à pH 11 (C). Conditions expérimentales : trois bioréacteurs batch séquentiels, lixiviat de ciment, bactéries pré-acclimatées issues de boues activées, 20 mM d'acétate.	120
Figure 55 : Protocole de l'expérience d'élévation des concentrations en NaNO_3 , NaNO_2 et KNO_3 de 50 à 200 mM dans trois cultures hétérotrophes inoculées avec des échantillons de boues activées. ...	122
Figure 56 : Effet de l'élévation des concentrations en NaNO_3 , NaNO_2 et KNO_3 de 50 à 200 mM sur les évolutions du pH (A) de la DO (B), des concentrations en nitrates et nitrites (C) et des concentrations en Na et K (D). Conditions expérimentales : trois bioréacteurs batch séquentiels, lixiviat de ciment, bactéries pré-acclimatées issues de boues activées, 20 mM d'acétate, pH 9,5.	123
Figure 57 : Effet de l'élévation des concentrations en NaNO_3 , NaNO_2 et KNO_3 de 50 à 200 mM sur les évolutions des concentrations en nitrates et en nitrites réduites, dans les bioréacteurs avec NaNO_3 (A), avec NaNO_2 (B), et avec KNO_3 (C). Conditions expérimentales : trois bioréacteurs batch séquentiels, lixiviat de ciment, bactéries pré-acclimatées issues de boues activées, 20 mM d'acétate, pH 9,5....	124
Figure 58 : Effet de l'élévation des concentrations en NaNO_3 , NaNO_2 et KNO_3 de 50 à 200 mM sur la distribution des espèces bactériennes au jour 100. Conditions expérimentales : trois bioréacteurs	

batch séquentiels, lixiviat de ciment, bactéries pré-acclimatées issues de boues activées, 20 mM d'acétate, pH 9,5.	127
Figure 59 : Protocole de l'expérience à pH très alcalin avec deux cultures hétérotrophes à pH 11,5 et 12,0.	129
Figure 60 : Influence de pH initiaux très alcalins 11,5 et 12,0 sur les évolutions du pH (A), de la DO (B), des concentrations en nitrates et nitrites (C), et des concentrations en nitrates et en nitrites réduites (D). Conditions expérimentales : deux bioréacteurs batch, lixiviat de ciment, bactéries pré-acclimatées issues de boues activées, 20 mM d'acétate, 50 mM de nitrates.	130
Figure 61 : Protocole expérimental schématisant la transition de l'acétate à l'hydrogène comme donneur d'électrons dans trois cultures inoculées à partir de boues activées à pH 9, 10 et 11.	132
Figure 62 : Influence de la transition de l'acétate à l'hydrogène sur les évolutions de la concentration en acétate (A), du pH (B), de la DO (C) dans trois cultures à pH 9, 10 et 11. Conditions expérimentales : trois bioréacteurs batch séquentiels, lixiviat de ciment, bactéries pré-acclimatées issues de boues activées, 50 à 100 mM de nitrates, 20 mM d'acétate ajouté uniquement au jour 0, et 1 bar de 100% d'H ₂	133
Figure 63 : Influence de la transition de l'acétate à l'hydrogène sur les évolutions de la concentration en nitrates (A), de la concentration en nitrites (B) dans trois cultures à pH 9, 10 et 11. Conditions expérimentales : trois bioréacteurs batch séquentiels, lixiviat de ciment, bactéries pré-acclimatées issues de boues activées, 50 à 100 mM de nitrates, 20 mM d'acétate ajouté uniquement au jour 0, et 1 bar de 100% d'H ₂	134
Figure 64 : Influence de la transition de l'acétate à l'hydrogène sur les évolutions des concentrations en nitrates et en nitrites réduites de la culture à pH 9 (A), de la culture pH 10 (B) et de la culture pH 11 (C). Conditions expérimentales : trois bioréacteurs batch séquentiels, lixiviat de ciment, bactéries pré-acclimatées issues de boues activées, 50 à 100 mM de nitrates, 20 mM d'acétate ajouté uniquement au jour 0, et 1 bar de 100% d'H ₂	136
Figure 65 : Synthèse des résultats des cultures hétérotrophes, gammes de pH et de concentrations en nitrates dans lesquelles les bactéries issues de boues activées ont pu réduire les nitrates ou survivre avec une activité ralentie.	138
Figure 66 : Protocole expérimental d'acclimation à des concentrations élevées de 10 à 550 mM de nitrates de cultures hydrogénotrophes inoculées à partir de boues activées.	145
Figure 67 : Photographie au jour 50 des trois bioréacteurs lors de l'élévation de 10 à 100 mM de nitrates en hydrogénotrophie.	146
Figure 68 : Influence de l'élévation de la concentration en nitrates de 10 à 100 mM sur les évolutions du pH (A), de la DO (B), des concentrations en nitrates et nitrites du jour 0 au jour 5 (C), des concentrations en nitrates et nitrites du jour 5 au jour 85 (D). Conditions expérimentales: trois bioréacteurs séquentiels à pH 9, 10 et 11, bactéries pré-acclimatées issues de boues activées, lixiviat de ciment, 1 bar de 100% d'H ₂	147
Figure 69 : Influence de l'élévation de la concentration en nitrates de 10 à 100 mM sur les évolutions des concentrations en nitrates et nitrites réduites, de la culture à pH 9 (A), de la culture à pH 10 (B), de la culture à pH 11 (C). Conditions expérimentales : trois bioréacteurs séquentiels à pH 9, 10 et 11, bactéries pré-acclimatées issues boues activées, lixiviat de ciment, 1 bar de 100% d'H ₂	149
Figure 70 : Influence du pH sur la distribution des phyla (A) et des espèces bactériennes (B) en fin de l'expérience d'élévation de la concentration en nitrates de 10 à 100 mM. Conditions expérimentales : trois bioréacteurs séquentiels à pH 9, 10 et 11, bactéries pré-acclimatées issues de boues activées, lixiviat de ciment, 1 bar de 100% d'H ₂	150
Figure 71 : Influence de l'élévation de 50 à 150 mM de la concentration en nitrates sur les évolutions du pH (A), de la DO (B), des concentrations en nitrates et nitrites (C). Conditions expérimentales : trois	

bioréacteurs séquentiels à pH 9, 10 et 10,5, bactéries pré-acclimatées issues de boues activées, lixiviat de ciment, 1 bar de 100% d'H ₂	152
Figure 72 : Influence de l'élévation de 50 à 150 mM de la concentration en nitrates sur les concentrations en nitrates et en nitrites réduites de la culture à pH 9 (A), à pH 10 (B), et à pH 10,5 (C). Conditions expérimentales : trois bioréacteurs séquentiels à pH 9, 10 et 10,5, bactéries pré-acclimatées issues de boues activées, lixiviat de ciment, 1 bar de 100% d'H ₂	154
Figure 73 : Influence de l'élévation de 200 à 550 mM suivie d'une diminution à 400 mM de la concentration en nitrates sur les évolutions du pH (A), de la DO (B), des concentrations en nitrates et nitrites (C). Conditions expérimentales : trois bioréacteurs séquentiels à pH 9, 10 et 11, bactéries pré-acclimatées issues de boues activées, lixiviat de ciment, 1 bar de 100% d'H ₂	155
Figure 74 : Influence de l'élévation de 200 à 550 mM suivie d'une diminution à 400 mM de la concentration en nitrates sur les concentrations en nitrates et en nitrites réduites de la culture à pH 9 (A), à pH 10 (B), et à pH 11 (C). Conditions expérimentales : trois bioréacteurs séquentiels à pH 9, 10 et 11, bactéries pré-acclimatées issues de boues activées, lixiviat de ciment, 1 bar de 100% d'H ₂ ...	156
Figure 75 : Protocole de l'expérience à pH très alcalin avec deux cultures hydrogénotrophes à pH 11,5 et 12,0.....	158
Figure 76 : Influence des pH très alcalins 11,5 et 12,0 sur les évolutions du pH et de la concentration en carbonates (A), des concentrations en nitrates et nitrites (B), de la DO (C). Représentation schématique de l'évolution de l'aspect visuel de la culture à pH 11,5 (D). Conditions expérimentales : deux bioréacteurs batch, bactéries pré-acclimatées issues de boues activées, lixiviat de ciment, 50 mM de nitrates, 1 bar de 100% d'H ₂	159
Figure 77 : Influence des pH très alcalins 11,5 et 12,0 sur les évolutions des concentrations en nitrates et en nitrites réduites de la culture à pH 11,5 (A), et de la culture à pH 12,0 (B). Conditions expérimentales : deux bioréacteurs batch, bactéries pré-acclimatées issues de boues activées, lixiviat de ciment, 50 mM de nitrates, 1 bar de 100% d'H ₂	160
Figure 78 : : Influence des pH très alcalins 11,5 et 12,0 sur la distribution des espèces bactériennes en fin d'expérience. Conditions expérimentales : deux bioréacteurs batch, bactéries pré-acclimatées issues de boues activées de station d'épuration des eaux usées domestiques, lixiviat de ciment, 50 mM de nitrates, 1 bar de 100% d'H ₂	161
Figure 79 : Schéma d'un autoclave (ou réacteur pressurisé) relié à une bouteille de gaz contenant un mélange 90% Ar 10 % H ₂	162
Figure 80 : Protocole des expériences réalisées à pression élevée c'est à dire à 1, 2 et 4 bars de dihydrogène.....	163
Figure 81 : Effet de la pression de dihydrogène à 1, 2 ou 4 bars sur les évolutions du pH (A), de la concentration en nitrates (B), de la concentration en nitrites (C). Conditions expérimentales : trois bioréacteurs batch, bactéries pré-acclimatées issues de boues activées, lixiviat de ciment, 10 mM de nitrates, 1 bar de 100% d'H ₂ , 20 et 40 bars de 90% d'Argon et 10% d'H ₂ , pH 9.....	164
Figure 82 : Protocole de l'expérience avec deux cultures hydrogénotrophes pressurisées à 10 bars de dihydrogène à pH 9 ou 11.....	165
Figure 83 : Effet du pH initial, fixé à 9 ou 11, à pression élevées d'H ₂ sur les évolutions du pH (A), des concentrations en nitrates et en nitrites (B). Conditions expérimentales : deux bioréacteurs batch, bactéries pré-acclimatées issues de boues activées, lixiviat de ciment, 10 mM de nitrates, 100 bars de 90% d'Argon et 10% d'H ₂	166
Figure 84 : Effet de pression élevées croissantes d'H ₂ de 1 à et 10 bars sur les évolutions des proportions de nitrates et de nitrites réduits dans les bioréacteurs à 1 bar d'H ₂ (A), à 2 bars d'H ₂ (B), à 4 bars d'H ₂ (C) et à 10 bars d'H ₂ (D). Conditions expérimentales : quatre bioréacteurs batch, bactéries issues de boues activées, lixiviat de ciment, 10 mM de nitrates, 1 bar de 100% d'H ₂ ou 20, 40 et 100 bars de 90% d'Argon et 10% d'H ₂ , pH 9.....	167

