PCT ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIETE INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets 6 : C02F 3/34	A1	(11) Numéro de publication internationale: **WO 97/06107**
		(43) Date de publication internationale: 20 février 1997 (20.02.97)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/01250

(22) Date de dépôt international: 6 août 1996 (06.08.96)

(30) Données relatives à la priorité:
95/09563 7 août 1995 (07.08.95) FR

(71) Déposants *(pour tous les Etats désignés sauf US)*: COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE [FR/FR]; 31-33, rue de la Fédération, F-75015 Paris (FR). COMURHEX, SOCIETE POUR LA CONVERSION DE L'URANIUM EN METAL ET HEXAFLUORURE [FR/FR]; L'Etendard, 36, avenue de l'Europe, F-78140 Vélizy-Villacoublay (FR). INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE [FR/FR]; 147, rue de l'Université, F-75338 Paris Cédex 07 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants *(US seulement)*: PACCARD, Emmanuelle [FR/FR]; Les Toits de l'Europe, Avenue Ferdinand-de-Lesseps, F-13100 Aix-en-Provence (FR). BESNAINOU, Bernard [FR/FR]; 27, rue du 11-Novembre, F-13100 Aix-en-Provence (FR). MOLETTA, René [FR/FR]; 566, chemin de Maudesse, F-11120 Le Somail (FR).

(74) Mandataire: AUDIER, P.; Brevatome, 25, rue de Ponthieu, F-75008 Paris (FR).

(81) Etats désignés: JP, KR, RU, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Publiée
Avec rapport de recherche internationale
Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.
Avec une indication relative à un micro-organisme déposé, fournie selon la règle 13 bis, séparément, et non pas avec la description.
Date de réception par le bureau international:
16 septembre 1996 (16.09.96)

(54) Title: METHOD FOR BIODEPOLLUTING EFFLUENTS WITH HIGH CONCENTRATIONS OF POLLUTANTS, AND STRAIN SELECTION PROCESS USABLE WITH SAID METHOD

(54) Titre: PROCEDE DE BIODEPOLLUTION D'EFFLUENTS A FORTES CONCENTRATIONS EN POLLUANTS, ET PROCEDE DE SELECTION DE SOUCHES UTILISABLE DANS LEDIT PROCEDE

(57) **Abstract**

A method for biodepolluting (or biologically purifying) effluents with high concentrations of organic pollutants and/or mineral elements capable of being oxidised or reduced by bacteria is described, wherein the mixed depolluting bacteria population used is selected and grown from samplings of the effluents to be treated, in culture media containing said effluents. The method is particularly a biological denitrification method for effluents containing high nitrate concentrations using mixed denitrifying bacteria populations. A process for selecting an efficient mixed bacteria population for biodepolluting effluents is also described, in particular a mixed denitrifying bacteria population wherein the selection and culture medium is made up of the effluents to be treated themselves.

(57) **Abrégé**

L'invention a trait à un procédé de biodépollution (ou d'épuration biologique) d'effluents à fortes concentrations en polluants organiques et/ou en éléments minéraux susceptibles d'être oxydés ou réduits par des bactéries dans lequel la population mixte de bactéries dépolluantes mise en œuvre est sélectionnée et cultivée àpartir de prélèvements des effluents à traiter et dans des milieux de culture comprenant les effluents à traiter eux-mêmes. Ce procédé est en particulier un procédé de dénitrification biologique d'effluents renfermant de fortes concentrations en nitrates à l'aide de populations mixtes de bactéries dénitrifiantes. L'invention a également trait à un procédé de sélection d'une population mixte de bactéries performante pour la biodépollution d'effluents en particulier d'une population mixte de bactéries dénitrifiantes dans lequel le milieu de sélection et de culture est constitué par ces effluents à traiter eux-mêmes.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	**GB**	Royaume-Uni	**MW**	Malawi
AT	Autriche	**GE**	Géorgie	**MX**	Mexique
AU	Australie	**GN**	Guinée	**NE**	Niger
BB	Barbade	**GR**	Grèce	**NL**	Pays-Bas
BE	Belgique	**HU**	Hongrie	**NO**	Norvège
BF	Burkina Faso	**IE**	Irlande	**NZ**	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	**IT**	Italie	**PL**	Pologne
BJ	Bénin	**JP**	Japon	**PT**	Portugal
BR	Brésil	**KE**	Kenya	**RO**	Roumanie
BY	Bélarus	**KG**	Kirghizistan	**RU**	Fédération de Russie
CA	Canada	**KP**	République populaire démocratique de Corée	**SD**	Soudan
CF	République centrafricaine			**SE**	Suède
CG	Congo	**KR**	République de Corée	**SG**	Singapour
CH	Suisse	**KZ**	Kazakhstan	**SI**	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	**LI**	Liechtenstein	**SK**	Slovaquie
CM	Cameroun	**LK**	Sri Lanka	**SN**	Sénégal
CN	Chine	**LR**	Libéria	**SZ**	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	**LT**	Lituanie	**TD**	Tchad
CZ	République tchèque	**LU**	Luxembourg	**TG**	Togo
DE	Allemagne	**LV**	Lettonie	**TJ**	Tadjikistan
DK	Danemark	**MC**	Monaco	**TT**	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	**MD**	République de Moldova	**UA**	Ukraine
ES	Espagne	**MG**	Madagascar	**UG**	Ouganda
FI	Finlande	**ML**	Mali	**US**	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	**MN**	Mongolie	**UZ**	Ouzbékistan
GA	Gabon	**MR**	Mauritanie	**VN**	Viet Nam

