

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international



WIPO | PCT



(10) Numéro de publication internationale
WO 2014/125217 A2

(51) Classification internationale des brevets :
C02F 3/30 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2014/050286

(22) Date de dépôt international :
13 février 2014 (13.02.2014)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
1351235 13 février 2013 (13.02.2013) FR

(71) Déposants : UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE (PARIS 6) [FR/FR]; 4, Place Jussieu, F-75005 Paris (FR). CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75016 Paris (FR).

(72) Inventeurs : GUERBOIS, Delphine; 15 rue Marmontel, F-75015 Paris (FR). MORIN, Guillaume; 9 rue de Laghouat, F-75018 Paris (FR). ONA-NGUEMA, Georges; 6 avenue Parmentier, F-94290 Villeneuve-le-roi (FR).

(74) Mandataires : GOULARD, Sophie et al.; Ipsilon Brema-Loyer, Le Centralis, 63 avenue du Général Leclerc, F-92340 Bourg-la-Reine (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport (règle 48.2.g)

(54) Title : METHOD OF BIOLOGICALLY-ASSISTED MINERAL DENITRIFICATION IN A LIQUID MEDIUM

(54) Titre : PROCEDE DE DENITRIFICATION MINERALE BIOLOGIQUEMENT ASSISTEE EN MILIEU LIQUIDE

(57) Abstract : The present invention concerns a method for processing nitrogenous materials, and in particular a continuous method of biologically-assisted mineral denitrification in a liquid medium, without producing ammonium, implementing a biogenic carbonated green rust, and the use of such a green rust for reducing nitrite ions into nitrogenous gas.

(57) Abrégé : La présente invention est relative à un procédé de traitement de matières azotées, et en particulier à un procédé continu de dénitrification minérale biologiquement assistée en milieu liquide, sans production d'ammonium, mettant en œuvre une rouille verte carbonatée biogénique et à l'utilisation d'une telle rouille verte pour la réduction des ions nitrites en gaz azotés.



WO 2014/125217 A2

PROCEDE DE DENITRIFICATION MINERALE BIOLOGIQUEMENT ASSISTEE EN MILIEU LIQUIDE

La présente invention est relative à un procédé de traitement de matières azotées, et en particulier à un procédé continu de dénitrification minérale biologiquement assistée en milieu liquide, sans production d'ammonium, mettant en œuvre une rouille verte carbonatée biogénique et à l'utilisation d'une telle rouille verte pour la réduction des ions nitrites en gaz azotés.

Les ions nitrates existent dans les eaux à l'état naturel en absence de pollution. Leur concentration, alors, n'excède pas 3 à 5 mg/l dans les eaux superficielles des rivières, canaux, lacs, étangs et quelques mg/l dans les eaux souterraines. Cependant, les teneurs en ions nitrates dans ces eaux sont en constante augmentation ces dernières années et traduisent une pollution de la ressource liée aux activités humaines (rejets industriels et domestiques de l'agriculture et des élevages, rejets d'effluents d'élevage, alimentation des eaux superficielles par des nappes polluées, « fuites » des zones industrielles et habitées) et en particulier aux activités de surfaces (occupation urbaine et industrielle dense et/ou agriculture intensive, agriculture traditionnelle moyennement intensive, habitat rural dispersé). Les concentrations en ions nitrates dans les nappes sont généralement d'autant plus élevées que celles-ci sont sensibles, peu protégées, influencées par l'urbanisation, les sites industriels et l'agriculture ou l'élevage intensifs. Ces concentrations varient aussi avec la vitesse de circulation-renouvellement des eaux dans les nappes. La limite maximale autorisée est de 50 mg/l en ions nitrates dans les adductions d'eau potable. Cependant, la limite supérieure d'un « bon état écologique » des eaux a été fixée à 25 mg/l dans la Directive Cadre sur l'Eau (DCE) du 23 octobre 2000.

Les ions nitrates ne sont pas toxiques en eux-mêmes. C'est leur transformation en ions nitrites et composés nitrosés (nitrosamines et nitrosamides) qui peut provoquer des troubles caractéristiques tels que la méthémoglobinémie ou cyanose du nourrisson, des troubles de la reproduction, des effets endocriniens ou vitaminiques chez les animaux et enfin la survenue de cancers digestifs chez l'Homme. En outre, les fortes teneurs en ions nitrates sont à l'origine de la prolifération d'algues vertes macroscopiques dans toute la région Bretagne.

Les techniques agréées et utilisées aujourd'hui de dépollution des ions nitrates consistent en un procédé de traitement des eaux polluées par voie biologique ou par voie physico-chimique à l'aide de résines échangeuses d'ions. Ces techniques sont très efficaces à court terme, mais onéreuses en investissements

et en exploitation. En particulier, la dénitrification purement biologique (i.e. dénitrification bactérienne), définie comme étant la réduction des ions nitrates en azote gazeux par l'intermédiaire de bactéries dénitrifiantes, a massivement été étudiée dans le cadre du traitement des eaux usées.

5 Les procédés existants de dénitrification purement biologique n'impliquent pas de souches bactériennes pures mais un consortium bactérien (c'est-à-dire un mélange de différentes souches bactériennes) qui se développe en fonction des paramètres physico-chimiques des eaux à traiter. Le principal inconvénient d'un tel procédé est la non-maîtrise des produits de réduction formés, à savoir une majorité
10 d'ammonium NH_4^+ (Cruz-Garcia *et al.*, Journal of Bacteriology, 2007, **189**(2), 656-662). Au regard des critères de qualités des eaux énoncées ci-dessus, la production d'ammonium n'est pas acceptable dans l'élaboration d'un procédé de dénitrification à grande échelle. En outre, lorsque de fortes concentrations en ions nitrates sont présentes, une accumulation des ions nitrites toxiques est observée lors
15 de la mise en œuvre d'un tel procédé.

Plus récemment, les recherches ont été menées sur des procédés d'oxydoréduction des ions nitrates par le Fe(II) ou le Fe(0). En particulier, ces procédés peuvent faire intervenir, comme source de Fe(II), des rouilles vertes synthétisées chimiquement. Les rouilles vertes sont des hydroxysels Fe(II)-Fe(III) à
20 structure en feuillets possédant un bas potentiel d'oxydo-réduction leur conférant un pouvoir réducteur puissant. Les rouilles vertes synthétiques telles que GR_{SO_4} , GR_{Cl} et GR_{CO_3} , présentent généralement un rapport de concentrations molaires Fe(II)/Fe(III) variant de 2 à 3 selon l'anion utilisé et il a été montré que la réduction des ions nitrates en présence de telles rouilles vertes synthétiques conduit à la
25 formation exclusive d'ammonium et de magnétite (Hansen *et al.*, Environ. Sci. Technol., 1996, **30**, 2053-2056 et Applied Clay science, 2001, **18**, 81-91).

Par ailleurs, des rapports de concentrations molaires plus faibles Fe(II)/Fe(III) peuvent être obtenus lorsque la rouille verte est préparée par voie biogénique à partir de la lépidocrocite ou de la rouille verte ferrique et de bactéries
30 ferri-réductrices de type *Shewanella putrefaciens*. Le rapport de concentrations molaires Fe(II)/Fe(III) obtenu est alors de l'ordre de 1 (Ona-Nguema *et al.*, Environ. Sci. Technol., 2002, **36**, 16-20). A ce jour, aucun procédé de l'art antérieur n'a toutefois permis d'isoler et de caractériser des rouilles vertes biogéniques de rapport de concentrations molaires Fe(II)/Fe(III) strictement
35 inférieur à 1 quel que soit l'anion utilisé.

Récemment, il a été proposé dans la demande internationale WO 2008/110689 d'utiliser un hydroxyde de Fe(II)-Fe(III) carbonaté, également appelé hydroxycarbonate ferreux-ferrique ou oxyhydroxycarbonate ferreux-ferrique ou encore rouille verte carbonatée, répondant à la formule

5 $\text{Fe}^{\text{II}}_{6(1-x)}\text{Fe}^{\text{III}}_{6x}\text{O}_{12}\text{H}_{2(7-3x)}\text{CO}_3$, pour la mise en œuvre d'un procédé d'oxydoréduction des ions nitrates en présence de bactéries ferri-réductrices. Dans cette formule, x est défini comme étant le rapport des concentrations molaires Fe(III)/[Fe(III)+Fe(II)]. L'hydroxycarbonate ferreux-ferrique présente un rapport de concentrations molaires Fe(II)/Fe(III) variant de 0,5 à 2 (ce qui correspond à une valeur de

10 x variant de 0,33 à 0,66) et s'oxyde en réduisant les ions nitrates en azote gazeux. La phase oxydée obtenue, présentant un rapport de concentrations molaires Fe(II)/Fe(III) inférieur à 0,5 ($x > 0,66$), est à son tour réduite en présence de bactéries ferri-réductrices pour régénérer l'hydroxycarbonate ferreux-ferrique de départ présentant un rapport de concentrations molaires Fe(II)/Fe(III) variant de

15 0,5 à 2 sans subir de modifications structurelles substantielles. Les exemples 1 et 2 décrivent d'une part, la préparation d'une rouille verte carbonatée biogénique (dont le rapport de concentrations molaires Fe(II)/Fe(III) varie de 0,5 à 2) par réduction bactérienne du Fer (III) en Fer (II) au sein d'un oxyhydroxycarbonate ferrique, et d'autre part, la réduction catalytique des ions nitrates en azote gazeux en présence

20 de cette rouille verte carbonatée. Cependant, des essais comparatifs ont été effectués par les inventeurs de la présente demande et démontrent que des rouilles vertes carbonatées biogéniques obtenues par bioréduction de rouille verte ferrique par *Shewanella putrefaciens* (rapport de concentrations molaires Fe(II)/Fe(III) = 1, correspondant à $x = 0,5$) ou par bioréduction de lépidocrocite par *Shewanella*

25 *putrefaciens* (rapport de concentrations molaires Fe(II)/Fe(III) = 1,25, correspondant à $x = 0,44$), sont incapables de réduire les ions nitrates et ce quel que soit le pH du milieu réactionnel ou alors après au moins 5 mois d'interaction (voir exemple comparatif 1 illustrant la présente demande). Par ailleurs, l'exemple 3 de la demande internationale WO 2008/110689 décrit la

30 réduction catalytique des ions nitrates en azote gazeux en présence d'une rouille verte carbonatée synthétique de rapport de concentrations molaires Fe(II)/Fe(III) = 2, correspondant à $x = 0,33$. Ces résultats sont toutefois en parfaite contradiction avec les résultats décrits par Hansen [10 décembre 2004, Académie d'agriculture de France, « Green rusts and reduction of pollutants » Abstract In

35 Colloque de l'Académie des Sciences « Biogéochimie du cycle de fer-rouilles vertes et fougérite].

Ainsi, contrairement à ce qui est décrit dans la demande internationale WO 2008/110689, une rouille verte carbonatée biogénique de rapport de concentrations molaires Fe(II)/Fe(III) de 1 ou de 1,25 n'est pas capable de réduire les ions nitrates en gaz azotés ou alors de façon très lente. Et lorsqu'une rouille
5 verte carbonatée synthétique de rapport de concentrations molaires Fe(II)/Fe(III) supérieur ou égal à 2 est utilisée, de l'ammonium est produit.

Enfin, Hansen *et al.* (Geochimica et Cosmochimica Acta, 1994, **58**, 12, 2599-2608) ont décrit la réduction des ions nitrites en présence d'une rouille verte synthétique GR_{SO4} de rapport de concentrations molaires Fe(II)/Fe(III) de 2 et
10 indiquent que la réduction peut conduire à plusieurs composés azotés, notamment de l'ammonium.

Des essais effectués par les inventeurs de la présente demande confirment d'ailleurs, d'une part qu'une rouille verte synthétique GR_{Cl} et d'autre part, qu'une rouille verte synthétique GR_{CO3}, toutes deux étant obtenues par voie chimique,
15 (rapport de concentrations molaires Fe(II)/Fe(III) respectifs de 3, correspondant à $x = 0,25$ et de 2, correspondant à $x = 0,33$) réduisent les ions nitrites en ammonium (voir exemples comparatifs 2 et 3 illustrant la présente demande).

Par conséquent, l'intégralité des réactions de dénitrification abiotique connues impliquant du Fe(II) ou du Fe(0) a montré la production d'ammonium
20 comme produit de réduction des ions nitrates/nitrites ou une cinétique très lente pour l'obtention de gaz azotés.

Des solutions curatives simples, respectueuses de l'environnement et moins coûteuses doivent donc être proposées aux populations concernées afin de réduire de manière drastique les concentrations d'azote dans les eaux en évitant la
25 production d'ammonium.

Ainsi, les inventeurs se sont donné pour but de pourvoir à un procédé de traitement de matières azotées, en particulier de traitement des ions nitrates/nitrites présents dans un milieu liquide, qui soit simple et économique à mettre en œuvre, utilisable à l'échelle industrielle, par exemple au sein de stations d'épuration, et ce
30 sans production d'ammonium.

La présente invention a donc pour objet un procédé de dénitrification minérale biologiquement assistée en milieu liquide, ledit procédé étant caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

i) une étape de préparation d'une rouille verte carbonatée par bioréduction d'un oxyhydroxyde de Fe(III) en conditions anaérobies en présence d'une culture d'au moins une bactérie présentant une activité ferri-réductrice jusqu'à obtention d'une rouille verte carbonatée présentant un rapport de concentrations molaires Fe(II)/Fe(III) variant de 1 à 1,5 ;

ii) une étape de réduction des ions nitrites présents dans un milieu liquide par mise en contact de ladite rouille verte carbonatée présentant un rapport de concentrations molaires Fe(II)/Fe(III) variant de 1 à 1,5 et d'un milieu liquide comprenant des ions nitrites, ladite étape conduisant à la formation d'un ou plusieurs gaz azoté(s), et à la production de Fe(III) associé à une phase solide comprenant un ou plusieurs oxyhydroxydes de Fe(III) et/ou un ou plusieurs hydroxydes de Fe(II)-Fe(III) carbonatés ;

iii) une étape de bioréduction dudit Fe(III) produit à l'étape ii), en présence d'une culture d'au moins une bactérie présentant une activité ferri-réductrice pour obtenir une rouille verte carbonatée avec un rapport de concentrations molaires Fe(II)/Fe(III) variant de 1 à 1,5.

