

ELIMINATION DES NITRATES PAR FILTRATION BIOLOGIQUE AUTOTROPHE SUR SOUFRE EN AQUARIOLOGIE MARINE

Michel HIGNETTE,* Benoit LAMORT,* Marc LANGOUET,** Sébastien LEROY* et Guy MARTIN***

* *Aquarium du MAAO - 293, Av. Daumesnil, 75012 Paris*

** *Le Grand Aquarium - La Ville Jouan - Av. du Général Patton, 35400 Saint Malo*

*** *Laboratoire Chimie des Nuisances et Génie de l'Environnement ENSCR - Av. du Général Leclerc, 35700 Rennes*

summary

A denitrification system, using sulphur as a medium, is proposed to maintain low levels of nitrate in aquariology. Settled on sulphur, autotrophic bacteria, *Thiobacillus denitrificans*, will reduce nitrates in gaseous nitrogen. This system proved to be active very rapidly; tolerance to dissolved oxygen is quite high, production of sulphate did not show evidence of toxicity and mixtures of sulphur and calcium carbonate are usefull in order to avoid pH decrease. There is a direct correlation between the necessary volume of sulphur and the amount of nitrate to reduce. This System works correctly with volumic loads around 1 kg of nitrate/m³ sulphur/day even in sea waters.

INTRODUCTION

Dans les aquariums fonctionnant en circuit fermé, l'accumulation des nitrates., produits de dégradation des composés azotés, est inéluctable. Ils présentent deux inconvénients majeurs : leur toxicité directe vis à vis des animaux, notamment envers les invertébrés et un danger potentiel en cas d'apparition d'un milieu réducteur.

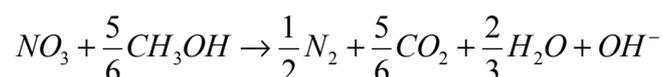
Actuellement, les moyens de limiter la concentration des nitrates dans les circuits fermés sont:

- la déconcentration: renouvellements partiels effectués avec une eau pauvre en nitrates,
- les filtres à algues (difficile à réaliser dans la pratique),
- l'utilisation de "microcosmes" (ADEY, 1983) ou de "mésocosmes" (JAUBERT, 1988),
- la dénitratisation bactérienne en milieu anaérobie, hétérotrophe vis à vis du carbone (respiration-nitrate) actuellement utilisée en aquariologie. Les travaux de MARTIN (1979) montrent que, sur un support soufré, des thiobactéries peuvent réaliser une dénitratisation autotrophe.

L'objectif de ce travail est de valider la possibilité d'appliquer cette technique à l'aquariologie, surtout en eau de mer où l'on cherche à minimiser les changements d'eau et à ne pas dépasser des concentrations de nitrates de l'ordre du mg/l pour les invertébrés.

LA DÉNITRATATION HÉTÉROTROPHE

De nombreuses bactéries anaérobies facultatives pratiquent la respiration-nitrate si elles sont placées en milieu hypoxique. Cette voie métabolique est coûteuse en énergie pour la cellule. Dans le but d'exploiter cette possibilité, il faut fournir aux colonies bactériennes un substrat carboné donneur d'électrons, donc des molécules hydrogène-carbonées (sucres, alcools). Si l'on considère le méthanol, le bilan réactionnel peut s'écrire:



Différents procédés permettent l'obtention d'un milieu anoxique:

- dégazage par dépression,
- saturation en azote gazeux,
- consommation de l'oxygène dissous par une importante flore bactérienne aérobie. C'est la méthode la plus employée en aquariologie car la plus simple et la moins coûteuse. Il faut faire circuler l'eau sur de gros volumes de supports bactériens en milieu confiné ce qui implique, dans la pratique, que les vitesses d'approche soient faibles et que seul 1/6^{ème} à 1/5^{ème} du volume du réacteur soit utilisé pour la respiration-nitrate, le reste servant à consommer l'oxygène dissous. Ces inconvénients qui nécessitent des filtres largement dimensionnés, sont compensés par le rendement élevé de la dénitratisation.