PROCEDE DE BIODEPOLLUTION D'EFFLUENTS A FORTES CONCENTRATIONS EN POLLUANTS, ET PROCEDE DE SELECTION DE SOUCHES UTILISABLE DANS LEDIT PROCEDE

DESCRIPTION

La présente invention a trait à un procédé de biodépollution (ou encore d'épuration biologique) d'effluents renfermant de fortes concentrations en polluants organiques ou en éléments minéraux susceptibles d'être réduits ou oxydés par des bactéries, en particulier l'invention a trait à un procédé de dénitrification biologique d'effluents à forte concentration en nitrates qui consiste à mettre en oeuvre une population mixte de bactéries dénitrifiantes. L'invention a également trait à un procédé de sélection de souches performantes pour la biodépollution d'effluents très chargés en polluants qui est basé sur l'utilisation de ces mêmes effluents comme base pour la préparation des milieux de culture. Ce procédé de sélection est en particulier utilisable pour sélectionner une population mixte de bactéries dénitrifiantes à hautes performances à partir de prélèvements réalisés sur le site industriel-même générant les effluents à dénitrifier. L'invention concerne également la souche dominante de cette population mixte de bactéries dénitrifiantes, cette souche étant une souche nouvelle qui a été déposée auprès de la Collection Nationale de cultures de Micro-organismes sous le numéro CNCM I 1563.

Il existe de nombreux polluants organiques et minéraux présentant des effets nocifs, en particulier, les effets nocifs des nitrates sont bien connus ; ils consistent notamment en une toxicité vis-à-vis de la vie aquatique, en la production d'algues dans les cours d'eau et les lacs, en un

appauvrissement de l'eau en oxygène dissous, en une réduction de l'efficacité de la désinfection par le chlore, en une réduction de la capacité de réutilisation des effluents, et en une toxicité aiguë et chronique pour l'homme, en particulier pour le nourrisson à des concentrations au-dessus de 10 mg/litre. Le rejet d'effluents chargés en nitrate est donc devenu de moins en moins souhaitable et se heurte à des réglementations restrictives.

La technique de biodénitrification ou de dénitrification biologique se définit comme la réduction des ions nitrates ou nitrites en azote moléculaire ou en oxydes d'azote sous l'action d'une bactérie. Cette technique a été appliquée avec succès à la dénitrification des effluents urbains, des effluents issus de l'agriculture ou encore des eaux de consommation peu chargées en nitrate : c'est-à-dire présentant une concentration généralement inférieure à 1 g/l.

Pour les concentrations plus élevées qui sont celles rencontrées dans les effluents industriels, de nombreux procédés non-biologiques ont tout d'abord été proposés : il s'agit par exemple d'une neutralisation par la chaux suivie soit d'une calcination, soit d'une transformation en engrais liquide ou solide, soit d'un enfouissement. Tous ces procédés présentent l'inconvénient de nécessiter entre autres l'utilisation de quantités importantes de réactifs, et de fortes consommations d'énergie.

Les procédés de dénitrification biologique peuvent également être appliqués aux effluents industriels fortement chargés, mais ils ont l'inconvénient de présenter une vitesse de réaction lente et de nécessiter une dilution importante des effluents à traiter. D'autre part, les effluents

industriels chargés en nitrates tels que les effluents issus des installations nucléaires, contiennent fréquemment des métaux lourds et d'autres inhibiteurs potentiels de la dénitrification biologique qui rendent difficile leur mise en oeuvre.

Cependant, de nombreuses tentatives, dont aucune ne s'est avérée entièrement satisfaisante, ont été réalisées pour dénitrifier des effluents à fortes teneurs en nitrates et notamment des effluents issus de l'industrie nucléaire.

Ainsi, C.W. Francis et al dans le document CONF 800447 (1980) décrivent-ils des essais de traitement de déchets riches en nitrate issus de l'industrie nucléaire dans lesquels sont testés trois types de réacteurs différents, dont un réacteur continu agité, alimenté par des effluents synthétiques reconstitués composés de nitrate d'ammonium, de calcium et de sodium.

La culture dénitrifiante utilisée est une culture issue d'un sédiment marin dont les capacités de dénitrification se sont avérées supérieures à celles de cultures issues d'un réacteur de dénitrification ou d'un sol agricole.

J.M. Napier et al dans Y-DA-6370 "Preprint for the Third ERDA Environmental Protection Conference, Chicago, Illinois, Septembre 23-25, 1975" étudient la dénitrification des effluents chargés en nitrates provenant d'une installation de purification de l'uranium. Trois types de réacteurs sont de nouveau testés dont un réacteur continu agité et la bactérie dénitrifiante mise en oeuvre initialement est *Pseudomonas Stutzeri*.

F.E. Clark et al dans Y-DA-6106 "Preprint for the 30 th. Annual Purdue Industrial Waste Conference, Purdue University, West Lafayette, Indiana,

May 6-8, 1975" décrivent de même des tests réalisés sur des effluents issus d'une installation de purification de l'uranium par extraction au solvant et mettant en jeu trois types de réacteurs dont le plus efficace s'est avéré être le réacteur continu agité. Les réacteurs sont ensemencés avec des cultures pures de *Pseudomonas denitrificans* et de *Pseudomonas stutzeri*, puis avec des cultures mixtes.

M.E. HOLLAND et al dans GAT-2002 "Biodenitrification of gaseous diffusion plant aqueous wastes : stirred bed reactor", Goodyear atomic corporation, Piketon, Ohio, publié le 3.10.1980 décrivent la biodénitrification d'effluents aqueux provenant d'une installation de diffusion gazeuse dans un réacteur à lit agité. Le taux de dénitrification est très faible à cause des effets toxiques des métaux lourds contenus dans les effluents sur les bactéries dénitrifiantes qui ne sont pas clairement identifiées et dont la nature exacte n'est pas connue.