Figure 85 : Synthèse des gammes de pH et de concentrations en nitrates dans lesquelles les bactéries issues de boues activées ont pu réduire les nitrates ou survivre avec une activité ralentie en condition hydrogénotrophe.	168
Figure 86 : Protocole de l'expérience d'insertion de pâtes de ciment vieilli dans des cultures hydrogénotrophes.	175
Figure 87 : Effet de l'ajout ou non de pâtes de ciment vieilli sur les évolutions du pH (A), des concentrations en nitrates et en nitrites (B). Photographie des deux bioréacteurs, avec et sans pâtes de ciment vieilli, prise au jour 42 (C). Conditions expérimentales : deux bioréacteurs séquentiels, bactéries pré-acclimatées issues de boues activées, lixiviat de ciment, 100 à 200 mM de nitrates, 0 ou 160 cm ² /L de pâte de ciment vieilli, 1 bar de 100% d'H ₂ , pH 9,5 à 10,2.	176
Figure 88 : Comparaison de l'effet de l'ajout ou non de pâtes de ciment vieilli sur les évolutions des concentrations en nitrates et en nitrites réduites des cultures sans pâtes de ciment (A), et avec pâtes de ciment (B). Conditions expérimentales : deux bioréacteurs séquentiels, bactéries pré-acclimatées issues de boues activées, lixiviat de ciment, 100 à 200 mM de nitrates, 0 ou 160 cm ² /L de pâte de ciment vieilli, 1 bar de 100% d'H ₂ , pH 9,5 à 10,2.	177
Figure 89 : (A) et (B) deux observations au MEB en SEI d'une pâte de ciment et tableau de la composition chimique des échantillons.	178
Figure 90 : Photographie d'une boîte de Pétri 7 jours après avoir été inoculée à partir des dépôts sur les pâtes de ciment.	178
Figure 91 : Protocole de l'expérience d'insertion de pâtes de ciment frais dans des cultures de boues activées hydrogénotrophes.	179
Figure 92 : Effet de l'ajout ou non de pâtes de ciment frais sur les évolutions du pH (A), des concentrations en nitrates et en nitrites (B). Conditions expérimentales : deux bioréacteurs séquentiels, lixiviat de ciment, bactéries issues de boues activées, 50 à 150 mM de nitrates, 270 cm ² /L de pâte de ciment frais, 1 bar de 100% d'H ₂ , pH 9,5 à 10,2.	180
Figure 93 : Effet de l'ajout (A) ou non (B) de pâtes de ciment frais sur les évolutions des concentrations en nitrates et en nitrites réduites conditions expérimentales : deux bioréacteurs séquentiels, lixiviat de ciment, bactéries issues de boues activées, 50 à 150 mM de nitrates, 0 ou 270 cm ² /L de pâte de ciment frais, 1 bar de 100% d'H ₂ , pH 9,5 à 10,2.	181
Figure 94 : (A) Observation MEB en SEI d'une pâte de ciment rincée à l'eau. Observation MEB en SEI (B) et en BSE (C) des dépôts fixés sur le filtre. (D) Tableau de la composition chimique des dépôts fixés sur le filtre.	182
Figure 95 : Effet de l'ajout ou non de pâtes de ciment frais sur la distribution des espèces bactériennes au jour 70. Conditions expérimentales : deux bioréacteurs séquentiels, lixiviat de ciment, 50 à 150 mM de nitrates, 0 ou 270 cm ² /L de pâte de ciment frais, 1 bar de 100% d'H ₂ , pH 9,5 à 10,2.	183
Figure 96 : Protocole de l'expérience avec ajout d'acier d'armature à béton dans des cultures hydrogénotrophes.	185
Figure 97 : Comparaison d'un contrôle abiotique avec acier et de deux cultures bactériennes avec ou sans acier. Effet de l'ajout ou non d'acier sur les évolutions du pH (A), de la concentration en carbonates (B), de la DO (C), des concentrations en nitrates et en nitrites dans les cultures bactériennes (E), des concentrations en nitrates et en nitrites dans le contrôle abiotique (F). (D) Photographie de la culture avec acier au jour 14 et du contrôle abiotique au jour 35. Conditions expérimentales : trois réacteurs batch, absence de bactéries ou bactéries pré-acclimatées issues de boues activées, lixiviat de ciment, 10 mM de nitrates, 0 ou 130 cm ² /L d'acier d'armature, 1 bar de 100% d'H ₂ , pH 9.	186
Figure 98 : Effet de l'ajout ou non d'acier d'armature sur la distribution des ordres bactériens (A), et des espèces bactériennes (B). Conditions expérimentales : deux bioréacteurs batch, bactéries pré-acclimatées issues de boues activées, lixiviat de ciment, 10 mM de nitrates, 0 ou 130 cm ² /L d'acier d'armature, 1 bar de 100% d'H ₂ , pH 9.	188

Figure 99 : Protocole de l'expérience avec ajout d'acier d'armature à béton dans des cultures hétérotrophes.	190
Figure 100 : Observation par spectroscopie Raman de la surface d'une tige d'acier extraite de la culture de la culture avec acier au jour 0 et 94.	190
Figure 101 : Effet de l'ajout ou non d'acier d'armature sur les évolutions du pH (A), de la DO (B), des concentrations en nitrates et en nitrites (C), des concentrations en nitrates et en nitrites réduites (D). Conditions expérimentales : deux bioréacteurs séquentiels, bactéries pré-acclimatées issues de boues activées, lixiviat de ciment, 50 à 400 mM de nitrates, 0 ou 130 cm ² /L d'acier d'armature, 20 mM d'acétate, pH 9.	191
Figure 102 : Exemple de mécanisme de catalyse surfacique par un oxyde de fer, inspiré de [156] : catalyse de la magnétite lors de la réduction des nitrates par le Fe ⁰	193
Figure 103 : Protocole de l'expérience avec ajout d'acier d'armature et de pâtes de ciment frais dans des cultures mixotrophiques.	194
Figure 104 : Influence de l'élévation de 50 à 400 mM de la concentration en nitrates en présence d'acier d'armature et de pâte de ciment sur les évolutions du pH (A), des concentrations en nitrates et nitrites (B), et des concentrations en nitrates et en nitrites réduites (C). Suivi entre le jour 0 et le jour 14. Conditions expérimentales : trois bioréacteurs séquentiels à pH 9, 10 et 11, bactéries pré-acclimatées issues de boues activées, lixiviat de ciment, 20 mM d'acétate, 130 cm ² /L d'acier d'armature, 160 cm ² /L de pâte de ciment frais, 1 bar de 100% d'H ₂	195
Figure 105 : Influence de l'élévation de 50 à 400 mM de la concentration en nitrates en présence d'acier d'armature et de pâte de ciment sur les évolutions du pH (A), et des concentrations en nitrates et nitrites (B). Suivi sur la deuxième partie de l'expérience entre le jour 14 et le jour 108. Conditions expérimentales: deux bioréacteurs séquentiels à pH 9 et 11 alimentés avec 1 bar de 100% d'H ₂ , un bioréacteur séquentiel à pH 9 alimenté avec 1 bar de 100% de N ₂ , bactéries pré-acclimatées issues de boues activées, lixiviat de ciment, 20 mM d'acétate, 130 cm ² /L d'acier d'armature, 160 cm ² /L de pâte de ciment frais.	196
Figure 106 : Influence de l'élévation de 50 à 400 mM de la concentration en nitrates en présence d'acier d'armature et de pâtes ciment sur les évolutions des concentrations en nitrates et nitrites réduites de la culture à pH 9 avec N ₂ (A), à pH 9 avec H ₂ (B), à pH 11 avec H ₂ (C). Suivi sur la deuxième partie de l'expérience entre le jour 14 et le jour 108. Conditions expérimentales : deux bioréacteurs séquentiels à pH 9 et 11 alimentés avec 1 bar de 100% d'H ₂ , un bioréacteur séquentiel à pH 9 alimenté avec 1 bar de 100% de N ₂ , bactéries pré-acclimatées issues de boues activées, lixiviat de ciment, 20 mM d'acétate, 130 cm ² /L d'acier d'armature, 160 cm ² /L de pâte de ciment frais.	197
Figure 107 : (A) Photographie au jour 108 des pâtes de ciment de la culture à pH 9 avec N ₂ et de la culture à pH 9 avec H ₂ . (B) Photographie au jour 108 des pâtes de ciment de la culture à pH 11. (C) Photographie au jour 108 des tiges d'acier de la culture à pH 9 avec N ₂ . (D) Photographie à gauche d'une tige d'acier non utilisée et à droite d'une tige d'acier extraite au jour 108 dans le réacteur à pH 9 avec H ₂ . Expérience d'élévation de 50 à 400 mM de la concentration en nitrates en présence d'acier d'armature et de pâtes ciment.	199
Figure 108 : Observation par spectroscopie Raman de la surface d'une tige d'acier extraite de la culture à pH 9 (H ₂) entre le jour 0 et le jour 108.	200
Figure 109 : Comparaison par spectroscopie Raman d'un point corrodé ou de la surface saine ou native (i.e. non corrodée) d'une tige d'acier extraite de la culture à pH 9 (H ₂) au jour 108.	200
Figure 110 : Observation MEB en BSE et en ISE, et tableau de la composition chimique d'une pâte de ciment extraite au jour 108 de la culture à pH 9 (H ₂).	201
Figure 111 : Observation MEB en BSE et en ISE, et tableau de la composition chimique d'une pâte de ciment extraite au jour 108 de la culture à pH 9 (H ₂), puis lavée à l'eau distillée.	202

Figure 112 : Schéma de synthèse des différents mécanismes selon lesquels l'acier pourrait jouer un rôle dans la réduction des nitrates.....	204
Figure 113 : Synthèse des gammes de pH et de concentrations en nitrates dans lesquelles les bactéries issues de boues activées ont pu réduire les nitrates ou survivre en présence (A) d'acétate, (B) de dihydrogène.	208
Figure 114 : Synthèses des gammes de pH et de concentrations en nitrates explorées dans la bibliographie et dans les travaux de la thèse.....	210