En effet, il a été découvert de manière surprenante que les ions nitrites pouvaient être réduits et convertis en un mélange gazeux comprenant N_2O et N_2 et ce sans générer d'ammonium, en présence d'une rouille verte carbonatée biogénique présentant un rapport de concentrations molaires Fe(II)/Fe(III) variant spécifiquement de 1 à 1,5. En dehors de la plage de valeurs [1-1,5] du rapport de concentrations molaires Fe(II)/Fe(III), soit la réduction des ions nitrites peut conduire à de l'ammonium, soit la cinétique de réduction est très lente et donc inadaptée à l'utilisation de ce procédé à l'échelle industrielle.

Ainsi, ladite étape ii) conduit à la formation d'un ou plusieurs gaz azoté(s), sans production d'ammonium, et à la production de Fe(III) associé à une phase solide comprenant un ou plusieurs oxyhydroxydes de Fe(III) et/ou un ou plusieurs hydroxydes de Fe(II)-Fe(III) carbonatés.

Par hydroxydes de Fe(II)-Fe(III) carbonatés, on entend de la rouille verte carbonatée biogénique obtenue à l'étape i) et qui n'a pas réagi lors de l'étape suivante ii), notamment lorsque celle-ci est introduite en excès par rapport aux ions nitrites lors de ladite étape ii).

Selon une forme de réalisation préférée, l'oxyhydroxyde de Fe(III) utilisé dans l'étape i) de préparation d'une rouille verte carbonatée présentant un rapport

de concentrations molaires Fe(II)/Fe(III) variant de 1 à 1,5, est choisi parmi la lépidocrocite (γ -FeOOH), la rouille verte ferrique ($\text{Fe}^{\text{III}}_6\text{O}_{12}\text{H}_8\text{CO}_3$), la ferrihydrite ($5\text{FeOOH}\cdot n\text{H}_2\text{O}$), et ce afin de privilégier une bioréduction complète.

Les étapes de préparation et de régénération d'une rouille verte carbonatée
5 présentant un rapport de concentrations molaires Fe(II)/Fe(III) variant de 1 à 1,5 selon les étapes i) et iii), peuvent être indépendamment effectuées en présence d'une culture pure d'au moins une bactérie présentant une activité ferri-réductrice.

Les bactéries présentant une activité ferri-réductrice utilisables lors des
étapes i) et iii) du procédé conforme à l'invention, peuvent être indépendamment
10 choisies parmi les espèces bactériennes de milieux aquatiques appartenant aux genres *Shewanella*, *Geobacter*, *Pseudomonas*, *Desulfovibrio*, *Geothrix* et *Pelobacter*. On préfère utiliser les bactéries du genre *Shewanella* et encore plus préférentiellement les bactéries choisies parmi *S. putrefaciens* CIP 59.28, *S. putrefaciens* CIP 80.40 et *S. oneidensis* MR1.

15 Le temps de bioréduction lors de l'étape i) est préférentiellement d'au moins 20 heures environ.

Par ailleurs, le temps de bioréduction lors de l'étape iii) varie de préférence de 5 heures à 5 jours environ selon l'état d'oxydation du système.

La concentration en bactérie ferri-réductrice lors des étapes i) et iii) est de
20 préférence supérieure à 10^8 UFC/ml. Alors, la concentration en Fe(III) lors des étapes i) et iii) est de préférence inférieure à 400 mM.

Le temps de contact lors de l'étape ii) est préférentiellement inférieur à 5 jours, de façon à éviter la formation de produits secondaires non désirables, tels que par exemple la magnétite.

25 Dans un mode de réalisation encore plus préféré, le temps de contact entre les ions nitrites et la rouille verte carbonatée lors de l'étape ii) varie de préférence de 1 heure à 48 heures environ.

La quantité de rouille verte utilisée au cours de l'étape ii) est
avantageusement telle que le rapport de concentrations molaires [ions Fe(II)
30 présents dans la rouille verte carbonatée]/[ions nitrites] est d'au moins 3 et ce afin de privilégier une réduction complète des ions nitrites ainsi que la production d'azote gazeux comme produit final.

Selon un mode de réalisation préféré du procédé conforme à l'invention, les étapes ii) et iii) peuvent être réalisées simultanément au cours d'une seule et même étape. Selon une forme de réalisation encore plus préférée, le procédé est réalisé en continu et lesdites étapes ii) et iii) peuvent alors être réitérées jusqu'à
5 épuisement total éventuel des ions nitrites dans le milieu liquide de départ.

Selon le procédé conforme à l'invention, la réduction des ions nitrites est rapide, de l'ordre de quelques heures, et reproductible avec l'assurance de ne jamais conduire à la production d'ammonium. De plus, l'oxydation de la rouille verte carbonatée biogénique par les ions nitrites conduit à l'obtention d'un ou
10 plusieurs oxyhydroxydes de Fe(III) et/ou un ou plusieurs hydroxydes de Fe(II)-Fe(III) carbonatés, qui sont à leur tour de nouveaux réductibles par les bactéries ferri-réductrices.

Le procédé conforme à l'invention fonctionne à partir des ions nitrites présents dans un milieu liquide. Par conséquent, les matières azotées présentes dans
15 ledit milieu liquide telles que par exemple les ions nitrates, devront être préalablement réduits en ions nitrites.

Ainsi, selon une forme de réalisation particulière de l'invention, le procédé comprend en outre une étape ii₀) qui est réalisée de façon préalable à l'étape ii) et au cours de laquelle les ions nitrates présents dans le milieu liquide sont réduits en
20 ions nitrites en présence d'une culture d'au moins une bactérie capable de réduire les ions nitrates en ions nitrites.

Lorsque la bactérie capable de réduire les ions nitrates en ions nitrites entraîne uniquement la réduction des ions nitrates en ions nitrites, l'étape ii₀) conduit à des ions nitrites seulement, sans production d'ammonium.

25 Lorsque la bactérie capable de réduire les ions nitrates en ions nitrites entraîne la réduction des ions nitrates en azote gazeux et/ou en oxyde d'azote gazeux (i.e. dénitrification bactérienne), l'étape ii₀) conduit à un ou plusieurs gaz azotés, sans production d'ammonium.

Lorsque la bactérie capable de réduire les ions nitrates en ions nitrites
30 entraîne au moins en partie une réduction dissimilatrice des ions nitrates en ammonium, ladite étape ii₀) peut conduire à la production d'ammonium.

Cette étape ii₀) de réduction préalable des ions nitrates en ions nitrites peut de préférence être réalisée à l'aide de bactéries capables de réduire les ions nitrates en ions nitrites choisies parmi les genres *Alcaligenes*, *Paracoccus*, *Thiobacillus*,

Vibrio, *Desulfovibrio*, *Shewanella*, *Micrococcus*, *Geobacter*, *Pseudomonas* et *Bacillus*. On préférera toutefois utiliser les bactéries du genre *Shewanella* et encore plus préférentiellement les bactéries choisies parmi *S. putrefaciens* CIP 59.28, *S. putrefaciens* CIP 80.40 et *S. oneidensis* MR1.

5 Dans un mode de réalisation particulier, l'étape ii₀) de réduction préalable des ions nitrates en ions nitrites peut être réalisée en présence d'une culture d'au moins une bactérie strictement dénitrifiante, c'est-à-dire capable de réduire les ions nitrates en ions nitrites sans production d'ammonium. En d'autres termes, l'étape ii₀) conduit à un ou plusieurs gaz azotés sans production d'ammonium.

10 Une telle bactérie strictement dénitrifiante peut être avantageusement *Paracoccus denitrificans*.

Par ailleurs, le temps de réduction lors de l'étape ii₀) varie de préférence de 2 heures à 24 heures environ.

15 La concentration en bactéries capables de réduire les ions nitrates en ions nitrites lors de l'étape ii₀) du procédé conforme à l'invention est de préférence d'au moins 10⁷ CFU/ml pour privilégier un temps de réaction inclus dans la gamme de temps mentionnée ci dessus.

20 Lorsque le milieu liquide à traiter comprend des ions nitrates, la quantité de rouille verte utilisée au cours de l'étape ii) est avantageusement telle que le rapport des concentrations molaires [ions Fe(II) présents dans la rouille verte carbonatée]/[ions nitrates] est d'au moins 3, et ce pour privilégier une réduction complète ainsi que la production d'azote gazeux comme produit final.

25 Selon un mode de réalisation préférée du procédé conforme à l'invention, les étapes ii₀) et ii) peuvent être réalisées simultanément au cours d'une seule et même étape, c'est-à-dire que les ions nitrites générés *in situ* au cours de l'étape ii₀) sont simultanément réduits selon l'étape ii). De ce fait, la rouille verte carbonatée présentant un rapport de concentrations molaires Fe(II)/Fe(III) variant de 1 à 1,5 obtenue selon l'étape i) est directement mise en contact avec un milieu liquide comprenant des ions nitrates et une culture d'au moins une bactérie capable
30 de réduire les ions nitrates en ions nitrites.

Selon ce mode de réalisation, les ions nitrites formés *in situ* dans le milieu liquide par mise en contact lors de l'étape ii) avec une rouille verte carbonatée présentant un rapport de concentrations molaires Fe(II)/Fe(III) variant de 1 à 1,5, conduisent à un ou plusieurs gaz azotés sans production d'ammonium, notamment

lorsque l'étape ii₀) met en œuvre une ou plusieurs bactéries qui permettent la dénitrification bactérienne et/ou qu'elles catalysent uniquement la transformation des ions nitrates en ions nitrites.

En effet, les inventeurs de la présente demande ont découvert de façon
5 surprenante que lorsque les étapes ii₀) et ii) sont réalisées simultanément au cours d'une seule et même étape et qu'elles mettent en œuvre des bactéries autochtones d'une eau usée épurée, la production d'ammonium est complètement évitée.

Lorsque l'étape ii₀) met en œuvre une ou plusieurs bactéries entraînant au moins en partie une réduction dissimilatrice des ions nitrates en ammonium, ladite
10 étape ii₀) peut conduire à la production d'ammonium. Cependant, la présence de la rouille verte carbonatée présentant un rapport de concentrations molaires Fe(II)/Fe(III) variant de 1 à 1,5 dans le milieu liquide permet de réduire considérablement sa production. L'étape ii₀) est alors une étape concurrente de l'étape ii).

Dans un mode de réalisation particulier, des bactéries identiques peuvent
15 être utilisées dans les étapes ii₀) et iii) et du procédé conforme à l'invention. Elles sont choisies parmi les genres *Shewanella*, *Geobacter*. Dans ce cas, les étapes ii₀), ii) et iii) peuvent alors être avantageusement réalisées simultanément au cours d'une seule et même étape. Selon une forme de réalisation encore plus préférée, le
20 procédé est réalisé en continu et lesdites étapes ii₀), ii) et iii) peuvent alors être répétées jusqu'à épuisement total éventuel des ions nitrates et ions nitrites dans le milieu liquide.

Selon un mode de réalisation préféré, il est préférable toutefois pour
25 obtenir un meilleur rendement, de découpler l'étape iii) de régénération de la rouille verte carbonatée biogénique, de l'étape ii₀) de réduction des ions nitrates et nitrites. Cela permet d'éviter que la présence du couple nitrate/nitrite inhibe partiellement l'étape de bioréduction par les bactéries ferri-réductrices.

Afin de mieux comprendre l'invention, la **figure 1** annexée répertorie les
30 différentes étapes pouvant être mises en œuvre lorsque des ions nitrates et des ions nitrites sont présents dans le milieu liquide à traiter. L'étape ii₀) représente la dénitrification bactérienne et/ou la réduction dissimilatrice des ions nitrates en ammonium. Les ions nitrites étant des intermédiaires systématiques des métabolismes microbiens de dénitrification et de réduction dissimilatrice des ions nitrates en ammonium, l'étape ii₀) peut être divisée en deux sous-étapes, une
35 première sous-étape ii_{0a}) de transformation des ions nitrates en ions nitrites et une

deuxième sous-étape ii₀b) de transformation des ions nitrites en produits de réduction N₂O, N₂ et NH₄⁺. L'étape i) représente la production initiale d'une rouille verte carbonatée de rapport de concentrations molaires Fe(II)/Fe(III) variant de 1 à 1,5 du procédé conforme à l'invention, par bioréduction d'un oxyhydroxyde de Fe(III). L'étape ii) représente la dénitrification abiotique par une rouille verte carbonatée de rapport de concentrations molaires Fe(II)/Fe(III) variant de 1 à 1,5 du procédé conforme à l'invention. L'étape iii) représente l'étape de réduction dissimilatrice du Fe(III) du procédé conforme à l'invention permettant la régénération de la rouille verte carbonatée de rapport de concentrations molaires Fe(II)/Fe(III) variant de 1 à 1,5.

Les inventeurs de la présente demande ont découvert que la vitesse de réduction abiotique des ions nitrites par la rouille verte carbonatée biogénique selon l'étape ii), pouvait concurrencer la réduction bactérienne des ions nitrites correspondant à l'étape ii₀b), et ainsi prendre en charge cet intermédiaire. Il est alors envisageable de coupler la dénitrification biologique impliquant des bactéries capables de réduire les ions nitrates en ions nitrites (étape ii₀a)) et la dénitrification abiotique impliquant la rouille verte carbonatée biogénique capable de réduire les ions nitrites en gaz azotés (étape ii)).