W.N. WHINNERY dans KY-712 "Denitrification of nitrate-containing heavy-metal-filtrate solutions" Paducah gaseous diffusion plant, publié le 1er Juillet 1981 indique que la dénitrification en continu de déchets nitratés riches en métaux lourds issus d'une installation de diffusion gazeuse n'a pas donné de résultats satisfaisants. Les bactéries utilisées sont soit *Pseudomonas stutzeri*, soit une souche de collection, soit une bactérie provenant d'un autre réacteur de dénitrification.

G. CLAUS et al dans "Autotrophic denitrification by *Thiobacillus denitrificans* in a packed bed reactor" décrivent l'utilisation d'un réacteur à garnissage à écoulement ascendant pour la dénitrification d'effluents industriels par une culture enrichie de la bactérie *Thiobacillus denitrificans*.

On a donc cherché à sélectionner de nouvelles souches dénitrifiantes présentant des capacités de dénitrification supérieures. Ainsi DENARIAZ et al dans Int. J. of Syst. Bacteriol., pp. 145-151, 1989 décrivent-ils la nouvelle souche *Bacillus halodenitrificans* ATCC 49067 isolée à partir d'un marais salant : cette bactérie se développe dans un milieu salin et tolère de fortes concentrations en sodium, en nitrites et en nitrates. L'isolat présente toutefois l'inconvénient de ne pas posséder d'activité de réductase vis-à-vis de l'oxyde nitreux.

Cette bactérie peut donc être utilisée pour le traitement d'effluents industriels avec de fortes teneurs en nitrate sous forme de nitrate de sodium, mais du fait qu'elle n'a pas de capacité de réduction du N_2O, elle nécessite la mise en oeuvre d'une seconde étape de traitement.

ROBINSON et al dans Can. Journal of Botany 30 : 147-154, 1951 décrivent la souche dénommée *Micrococcus halodenitrificans* qui se développe spécifiquement dans des milieux contenant du chlorure de sodium à une forte concentration supérieure à 2,2 % et ne se développe pas en présence d'autres sels. Cette bactérie réduit les nitrates et les nitrites en azote.

TOMLINSON et al dans Int. Journal of Syst. Bac. 36, 66-70, 1986 font mention d'une nouvelle souche *Halobacterium denitrificans* qui croît exclusivement en présence de nitrates ou de nitrites et à des concentrations élevées en NaCl, supérieures à 1,5 M.

Ces souches mentionnées ci-dessus se sont avérées dans l'ensemble incapables de dénitrifier des effluents industriels à fortes concentrations en nitrates ou bien leur mise en oeuvre s'est avérée restreinte à quelques cas particuliers.

Les principaux problèmes rencontrés sont essentiellement dus soit à une sensibilité importante des souches à l'un des intermédiaires de la dénitrification, en particulier les nitrites, soit à des exigences trop restrictives en ce qui concerne la force ionique du milieu de culture, soit à l'absence chez la souche de la dernière enzyme de la chaîne de dénitrification et arrêt de la réaction au N_2O.

D'autres auteurs, enfin, mettent en oeuvre des flores complexes sous la forme de boues activées, non contrôlées et non caractérisées, qui très souvent présentent des capacités de dénitrification en réacteur difficilement prévisibles et maîtrisables.

Il existe donc un besoin non satisfait pour un procédé de biodépollution d'effluents à fortes concentrations en polluants organiques et/ou en éléments minéraux susceptibles d'être réduits ou oxydés par des bactéries.

Il existe en particulier un besoin jusqu'alors non satisfait pour un procédé de biodénitrification ou dénitrification bactériologique d'effluents en particulier industriels fortement chargés en nitrates. Il existe aussi un besoin pour des souches dépolluantes qui puissent être mises en oeuvre dans des effluents fortement chargés en polluants. En particulier, il existe un besoin pour des souches dénitrifiantes réalisant l'ensemble de la chaîne de dénitrification qui puissent être mises en oeuvre dans des effluents même fortement chargés en nitrates, à force ionique élevée, pouvant contenir également d'autres sels à des concentrations élevées ainsi que des éléments tels que des métaux lourds ou autres. Il y a en particulier un besoin pour un procédé permettant de sélectionner des micro-organismes qui puissent être mis en oeuvre dans un procédé de dénitrification.

L'objet de l'invention est donc de fournir un procédé de biodépollution d'effluents à fortes concentrations en polluants organiques et/ou en éléments minéraux susceptibles d'être oxydés ou réduits par des bactéries qui remplisse l'ensemble des exigences indiquées ci-dessus.

L'objet de l'invention est en particulier de fournir un procédé de dénitrification biologique remplissant l'ensemble des exigences mentionnées ci-dessus. L'invention a également pour objet un procédé de sélection de souches bactériennes et en particulier des bactéries dénitrifiantes utilisables notamment dans ledit procédé de traitement d'effluents.

Les objectifs sont atteints conformément à l'invention par un procédé de biodépollution d'effluents fortement chargés en polluants organiques et/ou en éléments minéraux susceptibles d'être oxydés ou réduits par des bactéries caractérisé en ce que la population mixte de bactéries dépolluantes mise en oeuvre est sélectionnée et cultivée à partir de prélèvements des effluents à traiter et dans des milieux de culture comprenant ces effluents à traiter eux-mêmes. La sélection est par exemple effectuée par ce piquages successifs dans des milieux comprenant les effluents à traiter eux-mêmes.