REFERENCES

1. Andra Inventaire national des matières et déchets radioactifs Available online: <https://inventaire.andra.fr/> (accessed on May 6, 2019).
2. Andra *Inventaire national des matières et des déchets radioactifs*; Report of the Andra, 2019;
3. Andra Le Centre de Meuse/Haute-Marne de l'Andra Available online: <https://meusehautemarne.andra.fr/> (accessed on Sep 5, 2019).
4. Albrecht, A.; Bertron, A.; Libert, M. Microbial Catalysis of Redox Reactions in Concrete Cells of Nuclear Waste Repositories: A Review and Introduction. In *Cement-Based Materials for Nuclear Waste Storage*; 2013; pp. 147–159.
5. Kumar, A.; Vittal Rao, T.V.; Mukerjee, S.K.; Vaidya, V.N. Recycling of chemicals from alkaline waste generated during preparation of UO₃ microspheres by sol–gel process. *J. Nucl. Mater.* **2006**, *350*, 254–263, doi:10.1016/J.JNUCMAT.2006.01.009.
6. Andra Les déchets radioactifs - Classification Available online: <http://www.andra.fr/pages/fr/menu1/les-dechets-radioactifs/comment-sont-classes-les-dechets-radioactifs-r/les-dechets-de-moyenne-activite-a-vie-longue--ma-vl--66.html> (accessed on Nov 25, 2019).
7. Albrecht, A.; Bertron, A.; Blin, V.; Dagnelie, R.; Erable, B.; Truche, L. *Comportement chimique et transfert dans des environnements / ouvrages à physico-chimie complexe*; Internal report of the Andra, 2014;
8. Durban, N.; Erable, B.; Bertron, A. *Objectif 8 Déchets organiques - Stabilité biogéochimique des composés organiques dissous*; Internal report of the Andra, 2018;
9. Francis, C.W.; Hatcher, C.W. Biological denitrification of high-nitrates wastes generated in the nuclear industry. *Environ. Sci. Div.* **1980**.
10. Albina, P.; Durban, N.; Bertron, A.; Albrecht, A.; Robinet, J.-C.; Erable, B. Influence of Hydrogen Electron Donor, Alkaline pH, and High Nitrate Concentrations on Microbial Denitrification: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 5163, doi:10.3390/ijms20205163.
11. Swanson, J.S.; Cherkouk, A.; Arnold, T.; Meleshyn, A.; Reed, D.T. *The Microbiology of Subsurface, Salt-Based Nuclear Waste Repositories: Using Microbial Ecology, Bioenergetics, and Projected Conditions to Help Predict Microbial Effects on Repository Performance*; Report of the Los Alamos National Laboratory, NM (United States), 2016;
12. Stroes-Gascoyne, S.; Sergeant, C.; Schippers, A.; Hamon, C.J.; Nèble, S.; Vesvres, M.-H.; Barsotti, V.; Poulain, S.; Le Marrec, C. Biogeochemical processes in a clay formation in situ experiment: Part D – Microbial analyses – Synthesis of results. *Appl. Geochemistry* **2011**, *26*, 980–989, doi:10.1016/J.APGEOCHEM.2011.03.007.
13. Gales, G.; Libert, M.-F.; Sellier, R.; Cournac, L.; Chapon, V.; Heulin, T. Molecular hydrogen from water radiolysis as an energy source for bacterial growth in a basin containing irradiating waste. *FEMS Microbiol. Lett.* **2004**, *240*, 155–162, doi:10.1016/j.femsle.2004.09.025.
14. Wolfram, J.H.; Rogers, R.D. (Robert D.; Gazso, L.G. *Microbial degradation processes in radioactive waste repository and in nuclear fuel storage areas*; Kluwer Academic: NATO Scientific Affairs Division, Brussels, Belgium, 1997; ISBN 9780792344889.
15. Sarró, M.I.; Moreno, D.A.; Chicote, E.; Lorenzo, P.I.; García, A.M.; Montero, F. Biofouling on austenitic stainless steels in spent nuclear fuel pools. *Mater. Corros.* **2003**, *54*, 535–540, doi:10.1002/maco.200390117.
16. Albrecht, A. *Biogeochemical reaction and transport phenomena in cells for long-lived intermediate-level waste; Experimental and mathematical treatment of their impact on waste cell redox conditions. Example relevant for bituminous waste*; Internal report of the Andra, 2008;
17. Alquier, M.; Kassim, C.; Erable, B.; Bertron, A.; Jacquemet, N.; Sablayrolles, C.; Albasi, C.; Basseguy, R.; Escadeillas, G.; Strehaiano, P.; et al. *Etudes expérimentales de la réactivité des nitrates à l'interface bitume – eau cimentaire – ciment en conditions biotiques*; Internal report of the Andra, 2012;
18. Rafrafi, Y.; Ranaivomanana, H.; Erable, B.; Bertron, A.; Kassim, C.; Sablayrolles, C.; Albasi, C.; Basseguy, R.; Escadeillas, G.; Vignoles, M. *Bio-réactivité des nitrates en milieu cimentaire en*

- présence de matière organique et / ou d'H₂ – Exploitation du dispositif pilote et prise en compte de la corrosion*; Internal report of the Andra, 2013;
19. Rafrafi, Y.; Bertron, A.; Albrecht, A.; Erable, B. Surface and bacterial reduction of nitrate at alkaline pH: Conditions comparable to a nuclear waste repository. *Int. Biodeterior. Biodegradation* **2015**, *101*, 12–22, doi:10.1016/j.ibiod.2015.03.013.
 20. Alquier, M.; Kassim, C.; Bertron, A.; Sablayrolles, C.; Rafrafi, Y.; Albrecht, A.; Erable, B. Halomonas desiderata as a bacterial model to predict the possible biological nitrate reduction in concrete cells of nuclear waste disposals. *J. Environ. Manage.* **2014**, *132*, 32–41, doi:10.1016/j.jenvman.2013.10.013.
 21. Rafrafi, Y.; Durban, N.; Bertron, A.; Albrecht, A.; Robinet, J.; Erable, B. Use of a continuous-flow bioreactor to evaluate nitrate reduction rate of Halomonas desiderata in cementitious environment relevant to nuclear waste deep repository. *Biochem. Eng. J.* **2017**, *125*, 161–170, doi:10.1016/j.bej.2017.05.016.
 22. Durban, N.; Rafrafi, Y.; Rizoulis, A.; Albrecht, A.; Robinet, J.-C.; Lloyd, J.R.; Bertron, A.; Erable, B. Nitrate and nitrite reduction at high pH in a cementitious environment by a microbial microcosm. *Int. Biodeterior. Biodegradation* **2018**, *134*, 93–102, doi:10.1016/j.ibiod.2018.08.009.
 23. Alquier, M.; Kassim, C.; Bertron, A.; Rafrafi, Y.; Sablayrolles, C.; Albrecht, A.; Erable, B. Nitrate reducing bacterial activity in concrete cells of nuclear waste disposal. In Proceedings of the Long-Term Performance of Cementitious Barriers and Reinforced Concrete in Nuclear Power Plant and Radioactive Waste Storage and Disposal; EPJ Wep of Conferences, Ed.; 2013; Vol. 56.
 24. Bertron, A.; Jacquemet, N.; Erable, B.; Sablayrolles, C.; Escadeillas, G.; Albrecht, A. Reactivity of nitrate and organic acids at the concrete – bitumen interface of a nuclear waste repository cell. *Nucl. Eng. Des.* **2014**, *268*, 51–57, doi:10.1016/j.nucengdes.2013.11.085.
 25. Bertron, A. Understanding interactions between cementitious materials and microorganisms: a key to sustainable and safe concrete structures in various contexts. *Mater. Struct.* **2014**, *47*, 1787–1806, doi:10.1617/s11527-014-0433-1.
 26. Tang, Y.; Zhou, C.; Ziv-El, M.; Rittmann, B.E. A pH-control model for heterotrophic and hydrogen-based autotrophic denitrification. *Water Res.* **2011**, *45*, 232–240, doi:10.1016/j.watres.2010.07.049.
 27. Baumann, B.; van der Meer, J.R.; Snozzi, M.; Zehnder, A.J. Inhibition of denitrification activity but not of mRNA induction in Paracoccus denitrificans by nitrite at a suboptimal pH. *J. Microbiol.* **1997**, *72*, 183–9.
 28. Chih-Cheng, C.; Szu-kung, T. The optimum condition for autotrophic denitrification by Paracoccus denitrificans. *J. Chinese Inst. Environ. Eng.* **1998**, *Vol. 8*, 233–238.
 29. Glass, C.; Silverstein, J.; Oh, J. Inhibition of denitrification in activated sludge by nitrite. *Water Environ. Fed.* **1997**, *69*, 1086–1093.
 30. Jetten, M.S.M. New pathways for ammonia conversion in soil and aquatic systems. *Plant Soil* **2001**, *230*, 9–19, doi:10.1023/A:1004683807250.
 31. Akunna, J.C.; Bizeau, C.; Moletta, R. Denitrification in anaerobic digesters: Possibilities and influence of wastewater COD/N-NO_x ratio. *Environ. Technol.* **1992**, *13*, 825–836, doi:10.1080/09593339209385217.
 32. Karanasios, K.A.; Vasiliadou, I.A.; Pavlou, S.; Vayenas, D. V Hydrogenotrophic denitrification of potable water: A review. *J. Hazard. Mater.* **2010**, *180*, 20–37, doi:10.1016/j.jhazmat.2010.04.090.
 33. Rizoulis, A.; Steele, H.M.; Morris, K.; Lloyd, J.R. The potential impact of anaerobic microbial metabolism during the geological disposal of intermediate-level waste. *Environ. Sci.* **2012**, *76*, 3261–3270, doi:10.1180/minmag.2012.076.8.39.
 34. Bassil, N.M.; Bryan, N.; Lloyd, J.R. Microbial degradation of isosaccharinic acid at high pH. *ISME J.* **2014**, *9*, 310–320, doi:10.1038/ismej.2014.125.
 35. Crack, J.C.; Hutchings, M.I.; Thomson, A.J.; Le, N.E. Biochemical properties of Paracoccus denitrificans FnrP : reactions with molecular oxygen and nitric oxide. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.*

- 2016**, 71–82, doi:10.1007/s00775-015-1326-7.
36. Van Spanning, R.J.M.; Richardson, D.J. Introduction to the Biochemistry and Molecular Biology of Denitrification. *Biol. Nitrogen Cycle* **2007**, 3–20, doi:10.1016/B978-044452857-5.50002-3.
 37. Dhamole, P.B.; Nair, R.R.; Lele, S.S. Denitrification of Highly Alkaline Nitrate Waste Using Adapted Sludge. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2008**, 151, 433–440, doi:10.1007/s12010-008-8211-6.
 38. Miao, Y.; Liao, R.; Zhang, X.X.; Liu, B.; Li, Y.; Wu, B.; Li, A. Metagenomic insights into salinity effect on diversity and abundance of denitrifying bacteria and genes in an expanded granular sludge bed reactor treating high-nitrate wastewater. *Chem. Eng. J.* **2015**, 277, 116–123, doi:10.1016/j.cej.2015.04.125.
 39. Rezanía, B.; Cicek, N.; Oleszkiewicz, J.A. Kinetics of Hydrogen-Dependent Denitrification Under Varying pH and Temperature Conditions. *Biotechnol. Bioeng.* **2005**, 92, 1–7, doi:10.1002/bit.20664.
 40. Mohsenipour, M.; Shahid, S.; Ebrahimi, K. Removal techniques of nitrate from water. *Asian J. Chem.* **2014**, 26, 7881–7886, doi:10.14233/ajchem.2014.17136.
 41. Kapoor, A.; Viraraghavan, T. Nitrate Removal From Drinking Water—Review. *J. Environ. Eng.* **1997**, 123, 371–380, doi:10.1061/(ASCE)0733-9372(1997)123:4(371).
 42. Fernández-Nava, J.; Marañón, E.; Soons, J.; Castrillón, L. Denitrification of wastewater containing high nitrate and calcium concentrations. *Bioresour. Technol.* **2008**, 99, 7976–7981, doi:10.1016/j.biortech.2008.03.048.
 43. Marecik, R.; Biegańska-Marecik, R.; Cyplik, P.; Ławniczak, Ł.; Chrzanowski, Ł. Phytoremediation of Industrial Wastewater Containing Nitrates, Nitroglycerin, and Nitroglycol. *Polish J. Environ. Stud.* **2013**, 22, 773–780.
 44. Napier, J.; Bustamante, R.B. In-situ biodenitrification of the S-3 ponds. *Environ. Prog.* **1988**, 7, 13–16.
 45. Denariáz, G.; Payne, W.J.; Gall, J.L.E. A Halophilic Denitrifier, *Bacillus halodenitrificans* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **1989**, 39, 145–151.
 46. Yarbrough, J.M.; Rake, J.B.; Eagon, R.G. Bacterial Inhibitory Effects of Nitrite : Inhibition of Active Transport , But Not of Group Translocation , and of Intracellular Enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.* **1980**, 39, 831–834.
 47. Cua, L.S.; Stein, L.Y. Effects of nitrite on ammonia-oxidizing activity and gene regulation in three ammonia-oxidizing bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **2011**, 169–175, doi:10.1111/j.1574-6968.2011.02277.x.
 48. Custer, M.C.; Hansen, J.N. Lactoferrin and Transferrin Fragments React with Nitrite To Form an Inhibitor of *Bacillus cereus* Spore Outgrowth. *Appl. Environ. Microbiol.* **1983**, 45, 942–949.
 49. Park, H.I.; Choi, Y.J.; Pak, D. Autohydrogenotrophic denitrifying microbial community in a glass beads biofilm reactor. *Biotechnol. Lett.* **2005**, 27, 949–953, doi:10.1007/s10529-005-7654-x.
 50. Bai, J.; Zhao, Q.; Wang, J.; Lu, Q.; Ye, X.; Gao, Z. Denitrification potential of marsh soils in two natural saline-alkaline wetlands. *Chinese Geogr. Sci.* **2014**, 24, 279–286, doi:10.1007/s11769-014-0669-2.
 51. Simek, M.; Cooper, J.E. The influence of soil pH on denitrification : progress towards the understanding of this interaction over the last 50 years. *Eur. J. Soil Sci.* **2002**, 345–354.
 52. Ruiz-Romero, E.; Alcántara-Hernández, R.; Cruz-Mondragon, C.; Marsch, R.; Luna-Guido, M.L.; Dendooven, L. Denitrification in extreme alkaline saline soils of the former lake Texcoco. *Plant Soil* **2009**, 319, 247–257, doi:10.1007/s11104-008-9867-y.
 53. Sorokin, D.Y. Is there a limit for high-pH life? *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2005**, 55, 1405–1406, doi:10.1099/ijs.0.63737-0.
 54. Libert, M.; Bildstein, O.; Esnault, L.; Jullien, M.; Sellier, R. Molecular hydrogen : An abundant energy source for bacterial activity in nuclear waste repositories. *Phys. Chem. Earth* **2011**, 36, 1616–1623, doi:10.1016/j.pce.2011.10.010.
 55. Grebliunas, B.D.; Perry, W.L. Carbon limitation of sediment bacterial production and denitrification in high nitrate low carbon systems. *Environ. Earth Sci.* **2016**, 75, 1–9,