Le substrat carboné doit être disponible en quantité suffisante car il constitue la source d'énergie pour la flore dénitrifiante mais il est aussi consommé par la flore aérobie destinée à appauvrir le milieu en oxygène. Sa présence est nécessaire pour éviter la production de composés indésirables voire dangereux dans ce milieu anaérobie. Sur le plan pratique, la difficulté réside dans la distribution régulière de ce substrat. Selon St. AMAND *et al.*, (1969), la quantité de substrat carboné nécessaire peut être calculée selon l'équation:

$$Q = 2.47 N_3 + 1,53 N_2 + 0,87 D_o$$

Q = quantité de méthanol (mg /l).

N_3 = concentration en azote nitrique (mg/l).

N_2 = concentration en azote nitreux (mg/l).

D_o = concentration en oxygène dissous (mg/l).

La vitesse d'approche est en général comprise entre 0,1 et 0,8 m/h. En pratique, il faut réguler le débit de ces réacteurs en fonction des concentrations de nitrates et de nitrites en sortie. Le pH optimal se situe entre 7 et 8,5. Il est intéressant de noter que la dénitratation hétérotrophe s'accompagne d'une augmentation de l'alcalinité (0,081 °f TAC par mg de nitrates réduits).

A l'aquarium du MAAO, cette technique est utilisée avec des résultats variables. Les réacteurs sont construits en tube PVC et ont un volume de l'ordre de 50 à 80 litres. Les supports bactériens utilisés sont le Siporax et l'argile expansée. Le carbone organique est apporté sous forme d'acétate ou de méthanol. De tels réacteurs peuvent nécessiter une longue période de latence avant de fonctionner correctement (STRAUB, 1994). Pendant cette période, la concentration en nitrites dans l'effluent est susceptible d'atteindre des valeurs très élevées.

Ces dénitrificateurs sont capables de réduire des quantités importantes de nitrates et de fonctionner à des concentrations très élevées. Les points faibles du système sont sa grande consommation en carbone organique et la nécessité d'un milieu très hypoxique d'où l'obligation d'une surveillance constante.

LA DÉNITRATATION AUTOTROPHE PAR LES THIOBACTERIES

En milieu anaérobie, *Thiobacillus denitrificans*, bactérie chimio-autotrophe anaérobie facultative, est capable de pratiquer la respiration-nitrate. Diverses formes de soufre peuvent servir de source d'énergie; nous nous intéresserons uniquement au soufre natif (S^0).

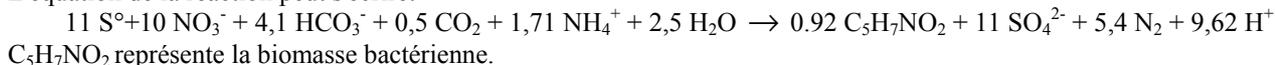
Peu connu en aquariologie, peu utilisé en aquaculture quoique évoqué dans les ouvrages de synthèse, le phénomène est pourtant étudié depuis vingt ans: SIKORA et KEENEY (1976), BATCHELOR et LAWRENCE (1978), DRISCOLL et BISOGNI (1978). Il a été adapté au traitement des eaux usées et des eaux potables. Les travaux de LE CLOIREC et MARTIN (1988) ont précisé les paramètres de fonctionnement de ces dénitrificateurs, aboutissant à la modélisation mathématique.

L'équation du rendement en fonction de la charge volumique est:

$$\rho = 1 - e^{\left(\frac{-3,3}{Cv}\right)}$$

Les réactions provoquent la réduction de l'ion nitrate en azote moléculaire parallèlement à l'oxydation du soufre en sulfates. Le nitrate est l'accepteur final des électrons provenant de l'oxydation du soufre. Cette réaction d'oxydoréduction fournit l'A.T.P. nécessaire à la biosynthèse bactérienne.