Ces objectifs sont en particulier atteints conformément à l'invention par un procédé de dénitrification biologique d'effluents industriels à forte concentration en nitrates qui consiste à mettre en oeuvre une population mixte de bactéries dénitrifiantes, ces bactéries ayant été sélectionnées et cultivées dans des conditions anaérobies en utilisant les mêmes effluents comme base pour la préparation des milieux de culture. Les milieux de culture utilisés sont donc des milieux non

synthétiques, non reconstitués, comme c'est le cas dans l'art antérieur.

Le procédé selon l'invention, qui est applicable en particulier à des effluents industriels, permet de réduire les nitrates présents dans les effluents à des concentrations pouvant atteindre jusqu'à 62 g/l (1M) et ceci à une vitesse de dégradation élevée, sans accumulation temporaire ou permanente de nitrites tout en minimisant les concentrations en substrat carboné nécessaires pour la dénitrification.

Selon l'invention, on met en oeuvre dans le procédé de dénitrification une population mixte qui est sélectionnée directement à partir de prélèvements par exemple de prélèvements de sols et sédiments de sites industriels, en particulier de prélèvements dans la lagune de stockage des effluents à traiter et dont la concentration est typiquement supérieure à 100 g/l.

La sélection consiste en un enrichissement des prélèvements en bactéries dénitrifiantes dans les conditions de dénitrification et dans les effluents à traiter eux-mêmes. L'originalité de ce procédé de sélection réside d'une part dans l'origine des prélèvements destinés à servir d'"inoculum" pour les cultures de sélection : ceux-ci sont réalisés directement sur le site industriel générant des effluents nitrates et si possible directement dans les bassins ou lagunes de stockage de ces effluents, et d'autre part dans le fait que tous les milieux de cultures utilisés pour cette sélection sont composés par les effluents à traiter eux-mêmes.

Les prélèvements effectués sur le site où sont générés les effluents, sont soumis à un enrichissement par repiquages successifs. La concentration des inocula étant supérieure ou égale à

10 % v/v en milieux liquides, dans les conditions de sélection - conditions de dénitrification - imposées par les effluents à traiter. Les milieux de culture et de sélection employés sont du type de celui décrit ci-dessus : ils comportent tout d'abord des effluents à traiter qui contiennent les nitrates notamment sous forme de KNO_3, $NaNO_3$, NH_4NO_3, et $Ca(NO_3)_2$ dilués de manière à obtenir différentes concentrations en nitrates compatibles avec le problème à résoudre, par exemple les concentrations pourront varier de 5 g/l à la concentration en nitrates des effluents non dilués, par exemple de 50 g/l. Ces milieux de sélection comprennent également un substrat carboné ou source de carbone assimilable en concentration telle que les demandes en carbone pour la dénitrification et la croissance cellulaire soient satisfaites ; il peut s'agir notamment d'un acide organique ou d'un alcool tel que l'acide acétique, le méthanol, l'éthanol, ou encore d'effluents industriels chargés en polluants carbonés tels que les vinasses, les cidrasses, les effluents de l'industrie de l'amidon, les mélasses, le lactosérum ou du mélange de plusieurs de ces substrats carbonés. Les quantités de substrat carboné nécessaires à la dénitrification totale sont fonction de la quantité de nitrates à éliminer, du nombre d'électrons libérés par la réaction d'oxydation du substrat carboné selon l'équation :

substrat carboné + $H_2O \rightarrow CO_2 + H^+ + e^-$, et de la production de biomasse correspondant à la réaction de dénitrification.

Par exemple, dans le cas de la souche *Pseudomonas halodenitrificans* sur acide acétique, l'oxydation totale de l'acide acétique en CO_2 donne $8e^-$ par mole d'acide acétique et pour la réaction de réduction des nitrates, un rapport minimal de 0,62 mole

d'acide acétique/mole NO_3^- est nécessaire. A cette quantité, il faut ajouter l'acide acétique consommé pour la production de biomasse, et la maintenance. Expérimentalement, dans le cas de Pseudomonas halodenitrificans sur acide acétique, un rapport molaire compris entre 0,63 et 1 de préférence supérieur à 0,8 est nécessaire pour obtenir une dénitrification totale.

Les milieux de culture et de sélection contiennent également du phosphore généralement ajouté sous la forme de phosphates : une quantité minimale de 16 mg de phosphore/g de biomasse est nécessaire et peut être apportée par exemple sous forme de KH_2PO_4 Na_2HPO_4, ou de leur mélange.

Enfin, les milieux de culture contiennent des oligo-éléments qui comprennent essentiellement Mo, Fe, S, Cu, Mg, Mn.... et leurs mélanges : la détermination d'une quantité minimale nécessaire de chacun de ces éléments n'étant pas aisée et fortement dépendante des souches mises en oeuvres, chacun d'eux sera ajouté en excès dans le milieu de culture sous la forme d'une solution d'oligo-éléments classiquement utilisée en laboratoire.

Enfin, si cela est nécessaire, une source d'azote complémentaire telle que NH^+_4 sous forme NH_4Cl par exemple est ajoutée au milieu de culture à une concentration comprise entre 1 et 10 g/l.

La population mixte, enrichie comme décrit ci-dessus et présentant la meilleure activité de dénitrification, cette activité ayant été déterminée de la manière suivante : dosage des nitrates, dosage de la source de carbone, dosage des gaz produits, subit ensuite une deuxième étape d'enrichissement en réacteur continu agité ou autre, alimenté avec un milieu de culture de même composition que celle mentionnée

ci-dessus. Dans le cas d'effluents contenant du calcium, celui-ci sera préalablement éliminé par précipitation par exemple au K_2HPO_4, afin d'éviter une précipitation de sels de calcium dans le réacteur pouvant inhiber la réaction de dénitrification.