Le procédé conforme à l'invention présente donc l'avantage de pouvoir être réalisé en continu et de conduire à une dénitrification de milieux liquides beaucoup plus rapidement que les procédés connus de l'art antérieur (de l'ordre de quelques heures au lieu de plusieurs semaines).

Le procédé est peu coûteux, à régénération autonome impliquant un faible entretien, écologique car basé sur les processus naturels, et adaptable à la concentration en matières azotées à traiter.

Par ailleurs, il est connu qu'une accumulation d'ions nitrites se produit dans les stations d'épuration dont le fonctionnement est basé sur des principes de nitrification/dénitrification biologique mais également lorsque des cultures mixtes sont contenues dans les boues activées. Ainsi, l'intervention des rouilles vertes carbonatées biogéniques sur les ions nitrites, quels que soient les métabolismes présents, permet d'éviter leur accumulation et d'améliorer les rendements en azote gazeux. En effet, selon le procédé conforme à l'invention, l'intervention des rouilles vertes lors de la réduction des ions nitrates permet de prendre en charge environ 50% des ions nitrites présents dans le milieu liquide. La production d'ammonium n'est pas totalement évitée mais elle est nettement diminuée.

Le procédé conforme à l'invention peut être utilisé dans les stations de traitement des eaux usées domestiques et industrielles, dans les stations de potabilisation et dans les stations de traitement du lisier ou de recyclage des boues.

Enfin, l'invention a également pour objet l'utilisation d'au moins une
5 rouille verte carbonatée, répondant à la formule $\text{Fe}^{\text{II}}_{6(1-x)}\text{Fe}^{\text{III}}_{6x}\text{O}_{12}\text{H}_{2(7-3x)}\text{CO}_3$, dans laquelle le rapport de concentrations molaires Fe(II)/Fe(III) varie de 1 à 1,5 pour catalyser, dans un milieu liquide, la réaction de réduction des ions nitrites sans production d'ammonium.

La présente invention est illustrée par les exemples ci-après, auxquels elle
10 n'est cependant pas limitée.

EXEMPLES

Les matières premières utilisées dans les exemples qui suivent sont listées ci-après :

- Nitrate de sodium : Carlo-Erba Reagents 99%
- 15 - Nitrite de sodium : Sigma-Aldrich > 97%
- Acide chlorhydrique (HCl) à 37 % : Sigma-Aldrich 37%
- Eau distillée ultrapure et exempte d'oxygène (eau milliQ) : Millipore, eau préalablement dégazée sous N_2 (Alphagaz, impuretés : $\text{H}_2\text{O} < 3$ ppm, $\text{O}_2 < 2$ ppm, $\text{C}_n\text{H}_n < 0,5$ ppm) et filtrée à l'aide d'un filtre stérile (diamètre des pores du filtre : 0,22 μm)
20
- Hydroxyde ferreux : Merck 99%
- Chlorure ferreux : Merck 99%

Les expériences de mise en contact de la rouille verte carbonatée biogénique avec les ions nitrites selon l'étape ii) du procédé conforme à l'invention
25 ou avec les ions nitrates et les ions nitrites lorsque les étapes ii₀) et ii) sont réalisées de façon simultanée, ont été conduites dans une boîte à gant vendu sous la dénomination commerciale Jacomex BS531 par la société Jacomex, sous atmosphère d'argon pour éviter l'oxydation de la rouille verte par l'oxygène présent dans l'air.

30 Les réactions ont été réalisées dans des bouteilles de verre de 100 mL et sous agitation rotative (10 rotations par minutes). Les conditions abiotiques ont été obtenues de la façon suivante : 0,1 g de rouille verte carbonatée biogénique

(dénommée ci-après GR_L ou GR_F) obtenu par bioréduction de la lépidocrocite (Lp) de formule $\gamma\text{-FeOOH}$ ou par bioréduction de la rouille verte ferrique (RVF) de formule $\text{Fe}^{\text{III}}_6(\text{OH})_4(\text{OOH})_4\text{CO}_3$ a été dispersé par ultra-sons dans 59 mL d'eau milliQ et le pH a été ajusté à $7,5 \pm 0,2$ avec une solution d'HCl de concentration 1 M. Deux solutions mères d'ions nitrites et d'ions nitrates de concentration 0,3 M, exemptes d'oxygène ont été préparées. 1 mL de la solution mère d'ions nitrites ou d'ions nitrates selon l'étude réalisée, a été ajouté à la solution contenant la rouille verte carbonatée biogénique GR_L ou GR_F telle que préparée ci-dessus. Ainsi, la concentration initiale théorique en ions nitrites ou en ions nitrates est d'environ 5 mM au début de la réaction.

Toutefois, la concentration initiale en ions nitrites ou ions nitrates déterminée expérimentalement varie d'environ 4 mM à 7 mM. En effet, afin de préserver les conditions anaérobies du système, une imprécision existe sur le volume de la solution mère en ions nitrites réellement injecté dans les flacons fermés. Cette imprécision induit une concentration initiale en ions nitrites calculée expérimentalement qui peut être légèrement différente de la concentration initiale théorique en ions nitrites.

Des échantillons ont été collectés pendant le temps de réaction grâce à une seringue munie d'une aiguille afin d'analyser les concentrations en Fe(II), en ions nitrites, en ions nitrates (lorsque le milieu liquide contient des ions nitrates) et en ammonium lors de la réaction. Par ailleurs, les phases solides oxydées (oxyhydroxydes de Fe(III)) ont été centrifugées, séchées et caractérisées par analyse par diffraction des rayons X (DRX).

La concentration en $\text{Fe(II)}_{\text{total}}$ a été déterminée après mélange de 0,5 mL d'un échantillon collecté et de 0,5 mL d'une solution d'HCl de concentration 1 M. La concentration en $\text{Fe(II)}_{\text{soluble}}$ a été déterminée après filtration d'un échantillon sur un filtre en membrane de cellulose, de marque Minisart (diamètre des pores du filtre : 0,22 μm) et mélange de 0,5 mL du filtrat obtenu et 0,5 mL d'une solution d'HCl de concentration 1M. Les concentrations en $\text{Fe(II)}_{\text{total}}$ et $\text{Fe(II)}_{\text{soluble}}$ ont été déterminées quelques secondes après le prélèvement de chacun des échantillons par la méthode modifiée de la 1,10-phénanthroline (Fadrus et Maly, *Analyst*, 1975, **100**, 549-554).

Les concentrations en ions nitrites, ions nitrates et ammonium ont été déterminées à partir des mêmes échantillons filtrés que ceux utilisés pour

déterminer la concentration en $\text{Fe(II)}_{\text{soluble}}$ par chromatographie ionique avec un appareil vendu sous la dénomination commerciale DIONEX ISC 3000.

Les valeurs de pH en solution ont été déterminées à l'aide d'un pHmètre vendu sous la dénomination commerciale Consort C830 par la société Fisher
5 Bioblock Scientific et étalonné à pH 4, 7 et 10 avec des solutions étalons Fisher Scientific.

Les rouilles vertes carbonatées obtenues selon l'étape i) du procédé conforme à l'invention et les oxyhydroxydes de Fe(III) (phases solides oxydées) obtenues selon l'étape ii) du procédé conforme à l'invention, ont été soumis à une
10 analyse par DRX. Pour éviter l'oxydation par l'air, les échantillons ont été prélevés sous atmosphère d'argon dans une boîte à gants (teneur en O_2 d'environ 40 ppm) avec une seringue, puis ont été directement placés sur une pastille de silicium et séchés dans un dessiccateur sous vide. La pastille contenant l'échantillon sec a été fixée dans une chambre anaérobie. Les mesures de diffractométrie de rayons X ont
15 été réalisées avec une radiation $\text{Co } K\alpha$ ($\lambda = 0,17889$ nm) à l'aide d'un diffractomètre vendu sous la dénomination commerciale Panalytical X'Pert Pro MPD monté selon la configuration Debye-Scherrer, en utilisant un miroir elliptique pour obtenir un flux élevé, un faisceau incident parallèle et un détecteur vendu sous la dénomination commerciale X'Celerator pour collecter les faisceaux diffractés.
20 Les données ont été enregistrées en mode de balayage continu avec un angle 2θ compris entre 5° et 80° et un pas de $0,0167^\circ$.

Les rouilles vertes carbonatées obtenues selon l'étape i) du procédé conforme à l'invention, ont été soumises à une analyse par microscopie électronique en transmission (MET). Un microscope électronique de marque
25 Philips CM 20 opérant à 200 kV, équipé d'un spectromètre à énergie dispersive a été utilisé pour observer les phases solides. Une suspension des rouilles vertes carbonatées à analyser a été dispersée rapidement dans l'air sur une grille recouverte de carbone amorphe et a été chargée dans le support d'analyse du microscope. Les produits ont été identifiés à partir de modèles de diffraction d'aires
30 sélectionnées et de l'analyse d'énergie dispersive.

Les rouilles vertes carbonatées obtenues selon l'étape i) du procédé conforme à l'invention, ont également été soumises à une analyse par spectroscopie Mössbauer en transmission (SMT). Les échantillons ont été préparés sous
35 atmosphère d'azote dans une boîte à gants et rapidement transférés dans un cryostat sous atmosphère inerte d'hélium avant d'effectuer les mesures à 77 K ou à 8 K.

La spectroscopie Mössbauer en transmission a été réalisée de 8 K à 295 K avec un cryostat Mössbauer à température variable proche du cycle de l'hélium, équipé avec une isolation vibratoire fabriquée par Cryo Industries of America, en utilisant un spectromètre vendu sous la dénomination commerciale Mössbauer à accélération constante avec une source de cobalt 57 noyée dans une matrice de rhodium et une activité de 50 mCi (millicuries) et calibré avec une feuille de fer de 25 μm d'épaisseur à température ambiante. Les spectres ont été ajustés en utilisant des lignes de profil Lorentzien.

EXEMPLE 1

10 **Préparation et caractérisation de rouilles vertes carbonatées biogéniques selon l'étape i) du procédé conforme à l'invention**

Deux oxyhydroxydes de Fe(III), la lépidocrocite (Lp) et la rouille verte ferrique (RVF), ont été utilisés pour préparer respectivement par bioréduction selon l'étape i) du procédé conforme à l'invention, deux rouilles vertes carbonatées biogéniques dénommées GR_L et GR_F.

Dans un premier temps, des inoculum de souches de bactéries *Shewanella putrefaciens* CIP 59.28 équivalents à la Collection de Cultures de Type Américain (ATCC) 12099, ont été préparés selon la méthode décrite dans Ona-Nguema *et al.*, Geochim. Cosmochim. Acta, 2009, **73**, 1359-1381. La densité cellulaire de chaque inoculum a été déterminée par le nombre d'unités formant une colonie (UFC). Une concentration en bactérie ferri-réductrice de $5,75 \cdot 10^9$ UFC/ml a été utilisée dans les deux bioréductions suivantes.

La bioréduction de la Lp en rouille verte carbonatée biogénique GR_L a été réalisée selon la procédure décrite dans Ona-Nguema *et al.*, Environ. Sci. Technol., 2002, **36**, 16-20 : une solution de Lp de concentration 80 mM et de pH $7,5 \pm 0,2$ a été préparée. Le milieu obtenu a ensuite été stérilisé par autoclave pendant 20 minutes à une température de 120°C, puis, une suspension de bactéries *Shewanella putrefaciens* CIP 59.28 a été ajoutée.

La bioréduction de la RVF en rouille verte carbonatée biogénique GR_F a été réalisée selon la procédure décrite comme suivant : une suspension de RVF de concentration 80 mM et de pH $7,5 \pm 0,2$ a été préparée en boîte à gant sous atmosphère N₂ dans de l'eau et des récipients préalablement stérilisés par autoclave pendant 20 minutes à une température de 120°C. Seule la RVF n'a pas été stérilisée car le chauffage à 120°C modifie sa structure. La stérilité de

l'environnement de préparation a été assurée à l'aide d'un brûleur électrique d'Hofmann vendu par la société Horo Dr. Hofmann GmbH. Puis, une suspension de bactéries *Shewanella putrefaciens* CIP 59.28 a été ajoutée.

Des échantillons ont été collectés pendant la réaction pour suivre la production de Fe(II) et déterminer les taux de bioréduction des deux oxyhydroxydes de Fe(III). Les expériences ont été réalisées sur 12 jours pour la RVF et sur 26 jours pour la Lp. Immédiatement après que la suspension de bactéries ferri-réductrice a été ajoutée, on observe la production de Fe(II)_{total}. La **figure 2** annexée montre l'évolution des concentrations en Fe(II)_{total} (Fe(II)_{tot}, en mM) en fonction du temps (en jours) lors de la bioréduction de la RVF (ronds pleins) et lors de la bioréduction de la Lp (carrés pleins). La valeur n indique le nombre de réplicats identiques. D'après la **figure 2a**, 38,6 mM de Fe(II)_{total} ont été produits après 12 jours de bioréduction de la RVF, alors que la même concentration de Fe(II)_{total} a été produite après 24 jours de bioréduction de la Lp. Comme montré sur la **figure 2b**, le taux de bioréduction initial a pu être calculé sur les 5 premiers jours et selon une cinétique du second ordre. Il est alors de 5,29 mM/h pour la RVF et de 3,21 mM/h pour la Lp.

Ces résultats suggèrent une bioréduction presque deux fois plus rapide de la RVF par rapport à la Lp. Dans les deux expériences, les profils cinétiques sont similaires avec une production rapide de Fe(II)_{total} le premier jour, suivi d'une phase de décélération jusqu'au 7^{ième} jour et enfin, une production linéaire après 7 jours. Ces observations permettent de penser que le Fe(III) est plus disponible pour les bactéries ferri-réductrices *Shewanella putrefaciens* CIP 59.28 dans la RVF que dans la Lp.