L'équation de la réaction peut s'écrire:



La quantité de sulfates produits est importante: 1,1 mole de SO_4^{2-} produite par mole de nitrates éliminés. Ceci ne semble pas poser de problème en eau de mer compte tenu de la teneur initiale élevée en sulfates (885 mg/l). La production d'acide diminue la réserve alcaline: l'élimination de 1 mole de nitrate entraîne une consommation de 0,41 mole de bicarbonates.

L'optimum de pH se situe entre 6,2 et 7,4. Le niveau d'hypoxie est peu limitatif: la réaction peut se dérouler malgré des concentrations d'oxygène dissous relativement élevées. Ceci autorise donc des débits élevés (supérieurs à 10 fois le volume des matériaux par heure).

C'est la charge volumique (Cv) exprimée en kilo de NO_3^- par m^3 de soufre et par jour qui permet de modéliser les quantités de substrat et les débits. En cas d'utilisation de billes de soufre de l'ordre de 1.4 mm de diamètre, la quantité maximale de nitrates éliminée semble être d'environ 3 kg de NO_3^-/m^3 S/j. La charge maximale pour obtenir un rendement de 100% se situe aux alentours de 0,8 kg. Au delà de cette charge, le rendement baisse, il est encore de 30% pour $Cv = 4,5$ kg NO_3^-/m^3 S/j.

L'application du procédé en milieu marin pouvait sembler peu appropriée compte tenu de la teneur en chlorure de sodium de l'eau de mer (29,5 g/l). En effet, CLAUS et KUTZNER (1985) montrent une action inhibitrice du NaCl observée à partir de 20 g/l (Fig. N° 1)

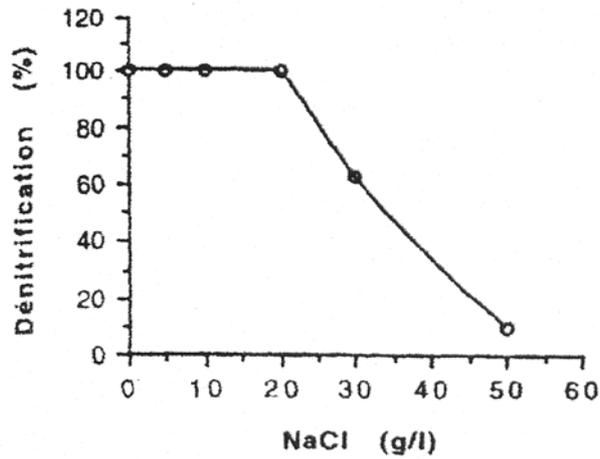


Figure N°1: Inhibition de la dénitrification par le chlorure de sodium (d'après CLAUS & KUTZNER, 1985).

Plus récemment, SANT'ANNA *et al.*, (1996) ont modélisé l'inhibition du rendement par le NaCl:

$$\rho = 1 - e\left(\frac{-143,5}{Cv(41 + I)}\right)$$

ρ = rendement.

I = concentration en NaCl (g/l).

Ce qui, dans notre cas, pour des charges de l'ordre de 1.5 kg, donne un rendement de 75% ($\rho = 87\%$ pour $Cv = 1$ kg.). Du point de vue théorique le procédé reste donc exploitable en eau de mer (Fig. N° 2 et N° 3).