Le principe de cette deuxième étape d'enrichissement consiste à effectuer un enrichissement de plus en plus poussé de la population mixte en bactéries dénitrifiantes en augmentant le taux de dilution appliqué au réacteur, par exemple jusqu'à une valeur de 0,8 j^{-1}.

Les souches dénitrifiantes composant la population mixte sont ensuite isolées, l'isolement étant réalisé sur une milieu solide de même composition + agar 15 g/l, et de même force ionique que le milieu d'enrichissement en réacteur continu agité. Les boîtes de Pétri ensemencées à partir d'un aliquot de la culture en réacteur continu agité sont incubées sous hotte anaérobie à une température comprise entre 10°C et 45°C, de préférence de 20 à 40°C de préférence encore à 30°C.

L'une des souches isolées, dominante dans la culture mixte, s'est révélée, après analyses phénotypique et génétique, être une souche nouvelle, non encore décrite dans la littérature, dénommée *Pseudomonas halodenitrificans* et déposée auprès de la Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes sous le n° CNCM I 1563.

L'invention comprend également tous les mutants, obtenus par des procédés connus de l'homme du métier, de cette souche nouvelle.

On comprendra que cette technique de sélection de souches performantes pour la biodépollution d'effluents, basée sur l'utilisation de ces mêmes effluents comme base pour la préparation des

milieux de culture peut être utilisée pour sélectionner n'importe quel type de bactéries, pour la biodépollution des effluents chargés en polluants organiques ou en éléments minéraux susceptibles d'être oxydés ou réduits par ces bactéries et est donc d'application générale.

La mise en oeuvre de la culture mixte présentant la meilleure activité de dénitrification dans un procédé de dénitrification conformément à l'invention est réalisée de la manière suivante : la population mixte sélectionnée présentant la meilleure activité de dénitrification est mise en culture avec une concentration suffisante en inoculum qui sera généralement supérieure ou égale à 10 % en v/v dans un réacteur agité de production de biomasse, alimenté avec des milieux de culture composés par les effluents à traiter dilués de manière à obtenir une concentration en nitrates adéquate, généralement inférieure à 62 g/l pour un pH légèrement acide et une force ionique correspondante, une source de carbone, c'est-à-dire d'énergie exogène, éventuellement une source d'azote complémentaire autre que les nitrates par exemple du chlorure d'ammonium à une concentration NH^+_4 comprise entre 1g/l et 10g/l, ainsi que du phosphore, des oligo-éléments qui sont des cofacteurs des enzymes de la dénitrification.

Les nitrates sont généralement présents sous forme de KNO_3, et $Ca(NO_3)_2$, mais peuvent également être présents sous la forme de HNO_3, $NaNO_3$, ...

Des effluents fortement chargés en nitrates qui peuvent être traités par le procédé de dénitrification selon l'invention, sont générés dans de nombreux procédés industriels, en particulier dans la fabrication des engrais, dans la fabrication des explosifs, dans la fabrication de l'acide nitrique,

ainsi que dans des procédés mis en oeuvre dans l'industrie nucléaire, tels que les procédés d'extraction et d'enrichissement de l'uranium, les procédés de dissolution nitrique de combustible nucléaire etc.

Des rejets d'effluents et liquides divers, riches en nitrates et qui sont susceptibles d'être traités par le procédé de l'invention peuvent également se rencontrer dans d'autres domaines notamment l'agriculture ou bien encore l'élevage etc.

La source de carbone est choisie parmi les sources carbonées connues de l'homme du métier. Dans ce domaine de la technique, par exemple on pourra utiliser un acide organique tel que l'acide acétique ou un alcool tel que le méthanol ou l'éthanol ou bien encore des effluents industriels chargés en polluants carbonés tels que les vinasses ou cidrasses, effluents de l'industrie de l'amidon, mélasses, lactosérum, ou le mélange de plusieurs de ces sources de carbone.

La source de carbone, ou substrat carboné, est présente en une concentration telle que les demandes en carbone pour la dénitrification et la croissance cellulaire soient satisfaites. Les quantités de substrat carboné nécessaires à la dénitrification totale sont fonction de la quantité de nitrates à éliminer, du nombre d'électrons libérés par la réaction d'oxydation du substrat carboné selon l'équation : substrat carboné + $H_2O \rightarrow CO_2 + H^+ + e^-$ et enfin de la production de biomasse correspondant à la réaction de dénitrification. Par exemple, dans le cas de la souche *Pseudomonas halodenitrificans* sur acide acétique, l'oxydation totale de l'acide acétique en CO_2 donne 8 e^- par mole d'acide acétique et pour la réaction de réduction des nitrates, un rapport minimal de 0,62 mole d'acide acétique/mole NO^-_3 est préféré. A cette

quantité, il faut ajouter l'acide acétique consommé pour la production de biomasse et la maintenance.

Expérimentalement, dans le cas de *Pseudomonas halodenitrificans* sur acide acétique, un rapport molaire minimal de 0,8 est donc préféré pour obtenir une dénitrification totale.

Le phosphore ajouté est généralement présent sous forme de phosphates : une quantité minimale de 16 mg de phosphore/g de biomasse est nécessaire et peut être apportée par exemple sous forme de KH_2PO_4 ou de Na_2HPO_4 ou de leur mélange.