Pendant la production de Fe(II)_{total}, l'aspect des rouilles vertes a été suivi par caractérisation minéralogique des précipités formés et les résultats sont reportés sur la figure 3 annexée. Ainsi, la **figure 3a** montre une analyse DRX de la RVF (partie basse) et de la rouille verte carbonatée biogénique obtenue GR_F après 14 jours de bioréduction de la RVF (pics caractéristiques notés GR, partie haute). La **figure 3b** montre une analyse DRX de la Lp (partie basse), de la rouille verte carbonatée biogénique obtenue GR_L après 14 jours de bioréduction de la Lp (partie intermédiaire) et après 33 jours de bioréduction de la Lp (pics caractéristiques notés GR, partie haute). Sur ces figures, l'intensité (en unités arbitraires, u.a) est fonction de l'angle 2 Théta (2θ). Ces analyses DRX indiquent que toute la RVF est réduite après 14 jours en une phase unique correspondant à de la rouille verte carbonatée

alors que la bioréduction complète de Lp est observée après 33 jours d'incubation. La bioréduction de la RVF est donc plus rapide que celle de la Lp.

Par ailleurs, les rouilles vertes GR_L et GR_F respectivement obtenues après 33 jours de bioréduction à partir de la Lp et 12 jours de bioréduction à partir de la RVF ont été centrifugées dans une boîte à gant sous flux d'azote, lavées deux fois avec de l'eau milliQ, et séchées pour être caractérisées par analyses SMT et MET.

Les **figures 4a** et **4b** annexées montrent respectivement la forme hexagonale des cristallites isolés de rouilles vertes carbonatées GR_F et GR_L observés par microscopie électronique en transmission (MET). Les diamètres moyens ont été respectivement mesurés sur 8 et 10 cristallites de GR_F et GR_L et sont respectivement de $2,29 \pm 0,42 \mu\text{m}$ et de $4,96 \pm 0,44 \mu\text{m}$.

Les spectres Mössbauer sont reportés sur les **figures 4c** et **4d** sur lesquelles la transmittance (en %) est fonction de la vitesse (en $\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$). Les spectres Mössbauer des échantillons de GR_F (**figure 4c**) et GR_L (**figure 4d**) mesurés à 77K présentent trois doublets quadripolaires. Le rapport de concentrations molaires Fe(II)/Fe(III) dans les rouilles vertes carbonatées GR_F et GR_L peut être déterminé à partir des doublets D1 (attribué au Fe(II) de la rouille verte carbonatée), D2 (également attribué au Fe(II) de la rouille verte carbonatée) et D3 (attribué au Fe(III) de la rouille verte carbonatée) caractéristiques d'un spectre de rouille verte et du rapport des aires relatives correspondantes $[\text{AR}(\text{D1})+\text{AR}(\text{D2})]/[\text{AR}(\text{D3})]$. Les rapports de concentrations molaires Fe(II)/Fe(III) de GR_F et GR_L sont donc respectivement de 1 et 1,25. Des rapports similaires peuvent être obtenus par calcul direct des concentrations molaires de $[\text{Fe}(\text{II}) + \text{Fe}(\text{III})]_{\text{total}} - \text{Fe}(\text{II})_{\text{total}}$ dans les rouilles vertes carbonatées GR_F et GR_L. A partir d'une solution de Lp de concentration 80 mM, 38,6 mM de Fe(II)_{total} sont produits à 26 jours d'incubation alors qu'il reste 41,4 mM de Fe(III). A partir d'une solution de RVF de concentration 80 mM, 43,2 mM de Fe(II)_{total} sont produits à 12 jours d'incubation alors qu'il reste 36,8 mM de Fe(III). Les rapports de concentrations molaires de Fe(II)/Fe(III) de GR_F et GR_L estimés selon cette méthode sont donc respectivement de 0,93 et 1,17. Ces rapports théoriques sont légèrement sous-estimés puisqu'ils sont calculés à partir des valeurs de concentration de Fe(II)_{total} lors de l'analyse des derniers échantillons à 12 jours pour la bioréduction de la Lp et à 27 jours pour la bioréduction de la RVF et ne sont pas calculés à partir des valeurs réelles de concentration de Fe(II)_{total} à la fin des expériences, c'est à dire à 14 jours pour la bioréduction de la RVF et à 33 jours pour la bioréduction de la Lp.

EXEMPLE 2

Réduction des ions nitrites présents dans un milieu liquide par mise en contact avec une rouille verte carbonatée biogénique GR_F ou GR_L selon l'étape ii) du procédé conforme à l'invention

5 Les rouilles vertes carbonatées biogéniques GR_F et GR_L obtenues ci-dessus à l'**exemple 1** (0,1 g) ont été incubées avec 5,4 mM d'ions nitrites à pH 7,5.

Il a été observé que ces particules de rouilles vertes carbonatées sont en équilibre avec 0,59 mM de Fe(II)_{soluble}. La **figure 5** annexée montre l'évolution des concentrations (en mM) en ions nitrites (triangles pleins), ammonium (losanges pleins), et en Fe(II)_{total} (Fe(II)_{tot}, ronds pleins) en fonction du temps (en heures).
10

Dans les deux expériences correspondant aux **figures 5a** et **5b**, on observe après ajout de la solution de nitrite de sodium que le Fe(II)_{total} est immédiatement oxydé et les ions nitrites réduits. De plus, aucune formation d'ammonium n'est observée lors de l'utilisation de telles rouilles vertes biogéniques GR_F et GR_L, alors
15 que l'utilisation d'une rouille verte synthétique GR_{Cl} conduit majoritairement à de l'ammonium (**voir exemple comparatif 2 ci-après**). Quand GR_F est utilisée, la réaction est rapide les premières trente minutes avec l'oxydation rapide du Fe(II)_{total} et ensuite la réaction suit une seconde cinétique plus lente jusqu'à 48 heures de réaction (**figure 5a**). La réaction est arrêtée après 48 heures par épuisement total du
20 Fe(II)_{total}. Avec GR_L, les mêmes observations peuvent être formulées à la différence que l'oxydation totale du Fe(II)_{total} est plus lente et que la réaction n'est pas finie après 6 jours (1mM de Fe(II)_{total} est toujours présent après 6 jours) (**figure 5b**). Pour les deux réactions, le rapport de concentrations molaires Fe(II)_{oxydé}/NO₂_{réduit} a été calculé après 48 heures de réaction ; il est de 2,1 pour GR_F et GR_L. Ceci suggère
25 la mise en place du même type de réaction entre les ions nitrites et les deux rouilles vertes carbonatées biogéniques GR_F et GR_L. Cependant la cinétique de réduction des ions nitrites et d'oxydation du Fe(II)_{total} est plus élevée lorsque GR_F est utilisée. Ceci peut s'expliquer par le fait que les particules de GR_F sont plus petites que celles de GR_L et présenteraient ainsi plus de sites de surfaces réactifs et donc une
30 capacité à réduire plus vite les ions nitrites que GR_L.

Les produits d'oxydation finaux des rouilles vertes carbonatées biogéniques GR_F et GR_L ont été caractérisés par DRX. La **figure 6** annexée montre l'intensité (en unités arbitraires, u.a) en fonction de l'angle 2-Theta (en degrés). L'oxydation des rouilles vertes carbonatées biogéniques par les ions nitrites conduit
35 à la production d'oxyhydroxydes de Fe(III) sans trace de magnétite. En effet,

l'oxydation de la GR_F et de la GR_L conduit à un mélange de goethite (pics caractéristiques notés Gt) et de lépidocrocite (pics caractéristiques notés Lp) (**figure 6**, partie haute : oxydation de la GR_F et partie basse : oxydation de la GR_L).

De plus grandes quantités de rouilles vertes carbonatées biogéniques GR_F et GR_L obtenues ci-dessus à l'**exemple 1** (0,3 g) ont ensuite été incubées avec 5 7 mM d'ions nitrites à pH 7,5. De ce fait, le rapport des concentrations molaires [ions Fe(II) présents dans la rouille verte carbonatée]/[ions nitrites] est de 3.

Dans les deux expériences correspondant aux **figures 5c** et **5d**, on observe que ce rapport des concentrations molaires [ions Fe(II) présents dans la rouille 10 verte carbonatée]/[ions nitrites] = 3, est suffisant pour la réduction complète des ions nitrites après 5 jours de réaction avec GR_F (**figure 5c**) et ce toujours sans production d'ammonium. Avec GR_L (**figure 5d**), la réaction est plus lente, probablement du fait de la taille plus importante de ces particules qui présentent ainsi moins de sites réactifs de surface. Pour les deux réactions, le rapport de 15 concentrations molaires Fe(II)_{oxydé}/NO₂_{réduit} a été calculé après 48 heures de réaction. Il est de 2,7 lorsque GR_F et de 3,2 lorsque GR_L est utilisée. La présence d'un excès de GR_F ou GR_L par rapport aux ions nitrites implique qu'au bout de 48 heures de réaction, la quantité d'ions nitrites réduite est similaire à celle réduite dans les expériences où 3 fois moins d'ions Fe(II)_{total} ont été utilisés. Par contre, 20 davantage d'ions Fe(II)_{total} ont été oxydés, suggérant une réduction plus complète des ions nitrites. Le Fe(II)_{total} étant introduit en excès, seulement une partie de ce Fe(II)_{total} est oxydé.

EXEMPLE 3

Dénitrification bactérienne et accumulation des ions nitrites en milieu liquide 25 selon l'étape ii₀) du procédé conforme à l'invention

Des expériences de réduction bactérienne des ions nitrates impliquant des bactéries modèles ont été menées avec 3 souches distinctes de l'espèce *Shewanella* (*S. putrefaciens* CIP 59.28, *S. putrefaciens* CIP 80.40 et *S. oneidensis* MR1). Chaque souche (2,5.10⁹ UFC/ml) a été incubée avec 5 à 6,5 mM d'ions nitrates ou 30 avec 4 à 5 mM d'ions nitrites à pH 7,5.

La **figure 7** annexée montre l'évolution des concentrations en ions nitrates (en mM) (ronds pleins), ions nitrites (carrés pleins) et ammonium (triangles pleins) en fonction du temps (en minutes) lors de la mise en contact des ions nitrates (diagrammes de gauche) ou des ions nitrites (diagrammes de droite) avec les

bactéries *S. putrefaciens* CIP 59.28 (**figure 7a**), avec les bactéries *S. putrefaciens* CIP 80.40 (**figure 7b**) et avec les bactéries *S. oneidensis* MR1 (**figure 7c**).

Les souches *S. putrefaciens* CIP 59.28 et *S. putrefaciens* CIP 80.40 accumulent les ions nitrites en 90 minutes environ et la production d'ammonium apparaît au bout de 120 minutes environ. La souche *S. oneidensis* MR1 accumule les ions nitrites en seulement 30 minutes environ et la production d'ammonium apparaît plus rapidement au bout de 90 minutes environ.

Les expériences ont montré que ces trois souches accumulent suffisamment d'ions nitrites pour envisager leur éventuelle prise en charge par les rouilles vertes carbonatées biogéniques.

EXEMPLE 4

Couplage de la dénitrification bactérienne et de la dénitrification abiotique (étapes ii₀) et ii) du procédé conforme à l'invention réalisées simultanément)

La **figure 8** annexée montre l'évolution des concentrations en ions nitrates (en mM) (ronds pleins), ions nitrites (carrés pleins), ammonium (triangles pleins) et Fe(II)_{total} (Fe(II)_{tot}, losanges pleins) en fonction du temps (en minutes) lors de la mise en contact de 6 mM d'ions nitrates avec 0,1 g de GR_F biogénique et des bactéries *S. putrefaciens* CIP 59.28 (**figure 8a**), *S. putrefaciens* CIP 80.40 (**figure 8b**) et *S. oneidensis* MR1 (**figure 8c**) ($3,75 \cdot 10^9$ UFC/ml).

Les ions nitrates sont réduits rapidement par les bactéries en 1 à 2 heures selon la souche utilisée. Les ions nitrites sont observés comme intermédiaires. Les résultats démontrent que les bactéries convertissent dans un premier temps les ions nitrates en ions nitrites, puis, les bactéries réduisent une partie de ces ions nitrites conduisant à la production d'ammonium.

Par ailleurs, les ions Fe(II) de la rouille verte carbonatée biogénique sont oxydés, démontrant une intervention des particules de rouille verte dans le système. Aussitôt que tous les ions nitrates ont été réduits, l'activité ferri-réductrice est mise en jeu pour produire à nouveau du Fe(II).

Dans les **figures 8a, 8b et 8c**, on observe que la concentration en Fe(II)_{total} initiale (à $t = 0$) est sensiblement identique à la concentration en Fe(II)_{total} finale (à $t = 300$ minutes). Par ailleurs, des analyses DRX et MEB (microscopie électronique à balayage) non représentées montrent que l'on régénère bien une rouille verte carbonatée et que les particules de rouille verte sont de tailles similaires à celles des particules de la rouille verte de départ. Ainsi, on a bien

régénération selon l'étape iii) d'une rouille verte carbonatée présentant un rapport de concentrations molaires Fe(II)/Fe(III) variant de 1 à 1,5.

La **figure 9** annexée montre l'accumulation des ions nitrites (en mM) lors de la mise en contact de 6 mM d'ions nitrates avec des bactéries seules (2,5.10⁹ UFC/ml) (trait plein) ou avec des bactéries (3,75.10⁹ UFC/ml) et 0,1 g de GR_F (trait pointillé) en fonction du temps (en minutes). Différentes souches de bactéries sont utilisées *S. putrefaciens* CIP 59.28 (ronds pleins), *S. putrefaciens* CIP 80.40 (carrés pleins) et *S. oneidensis* MR1(triangles pleins).

D'après la **figure 9**, il apparaît qu'en présence de rouilles vertes, l'accumulation des ions nitrites est réduite de 50% lorsque les incubations sont réalisées avec les bactéries de souches *S. putrefaciens* CIP 80.40 et *S. oneidensis* MR1. Cela montre l'implication des rouilles vertes carbonatées biogéniques en présence de bactéries capables de réduire les ions nitrates.