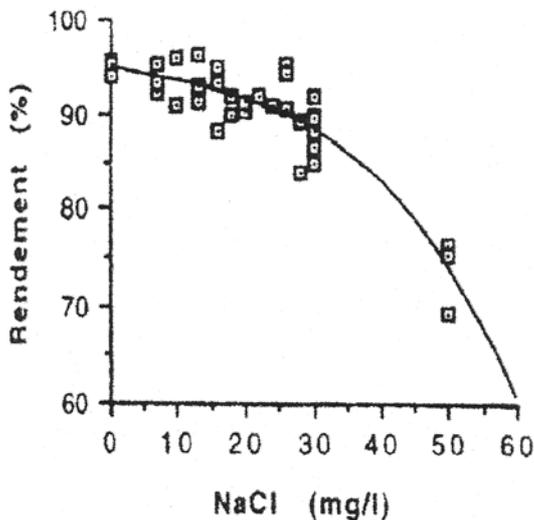


Fig. N°2: Performance de la colonne dénitrifiante en fonction de la concentration en NaCl dans l'alimentation pour $Cv = 1 \text{ kg NO}_3^-/\text{m}^3 \text{ S/j}$ ($T = 20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$) (d'après SANT'ANNA *et al.*, 1996).

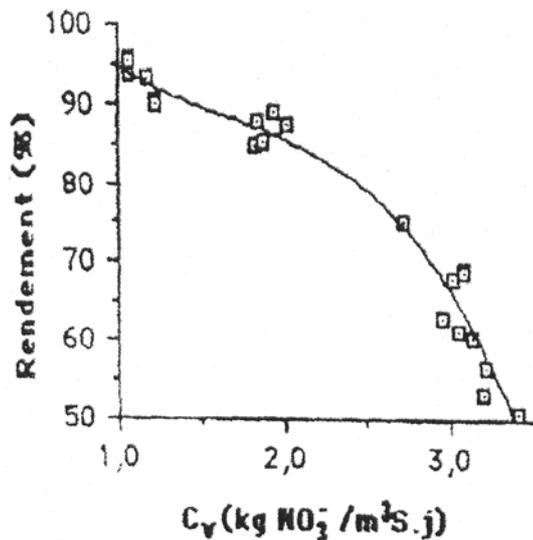


Fig. N°3: Influence de la charge volumique sur le rendement de dénitrification à $20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ (d'après SANT'ANNA *et al.*, 1996).

EXPERIENCES –RESULTATS

Les premiers essais d'application à l'aquariologie marine datent de septembre 1991. Toutes ces expériences ont été réalisées en eau de mer à 25-28 °C.

Trois réacteurs ont été mis en service sur des bacs différents peuplés de poissons et d'invertébrés. Chaque système est constitué d'une cartouche en PVC de 75 mm de diamètre et 400 mm de longueur remplie de 2 kg (1,2 l) de soufre en canon broyé (granulométrie inférieure à 5 mm). La cartouche est alimentée par une dérivation du circuit de filtration, le débit est réglé par une pince de Mohr. La mise en route se fait à très faible débit (goutte à goutte). En 48 heures, la concentration de nitrites en sortie monte à près d'1 mg/l; le débit est alors augmenté à 3 l/h (soit plus de 2 fois de volume du matériau par

heure) Dans ces conditions, la concentration de nitrates "à l'équilibre" dans un bac de 200 litres se situe aux alentours de 12 à 20 mg/l; la concentration de nitrates de l'effluent étant inférieure à 1 mg/l. Ensuite le débit a été augmenté à 10 l/h (soit plus de 8 fois le volume du filtre par heure), ce qui n'a pas modifié la concentration de nitrates de l'effluent. Du maërl a été ajouté en sortie de filtre car le pH chutait à 6 - 6,5 (contre 8,0 - 8,3 en entrée). Le système fonctionne toujours actuellement avec les mêmes animaux.