Les oligo-éléments comprennent essentiellement Mo, Fe, S, Cu, Mg, Mn et leurs mélanges : la détermination d'une quantité minimale nécessaire de chacun de ces éléments n'étant pas aisée et fortement dépendante des souches mises en oeuvre, chacun d'eux sera ajouté en excès dans le milieu de culture sous la forme d'une solution d'oligo-éléments classiquement utilisée en laboratoire.

On obtient ainsi une biomasse qui peut servir à ensemencer tout type de réacteur de dénitrification contenant les effluents à traiter et fonctionnant en mode discontinu ou alimenté par ces effluents et fonctionnant alors en mode continu. On applique dans chaque cas un taux de dilution qui est adapté au type de réacteur mis en oeuvre. Ainsi, dans le cas d'un réacteur de type "batch" ou discontinu le taux de dilution est-il nul.

Pour ce qui concerne les réacteurs alimentés fonctionnant en continu parmi lesquels on peut citer les réacteurs continus agités, les réacteurs à membranes, les réacteurs à lit fixe, les réacteurs à lit fluidisé, les réacteurs continus agités étant préférés.

Le taux de dilution appliqué est fonction de la concentration en biomasse initiale qui peut varier entre de larges limites, mais qui peut être généralement choisie entre quelques centaines de mg/l et plusieurs g/l ; le taux de dilution dépend également de la productivité spécifique des cellules et de la concentration finale en biomasse recherchée comme cela sera illustré dans les exemples 6 à 9 joints.

Il est d'autre part nécessaire de fournir des ions H^+, car, comme le montre l'équation de dénitrification, qui peut s'écrire sous la forme très générale suivante :

Source de carbone et d'énergie + NO_3^- + H^+ → $C_5H_7O_2N$ + CO_2 + N_2 + H_2O ($C_5H_7O_2N$ désignant la biomasse formée), la réaction de dénitrification consomme des ions H^+, c'est-à-dire que pour travailler dans des conditions de pH maîtrisées, il faut maintenir le pH à une valeur fixe, c'est-à-dire le réguler par addition d'ions H^+.

Les ions H^+ peuvent être fournis par trois voies différentes : tout d'abord par l'intermédiaire du CO_2 produit par la réaction, qui se répartit, en fonction de la consigne de pH fixée, entre la phase gazeuse et la phase liquide selon l'équilibre :

$$CO_{2gaz} \xleftrightarrow[\text{Loi de Henry}]{} CO_{2\ dissous} + H_2O \xleftrightarrow[pk = 6,33]{} HCO_3^- + H^+$$

Ce type de régulation du pH nécessite cependant de maintenir dans le réacteur des pressions partielles de CO_2 qui peuvent devenir inhibitrices pour de fortes concentrations en nitrates.

Les bicarbonates HCO_3^- étant également toxiques vis-à-vis des bactéries dénitrifiantes, la réaction de dénitrification doit être conduite de manière à fournir les ions H^+ nécessaires à la régulation du pH sans atteindre le seuil d'inhibition par les bicarbonates. Ce seuil dépend de la population

dénitrifiante mise en oeuvre. Il se situe par exemple entre 0,17 et 0,22 mol/l pour la population mixte sélectionnée ici. Ce seuil pourra être facilement déterminé par l'homme du métier en fonction de la population dénitrifiante utilisée.

La régulation du pH peut être réalisée par l'ajout d'un acide exogène. Cet acide est en général un acide minéral fort, l'acide préféré étant l'acide sulfurique concentré ou l'acide chlorhydrique.

Dans ce cas, les produits de la réaction seront du gaz carbonique CO_2 qui se trouvera sous la forme d'un mélange CO_2 gazeux, bicarbonates, carbonates, dont les proportions dépendent du pH ; des ions tels que des ions sulfates SO_4^{2-} ou des ions Cl- qui proviennent de l'acide ajouté pour régulation du pH ; de l'azote gazeux ; de la biomasse ; et de l'eau.

Les nitrates présents dans les effluents et transformés en azote moléculaire au cours de la réaction sont remplacés, selon le principe de respect de l'électro-neutralité du milieu de culture, d'une part par des sulfates ou des chlorures et d'autre part par des bicarbonates produits par solubilisation du CO_2 généré par la réaction. Ainsi, la force ionique du milieu de culture ($FI= \frac{1}{2}\sum_i Cizi^2$ où zi représente la valence de l'ion considéré, et Ci la concentration de l'ion i), variera-t'elle en fonction des proportions en sulfates ou chlorures et bicarbonates dans le milieu de culture.

Dans le cas d'une régulation du pH de ce type, la réaction de dénitrification doit être conduite de manière à ce que les proportions en sulfates ou chlorures et bicarbonates soient telles qu'il n'y ait pas d'inhibition de la réaction de dénitrification, due soit directement à la concentration de l'une des deux

espèces ioniques, soit indirectement à la force ionique du milieu de culture.

Enfin, on peut réguler le pH par l'ajout simultané par exemple d'acide sulfurique concentré ou d'acide chlorhydrique concentrés et du substrat carboné dans le cas où celui-ci est un acide organique par exemple l'acide acétique. Une partie des ions H^+ nécessaires à la régulation du pH est amenée directement par la source de carbone et d'énergie présente dans le milieu d'alimentation dont le pH est alors acide, en général inférieur à 4.

La consigne de régulation du pH peut varier de 6 à 9, mais est préférentiellement fixée aux environs de la neutralité.

La température de dénitrification peut varier de 10 à 45°C, de préférence 20 à 40°C mais se situe encore préférentiellement aux environs de 30°C.