EXEMPLE COMPARATIF 1

Réduction des ions nitrates en milieu liquide par les rouilles vertes carbonatées biogéniques GR_F et GR_L

Des essais comparatifs de réduction des ions nitrates ont été menés avec la rouille verte GR_F préparée selon l'**exemple 1** et dont le rapport de concentrations molaires Fe(II)/Fe(III) est de 1. La **figure 10** annexée montre l'évolution des concentrations (en mM) en Fe(II)_{total} (=Fe(II)_{GR_F}+Fe(II)_{soluble}) (Fe(II)_{tot}, ronds pleins), en Fe(II)_{soluble} (Fe(II)_{sol}, carrés pleins) et en ions nitrates (triangles pleins) en fonction du temps (en jours) lors de la mise en contact de 0,1 g de rouille verte carbonatée GR_F avec 5 mM d'ions nitrates pendant 13 jours à un pH de 6,5 (**figure 10a**), à un pH de 7 (**figure 10b**), et à un pH de 10 (**figure 10c**).

Il est ainsi montré que les ions nitrates ne sont pas réduits par la rouille verte carbonatée présentant un rapport de concentrations molaires Fe(II)/Fe(III) de 1.

La même réaction réalisée avec la rouille verte carbonatée GR_L présentant un rapport de concentrations molaires Fe(II)/Fe(III) de 1,25 et préparée selon l'**exemple 1**, montre la réduction des ions nitrates mais seulement après 5 mois d'interaction.

EXEMPLE COMPARATIF 2

Préparation d'une rouille verte synthétique GR_{Cl} et réduction des ions nitrites en présence de cette rouille verte

Une rouille verte synthétique GR_{Cl} répondant à la formule
5 $[\text{Fe}^{\text{II}}_{4(1-x)}\text{Fe}^{\text{III}}_{4x}\text{OH}_8\text{Cl}\cdot n\text{H}_2\text{O}]$ a été préparée par oxydation à l'air d'une suspension d'hydroxyde ferreux en présence d'un léger excès de chlorure ferreux dissous (Refait *et al.*, Corrosion Science, 1997, **39**, 539-553).

La **figure 11** annexée (partie basse) montre l'analyse DRX de la rouille verte synthétique GR_{Cl} ainsi obtenue (pics caractéristiques notés RV). Sur cette
10 figure, l'intensité (en unités arbitraires) est fonction de l'angle 2θ (en degrés). Selon la littérature, le rapport de concentrations molaires Fe(II)/Fe(III) dans la rouille verte synthétique GR_{Cl} est proche de 3 (Génin *et al.*, Solid State Sciences, 2004, **39**, 705-718).

40 ml d'une suspension aqueuse de rouille verte GR_{Cl} (0,3 g) contient
15 2 mM d'ions Fe^{2+} correspondant au $\text{Fe}(\text{II})_{\text{soluble}}$ naturellement en équilibre avec la GR_{Cl}. La **figure 12a** annexée montre l'évolution des concentrations (en mM) en ions nitrites (triangles pleins), ammonium (losanges pleins), en $\text{Fe}(\text{II})_{\text{soluble}}$ (carrés pleins) et en $\text{Fe}(\text{II})_{\text{total}}$ (ronds pleins) en fonction du temps (en heures). L'injection de 5 mM de nitrite de sodium entraîne une diminution de la concentration en
20 $\text{Fe}(\text{II})_{\text{total}}$ et en $\text{Fe}(\text{II})_{\text{soluble}}$ et une consommation rapide des ions nitrites. Le $\text{Fe}(\text{II})$ de la rouille verte et le $\text{Fe}(\text{II})$ soluble participent à la réaction et de l'ammonium est produit. Le $\text{Fe}(\text{II})$ soluble consommé réapparaît rapidement après 40 minutes par équilibration avec la rouille verte seulement quand les ions nitrites ont été complètement réduits. Il est supposé que l'absence de $\text{Fe}(\text{II})_{\text{soluble}}$ pendant les
25 premières 40 minutes s'explique par sa libération et sa consommation simultanées en présence des ions nitrites.

Afin de vérifier quel type de $\text{Fe}(\text{II})$ est impliqué dans la production d'ammonium, la dénitrification en présence d'une solution d'ions Fe^{2+} issus d'une solution de FeCl_2 de concentration 2 mM sans rouille verte carbonatée a été testée.
30 Quatre mélanges de départ I₀, II₀, III₀ et IV₀ contenant des concentrations variables de 0,05 mM à 0,5 mM en ions nitrites, 2 mM d'ions nitrates, 1 mM d'ions ammonium et 0 ou 2 mM d'ions Fe^{2+} ont été préparés. La solution contrôle IV₀ ne contient pas d'ions Fe^{2+} (voir Tableau 1 ci-dessous).

TABLEAU 1

Composition des mélanges de départ	I ₀	II ₀	III ₀	IV ₀
Ions nitrites	0,05 mM	0,2 mM	0,5 mM	0,5 mM
Ions nitrates	2 mM	2 mM	2 mM	2 mM
Ions ammonium	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM
Ions Fe(II)	2 mM	2 mM	2 mM	0 mM

La **figure 12b** annexée montre les concentrations (en mM) en ions nitrites (1^{er} rectangles de couleur noire), ions nitrates (2^{ième} rectangles de couleur grise), ammonium (3^{ième} rectangles comportant des barres en biais) et ions Fe²⁺ (4^{ième} rectangles comportant des barres horizontales) dans les quatre mélanges finaux I, II, III et IV respectivement obtenus après préparation des mélanges de départ I₀, II₀, III₀ et IV₀ et réaction pendant 48 heures.

Dans toutes les conditions, le Fe²⁺ réduit les ions nitrites sans production d'ammonium, impliquant la formation d'azote gazeux. Aucune réduction des ions nitrites n'a été observée dans la solution contrôle sans ions Fe²⁺ et aucune réactivité des ions Fe²⁺ avec les ions nitrates n'a été observée. Ainsi, la production d'ammonium dans l'expérience de réduction des ions nitrites par GR_{Cl} devrait être attribuée uniquement à la partie des ions nitrites réduits par la rouille verte synthétique GR_{Cl}.

Après 1h30 (**figure 12a**), la réaction a été terminée, les ions nitrites ont été complètement réduits. Plus précisément, après 20 minutes, 0,67 mM d'ammonium a été formé et a été attribué à 0,67 mM d'ions nitrites réduits par la rouille verte sur 2,94 mM réduits au total à ce temps. Ainsi, les rouilles vertes contribuent seulement à 20% de la réaction quand des ions Fe²⁺ coexistent. Ensuite, tous les ions Fe²⁺ sont consommés entre 20 et 40 minutes et 54% des ions nitrites réduits sont convertis en ammonium. Ainsi, l'implication de la rouille verte a augmenté à 54% après la disparition des ions Fe²⁺. Cela implique néanmoins que 46% des ions nitrites sont toujours réduits en gaz azoté. Ceci pourrait suggérer que des ions Fe²⁺ sont petit à petit remis en solution à partir de la rouille verte dès 20 minutes et que leur absence entre 20 et 40 minutes impliquerait qu'ils soient immédiatement oxydés par les ions nitrites dès le début de leur relargage. L'équilibre total à une

concentration de 2 mM réapparaît seulement après 1h30, lorsque les ions nitrites sont absents.

La **figure 11** annexée (partie haute) montre également l'analyse DRX du produit obtenu après oxydation de la rouille verte synthétique GR_{Cl} par les ions nitrites. Le produit obtenu comprend un mélange de magnétite (pics caractéristiques notés Mt et de rouille verte synthétique GR_{Cl} résiduelle (pics caractéristiques notés RV). Ainsi, la différence de réactivité entre la rouille verte synthétique GR_{Cl} et les rouilles vertes biogéniques carbonatées GR_F et GR_L (**exemple 2**) vis-à-vis des ions nitrites est également observée en minéralogie puisque les phases minérales oxydées obtenues lors de la réduction des ions nitrites sont différentes.

EXEMPLE COMPARATIF 3

Préparation d'une rouille verte synthétique GR_{CO_3} et réduction des ions nitrites en présence de cette rouille verte

Une rouille verte carbonatée synthétique GR_{CO_3} répondant à la formule $Fe^{II}_4Fe^{III}_2(OH)_{12}CO_3 \cdot 3H_2O$ a été préparée par co-précipitation de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ et $Fe_2SO_4 \cdot 5H_2O$ en condition d'anoxie. Le rapport de concentrations molaires $Fe(II)/Fe(III)$ dans la rouille verte carbonatée synthétique GR_{CO_3} obtenue était de 2 (Bocher *et al.*, Solid State Sciences, 2004, **6**, 117-124). La rouille verte a ensuite été centrifugée, lavée avec de l'eau dégazée et séchée au dessiccateur sous vide en condition d'anoxie.

La GR_{CO_3} synthétique ainsi obtenue (0,1 g de poudre) a été remise en suspension aqueuse en présence de 6,5 mM d'ions nitrites à pH 8 dans un volume de 60 ml. La **figure 13** annexée montre l'évolution des concentrations (en mM) en ions nitrites (triangles pleins) et en ammonium (losanges pleins) en fonction du temps (en heures).

Il est observé qu'après 48 heures de mise en contact des ions nitrites avec GR_{CO_3} , 3,05 mM d'ions nitrites sont réduits et 0,70 mM d'ammonium est produit. Cela permet de conclure qu'au moins une partie non négligeable des ions nitrites sont réduits en ammonium.

EXEMPLE 5

Couplage de la dénitrification bactérienne et de la dénitrification abiotique (étape ii₀) et ii) du procédé conforme à l'invention réalisées simultanément mettant en œuvre un consortium biologique autochtone d'une eau épurée
5 **comprenant des ions nitrites ou des ions nitrates**

Deux expériences ont été réalisées pour déterminer la capacité des bactéries autochtones d'une eau usée épurée à réduire les ions nitrates et nitrites en présence ou en l'absence des rouilles vertes biogéniques carbonatées GR_L et GR_F telles qu'obtenues à l'exemple 1.

10 Il est important de noter que cette eau usée épurée comprenait environ 60 mg/l d'ammonium avant les expériences, du fait vraisemblablement d'un dysfonctionnement dans le traitement de nitrification utilisé dans la station d'épuration Rhysostep[®] SAUR de Douy-la-Ramée (77), d'où elle a été prélevée. Cette station est de type filtres plantés de roseaux.

15 Dans une première expérience, cette eau usée épurée a été incubée avec 76,4 mg/l N-NO₂⁻ environ.

Les expressions « mg/l N-NO₂⁻ », « mg/l N-NO₃⁻ », et « mg/l N-NH₄⁺ » signifient respectivement les concentrations en azote (en mg/l) contenu dans NO₂⁻, dans NO₃⁻, et dans NH₄⁺.

20 La **figure 14** annexée montre l'évolution des concentrations (en mg-N/l) en ions nitrites (triangles pleins) et en ammonium (losanges pleins) en fonction du temps (en jours) dans cette eau usée épurée comprenant des ions nitrites, en l'absence de rouille verte carbonatée biogénique (**figure 14a**), en présence de GR_L (**figure 14b**) ou en présence de GR_F (**figure 14c**).

25 Dans l'eau usée épurée seule (i.e. sans rouille verte carbonatée biogénique), 30,6 mg/l N-NO₂⁻ sont réduits en 5 jours sans production d'ammonium (**figure 14a**). Lorsque la rouille verte carbonatée biogénique est présente dans l'eau usée épurée, la réduction des ions nitrites est fortement améliorée toujours sans aucune production d'ammonium (**figures 14b et 14c**). En effet, après 4 jours
30 d'incubation, 70,4 mg/l N-NO₂⁻ et 76,4 mg/l N-NO₂⁻ sont réduits en présence respectivement de GR_L et GR_F. Ainsi, la réactivité de la rouille verte biogénique carbonatée dans cette eau usée épurée n'est pas altérée et reste similaire à celle déjà observée sur des eaux synthétiques.

Ces résultats démontrent que la rouille verte carbonatée biogénique présente une forte réactivité vis-à-vis des ions nitrites (étape ii) du procédé conforme à l'invention) même dans un milieu liquide naturel comprenant un consortium biologique naturel (i.e. une eau usée épurée comprenant un consortium biologique autochtone). La rouille verte carbonatée biogénique réduit les ions nitrites en gaz azotés sans produire d'ammonium.

Cette expérience montre la réactivité de la rouille verte carbonatée biogénique vis-à-vis des ions nitrites dans l'eau usée épurée.

Dans une deuxième expérience, l'eau usée épurée telle que définie ci-dessus a été incubée avec des ions nitrates.

La **figure 15** montre l'évolution des concentrations (en mg-N/l) en ions nitrates (ronds pleins), nitrites (triangles pleins) et ammonium (losanges pleins) en fonction du temps (en jours) dans cette eau usée épurée comprenant des ions nitrates, en l'absence de rouille verte carbonatée biogénique (**figure 15a**) ou en présence de GR_L (**figure 15b**).

La **figure 15a** montre que dans l'eau usée épurée incubée avec 73 mg/l N-NO₃⁻ et en l'absence de GR_L, 28,6 mg/l N-NO₃⁻ sont réduits le premier jour avec une accumulation maximale en ions nitrites de 16,8 mg/l N-NO₂⁻ pendant la première heure et aucune production d'ammonium n'est observée. Par ailleurs, aucune réduction supplémentaire du nitrate n'est observée les jours suivants.

La **figure 15b** montre que dans l'eau usée épurée incubée avec 83,9 mg/l N-NO₃⁻ en présence de GR_L (Figure 2b), les ions nitrates sont complètement réduits en 4 jours, toujours sans production d'ammonium, avec 47,1 mg/l N-NO₃⁻ réduits le premier jour et une accumulation maximale en ions nitrites de 24,4 mg/l N-NO₂⁻.