Suite à ces observations réalisées chez un aquariophile (M.L.), une expérimentation a été mise en place à l'aquarium du MAAO. Une cartouche PVC de 50 mm de diamètre et de 550 mm de long est remplie de canon de soufre concassé (granulométrie inférieure à 1,5 mm) est installée sur un bac de 160 litres hébergeant des coraux mous et un couple d'*Amphiprion frenatus*. Le débit est très faible (environ 0,6 l/h, soit 1,8 fois le volume du filtre par heure). L'eau y est envoyée sous pression par une petite pompe centrifuge. Le débit est réglé par une pince en sortie. L'eau n'a pas été renouvelée depuis 17 mois. La concentration des nitrates dans le bac est de 2,3 mg/l; celle de l'effluent étant de 1 mg/l. Le pH est de 7,9 à 8,0 et le TAC d'environ 7 °f. Des ajouts de substances tampons (Seabuffer) sont effectués en faible quantité deux fois par mois. Les animaux, poissons et invertébrés, sont en parfaite santé, y compris les nouveaux arrivants.

Au Grand Aquarium de Saint Malo, trois filtres de ce type ont été installés sur deux circuits différents. Toutes les colonnes sont constituées de tube PVC de diamètre 310 mm. Le premier, installé sur le circuit d'eau de mer tropicale, est constitué de 3 colonnes en série: l'eau est injectée au bas de la première colonne remplie de 150 kg (130 l) de soufre en billes (diamètre moyen 3,5 mm), les 2 colonnes suivantes sont aussi traversées par un courant ascendant; elles contiennent du maërl destiné à tamponner l'effluent.

Le débit est d'environ 750 l/h, la concentration de nitrates est de 2,5 mg/l en entrée et inférieure à 1 mg/l en sortie. Le pH en entrée est de 8,18, Les pH en sortie sont: 6,8 pour la colonne 1; 7,0 pour la colonne 2 et 7,14 pour la colonne 3.

Par la suite, le débit a été augmenté à 1200 l/h soit une $C_v = 0.5 \text{ kg de NO}_3^-/\text{m}^3 \text{ S/j}$ avec des résultats identiques.

Les 2 autres sont installés sur le circuit des requins. Ils sont composés chacun de 2 colonnes garnies de 150 kg (130 l) de soufre en billes et de 150 kg (150 l) de maërl. Dans l'un des 2 filtres, les matériaux sont séparés (soufre, puis maërl). L'eau est injectée par une pompe, le débit est réglé à 480 l/h par un système by-pass. La concentration en nitrates à l'entrée est de 6,5 mg/l ($C_v = 0.6 \text{ kg NO}_3^-/\text{m}^3 \text{ S/j}$); en sortie elle est inférieure à 1 mg/l. Le pH en sortie est de 7,13. Le TAC est identique en entrée et en sortie du filtre.

Dans le deuxième filtre, les 150 kg de soufre et les 150 kg de maërl sont mélangés. Le reste de l'installation est identique au premier. La concentration en nitrates en sortie est inférieure à 1 mg/l. Le pH en sortie est de 7,28. L'acidification constatée lors de la dénitrification autotrophe, résulte d'une augmentation de la concentration en acide carbonique. Il est d'ailleurs possible de faire remonter le pH en aérant énergiquement l'effluent (dégazage du CO_2).

Ces diverses expériences ayant fait la preuve de leur absence de toxicité, des systèmes de dénitrification autotrophe ont été mis en place sur le circuit général alimentant la plupart des bacs marins d'exposition au public de l'aquarium du MAAO (environ 45 000 litres d'eau). Dans le but de comparer, d'une façon rigoureuse, les deux voies de dénitrification, trois réacteurs en forme de U, fabriqués en tube PVC de 200 mm de diamètre, ont été montés en parallèle sur ce circuit. Un des tubes (tube 3) est rempli de 80 litres d'argile expansée, il est irrigué avec un débit d'environ 40 litres par heure et reçoit en continu une adjonction de 350 ml de méthanol par jour. Le rendement (taux de nitrates éliminés) est d'environ 30 à 35 % (Fig. N° 4).