- doi:10.1007/s12665-016-5464-1.
56. Pedersen, K. Microbial life in deep granitic rock. *FEMS Microbiol. Rev.* **1997**, *20*, 399–414, doi:10.1111/j.1574-6976.1997.tb00325.x.
 57. Devlin, J.F.; Eedy, R.; Butler, B.J. The effects of electron donor and granular iron on nitrate transformation rates in sediments from a municipal water supply aquifer. *J. Contam. Hydrol.* **2000**, *46*, 81–97, doi:10.1016/S0169-7722(00)00126-1.
 58. Mateju, V.; Krejci, J.; Janoch, T. Biological water denitrification - A review. *Enzym. Microbiol. Technol.* **1992**, *14*.
 59. Ergas, S.J.; Reuss, A.F. Hydrogenotrophic denitrification of drinking water using a hollow fibre membrane bioreactor. *J. Water Supply* **2001**, *50*.
 60. Liu, F.; Huang, G.; Fallowfield, H.; Guan, H.; Zhu, L.; Hu, H. *Study on Heterotrophic-Autotrophic Denitrification Permeable Reactive Barriers (HAD PRBs) for In Situ Groundwater Remediation*; SpringerBriefs in Water Science and Technology; Springer: Berlin, Heidelberg, 2014; ISBN 978-3-642-38153-9.
 61. Chang, C.C.; Tseng, S.K.; Huang, H.K. Hydrogenotrophic denitrification with immobilized *Alcaligenes eutrophus* for drinking water treatment. *Bioresour. Technol.* **1999**, *69*, 53–58, doi:10.1016/S0960-8524(98)00168-0.
 62. Ghafari, S.; Hasan, M.; Aroua, M.K. Improvement of autohydrogenotrophic nitrite reduction rate through optimization of pH and sodium bicarbonate dose in batch experiments. *J. Biosci. Bioeng.* **2009**, *107*, 275–280, doi:10.1016/j.jbiosc.2008.11.008.
 63. Chen, J.; Strous, M. Denitrification and aerobic respiration, hybrid electron transport chains and co-evolution. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **2013**, *1827*, 136–144, doi:10.1016/j.bbabi.2012.10.002.
 64. Kučera, I.; Křivánková, L.; Dadák, V. The role of ubiquinone in linking nitrate reductase and cytochrome o to the respiratory chain of *Paracoccus denitrificans*. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1984**, *765*, 43–47, doi:10.1016/0005-2728(84)90155-5.
 65. Pelmont, J. *Biodégradations et métabolismes: les bactéries pour les technologies de l'environnement*; EDP sciences: Grenoble, 2005; ISBN 286883745X.
 66. Richardson, D.J.; van Spanning, R.J.M. The Prokaryotic Nitrate Reductases. *Biol. Nitrogen Cycle* **2007**, 21–35, doi:10.1016/B978-044452857-5.50003-5.
 67. Suharti de Vries, S.; Pouvreau, L.A.M. Nitric Oxide Reductase: Structural Variations and Catalytic Mechanism. *Biol. Nitrogen Cycle* **2007**, 57–66, doi:10.1016/B978-044452857-5.50005-9.
 68. Zumft, W.G.; Körner, H. Nitrous Oxide Reductases. *Biol. Nitrogen Cycle* **2007**, 67–81, doi:10.1016/B978-044452857-5.50006-0.
 69. Arai, H.; Kodama, T.; Igarashi, Y. Cascade regulation of the two CRP/FNR-related transcriptional regulators (ANR and DNR) and the denitrification enzymes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **1997**, *25*, 1141–1148, doi:10.1046/j.1365-2958.1997.5431906.x.
 70. Silvestrini, M.C.; Falcinelli, S.; Ciabatti, I.; Cutruzzola, F.; Brunori, M. *Pseudomonas aeruginosa* nitrite reductase (or cytochrome oxidase): An overview. *Biochimie* **1994**, *76*, 641–654, doi:10.1016/0300-9084(94)90141-4.
 71. Kuroki, M.; Igarashi, Y.; Ishii, M.; Arai, H. Fine-tuned regulation of the dissimilatory nitrite reductase gene by oxygen and nitric oxide in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol. Rep.* **2014**, *6*, 792–801, doi:10.1111/1758-2229.12212.
 72. Kornaros, M.; Zafiri, C.; Lyberatos, G. Kinetics of denitrification by *Pseudomonas denitrificans* under growth conditions limited by carbon and/or nitrate or nitrite. *Water Environ. Res.* **1996**, *68*, 934–945, doi:10.2175/106143096X127947.
 73. Thomsen, J.K.; Geest, T.; Cox, R.P. Mass Spectrometric Studies of the Effect of pH on the Accumulation of Intermediates in Denitrification by *Paracoccus denitrificans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **1994**, 536–541.
 74. Kucera, I.; Dadak Vladimir; Matyasek Roman The influence of pH on the kinetics of dissimilatory nitrite reduction in *Paracoccus denitrificans*. *Biochim. Biophys. Acta* **1986**, *848*, 1–7.
 75. Van Rijn, J.; Tal, Y.; Barak, Y. Influence of volatile fatty acids on nitrite accumulation by a

- Pseudomonas stutzeri* strain isolated from a denitrifying fluidized bed reactor. *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, *62*, 2615–2620.
76. Li, G.; Vilcherrez, D.; Carvajal-arroyo, J.M.; Sierra-alvarez, R.; Field, J.A. Exogenous nitrate attenuates nitrite toxicity to anaerobic ammonium oxidizing (anammox) bacteria. *Chemosphere* **2016**, *144*, 2360–2367, doi:10.1016/j.chemosphere.2015.11.013.
 77. Glass, C.C.; Silverstein, J. Denitrification Kinetics of High Nitrate Concentration Water : pH Effect on Inhibition and Nitrite Accumulation. *Water Res.* **1998**, *32*, 831–839, doi:10.1016/S0043-1354(97)00260-1.
 78. Wilderer, P.A.; Jones, W.L.; Daub, U. Competition in denitrification systems affecting reduction rate and accumulation of nitrite. *Water Res.* **1987**, *21*, 239–245.
 79. Liessens, J.; Vanbrabant, J.; De Vos, P.; Kersters, K.; Verstraete, W. Mixed culture hydrogenotrophic nitrate reduction in drinking water. *Microb. Ecol.* **1992**, *24*, 271–290, doi:10.1007/BF00167786.
 80. Szekeres, S.; Kiss, I.; Kalman, M.; Soares, M.I.M. Microbial population in a hydrogen-dependent denitrification reactor. *Water Res.* **2002**, *36*, 4088–4094, doi:10.1016/S0043-1354(02)00130-6.
 81. Turk, O.; Mavinic, D.S. Benefits of using selective inhibition to remove nitrogen from highly nitrogenous wastes. *Environ. Technol. Lett.* **1987**, *8*, 419–426, doi:10.1080/09593338709384500.
 82. Bollag, J.-M.; Henninger, N.M. Effects of nitrite toxicity on soil bacteria aerobic and anaerobic conditions. *Soil Biol. Biochem.* **1978**, *10*.
 83. Watts, M.P.; Khijniak, T. V.; Boothman, C.; Lloyd, J.R. Treatment of alkaline Cr(VI)-contaminated leachate with an alkaliphilic metal-reducing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **2015**, *81*, 5511–5518, doi:10.1128/AEM.00853-15.
 84. Banihani, Q.; Sierra-Alvarez, R.; Field, J.A. Nitrate and nitrite inhibition of methanogenesis during denitrification in granular biofilms and digested domestic sludges. *Biodegradation* **2009**, 801–812, doi:10.1007/s10532-009-9268-9.
 85. Marais, J.P.; Therion, J.J.; Mackie, R.I. Effect of nitrate and its reduction products on the growth and activity of the rumen microbial population. *Br. J. Nutr.* **1988**, 301–313.
 86. Hartop, K.R.; Sullivan, M.J.; Giannopoulos, G.; Gates, A.J.; Bond, P.L.; Yuan, Z.; Clarke, T.A.; Rowley, G.; Richardson, D.J. The metabolic impact of extracellular nitrite on aerobic metabolism of *Paracoccus denitrificans*. *Water Res.* **2017**, *113*, 207–214, doi:10.1016/J.WATRES.2017.02.011.
 87. Dhamole, P.B.; Nair, R.R.; Souza, S.F.D.; Lele, S.S. Denitrification of high strength nitrate waste. *Bioresour. Technol.* **2007**, *98*, 247–252, doi:10.1016/j.biortech.2006.01.019.
 88. Blasco, R.; Martínez-Luque, M.; Madrid, M.P.; Castillo, F.; Moreno-Vivián, C. *Rhodococcus sp. RB1* grows in the presence of high nitrate and nitrite concentrations and assimilates nitrate in moderately saline environments. *Arch. Microbiol.* **2001**, *175*, 435–440, doi:10.1007/s002030100285.
 89. Mariáγγελ, L.; Aspé, E.; Martí, M.C.; Roeckel, M. The effect of sodium chloride on the denitrification of saline fishery wastewaters. *Environ. Technol.* **2008**, *Vol 29*, doi:10.1080/09593330802015318.
 90. Dinçer, A.R.; Kargi, F. Salt Inhibition of Nitrification and Denitrification in Saline Wastewater. *Environ. Technol.* **1999**, *20*, doi:10.1080/09593332008616912.
 91. Glass, C.; Silverstein, J. Denitrification of high-nitrate, high-salinity wastewater. *Water Res.* **1999**, *33*, 223–229, doi:10.1016/S0043-1354(98)00177-8.
 92. Liao, R.; Shen, K.; Li, A.-M.; Shi, P.; Li, Y.; Shi, Q.; Wang, Z. High-nitrate wastewater treatment in an expanded granular sludge bed reactor and microbial diversity using 454 pyrosequencing analysis. *Bioresour. Technol.* **2013**, *134*, 190–197, doi:10.1016/J.BIORTECH.2012.12.057.
 93. Heimann, A.; Jakobsen, R.; Blodau, C. Energetic Constraints on H₂-Dependent Terminal Electron Accepting Processes in Anoxic Environments: A Review of Observations and Model Approaches. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, *44*, 24–33, doi:10.1021/es9018207.
 94. Schwartz, E.; Fritsch, J.; Friedrich, B. H₂-Metabolizing Prokaryotes. In *The Prokaryotes*; Springer:

- Berlin, Heidelberg, 2013; pp. 119–199.
95. Burgdorf, T.; Lenz, O.; Buhrke, T.; van der Linden, E.; Jones, A.K.; Albracht, S.P.J.; Friedrich, B. [NiFe]-hydrogenases of *Ralstonia eutropha* H16: modular enzymes for oxygen-tolerant biological hydrogen oxidation. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *10*, 181–96, doi:10.1159/000091564.
 96. Winkler, M.; Esselborn, J.; Happe, T. Molecular basis of [FeFe]-hydrogenase function: An insight into the complex interplay between protein and catalytic cofactor. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **2013**, *1827*, 974–985, doi:10.1016/j.bbabi.2013.03.004.
 97. Horch, M.; Lauterbach, L.; Lenz, O.; Hildebrandt, P.; Zebger, I. NAD(H)-coupled hydrogen cycling–structure–function relationships of bidirectional [NiFe] hydrogenases. *FEBS Lett.* **2012**, *586*, 545–556, doi:10.1016/j.febslet.2011.10.010.
 98. Seigo, S.; Oliver, P.; Sonja, V.; Michael, S.; Stagni, M.S. The Crystal Structure of [Fe]-Hydrogenase Reveals the Geometry of the Active Site. *Science* **2008**, *321*, 572–576, doi:10.1126.
 99. Laska, S.; Kletzin, A. Improved purification of the membrane-bound hydrogenase–sulfur-reductase complex from thermophilic archaea using ϵ -aminocaproic acid-containing chromatography buffers. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **2000**, *737*, 151–160, doi:10.1016/S0378-4347(99)00362-X.
 100. Korbas, M.; Vogt, S.; Meyer-Klaucke, W.; Bill, E.; Lyon, E.J.; Thauer, R.K.; Shima, S. The iron-sulfur cluster-free hydrogenase (Hmd) is a metalloenzyme with a novel iron binding motif. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 30804–13, doi:10.1074/jbc.M605306200.
 101. Lim, J.K.; Kang, S.G.; Lebedinsky, A. V.; Lee, J.-H.; Lee, H.S. Identification of a Novel Class of Membrane-Bound [NiFe]-Hydrogenases in *Thermococcus onnurineus* NA1 by In Silico Analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 6286, doi:10.1128/AEM.00123-10.
 102. Liot, Q.; Constant, P. Breathing air to save energy – new insights into the ecophysiological role of high-affinity [NiFe]-hydrogenase in *Streptomyces avermitilis*. *Microbiologyopen* **2016**, *5*, 47, doi:10.1002/MBO3.310.
 103. Infossi, P.; Lojou, E.; Chauvin, J.-P.; Herbette, G.; Brugna, M.; Giudici-Ortoni, M.-T. Aquifex aeolicus membrane hydrogenase for hydrogen biooxidation: Role of lipids and physiological partners in enzyme stability and activity. *Int. J. Hydrogen Energy* **2010**, *35*, 10778–10789, doi:10.1016/J.IJHYDENE.2010.02.054.
 104. Islam, Z.F.; Cordero, P.R.F.; Feng, J.; Chen, Y.-J.; Bay, S.K.; Jirapanjawan, T.; Gleadow, R.M.; Carere, C.R.; Stott, M.B.; Chiri, E.; et al. Two Chloroflexi classes independently evolved the ability to persist on atmospheric hydrogen and carbon monoxide. *ISME J.* **2019**, *13*, 1801–1813, doi:10.1038/s41396-019-0393-0.
 105. Cassier-Chauvat, C.; Veaudor, T.; Chauvat, F. Advances in the function and regulation of hydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 19938–51, doi:10.3390/ijms151119938.
 106. Mei, N.; Postec, A.; Monnin, C.; Pelletier, B.; Payri, C.E.; Ménez, B.; Frouin, E.; Ollivier, B.; Erauso, G.; Quéméneur, M. Metagenomic and PCR-Based Diversity Surveys of [FeFe]-Hydrogenases Combined with Isolation of Alkaliphilic Hydrogen-Producing Bacteria from the Serpentinite-Hosted Prony Hydrothermal Field, New Caledonia. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 1301, doi:10.3389/fmicb.2016.01301.
 107. Sim, E.; Vignais, P.M. Comparison of the membrane-bound and detergent-solubilised hydrogenase from *paracoccus denitrificans* isolation of the hydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta - Enzymol.* **1979**, *570*, 43–55.
 108. Knuttel, K.; Schneider, K.; Schlegel, H.G.; Muller, A. The membrane-bound hydrogenase from *Paracoccus denitrificans*. Purification and molecular characterization. *Eur. J. Biochem.* **1989**, *179*, 101–108, doi:10.1111/j.1432-1033.1989.tb14526.x.
 109. Mao, Y.; Xia, Y.; Wang, Z.; Zhang, T. Reconstructing a *Thauera* genome from a hydrogenotrophic-denitrifying consortium using metagenomic sequence data. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 6885–6895, doi:10.1007/s00253-014-5756-x.
 110. Zhang, Y.; Zhong, F.; Xia, S.; Wang, X.; Li, J. Autohydrogenotrophic denitrification of drinking

- water using a polyvinyl chloride hollow fiber membrane biofilm reactor. *J. Hazard. Mater.* **2009**, *170*, 203–209, doi:10.1016/j.jhazmat.2009.04.114.
111. Yoon, J.-H.; Kang, S.-J.; Ryu, S.H.; Jeon, C.O.; Oh, T.-K. *Hydrogenophaga bisanensis* sp. nov., isolated from wastewater of a textile dye works. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2008**, *58*, 393–397, doi:10.1099/ijs.0.65271-0.
 112. Sargent, F. The Model [NiFe]-Hydrogenases of *Escherichia coli*. *Adv. Microb. Physiol.* **2016**, *68*, 433–507, doi:10.1016/bs.ampbs.2016.02.008.
 113. Schäfer, C.; Friedrich, B.; Lenz, O. Novel, oxygen-insensitive group 5 [NiFe]-hydrogenase in *Ralstonia eutropha*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2013**, *79*, 5137–45, doi:10.1128/AEM.01576-13.
 114. Rey, F.E.; Oda, Y.; Harwood, C.S. Regulation of uptake hydrogenase and effects of hydrogen utilization on gene expression in *Rhodospseudomonas palustris*. *J. Bacteriol.* **2006**, *188*, 6143–52, doi:10.1128/JB.00381-06.
 115. Schut, G.J.; Adams, M.W.W. The iron-hydrogenase of *Thermotoga maritima* utilizes ferredoxin and NADH synergistically: a new perspective on anaerobic hydrogen production. *J. Bacteriol.* **2009**, *191*, 4451–7, doi:10.1128/JB.01582-08.
 116. Ballor, N.R.; Paulsen, I.; Leadbetter, J.R. Genomic Analysis Reveals Multiple [FeFe] Hydrogenases and Hydrogen Sensors Encoded by Treponemes from the H₂-Rich Termite Gut. *Microb. Ecol.* **2012**, *63*, 282–294, doi:10.1007/s00248-011-9922-8.
 117. Ash, P.A.; Liu, J.; Coutard, N.; Heidary, N.; Horch, M.; Gudim, I.; Simler, T.; Zebger, I.; Lenz, O.; Vincent, K.A. Electrochemical and Infrared Spectroscopic Studies Provide Insight into Reactions of the NiFe Regulatory Hydrogenase from *Ralstonia eutropha* with O₂ and CO. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119*, 13807–13815, doi:10.1021/acs.jpcc.5b04164.
 118. Burgdorf, T.; De Lacey, A.L.; Friedrich, B. Functional analysis by site-directed mutagenesis of the NAD(+)-reducing hydrogenase from *Ralstonia eutropha*. *J. Bacteriol.* **2002**, *184*, 6280–8, doi:10.1128/jb.184.22.6280-6288.2002.
 119. Nesbit, A.D.; Fleischhacker, A.S.; Teter, S.J.; Kiley, P.J. ArcA and AppY antagonize IscR repression of hydrogenase-1 expression under anaerobic conditions, revealing a novel mode of O₂ regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **2012**, *194*, 6892–9, doi:10.1128/JB.01757-12.
 120. Dijkhuizen, L.; Harder, W. Current views on the regulation of autotrophic carbon dioxide fixation via the Calvin cycle in bacteria. *J. Microbiol.* **1984**, *50*, 473–487.
 121. Fuchs, G. Alternative Pathways of Carbon Dioxide Fixation: Insights into the Early Evolution of Life? *Annu. Rev. Microbiol.* **2011**, *65*, 631–658, doi:10.1146/annurev-micro-090110-102801.
 122. Blombach, B.; Takors, R. CO₂ – intrinsic product, essential substrate, and regulatory trigger of microbial and mammalian production processes. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2015**, *3*, 1–11, doi:10.3389/fbioe.2015.00108.
 123. Tong, L. Structure and function of biotin-dependent carboxylases. *Cell. Mol. Life Sci.* **2013**, *70*, 863–91, doi:10.1007/s00018-012-1096-0.
 124. Chollet, R.; Vidal, J.; O’Leary, M.H. Phosphoenolpyruvate Carboxylase: A Ubiquitous, Highly Regulated Enzyme in Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1996**, *47*, 273–298, doi:10.1146/annurev.arplant.47.1.273.
 125. Vasiliadou, I.A.; Siozios, S.; Papadas, I.T.; Bourtzis, K.; Pavlou, S.; Vayenas, D.V. Kinetics of pure cultures of hydrogen-oxidizing denitrifying bacteria and modeling of the interactions among them in mixed cultures. *Biotechnol. Bioeng.* **2006**, *95*, 513–525, doi:10.1002/bit.21031.
 126. Ghafari, S.; Hasan, M.; Aroua, M.K. Effect of carbon dioxide and bicarbonate as inorganic carbon sources on growth and adaptation of autohydrogenotrophic denitrifying bacteria. *J. Hazard. Mater.* **2009**, *162*, 1507–1513, doi:10.1016/j.jhazmat.2008.06.039.
 127. Epsztein, R.; Beliavski, M.; Tarre, S.; Green, M. High-rate hydrogenotrophic denitrification in a pressurized reactor. **2016**, *286*, 578–584, doi:10.1016/j.cej.2015.11.004.
 128. Lee, J.W.; Lee, K.H.; Park, K.Y.; Maeng, S.K. Hydrogenotrophic denitrification in a packed bed reactor : Effects of hydrogen-to-water flow rate ratio. *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 3940–3946, doi:10.1016/j.biortech.2010.01.022.