Ainsi, la réduction des ions nitrates en présence de rouille verte carbonatée biogénique et d'un consortium biologique naturel est nettement améliorée par rapport à celle conduite en présence d'une eau comprenant un seul type de bactéries pures (cf. exemple 4). L'accumulation des ions nitrites est moins prolongée dans le temps, suggérant que la rouille verte carbonatée biogénique réagit avec les ions nitrites au fur et à mesure de leur production.

Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait qu'en présence d'une rouille verte carbonatée biogénique conforme à l'invention, le consortium biologique autochtone de l'eau usée épurée semble utiliser le « pool » de carbone organique

uniquement pour catalyser la transformation des ions nitrates en nitrites (étape ii_{0a}) (**figure 1**), les ions nitrites sont ensuite à leur tour réduits par la rouille verte carbonatée biogénique en gaz azotés (étape ii); alors que lorsque l'eau usée épurée est soumise à une dénitrification purement biologique, le consortium biologique
5 autochtone semble utiliser le « pool » de carbone organique pour catalyser la transformation des ions nitrates en nitrites et la transformation des ions nitrites en gaz azotés (étapes ii_{0a} et ii_{0b}) (**figure 1**).

Ainsi, en présence de la rouille verte carbonatée biogénique de l'invention, la transformation des ions nitrites en gaz azotés est majoritairement abiotique et ne
10 nécessite pas directement l'apport supplémentaire de carbone organique.

REVENDICATIONS

1. Procédé de dénitrification minérale biologiquement assistée en milieu liquide, ledit procédé étant caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

5 i) une étape de préparation d'une rouille verte carbonatée par bioréduction d'un oxyhydroxyde de Fe(III) en conditions anaérobies en présence d'une culture d'au moins une bactérie présentant une activité ferri-réductrice jusqu'à obtention d'une rouille verte carbonatée présentant un rapport de concentrations molaires Fe(II)/Fe(III) variant de 1 à 1,5 ;

10 ii) une étape de réduction des ions nitrites présents dans un milieu liquide par mise en contact de ladite rouille verte carbonatée présentant un rapport de concentrations molaires Fe(II)/Fe(III) variant de 1 à 1,5 et d'un milieu liquide comprenant des ions nitrites, ladite étape conduisant à la formation d'un ou plusieurs gaz azoté(s), et à la production de Fe(III) associé à une phase solide comprenant un ou plusieurs oxyhydroxydes de Fe(III) et/ou un ou plusieurs
15 hydroxydes de Fe(II)-Fe(III) carbonatés ;

iii) une étape de bioréduction dudit Fe(III) produit à l'étape ii), en présence d'une culture d'au moins une bactérie présentant une activité ferri-réductrice pour obtenir une rouille verte carbonatée avec un rapport de concentrations molaires Fe(II)/Fe(III) variant de 1 à 1,5.

20 2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'oxyhydroxyde de Fe(III) utilisé dans l'étape i), est choisi parmi la lépidocrocite, la rouille verte ferrique et la ferrihydrite.

3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que les étapes de bioréduction i) et iii) sont indépendamment effectuées en présence d'une culture
25 pure d'au moins une bactérie présentant une activité ferri-réductrice.

4. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que les bactéries présentant une activité ferri-réductrice utilisables lors des étapes i) et iii), sont indépendamment choisies parmi les espèces bactériennes de milieux aquatiques appartenant aux genres *Shewanella*, *Geobacter*,
30 *Pseudomonas*, *Desulfovibrio*, *Geothrix* et *Pelobacter*.

5. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le temps de bioréduction lors de l'étape iii) varie de 5 heures à 5 jours.

6. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la concentration en bactérie ferri-réductrice lors des étapes i) et iii) est supérieure à 10^8 UFC/ml.

7. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le temps de contact lors de l'étape ii) est inférieure à 5 jours.

8. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la quantité de rouille verte utilisée au cours de l'étape ii) est telle que le rapport des concentrations molaires [ions Fe(II) présents dans la rouille verte carbonatée]/[ions nitrites] est d'au moins 3.

9. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que les étapes ii) et iii) sont réalisées simultanément au cours d'une seule et même étape.

10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'il est réalisé en continu et lesdites étapes ii) et iii) sont réitérées jusqu'à épuisement total éventuel des ions nitrites dans le milieu liquide de départ.

11. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'une étape ii₀) de réduction des ions nitrates présents dans le milieu liquide en ions nitrites, en présence d'une culture d'au moins une bactérie capable de réduire les ions nitrates en ions nitrites, est réalisée de façon préalable à l'étape ii).

12. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que les bactéries utilisables lors de l'étape ii₀), capables de réduire les ions nitrates en ions nitrites, sont choisies parmi les genres *Alcaligenes*, *Paracoccus*, *Thiobacillus*, *Vibrio*, *Desulfovibrio*, *Shewanella*, *Micrococcus*, *Geobacter*, *Pseudomonas* et *Bacillus*.

13. Procédé selon la revendication 11 ou 12, caractérisé en ce que le temps de réduction lors de l'étape ii₀) varie de 2 heures à 24 heures.

14. Procédé selon l'une quelconque des revendications 11 à 13, caractérisé en ce que la concentration en bactéries capables de réduire les ions nitrates en ions nitrites lors de l'étape ii₀) est d'au moins 10^7 UFC/ml.

15. Procédé selon l'une quelconque des revendications 11 à 14, caractérisé en ce que la quantité de rouille verte utilisée au cours de l'étape ii) est telle que le rapport des concentrations molaires [ions Fe(II) présents dans la rouille verte carbonatée]/[ions nitrates] est d'au moins 3.
- 5 16. Procédé selon l'une quelconque des revendications 11 à 15, caractérisé en ce que les étapes ii₀), ii) et iii) sont réalisées simultanément au cours d'une seule et même étape.