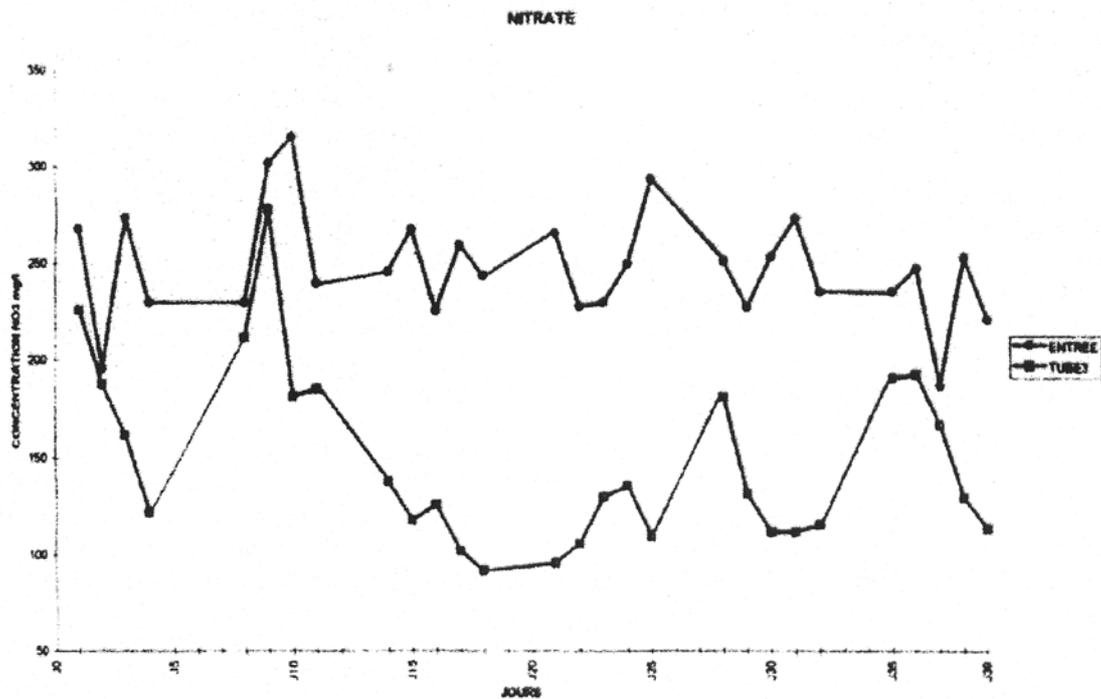


Figure N°4: Evolution des concentrations en nitrates à l'entrée (courbe du haut) et en sortie du tube 3 (dénitrateur hétérotrophe).