129. Vasiliadou, I.A.; Pavlou, S.; Vayenas, D. V. A kinetic study of hydrogenotrophic denitrification. *Process Biochem.* **2006**, *41*, 1401–1408, doi:10.1016/j.procbio.2006.02.002.
130. Lee, K.-C.; Rittmann, B.E. Effects of pH and precipitation on autohydrogenotrophic denitrification using the hollow-fiber membrane-biofilm reactor. *Water Res.* **2003**, *37*, 1551–1556, doi:10.1016/S0043-1354(02)00519-5.
131. Timmermans, P.; Van Haute, A. Denitrification with methanol Fundamental study of the growth and denitrification capacity of *Hyphomicrobium sp.* *Water Res.* **1983**, *17*, 1249–1255.
132. Blaszczyk, M. Effect of Medium Composition on the Denitrification of Nitrate by *Paracoccus denitrificans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **1993**, *59*, 3951–3953.
133. Horikoshi, K. Alkaliphiles : Some Applications of Their Products for Biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1999**, *63*, 735–750.
134. Janto, B.; Ahmed, A.; Ito, M.; Liu, J.; Hicks, D.B.; Pagni, S.; Fackelmayer, O.J.; Smith, T.; Earl, J.; Elbourne, L.D.H.; et al. The genome of alkaliphilic *Bacillus pseudofirmus* OF4 reveals adaptations that support the ability to grow in an external pH range from 7.5 to 11.4. *Environ. Microbiol.* **2012**, *13*, 3289–3309, doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02591.x.The.
135. Thorpe, C.L.; Law, G.T.W.; Boothman, C.; Lloyd, J.R.; Burke, I.T.; Morris, K. The Synergistic Effects of High Nitrate Concentrations on Sediment Bioreduction. *Geomicrobiol. J.* **2012**, *29*, 484–493, doi:10.1080/01490451.2011.581332.
136. Li, W.; Li, C.; Lin, X.; Liu, Y.; Abbas, G.; Zheng, P. Effects of operation mode on self-alkalization of high-load denitrifying reactor. *Bioresour. Technol.* **2015**, *187*, 282–287, doi:10.1016/j.biortech.2015.03.063.
137. Pedersen, K.; Nilsson, E.; Arlinger, J.; Hallbeck, L.; O’Neill, A. Distribution, diversity and activity of microorganisms in the hyper-alkaline spring waters of Maqarin in Jordan. *Extremophiles* **2004**, *8*, 151–164, doi:10.1007/s00792-004-0374-7.
138. Roadcap, G.S.; Sanford, R.A.; Jin, Q.; Pardinias, R.; Bethke, C.M. Extremely Alkaline (pH > 12) Ground Water Hosts Diverse Microbial Community. *Ground Water* **2006**, *44*, 511–517, doi:10.1111/j.1745-6584.2006.00199.x.
139. Preiss, L.; Hicks, D.B.; Suzuki, S.; Meier, T.; Krulwich, T.A. Alkaliphilic bacteria with impact on industrial applications , concepts of early life forms , and bioenergetics of ATP synthesis. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2015**, *3*, 1–16, doi:10.3389/fbioe.2015.00075.
140. Sturr, M.G.; Guffanti, A.A.; Krulwich, T.A. Growth and Bioenergetics of Alkaliphilic *Bacillus finmus* OF4 in Continuous Culture at High pH. *J. Bacteriol. Microbiol.* **1994**, *176*, 3111–3116.
141. Ling, H.L.; Rahmat, Z.; Bakar, F.D.A.; Murad, A.M.A.; Illias, R.M. Secretome analysis of alkaliphilic bacterium *Bacillus lehensis* G1 in response to pH changes. *Microbiol. Res.* **2018**, *215*, 46–54, doi:10.1016/J.MICRES.2018.06.006.
142. Shirai, T.; Suzuki, A.; Yamane, T.; Ashida, T.; Kobayashi, T.; Hitomi, J.; Ito, S. High-resolution crystal structure of M-protease: phylogeny aided analysis of the high-alkaline adaptation mechanism. *Protein Eng.* **1997**, *10*, 627–634.
143. Shirai, T.; Igarashi, K.; Ozawa, T.; Hagihara, H.; Kobayashi, T.; Ozaki, K.; Ito, S. Ancestral Sequence Evolutionary Trace and Crystal Structure Analyses of Alkaline α -Amylase From *Bacillus sp.* KSM-1378 to Clarify the Alkaline Adaptation Process of Proteins. *Proteins* **2007**, *610*, 600–610, doi:10.1002/prot.
144. Dubnovitsky, A.P.; Kapetaniou, E.G.; Papageorgiou, A.C. Enzyme adaptation to alkaline pH : Atomic resolution (1.08 Å) structure of phosphoserine aminotransferase from *Bacillus alcalophilus*. *Protein Sci.* **2005**, *14*, 97–110, doi:10.1110/ps.041029805.Protein.
145. Shapovalova, A.A.; Khijniak, T. V; Tourova, T.P.; Muyzer, G.; Sorokin, D.Y. Heterotrophic denitrification at extremely high salt and pH by haloalkaliphilic Gammaproteobacteria from hypersaline soda lakes. *Extremophiles* **2008**, *12*, 619–625, doi:10.1007/s00792-008-0166-6.
146. Yoshida, T. Acetate biodegradation by anaerobic microorganisms at high pH and high calcium concentration. *J. Environ. Radioact.* **2011**, *102*, 170–177, doi:10.1016/j.jenvrad.2010.11.008.
147. Hall-Stoodley, L.; Costerton, J.W.; Stoodley, P. Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, *2*, 95–108, doi:10.1038/nrmicro821.

148. Coetser, S.E.; Cloete, T.E. Biofouling and Biocorrosion in Industrial Water Systems. *Crit. Rev. Microbiol.* **2005**, *31*, 213–232, doi:10.1080/10408410500304074.
149. Voegel, C. Impact biochimique des effluents agricoles et agroindustriels sur les structures/ouvrages en béton dans la filière de valorisation par méthanisation (ou codigestion anaérobie), Doctoral thesis, Université de Toulouse, France, 2017.
150. Voegel, C.; Durban, N.; Bertron, A.; Landon, Y.; Erable, B. Evaluation of microbial proliferation on cementitious materials exposed to biogas systems. *Environ. Technol.* **2019**, 1–11.
151. Cote Coy, C. Biocorrosion of carbon steel in water injection systems of the oil and gas industry: new experimental models from the field, Doctoral thesis, Université de Toulouse, France, 2013.
152. Sanhueza, E.; Paredes-Osses, E.; González, C.L.; García, A. Effect of pH in the survival of *Lactobacillus salivarius* strain UCO_979C wild type and the pH acid acclimated variant. *Electron. J. Biotechnol.* **2015**, *18*, 343–346, doi:10.1016/J.EJBT.2015.06.005.
153. Lin, K.-S.; Chang, N.-B.; Chuang, T.-D. Fine structure characterization of zero-valent iron nanoparticles for decontamination of nitrites and nitrates in wastewater and groundwater. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **2008**, *9*, 025015, doi:10.1088/1468-6996/9/2/025015.
154. Etique, M. Effets de l'activité bactérienne réductrice du fer ferrique et des nitrates sur les transformations des produits de corrosion magnétite et sidérite de l'acier non allié, Doctoral thesis, Université de Lorraine, France, 2014.
155. Maitte, B. Influence de l'activité bactérienne ferro-oxydante et ferri-réductrice sur les propriétés minéralogiques et micromécaniques du minerai de fer dans le contexte des mines abandonnées de Lorraine, Doctoral thesis, Université de Lorraine, France, 2015.
156. Xu, J.; Hao, Z.; Xie, C.; Lv, X.; Yang, Y.; Xu, X. Promotion effect of Fe²⁺ and Fe₃O₄ on nitrate reduction using zero-valent iron. *Desalination* **2012**, *284*, 9–13, doi:10.1016/J.DESAL.2011.08.029.
157. Sørensen, J.; Thorling, L. Stimulation by lepidocrocite (7-FeOOH) of Fe(II)-dependent nitrite reduction. *Geochim. Cosmochim. Acta* **1991**, *55*, 1289–1294, doi:10.1016/0016-7037(91)90307-Q.
158. Klueglein, N.; Kappler, A. Abiotic oxidation of Fe(II) by reactive nitrogen species in cultures of the nitrate-reducing Fe(II) oxidizer *Acidovorax* sp. BoFeN1 - questioning the existence of enzymatic Fe(II) oxidation. *Geobiology* **2013**, *11*, 180–190, doi:10.1111/gbi.12019.
159. Beech, I.B.; Gaylarde, C.C. Recent advances in the study of biocorrosion: an overview. *Rev. Microbiol.* **1999**, *30*, 117–190, doi:10.1590/S0001-37141999000300001.
160. Weinberg, E.D. Cellular regulation of iron assimilation. *Q. Rev. Biol.* **1989**, *64*, 261–90.
161. Andrews, S.C.; Robinson, A.K.; Rodríguez-Quñones, F. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol. Rev.* **2003**, *27*, 215–237, doi:10.1016/S0168-6445(03)00055-X.
162. Berggren, G.; Adamska, A.; Lambertz, C.; Simmons, T.R.; Esselborn, J.; Atta, M.; Gambarelli, S.; Mouesca, J.-M.; Reijerse, E.; Lubitz, W.; et al. Biomimetic assembly and activation of [FeFe]-hydrogenases. *Nature* **2013**, *499*, 66–69, doi:10.1038/nature12239.
163. Barry, S.M.; Challis, G.L. Recent advances in siderophore biosynthesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 205–215, doi:10.1016/J.CBPA.2009.03.008.
164. Beech, I.B.; Sunner, J.A.; Hiraoka, K. Microbe-surface interactions in biofouling and biocorrosion processes. *Int. Microbiol.* **2005**, *8*, 157–68.
165. Volkland, H.-P.; Harms, H.; Müller, B.; Repphun, G.; Wanner, O.; Zehnder, A.J.B. Bacterial Phosphating of Mild (Unalloyed) Steel. *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*, 4389.
166. Huang, C.-P.; Wang, H.-W.; Chiu, P.-C. Nitrate reduction by metallic iron. *Water Res.* **1998**, *32*, 2257–2264, doi:10.1016/S0043-1354(97)00464-8.
167. Choe, S.; Liljestrand, H.M.; Khim, J. Nitrate reduction by zero-valent iron under different pH regimes. *Appl. Geochemistry* **2004**, *19*, 335–342, doi:10.1016/J.APGEOCHEM.2003.08.001.
168. Truche, L.; Berger, G.; Albrecht, A.; Domergue, L. Abiotic nitrate reduction induced by carbon steel and hydrogen: Implications for environmental processes in waste repositories. *Appl. Geochemistry* **2013**, *28*, 155–163, doi:10.1016/j.apgeochem.2012.10.010.
169. Weber, K.A.; Picardal, F.W.; Roden, E.E. Microbially catalyzed nitrate-dependent oxidation of