Figure 1

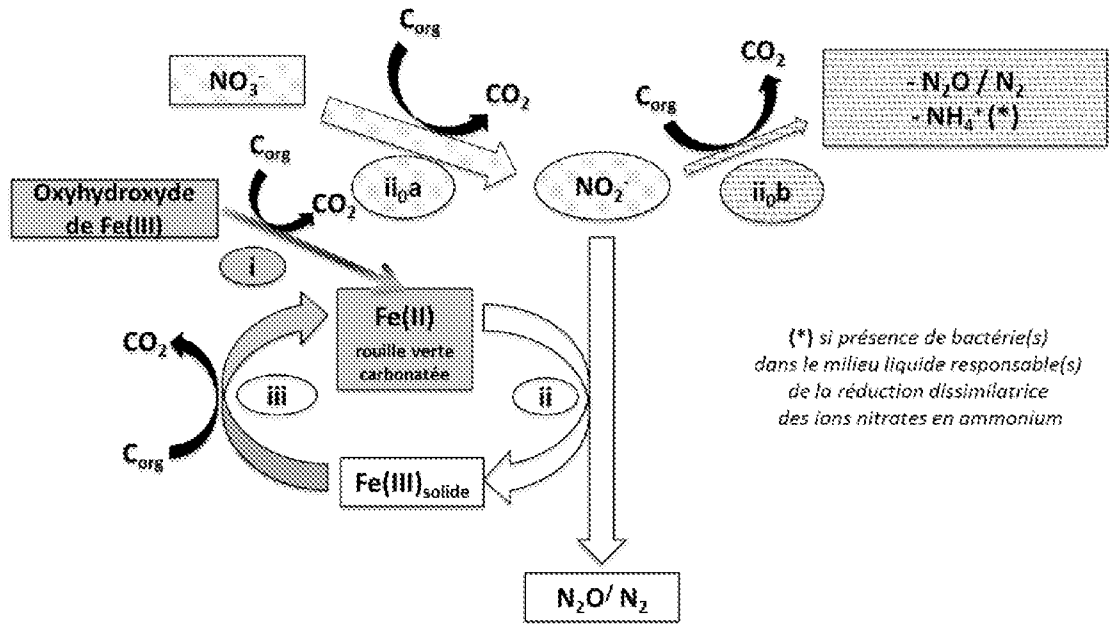


Figure 2

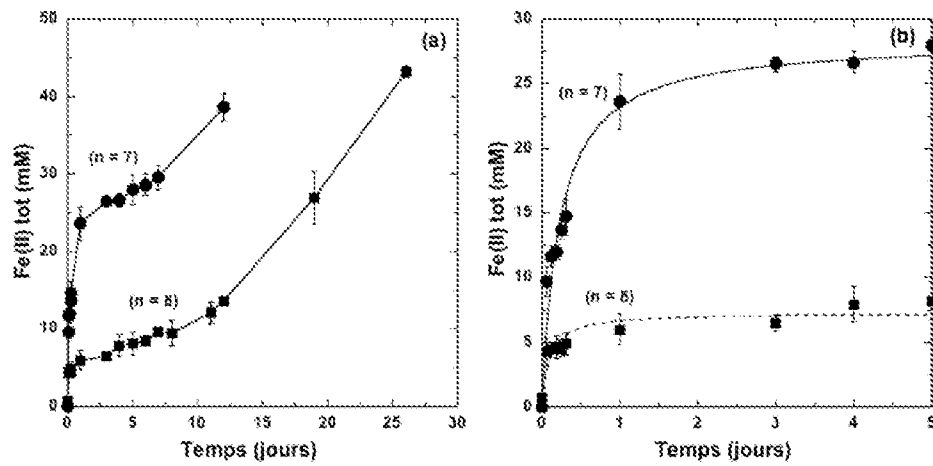


Figure 3

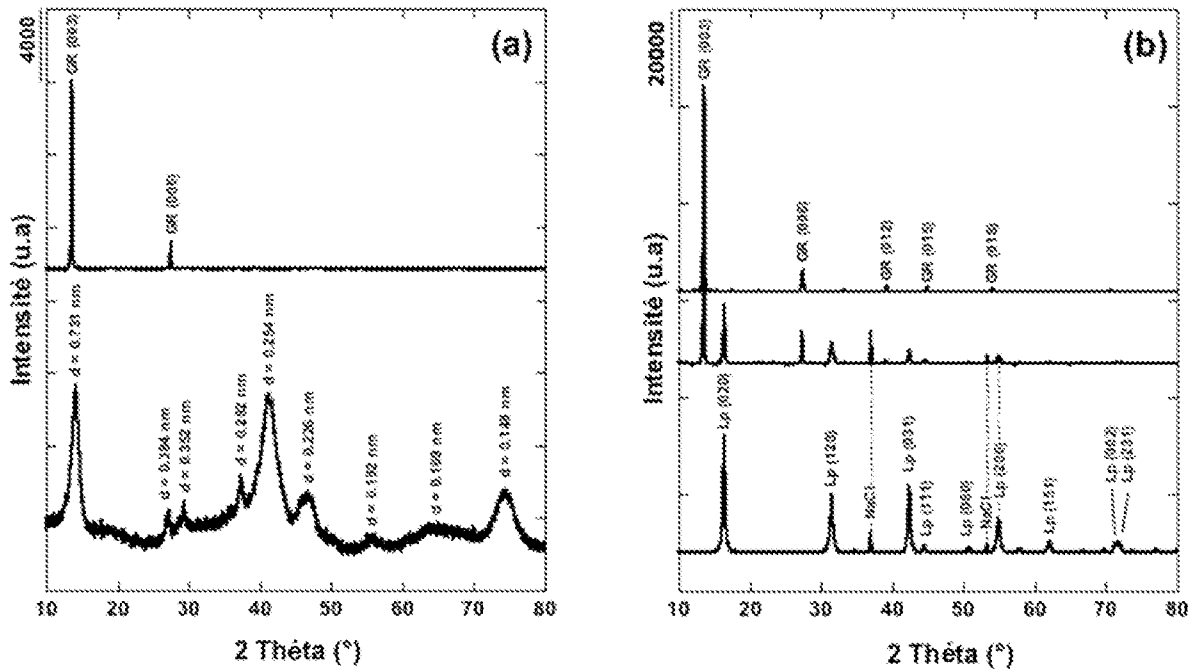


Figure 4

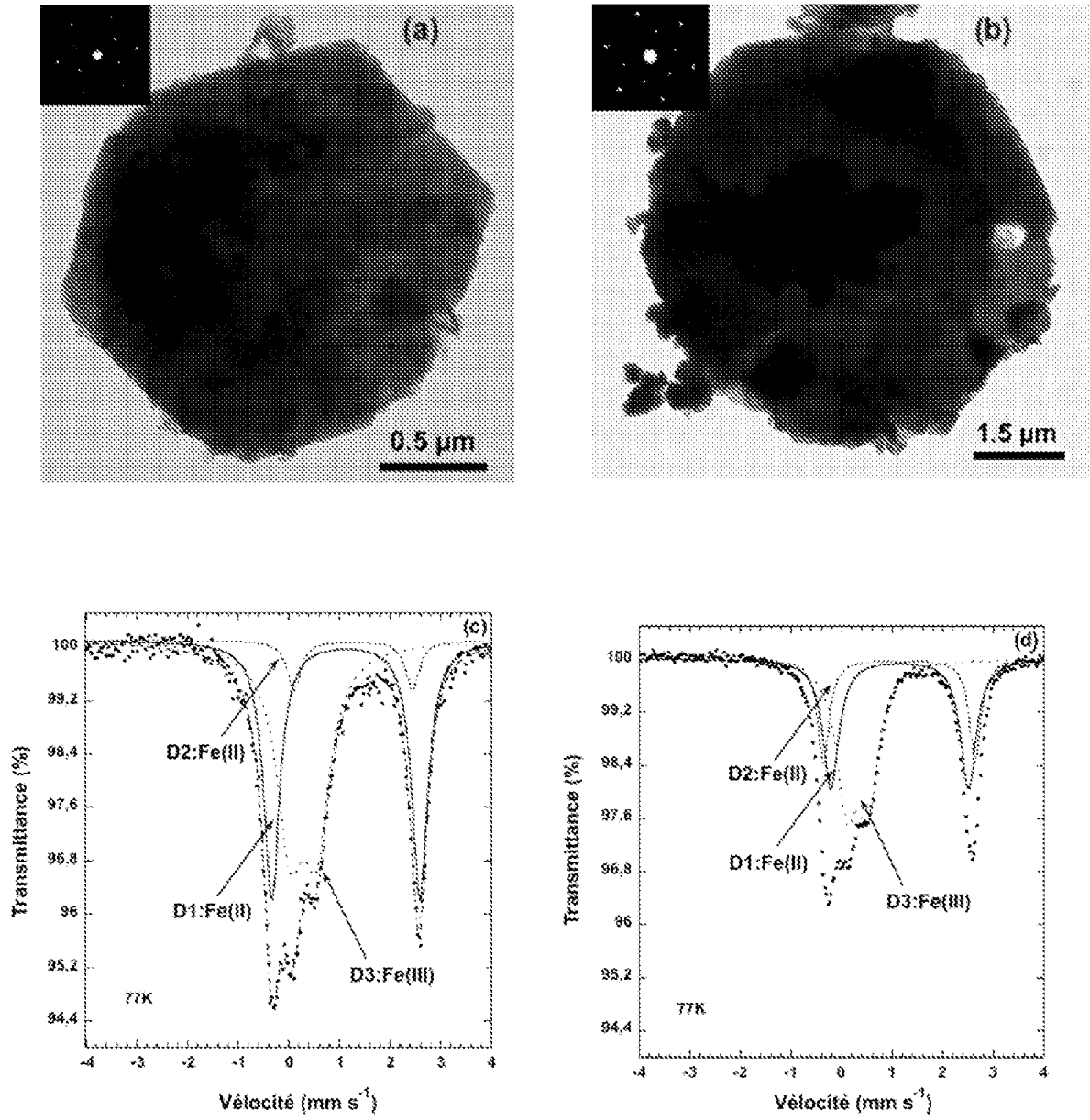


Figure 5

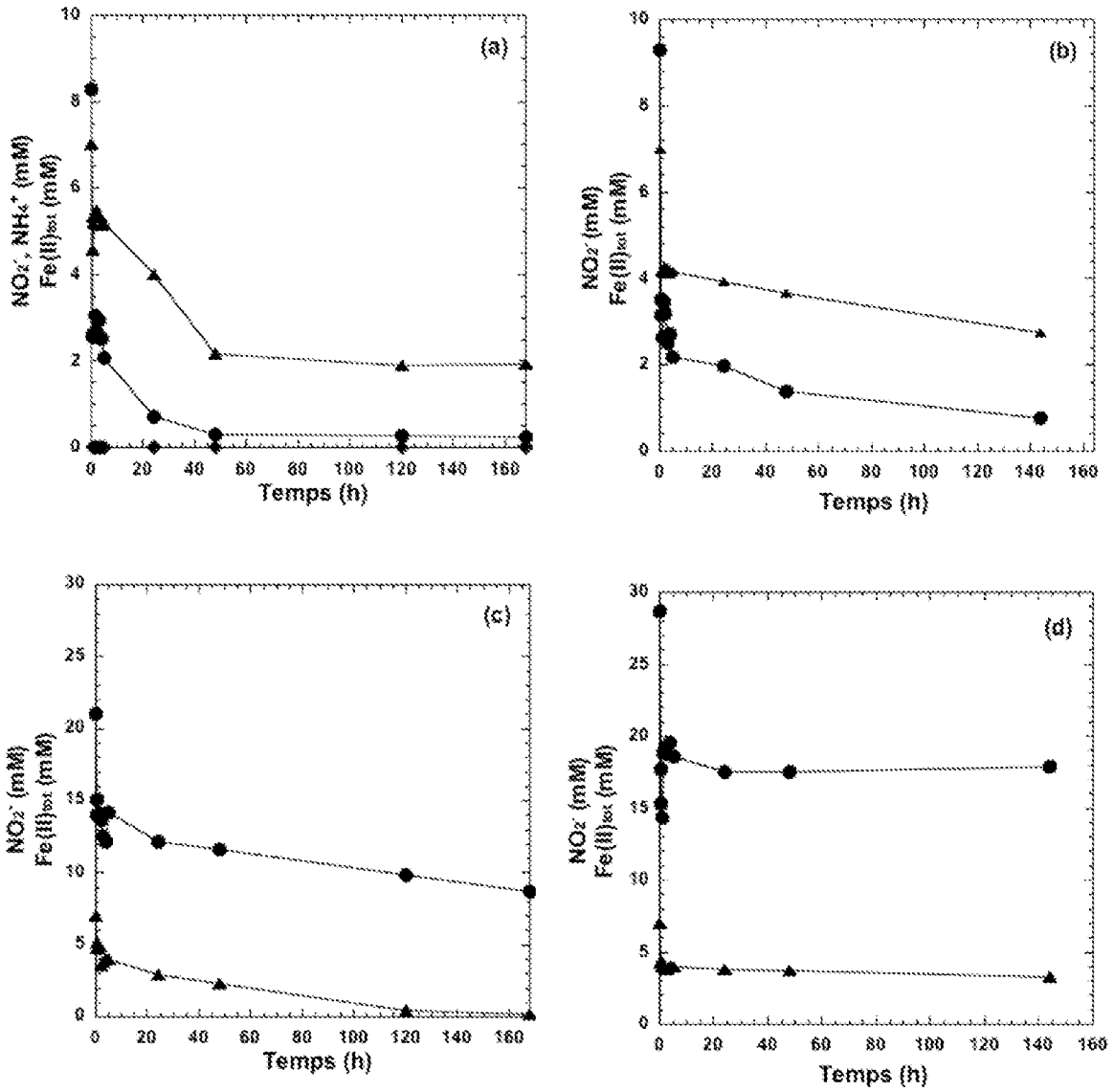


Figure 6

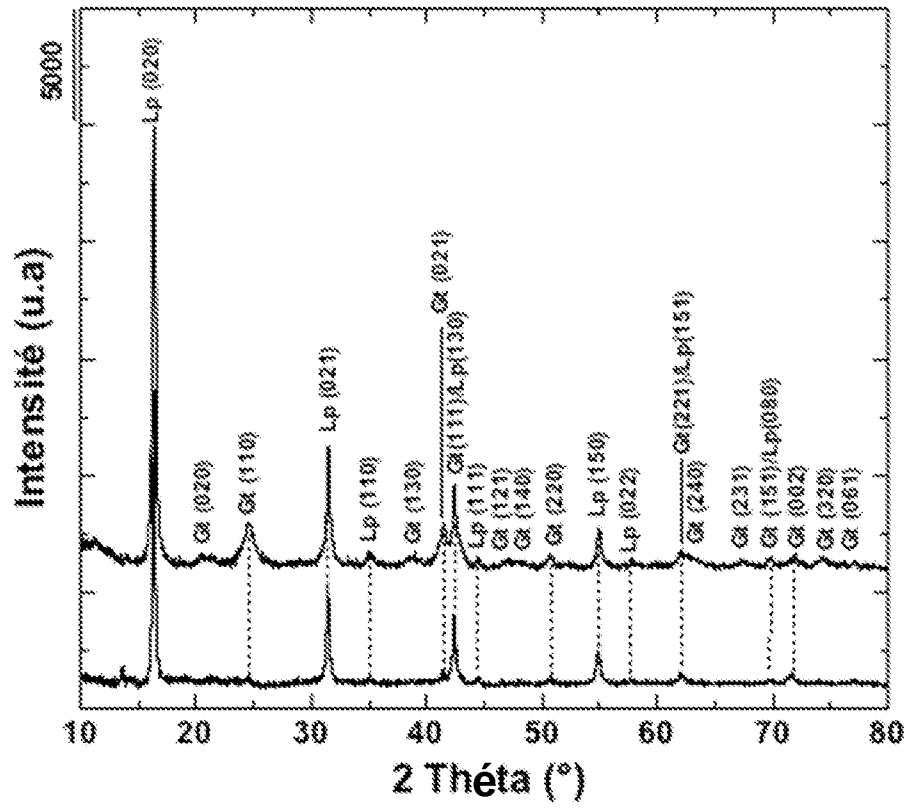
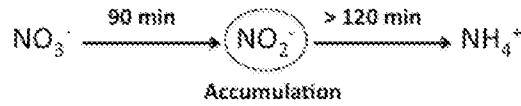
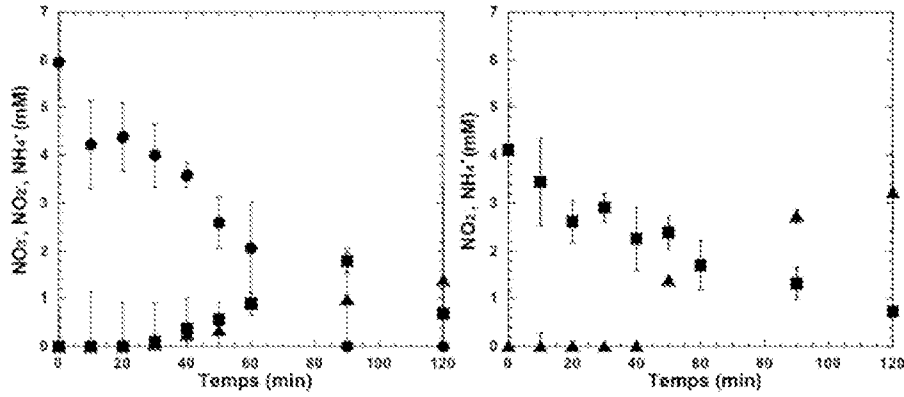
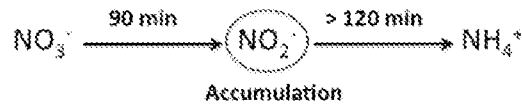
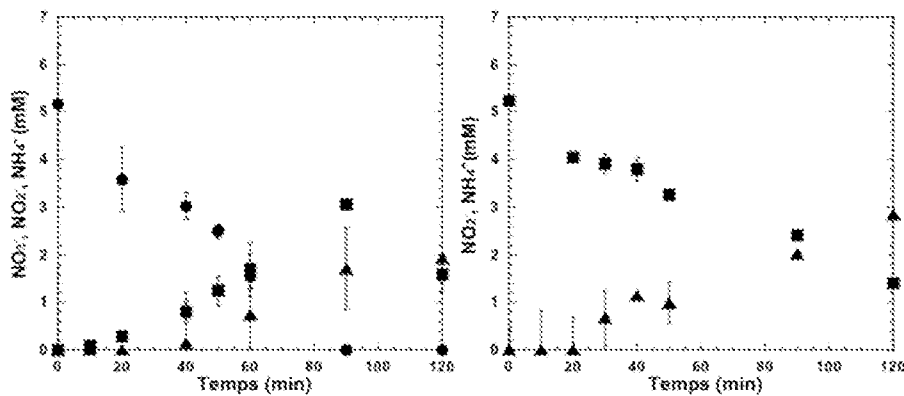


Figure 7

(a) 1- *S. putrefaciens* CIP 59.28



(b) 2- *S. putrefaciens* CIP 80.40



(c) 3- *S. oneidensis* MR1

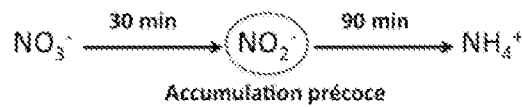
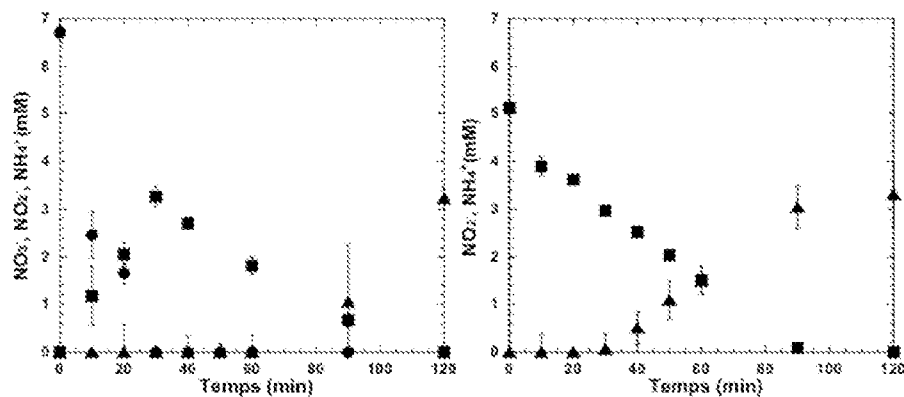