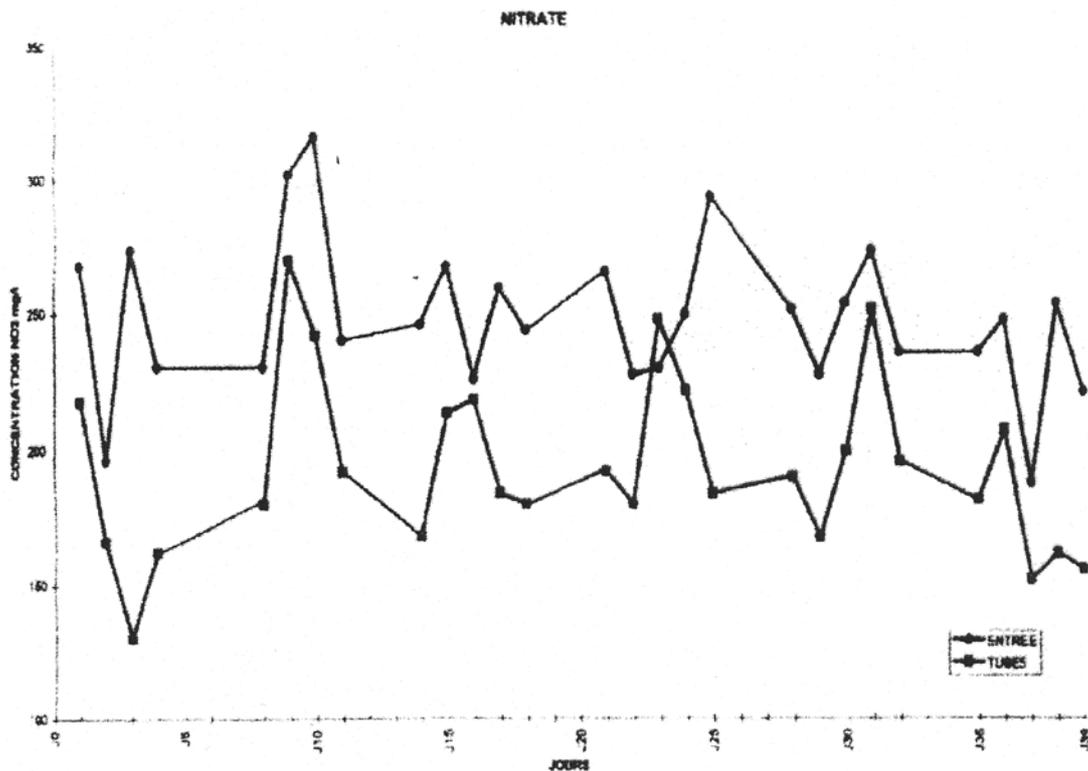


Figure N°5: Evolution des concentrations à l'entrée (courbe du haut) et en sortie du tube 5 (dénitrateur autotrophe).

Les variations importantes de la concentration en nitrates à l'entrée du filtre en fonction du temps correspondent aux fluctuations des contributions relatives de chacun des aquariums bénéficiant d'une filtration nitrifiante autonome.

Les deux autres tubes sont remplis avec 20 litres de soufre pour l'un et 40 litres pour l'autre (soufre en canon concassé de granulométrie irrégulière inférieure à 25 mm). On place ensuite 10 litres de maërl dans chacun des deux tubes. Le débit est d'environ 30 l/h, les charges et les rendements moyens sont:

- pour le premier: $C_v = 9 \text{ kg NO}_3^-/\text{m}^3 \text{ S/j}$ et rendement = 12%
- pour le second: $C_v = 4,5 \text{ kg NO}_3^-/\text{m}^3 \text{ S/j}$ et rendement = 25% (tube 5 - Fig. N° 5).

Un autre réacteur, constitué d'une colonne en PVC (diamètre 90 mm. hauteur 1400 mm) est alimenté avec un débit variable (4 à 16 l/h) et une concentration de nitrates variable (40 à 250 mg/l). Il est rempli de 8 litres d'un mélange à parts égales soufre et maërl. Le rendement a été proche de 100% jusqu'à $C_v=1,5 \text{ kg NO}_3^-/\text{m}^3 \text{ S/j}$.
Le démarrage du processus de dénitrification s'est effectué en moins de 24 heures.

DISCUSSION

Ces tests ont tous été effectués sur des aquariums peuplés, c'est-à-dire en conditions réelles. Ceci amène par rapport au laboratoire, une certaine variabilité dans les résultats. Néanmoins, la répétition des expériences permet de dégager un certain nombre de paramètres régissant le fonctionnement de ce nouveau type de réacteur. L'innocuité vis à vis de la faune et la flore marine semble totale.

Le rendement est important jusqu'à des charges volumiques de $1,5 \text{ kg NO}_3^-/\text{m}^3 \text{ S/j}$ mais moins intéressant pour des fortes concentrations que celui de la voie hétérotrophe. Par contre, il est plus efficace pour les faibles concentrations. On a pu constater que le démarrage des réactions a lieu en quelques heures. Ceci présente un net avantage par rapport au système hétérotrophe qui demande un délai long, variable selon les substrats utilisés.

La concentration en oxygène dissous n'est que peu limitative. Elle peut être élevée (de l'ordre de 3 mg/l) contrairement au système hétérotrophe qui nécessite des concentrations en oxygène dissous inférieure à 0,2 - 0,4 mg/l; ceci autorise donc des vitesses d'approche plus élevées.