- biogenic solid-phase Fe(II) compounds. *Environ. Sci. Technol.* **2001**, *35*, 1644–1650, doi:10.1021/es0016598.
170. Benz, M.; Brune, A.; Schink, B. Anaerobic and aerobic oxidation of ferrous iron at neutral pH by chemoheterotrophic nitrate-reducing bacteria. *Arch. Microbiol.* **1998**, *169*, 159–165, doi:10.1007/s002030050555.
171. Etique, M.; Jorand, F.P.A.; Zegeye, A.; Grégoire, B.; Despas, C.; Ruby, C. Abiotic Process for Fe(II) Oxidation and Green Rust Mineralization Driven by a Heterotrophic Nitrate Reducing Bacteria (*Klebsiella mobilis*). *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48*, 3742–3751, doi:10.1021/es403358v.
172. Hwang, Y.-H.; Kim, D.-G.; Shin, H.-S. Mechanism study of nitrate reduction by nano zero valent iron. *J. Hazard. Mater.* **2011**, *185*, 1513–1521, doi:10.1016/J.JHAZMAT.2010.10.078.
173. Tang, C.; Zhang, Z.; Sun, X. Effect of common ions on nitrate removal by zero-valent iron from alkaline soil. *J. Hazard. Mater.* **2012**, *231–232*, 114–119, doi:10.1016/J.JHAZMAT.2012.06.042.
174. Huang, Y.H.; Zhang, T.C. Nitrite reduction and formation of corrosion coatings in zerovalent iron systems. *Chemosphere* **2006**, *64*, 937–943, doi:10.1016/J.CHEMOSPHERE.2006.01.025.
175. Buresh, R.J.; Moraghan, J.T. Chemical Reduction of Nitrate by Ferrous Iron1. *J. Environ. Qual.* **1976**, *5*, 320, doi:10.2134/jeq1976.00472425000500030021x.
176. Miot, J.; Benzerara, K.; Morin, G.; Bernard, S.; Beyssac, O.; Larquet, E.; Kappler, A.; Guyot, F. Transformation of vivianite by anaerobic nitrate-reducing iron-oxidizing bacteria. *Geobiology* **2009**, *7*, 373–384, doi:10.1111/j.1472-4669.2009.00203.x.
177. Kebbouche-Gana, S.; Gana, M.L. Biocorrosion of carbon steel by a nitrate-utilizing consortium of sulfate-reducing bacteria obtained from an Algerian oil field. *Ann. Microbiol.* **2012**, *62*, 203–210, doi:10.1007/s13213-011-0247-0.
178. Etique, M.; Zegeye, A.; Grégoire, B.; Carteret, C.; Ruby, C. Nitrate reduction by mixed iron(II-III) hydroxycarbonate green rust in the presence of phosphate anions: The key parameters influencing the ammonium selectivity. *Water Res.* **2014**, *62*, 29–39, doi:10.1016/J.WATRES.2014.05.028.
179. Iino, T.; Ito, K.; Wakai, S.; Tsurumaru, H.; Ohkuma, M.; Harayama, S. Iron corrosion induced by nonhydrogenotrophic nitrate-reducing *Prolixibacter sp.* strain MIC1-1. *Appl. Environ. Microbiol.* **2015**, *81*, 1839–46, doi:10.1128/AEM.03741-14.
180. Almeida, J.S.; Reis, M.A.M.; Carrondo, M.J.T. Competition between nitrate and nitrite reduction in denitrification by *Pseudomonas fluorescens*. *Biotechnol. Bioeng.* **1995**, *46*, 476–484, doi:10.1002/bit.260460512.
181. Huang, Y.H.; Zhang, T.; Shea, P.J.; Comfort, S.D. Effects of Oxide Coating and Selected Cations on Nitrate Reduction by Iron Metal. *J. Environ. Qual.* **2003**, *32*, 1306.
182. Van Cleemput, O.; Baert, L. Nitrite stability influenced by iron compounds. *Soil Biol. Biochem.* **1983**, *15*, 137–140, doi:10.1016/0038-0717(83)90093-7.
183. Postma, D. Kinetics of nitrate reduction by detrital Fe(II)-silicates. *Geochim. Cosmochim. Acta* **1990**, *54*, 903–908, doi:10.1016/0016-7037(90)90384-W.
184. Truche, L.; Berger, G.; Albrecht, A.; Domergue, L. Engineered materials as potential geocatalysts in deep geological nuclear waste repositories: A case study of the stainless steel catalytic effect on nitrate reduction by hydrogen. *Appl. Geochemistry* **2013**, *35*, 279–288, doi:10.1016/J.APGEOCHEM.2013.05.001.
185. Bertron, A.; Duchesne, J.; Escadeillas, G. Accelerated tests of hardened cement pastes alteration by organic acids: analysis of the pH effect. *Cem. Concr. Res.* **2005**, *35*, 155–166, doi:10.1016/j.cemconres.2004.09.009.
186. Bertron, A.; Ranaivomanana, H.; Jacquemet, N.; Erable, B.; Sablayrolles, C.; Escadeillas, G.; Albrecht, A. Physico-chemical interactions at the concrete-bitumen interface of nuclear waste repositories. In Proceedings of the Long-Term Performance of Cementitious Barriers and Reinforced Concrete in Nuclear Power Plant and Radioactive Waste Storage and Disposal; L'Hostis, V., Gens, R., Eds.; EDP Sciences, 2013; Vol. 56, p. 01002.
187. Oh, S.J.; Cook, D.C.; Townsend, H.E. Characterization of Iron Oxides Commonly Formed as Corrosion Products on Steel. *Hyperfine Interact.* **1998**, *112*, 59–66,

- doi:10.1023/A:1011076308501.
188. Hanesch, M. Raman spectroscopy of iron oxides and (oxy)hydroxides at low laser power and possible applications in environmental magnetic studies. *Geophys. J. Int.* **2009**, *177*, 941–948, doi:10.1111/j.1365-246X.2009.04122.x.
 189. Mazoch, J.; Tesářík, R.; Sedláček, V.; Kucera, I.; Turánek, J. Isolation and biochemical characterization of two soluble iron(III) reductases from *Paracoccus denitrificans*. *Eur. J. Biochem.* **2004**, *271*, 553–62.
 190. Kurt, M.; Dunn, I.J.; Bourne, J.R. Biological denitrification of drinking water using autotrophic organisms with H₂ in a fluidized-bed biofilm reactor. *Biotechnol. Bioeng.* **1987**, *29*, 493–501, doi:10.1002/bit.260290414.
 191. Qu, Z.; Bakken, L.R.; Molstad, L.; Frostegård, Å.; Bergaust, L.L. Transcriptional and metabolic regulation of denitrification in *Paracoccus denitrificans* allows low but significant activity of nitrous oxide reductase under oxic conditions. *Environ. Microbiol.* **2016**, *18*, 2951–2963, doi:10.1111/1462-2920.13128.
 192. Rafrafi, Y.; Bertron, A.; Sablayrolles, C.; Albrecht, A.; Erable, B. Catalyse biotique et abiotique de la réduction des nitrates en milieu alcalin dans le contexte du stockage profond des déchets radioactifs. *Matériaux Tech.* **2013**, *101*, 1–8, doi:10.1051/mattech/2012054.
 193. Li, W.; Zheng, P.; Guo, J.; Ji, J.; Zhang, M.; Zhang, Z.; Zhan, E. Characteristics of self-alkalization in high-rate denitrifying automatic circulation (DAC) reactor fed with methanol and sodium acetate. *Bioresour. Technol.* **2014**, *154*, 44–50.
 194. Wang, D.; Fu, Q.; Xu, Q.; Liu, Y.; Hao Ngo, H.; Yang, Q.; Zeng, G.; Li, X.; Ni, B.-J. Free nitrous acid-based nitrifying sludge treatment in a two-sludge system enhances nutrient removal from low-carbon wastewater. *Bioresour. Technol.* **2017**, *244*, 920–928, doi:10.1016/J.BIORTECH.2017.08.045.
 195. Xu, Q.; Liu, X.; Yang, G.; Wang, D.; Wang, Q.; Liu, Y.; Li, X.; Yang, Q. Free nitrous acid-based nitrifying sludge treatment in a two-sludge system obtains high polyhydroxyalkanoates accumulation and satisfied biological nutrients removal. *Bioresour. Technol.* **2019**, *284*, 16–24, doi:10.1016/J.BIORTECH.2019.03.116.
 196. Brooks, A.N.; Turkarlan, S.; Beer, K.D.; Lo, F.Y.; Baliga, N.S. Adaptation of cells to new environments. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* **2011**, *3*, 544–61, doi:10.1002/wsbm.136.
 197. Rosenzweig, R.F.; Sharp, R.R.; Treves, D.S.; Adams, J. Microbial evolution in a simple unstructured environment: genetic differentiation in *Escherichia coli*. *Genetics* **1994**, *137*, 903–17.
 198. Rainey, P.B.; Travisano, M. Adaptive radiation in a heterogeneous environment. *Nature* **1998**, *394*, 69–72, doi:10.1038/27900.
 199. Kim, Y.M.; Cho, H.U.; Lee, D.S.; Park, D.; Park, J.M. Comparative study of free cyanide inhibition on nitrification and denitrification in batch and continuous flow systems. *Desalination* **2011**, *279*, 439–444, doi:10.1016/J.DESAL.2011.06.026.
 200. Najafpour, G.D. Biological Treatment. In *Biochemical Engineering and Biotechnology*; Elsevier, 2015; pp. 557–595.
 201. Krulwich, T.A.; Sachs, G.; Padan, E. Molecular aspects of bacterial pH sensing and homeostasis. *Nat. Rev. Microbiol.* **2011**, *9*, 330–43, doi:10.1038/nrmicro2549.
 202. Padan, E.; Bibi, E.; Ito, M.; Krulwich, T.A. Alkaline pH homeostasis in bacteria: New insights. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2005**, *1717*, 67–88, doi:10.1016/J.BBAMEM.2005.09.010.
 203. Fernández-Nava, Y.; Marañón, E.; Soons, J.; Castrillón, L. Denitrification of high nitrate concentration wastewater using alternative carbon sources. *J. Hazard. Mater.* **2010**, *173*, 682–688, doi:10.1016/j.jhazmat.2009.08.140.
 204. Cao, X.; Qian, D.; Meng, X. Effects of pH on nitrite accumulation during wastewater denitrification. *Environ. Technol.* **2013**, *34*, 45–51, doi:10.1080/09593330.2012.679700.
 205. Xie, Y.; Fan, Y.; Li, W.; Zhang, Y. Effects of different solid carbon sources on activated sludge denitrification performance under different PH conditions. In Proceedings of the The 3rd International Conference on Mechatronics, Robotics and Automation; Atlantis Press: Paris,