Figure 8

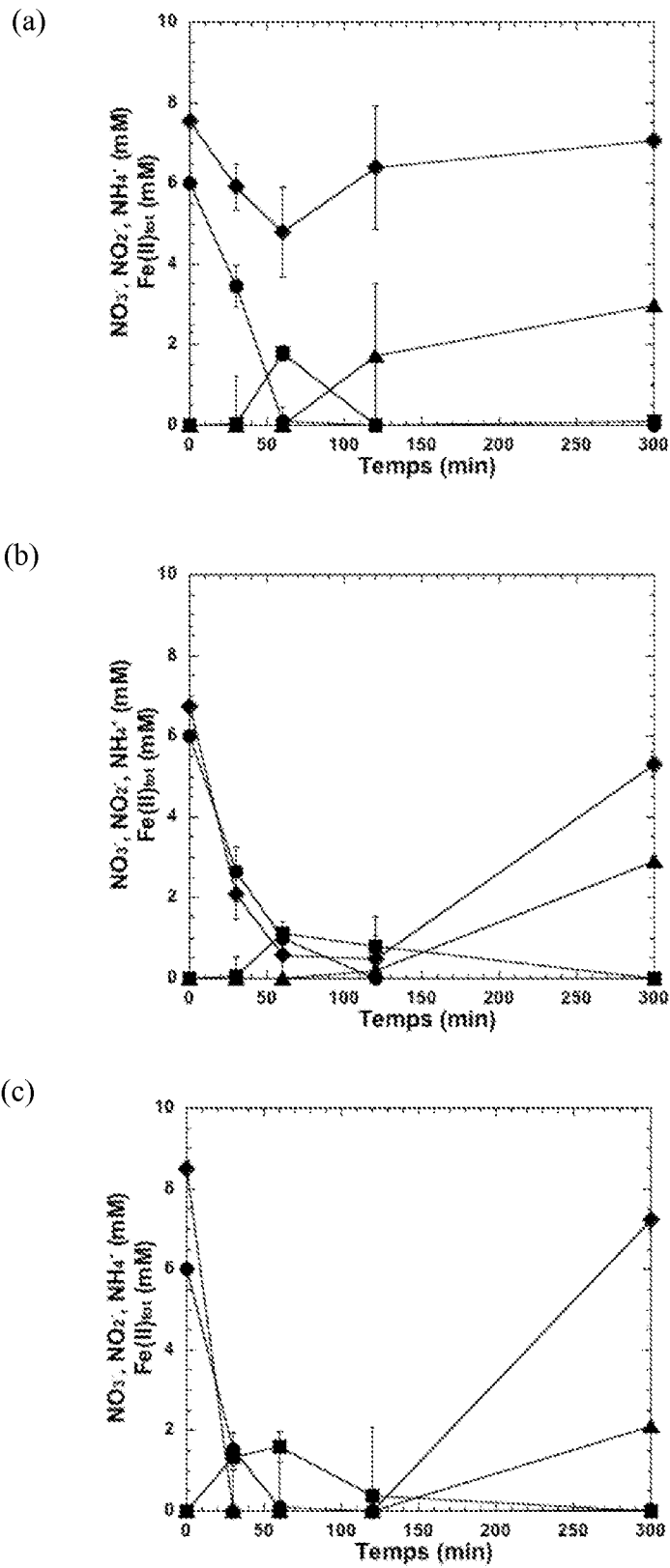


Figure 9

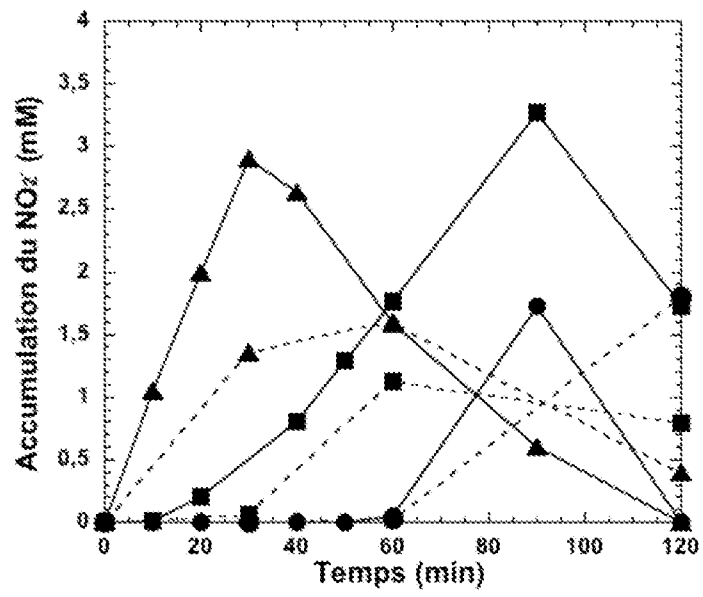


Figure 10

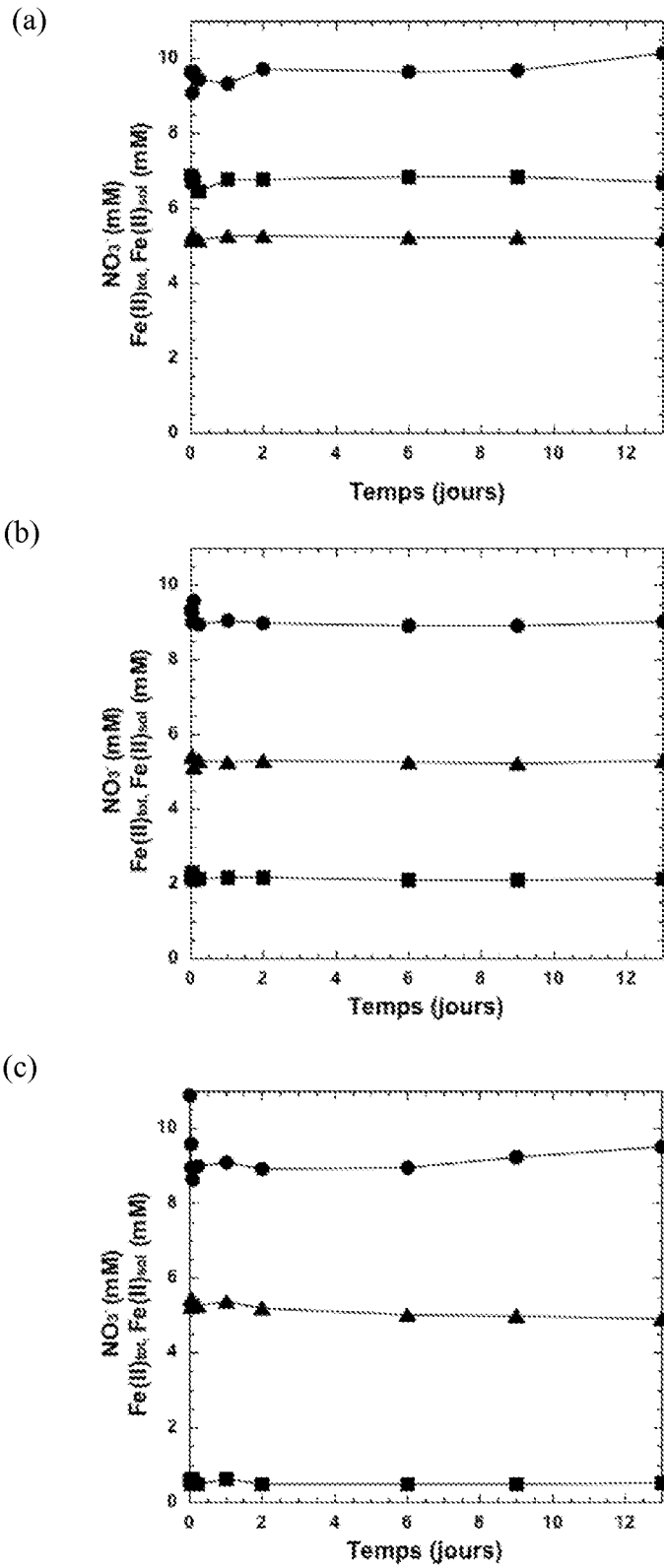


Figure 11

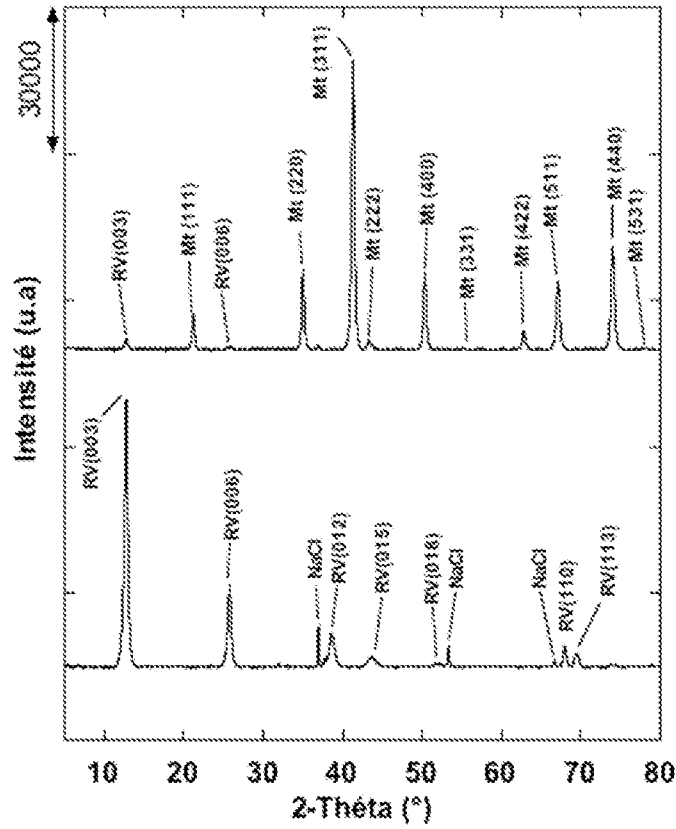


Figure 12

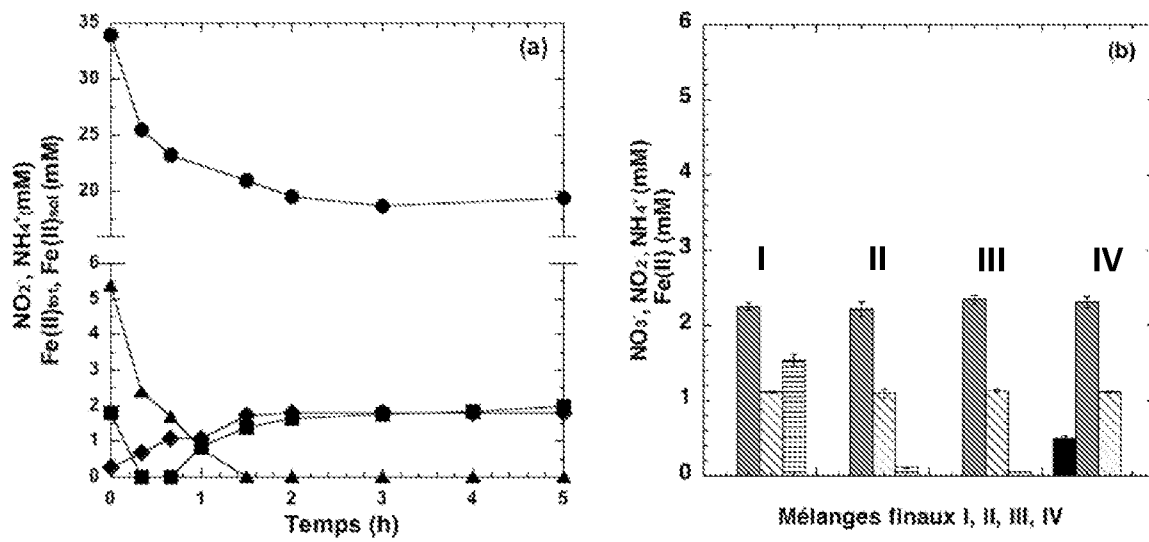


Figure 13

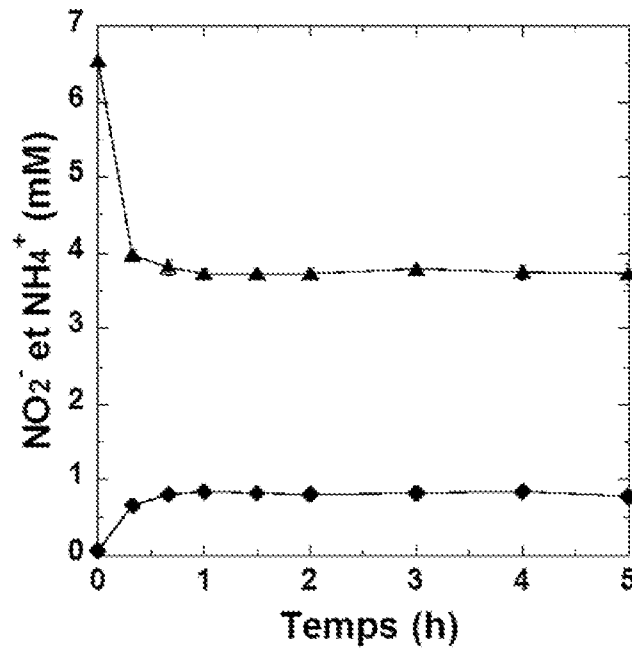


Figure 14

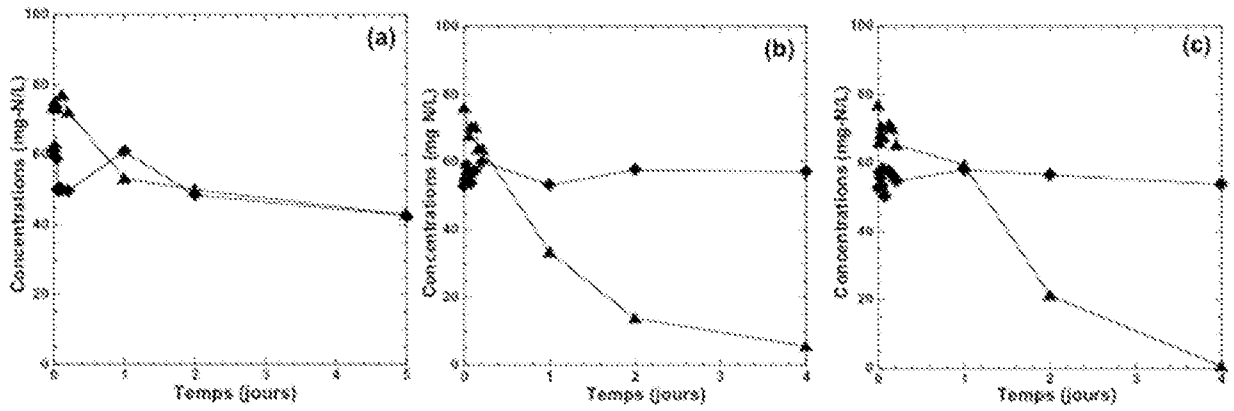


Figure 15