Le pH optimal se situe entre 6,2 et 7,4 (hétérotrophe: 7.5 - 8.5). Ce système présente donc 1 inconvénient d'acidifier le milieu et de consommer la réserve alcaline (0,41 mole de bicarbonate par mole de nitrate éliminée). Mais ce phénomène peut être compensé en lit mélangé: soufre-substrat calcaire (maërl, sable corallien).

Contrairement au système hétérotrophe, ce système libère une grande quantité de sulfates (1.1 mole de sulfate libérée par mole de nitrate réduite) qui, malgré leur accumulation au cours du temps n'ont pas montré de toxicité.

Le gros avantage de ce système est son autonomie, contrairement à l'hétérotrophe qui nécessite un apport régulier et très important de carbone organique, sauf si l'on utilise un support bactérien chargé en "sucres" ou constitué directement de carbone organique.

En pratique, le système hétérotrophe peut rendre de grands services sur une eau très chargée en nitrates mais il nécessite plus de main d'oeuvre pour la surveillance et l'ajout du substrat carboné. La dénitrification autotrophe sur soufre est très pratique, totalement autonome; elle trouve son maximum d'efficacité sur une installation présentant une faible concentration de nitrates et permet d'en éviter l'augmentation.

CONCLUSION

Après plus de cinq ans d'expérimentation en aquariologie, les résultats prouvent l'intérêt de la réduction des nitrates par voie autotrophe. Le principe de fonctionnement à lits mélangés permet d'envisager des perspectives intéressantes de couplage dénitrificateur-réacteur à calcaire, libérant l'utilisateur de la contrainte due à l'injection de CO_2 sur ce dernier. Il reste encore de nombreux paramètres à optimiser par le passage du stade pilote à l'utilisation régulière.

REFERENCES

- ADEY W., 1983. The microcosm: a new tool for need research. *Coral reefs*, **1**: 193-201.
- BATCHELOR B. & LAWRENCE A.W., 1978. *Wat. Res.*, **12**, 1075
- CLAUS G. & KUTZNER H.J., 1985. Autotrophic denitrification by *Thiobacillus demtrificans* in a packed bed reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **22**: 289-296.
- DRISCOLL C.G. & BISOGNI J.J., 1978. The use of sulfur and sulfite in packed bed reactors for autotrophic denitrification. *J. Water poll. Control Fed.*, **50** (3): 569-577.
- LE CLOIREC P. & MARTIN G., 1988. Procédé biologique autotrophe d'élimination totale de l'azote minéral (ammoniacque, nitrites et nitrates). *Wat Supply*, **6**: 151-156.
- JAUBERT J., 1989. An integrated nitrifying-denitrifying biological system capable of purifying sea water in a closed circuit aquarium. In: Deuxième Congrès International d'Aquariologie (1988); Monaco. *Bull. Inst. océanogr. Monaco*, N° spécial **5**: 101-106.
- MARTIN G., 1979. Le problème de l'azote dans les eaux. Tech. Doc., Lavoisier. Paris.
- SANT'ANNA F.P.S., MARTIN G. & TAHA S., 1996. Incidence du chlorure de sodium sur la dénitrification d'éluats de résines par une bactérie chimioautotrophe soufre-oxydante *Rev Sci Eau* **3**: 333-350.
- St. AMAND, PERCY P. & Me CARTY P., 1969. Treatment of high nitrate waters. *J. Am. Wat. Works Ass.*, **61** (2): 659-662.

SIKORA L. & KEENEY, 1976. *Ann. Meeting Am. Soc. Microbiol.*, 210.

STRAUB J., 1994. Continuous denitrification in a marine aquarium by supplementation of dissolved organic carbon. *In*: Congrès E.U.A.C., Leipzig, Mém. Inst. océanogr. P. Ricard, pp: 89-99.