- France, 2015.
206. Roco, C.A.; Bergaust, L.L.; Bakken, L.R.; Yavitt, J.B.; Shapleigh, J.P. Modularity of nitrogen-oxide reducing soil bacteria: linking phenotype to genotype. *Environ. Microbiol.* **2017**, *19*, 2507–2519, doi:10.1111/1462-2920.13250.
 207. Lycus, P.; Lovise Bøthun, K.; Bergaust, L.; Peele Shapleigh, J.; Reier Bakken, L.; Frostegård, Å. Phenotypic and genotypic richness of denitrifiers revealed by a novel isolation strategy. *ISME J.* **2017**, *11*, 2219–2232, doi:10.1038/ismej.2017.82.
 208. Epstein, W. The roles and regulation of potassium in bacteria. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **2003**, *75*, 293–320.
 209. Ballal, A.; Basu, B.; Apte, S.K. The Kdp-ATPase system and its regulation. *J. Biosci.* **2007**, *32*, 559–568, doi:10.1007/s12038-007-0055-7.
 210. Walderhaug, M.O.; Dosch, D.C.; Epstein, W. Potassium Transport in Bacteria. *Ion Transp. Prokaryotes* **1987**, 85–130, doi:10.1016/B978-0-12-596935-2.50005-0.
 211. Roe, A.J.; McLaggan, D.; O'Byrne, C.P.; Booth, I.R. Rapid inactivation of the *Escherichia coli* Kdp K⁺ uptake system by high potassium concentrations. *Mol. Microbiol.* **2000**, *35*, 1235–1243, doi:10.1046/j.1365-2958.2000.01793.x.
 212. Bai, H.; Liao, S.; Wang, A.; Huang, J.; Shu, W.; Ye, J. High-efficiency inorganic nitrogen removal by newly isolated *Pannonibacter phragmitetus* B1. *Bioresour. Technol.* **2019**, *271*, 91–99, doi:10.1016/J.BIORTECH.2018.09.090.
 213. Borsodi, A.K.; Micsinai, A.; Kovács, G.; Tóth, E.; Schumann, P.; Kovács, A.L.; Böddi, B.; Márialigeti, K. *Pannonibacter phragmitetus* gen. nov., sp. nov., a novel alkalitolerant bacterium isolated from decomposing reed rhizomes in a Hungarian soda lake. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2003**, *53*, 555–561, doi:10.1099/ijs.0.02356-0.
 214. Zhang, Y.-J.; Zhang, X.-Y.; Zhao, H.-L.; Zhou, M.-Y.; Li, H.-J.; Gao, Z.-M.; Chen, X.-L.; Dang, H.-Y.; Zhang, Y.-Z. *Idiomarina maris* sp. nov., a marine bacterium isolated from sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2012**, *62*, 370–375, doi:10.1099/ijs.0.027896-0.
 215. Okada, N.; Nomura, N.; Nakajima-Kambe, T.; Uchiyama, H. Characterization of the Aerobic Denitrification in *Mesorhizobium* sp. Strain NH-14 in Comparison with that in Related *Rhizobia*. *Microbes Environ.* **2005**, *20*, 208–215, doi:10.1264/jjsme2.20.208.
 216. Siddiqi, M.Z.; Thao, N.T.P.; Choi, G.; Kim, D.-C.; Lee, Y.-W.; Kim, S.Y.; Wee, J.-H.; Im, W.-T. *Mesorhizobium denitrificans* sp. nov., a novel denitrifying bacterium isolated from sludge. *J. Microbiol.* **2019**, *57*, 238–242, doi:10.1007/s12275-019-8590-0.
 217. Lai, Q.; Qiao, N.; Wu, C.; Sun, F.; Yuan, J.; Shao, Z. *Stappia indica* sp. nov., isolated from deep seawater of the Indian Ocean. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2010**, *60*, 733–736, doi:10.1099/ijs.0.013417-0.
 218. Kim, B.-C.; Park, J.R.; Bae, J.-W.; Rhee, S.-K.; Kim, K.-H.; Oh, J.-W.; Park, Y.-H. *Stappia marina* sp. nov., a marine bacterium isolated from the Yellow Sea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2006**, *56*, 75–79, doi:10.1099/ijs.0.63735-0.
 219. Almeida, J.S.; Reis, M.A.M.; Carrondo, M.J.T. Competition Between Nitrate and Nitrite Reduction in Denitrification by *Pseudomonas fluorescens*. *Biotechnol. Bioeng.* **1995**, *46*.
 220. Ochiai, A.; Itoh, T.; Kawamata, A.; Hashimoto, W.; Murata, K. Plant Cell Wall Degradation by Saprophytic *Bacillus subtilis* Strains: Gene Clusters Responsible for Rhamnogalacturonan Depolymerization. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 3803, doi:10.1128/AEM.00147-07.
 221. Berendes, F.; Gottschalk, G.; Heine-dobbernack, E.; Moore, E.R.B.; Tindale, B.; Gmbh, Z.; Ib, M.W.; Braunschweig, D. *Halomonas desiderata* sp. nov., a New Alkaliphilic, Halotolerant and Denitrifying Bacterium Isolated from a Municipal Sewage Works. *Syst. Appl. Microbiol.* **1996**, *19*, 158–167, doi:10.1016/S0723-2020(96)80041-5.
 222. Wan, Y.; Zhou, L.; Wang, S.; Liao, C.; Li, N.; Liu, W.; Wang, X. Syntrophic Growth of *Geobacter sulfurreducens* Accelerates Anaerobic Denitrification. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1572, doi:10.3389/fmicb.2018.01572.
 223. Chen, D.; Yang, K.; Wang, H. Effects of important factors on hydrogen-based autotrophic denitrification in a bioreactor. *Desalin. Water Treat.* **2016**, *57*, 3482–3488,

- doi:10.1080/19443994.2014.986533.
224. Fida, T.T.; Gassara, F.; Voordouw, G. Biodegradation of isopropanol and acetone under denitrifying conditions by *Thauera* sp. TK001 for nitrate-mediated microbially enhanced oil recovery. *J. Hazard. Mater.* **2017**, *334*, 68–75, doi:10.1016/J.JHAZMAT.2017.03.061.
 225. Macy, J.M.; Rech, S.; Auling, G.; Dorsch, M.; Stackebrandt, E.; Sly, L.I. *Thauera selenatis* gen. nov., sp. nov., a Member of the Beta Subclass of *Proteobacteria* with a Novel Type of Anaerobic Respiration. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **1993**, *43*, 135–142, doi:10.1099/00207713-43-1-135.
 226. Li, P.; Wang, Y.; Zuo, J.; Wang, R.; Zhao, J.; Du, Y. Nitrogen Removal and N₂O Accumulation during Hydrogenotrophic Denitrification: Influence of Environmental Factors and Microbial Community Characteristics. *Environ. Sci. Technol.* **2017**, *51*, 870–879, doi:10.1021/acs.est.6b00071.
 227. Yin, X.; Stotzky, G. Gene Transfer Among Bacteria in Natural Environments. *Adv. Appl. Microbiol.* **1997**, *45*, 153–212, doi:10.1016/S0065-2164(08)70263-6.
 228. Misal, S.A.; Lingojwar, D.P.; Gawai, K.R. Properties of NADPH Azoreductase from Alkaliphilic Red Bacteria *Aquiflexum* sp. DL6. *Protein J.* **2013**, *32*, 601–608, doi:10.1007/s10930-013-9522-1.
 229. Misal, S.A.; Bajoria, V.D.; Lingojwar, D.P.; Gawai, K.R. Purification and characterization of nitroreductase from red alkaliphilic bacterium *Aquiflexum* sp. DL6. *Appl. Biochem. Microbiol.* **2013**, *49*, 227–232, doi:10.1134/S0003683813030125.
 230. Grond, K. *Preliminary genome analysis of Porphyrobacter sp. nov. isolated from brackish sediment collected from the trunk river bank*; 2016;
 231. Li, X.; Koblížek, M.; Feng, F.; Li, Y.; Jian, J.; Zeng, Y. Whole-Genome Sequence of a Freshwater Aerobic Anoxygenic Phototroph, *Porphyrobacter* sp. Strain AAP82, Isolated from the Huguangyan Maar Lake in Southern China. *Genome Announc.* **2013**, *1*, doi:10.1128/GENOMEA.00072-13.
 232. Hayashi, R. *Trends in high pressure bioscience and biotechnology*; Elsevier: Kyoto, Japan, 2002; ISBN 0080543227.
 233. *Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology II*; Winter, R., Ed.; Springer: Berlin, Heidelberg, 2003; ISBN 978-3-642-05674-1.
 234. Kunugi, S.; Tanaka, N. Pressure-driven Cold Denaturation of Proteins and Structure Formation of Water-soluble Polymers. In *Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology II*; Springer: Berlin, Heidelberg, 2003; pp. 49–54.
 235. Janosch, S.; Kinne-Saffran, E.; Kinne, R.K.H.; Winter, R. Inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase by Hydrostatic Pressure. In *Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology II*; Springer: Berlin, Heidelberg, 2003; pp. 215–219.
 236. Ludwig, H. Effects of High Pressure on Bacteria and Fungi. In *Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology II*; Springer: Berlin, Heidelberg, 2003; pp. 259–265.
 237. Vogel, R.F.; Ehrmann, M.A.; Gänzle, M.G.; Kato, C.; Korakli, M.; Scheyhing, C.H.; Molina-Gutierrez, A.; Ulmer, H.M.; Winter, R. High Pressure Response of Lactic Acid Bacteria. In *Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology II*; Springer: Berlin, Heidelberg, 2003; pp. 249–254.
 238. Sato, T.; Miwa, T.; Ishii, A.; Kato, C.; Wachi, M.; Nagai, K.; Aizawa, M.; Horikoshi, K. The dynamism of *Escherichia coli* under high hydrostatic pressure—repression of the FtsZ-ring formation and chromosomal DNA condensation. *Prog. Biotechnol.* **2002**, *19*, 233–238, doi:10.1016/S0921-0423(02)80105-8.
 239. McKenzie, C.M.; Seviour, E.M.; Schumann, P.; Maszenan, A.M.; Liu, J.-R.; Webb, R.I.; Monis, P.; Saint, C.P.; Steiner, U.; Seviour, R.J. Isolates of '*Candidatus Nostocoida limicola*' Blackall et al. 2000 should be described as three novel species of the genus *Tetrasphaera*, as *Tetrasphaera jenkinsii* sp. nov., *Tetrasphaera vanveenii* sp. nov. and *Tetrasphaera veronensis* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2006**, *56*, 2279–2290, doi:10.1099/ij.s.0.63978-0.
 240. Lin, D.X.; Wang, E.T.; Tang, H.; Han, T.X.; He, Y.R.; Guan, S.H.; Chen, W.X. *Shinella kummerowiae* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from root nodules of the herbal legume *Kummerowia stipulacea*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2008**, *58*, 1409–1413, doi:10.1099/ij.s.0.65723-0.

241. Lee, M.; Woo, S.-G.; Ten, L.N. *Shinella daejeonensis* sp. nov., a nitrate-reducing bacterium isolated from sludge of a leachate treatment plant. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2011**, *61*, 2123–2128, doi:10.1099/ijs.0.026435-0.
242. Zindel, U.; Freudenberg, W.; Rieth, M.; Andreesen, J.R.; Schnell, J.; Widdel, F. *Eubacterium acidaminophilum* sp. nov., a versatile amino acid-degrading anaerobe producing or utilizing H₂ or formate. *Arch. Microbiol.* **1988**, *150*, 254–266, doi:10.1007/BF00407789.
243. Yin, X.; Qiao, S.; Zhou, J.; Bhatti, Z. Effects of redox mediators on nitrogen removal performance by denitrifying biomass and the activity of Nar and Nir. *Chem. Eng. J.* **2014**, *257*, 90–97, doi:10.1016/J.CEJ.2014.07.029.
244. Guo, H.; Chen, Z.; Guo, J.; Lu, C.; Song, Y.; Han, Y.; Li, H.; Hou, Y. Enhanced denitrification performance and biocatalysis mechanisms of polyoxometalates as environmentally-friendly inorganic redox mediators. *Bioresour. Technol.* **2019**, *291*, 121816, doi:10.1016/J.BIORTECH.2019.121816.
245. Xie, Z.; Guo, J.; Lu, C.; Song, Y.; Xing, Y.; Yang, Q.; Han, Y.; Li, H. Biocatalysis mechanisms and characterization of a novel denitrification process with porphyrin compounds based on the electron transfer chain. *Bioresour. Technol.* **2018**, *265*, 548–553, doi:10.1016/J.BIORTECH.2018.05.069.
246. Michel, F.M.; Ehm, L.; Antao, S.M.; Lee, P.L.; Chupas, P.J.; Liu, G.; Strongin, D.R.; Schoonen, M.A.A.; Phillips, B.L.; Parise, J.B. The structure of ferrihydrite, a nanocrystalline material. *Science* **2007**, *316*, 1726–9, doi:10.1126/science.1142525.