La biomasse est séparée de l'effluent dénitrifié qui peut être rejeté après avoir subi éventuellement d'autres traitements, tandis que la biomasse peut servir à ensemencer d'autres réacteurs.

L'invention va maintenant être illustrée au moyen des exemples de réalisation suivants donnés à titre illustratif et non limitatif.

Exemples 1 à 7 :

On réalise en anaérobiose, avec de l'acide acétique comme source de carbone une culture d'une population mixte sélectionnée conformément à l'invention, et dont la souche dominante est *Pseudomonas halodenitrificans*. On obtient une biomasse, très active du point de vue de la dénitrification que l'on utilise pour ensemencer un réacteur de type continu agité d'un volume utile de 0,45 litre. Le réacteur est alimenté par un milieu de dénitrification constitué par les effluents à traiter contenant des

nitrates sous forme de KNO_3, $NaNO_3$ et NH4NO3 à une concentration de 500 mM auxquels sont ajoutées une source de carbone et d'énergie constituée par de l'acide acétique dans une quantité telle que le rapport de la concentration en acide acétique à celle en nitrates soit de 0,8 ainsi que 1 ml/l d'une solution d'oligo-éléments dont la composition est la suivante :

Solution d'oligo-éléments pour 1 litre d'eau distillée

$CuSO_4$, $5H_2O$	50 mg
$B(OH)_3$	100 mg
$MnSO_4$, H_2O	100 mg
$ZnSO_4$, $7H_2O$	100 mg
$Mo_7O_{24}(NH_4)_6$, $4H_2O$	1 g
$Co(NO_3)_2$, $6H_2O$	100 mg

On a obtenu les résultats suivants rassemblés dans le tableau 1.

TABLEAU 1

Exemple	[(NO_3^-)] influent (mM)	Temps de séjour (j)	Productivité de dégradation des NO_3^-	
			(mol/l.j)	(kg/m^3j)
1	500	2,68	0,220	13,61
2	500	1,70	0,284	17,6
3	500	1,34	0,374	23,2
4	500	1,10	0,452	28,1
5	500	0,94	0,533	33,1
6	500	0,85	0,586	36,3
7	500	0,77	0,649	40,3

Pour ce qui concerne l'exemple 6, les données cinétiques suivantes ont également été calculées : la concentration en biomasse est de 4 g/l

et la productivité spécifique de 9 kg de nitrate/kg de biomasse et par jour.

Exemple 8 : On utilise un réacteur continu agité d'un volume utile de 1 litre alimenté par un effluent dont l'azote nitrique est constitué par KNO_3, $NaNO_3$, NH_4NO_3, et dont la concentration en nitrates est de 0,8 M.

A cet effet, est ajouté un substrat carboné constitué d'acide acétique de façon à ce que le rapport de la concentration en acide acétique à la concentration en nitrates soit de 0,8. La biomasse est la même que celle utilisée dans les exemples 1 à 7 et le temps de séjour est de 2,29 jours.

La productivité de la dégradation des nitrates est de 0,349 mole/l.j, soit 21,7 kg de nitrates/m^3.j.

Exemple 9 : Extrapolation de l'exemple 6 à un réacteur à membranes.

Pour une concentration en biomasse de 50 g/l, on obtient une productivité de 7,25 mole/l.j, soit 450 kg de NO_3^-/m^3.j.

Les résultats montrent que les performances obtenues dans le procédé de l'invention avec la mise en oeuvre d'un réacteur continu agité sont supérieures à toutes celles obtenues dans l'art antérieur pour le même type de réacteur.

REVENDICATIONS

1. Procédé de biodépollution d'effluents renfermant de fortes concentrations en polluants organiques et/ou en éléments minéraux, susceptibles d'être oxydés ou réduits par des bactéries, caractérisé en ce que la population mixte de bactéries dépolluantes mise en oeuvre est sélectionnée et cultivée à partir de prélèvements des effluents à traiter et dans des milieux de culture comprenant les effluents à traiter eux-mêmes.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le procédé est un procédé de dénitrification biologique, en ce que les polluants sont des nitrates et en ce que la population mixte de bactéries mise en oeuvre est une population mixte de bactéries dénitrifiantes.

3. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la suspension contenant la population mixte dénitrifiante sélectionnée est introduite dans un réacteur de dénitrification maintenu dans des conditions anaérobies alimenté par les effluents à traiter auxquels on ajoute un substrat carboné, une source de phosphore, des oligo-éléments, et en ce que le pH est maintenu à une valeur comprise entre 6 et 9.

4. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que la population mixte est sélectionnée par repiquages successifs dans des milieux comprenant les effluents à traiter eux-mêmes.

5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que le milieu de culture comprend outre les nitrates, un substrat carboné, une source de phosphore et des oligo-éléments.

6. Procédé selon la revendication 3 ou 5, caractérisé en ce que le substrat carboné est choisi

parmi les acides organiques, les alcools, les effluents industriels chargés en polluants carbonés et leurs mélanges.

7. Procédé selon la revendication 3 ou 5, caractérisé en ce que la source de phosphore est constituée par des phosphates à une concentration supérieure à 16 mg de phosphore/g de biomasse.

8. Procédé selon la revendication 3 ou 5, caractérisé en ce que les oligo-éléments sont choisis parmi Mo, Fe, S, Cu, Mg, Mn et leurs mélanges.

9. Procédé selon la revendication 3 ou 5, caractérisé en ce que le contenu du réacteur et/ou le milieu de culture comprend en outre une source d'azote complémentaire différente des nitrates.

10. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que la biomasse est ensuite séparée de l'effluent dénitrifié.

11. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que le réacteur de dénitrification est choisi parmi les réacteurs discontinus "batch", les réacteurs continus agités, les réacteurs à lit fixe, les réacteurs à lit fluidisé, les réacteurs à lit agité, les réacteurs à membrane.

12. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que le pH est régulé grâce à la présence d'une pression partielle de CO_2 dans le réacteur.

13. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que le pH est régulé par addition d'un acide exogène dans le réacteur.

14. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que le pH est régulé par ajout simultané d'un acide exogène minéral fort et du substrat carboné si ce dernier est un acide organique.

15. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que la température de dénitrification est comprise entre 10 et 45°C.

16. Procédé de sélection d'une population mixte de bactéries performantes pour la biodépollution d'effluents chargés en polluants, caractérisé en ce que la population mixte de bactéries dépolluantes mise en oeuvre est sélectionnée et cultivée à partir de prélèvements des effluents à traiter et dans des milieux de culture comprenant les effluents à traiter eux-mêmes.

17. Procédé de sélection selon la revendication 16, caractérisé en ce que la population mixte de bactéries dépolluantes est une population mixte de bactéries dénitrifiantes, et en ce que les polluants sont des nitrates.

18. Souche dénitrifiante *Pseudomonas halodénitrificans* déposée sous la référence CNCM I 1563 ou l'un de ses mutants.

Référence du dossier du déposant ou du mandataire	B 2239.3 PA	Demande internationale n° PCT/FR96/012

INDICATIONS RELATIVES A UN MICRO-ORGANISME DEPOSE

(règle 13*bis* du PCT)

A. Les indications ont trait au micro-organisme visé dans la description

page 1 , lignes 26 à 29 .

B. IDENTIFICATION DU DEPOT D'autres dépôts font l'objet d'une feuille supplémentaire ☐

Nom de l'institution de dépôt

CNCM - COLLECTION NATIONALE DE CULTURES DE MICROORGANISMES

Adresse de l'institution de dépôt *(y compris le code postal et le pays)*

INSTITUT PASTEUR
25, rue du Docteur Roux
75724 PARIS CEDEX 15
FRANCE

Date du dépôt	n° d'ordre
21 avril 1995	I-1563

C. INDICATIONS SUPPLEMENTAIRES *(le cas échéant)* Une feuille supplémentaire est jointe pour la suite de ces renseignements ☐

D. ETATS DESIGNES POUR LESQUELS LES INDICATIONS SONT DONNEES
(si les indications ne sont pas données pour tous les Etats désignés)

E. INDICATIONS FOURNIES SEPAREMENT *(le cas échéant)*

Les indications énumérées ci-après seront fournies ultérieurement au Bureau international *(spécifier la nature générale des indications p. ex., "n° d'ordre du dépôt")*

Réservé à l'office récepteur	Réservé au Bureau international
☐ Cette feuille a été reçue en même temps que la demande internationale	☒ Cette feuille est parvenue au Bureau international le : 16.09.96 (16 Sep 96)
Fonctionnaire autorisé	Fonctionnaire autorisé Anita Addae-Kvesch

Formulaire PCT/RO/134 (juillet 1992)

PCT 897/200792

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In tional Application No
PCT/FR 96/01250

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C02F3/34

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C02F

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,91 01278 (APPLIED BIOTECHNOLOGIES ;SECOPRO INTERNATIONAL LTD (GB)) 7 February 1991 see page 2, line 27 - page 3, line 10 see page 3, line 27 - line 35 see page 10, line 18 - page 11, line 8 ---	1,2,5,8, 16
A	EP,A,0 562 466 (POSPISCHIL BRANKO) 29 September 1993 see the whole document ---	1-17
A	EP,A,0 634 368 (SEKOULOV IVAN PROF DR ING) 18 January 1995 see the whole document -----	2,11,17, 18

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
5 December 1996	18. 12. 96

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Gonzalez Arias, M

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int ional Application No
PCT/FR 96/01250

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A-9101278	07-02-91	AU-A-	4908093	13-01-94
		AU-A-	6033890	22-02-91
		EP-A-	0434810	03-07-91
		JP-T-	4505279	17-09-92
EP-A-0562466	29-09-93	DE-A-	4208698	14-10-93
EP-A-0634368	18-01-95	DE-D-	59301177	25-01-96

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

D ıde Internationale No
PCT/FR 96/01250

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C02F3/34

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 6 C02F

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO,A,91 01278 (APPLIED BIOTECHNOLOGIES ;SECOPRO INTERNATIONAL LTD (GB)) 7 Février 1991 voir page 2, ligne 27 - page 3, ligne 10 voir page 3, ligne 27 - ligne 35 voir page 10, ligne 18 - page 11, ligne 8 ---	1,2,5,8, 16
A	EP,A,0 562 466 (POSPISCHIL BRANKO) 29 Septembre 1993 voir le document en entier ---	1-17
A	EP,A,0 634 368 (SEKOULOV IVAN PROF DR ING) 18 Janvier 1995 voir le document en entier -----	2,11,17, 18

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
5 Décembre 1996	18. 12. 96

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale	Fonctionnaire autorisé
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Gonzalez Arias, M

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

D ıde Internationale No
PCT/FR 96/01250

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
WO-A-9101278	07-02-91	AU-A-	4908093	13-01-94
		AU-A-	6033890	22-02-91
		EP-A-	0434810	03-07-91
		JP-T-	4505279	17-09-92
EP-A-0562466	29-09-93	DE-A-	4208698	14-10-93
EP-A-0634368	18-01-95	DE-D-	59301177	25-01-96