

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE  
Faculté de génie  
Département de génie chimique et biotechnologique

# ÉLIMINATION DU MÉTHANOL DANS DES EFFLUENTS SALINS PAR BIOFILTRATION AÉROBIE

Mémoire de maîtrise  
Spécialité : génie chimique

Djazia LIAMINI

Jury : Pr. Hubert CABANA (directeur)  
Pr. Josiane NIKIEMA (co-directrice)  
Pr. Roland LEDUC (correcteur)  
Pr. Michèle HEITZ (rapporteur)

Je dédie ce travail à mes parents que j'aime plus que tout au monde. À mon père (mon piapiou), cet homme au caractère d'acier, aux cheveux argentés, et au cœur d'or, que j'admire profondément. À ma mère (ma mamounette), mon maître spirituel, d'une sagesse extraordinaire, remplie d'amour, et qui remplit d'amour tout ce qui l'entoure.

À mes deux frangins. Le grand brun intello de frère aîné, Mokhtar (kitou), et le moins grand, brun aussi, mais plus fou de grand frère, Redouane (Yak), pour qui j'ai une tendresse infinie. À Romy (*mein liebestraum*), qui m'offre l'incroyable chance de l'avoir comme amie, mais également comme belle-sœur. Et bien-sûr ma petite nièce d'amour, Mayelle.

À toutes les personnes que j'aime tout particulièrement,

À mon meilleur ami, Imad Touahar (Imadion), à ma meilleure amie et sœur de cœur, Élodie Taillet (Khello) et à Wanis Ziat (Wanisson).

À Ali Ahmari, en qui j'ai découvert une personne extraordinaire, et aux valeurs humaines exceptionnelles.

À Sylvain Vigier, qui a été présent à un moment crucial.

À mes amis-chéris (que je n'oublis pas!) algériens : Mehdi, Dallal, Dris, Kenza, Zico aux français : Fabien, Denis, et Étienne, et aux sherbrookoïses d'adoption : Carina, et Jamie

## RÉSUMÉ

La recherche sur le traitement des eaux usées industrielles prend de plus en plus d'importance à cause de la complexité des effluents que les industries rejettent. Parmi ces effluents, 5% (v/v) ont une salinité variant entre 3 et 350 g/L en chlorure de sodium (NaCl), la salinité étant la quantité de sels minéraux dissous dans l'eau. Les réglementations environnementales sont de plus en plus strictes de sorte que les procédés de traitement utilisés pourraient devenir inappropriés. Les effluents salins en particulier sont souvent incapables de satisfaire les réglementations de rejet des eaux usées, à cause de leur difficulté de traitement due au mélange complexe de matière organique et de sel. Le bon fonctionnement des procédés biologiques conventionnels est souvent négativement affecté par la présence de ce dernier. C'est donc vers les procédés physico-chimiques que les industries se sont tournées pour traiter les effluents salins. Mais ceux-ci étant très coûteux en termes d'opération et de maintenance, la recherche s'est concentrée sur la faisabilité du traitement d'effluents salins par procédés biologiques, plus économiques. Les nouvelles recherches sur des bactéries résistantes au sel (halophiles et halotolérantes) appliquées aux traitements biologiques, bien que peu nombreuses encore, sur la sélection bactérienne et la bioaugmentation ouvrent de nouvelles possibilités quant au traitement biologique de la matière organique présente dans les effluents salins. Cette étude a donc pour objectif principal de valider la biofiltration aérobie pour le traitement du méthanol à l'état liquide en milieu salin. Pour cela, on a réalisé le suivi de divers paramètres opératoires (concentration du méthanol à l'entrée du réacteur, charge organique, teneurs en sel). Le développement de cette technologie serait une innovation dans le traitement des effluents industriels, puisque l'application de la biofiltration au traitement de ce type d'effluent n'a jamais été étudiée. La biofiltration présente des avantages économiques comparativement aux technologies utilisées jusqu'à présent. Cette étude a permis d'obtenir une efficacité d'élimination du méthanol satisfaisante (de l'ordre de 54%) pour un effluent contenant des concentrations élevées en sel (30 g/L) sous forme de NaCl, et en méthanol 5 (g/L) pour un débit d'alimentation liquide de 5 L/j.

**Mots-clés :** Biofiltration, aérobie, effluent salin, méthanol, volatilisation, halotolérantes, halophiles, acclimatation

## REMERCIEMENTS

Je tiens à adresser mes sincères remerciements à la Professeur Josiane Nikiema pour sa confiance, et pour m'avoir donnée l'opportunité de vivre une expérience très enrichissante dans le cadre de la recherche scientifique.

Un gros merci au Professeur Hubert Cabana, pour son aide inestimable, ses excellents conseils, sa bonne humeur, son soutien, et son humour.

Je tiens aussi à remercier les Professeurs Roland Leduc et Michèle Heitz d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je remercie les superbes techniciennes de laboratoire de génie chimique qui m'ont été d'une aide précieuse, et qui ont contribué à rendre mon expérience en recherche des plus agréables.

Je remercie mon collègue et ami Ali Ahmari de m'avoir précieusement aidée et conseillée, ainsi qu'Imad Touahar dont l'aide a été immense à tous points de vue.

Je remercie Wanis Ziat pour son soutien immense, et Élodie Taillet pour avoir toujours su trouver les mots réconfortants dans des périodes difficiles.



## TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES .....	vii
LISTE DES TABLEAUX .....	ix
LISTE DES ACRONYMES.....	xi
1 INTRODUCTION GÉNÉRALE .....	1
1.1 Contexte .....	1
1.2 Objectif de la recherche .....	4
1.3 Structure du mémoire.....	4
2 REVUE DE LITTÉRATURE SUR LE TRAITEMENT BIOLOGIQUE DES EFFLUENTS SALINS .....	7
2.1 Introduction.....	7
2.2 Effet du sel sur les bactéries .....	9
2.2.1 Le stress salin .....	9
2.2.2 Les bactéries halophiles et halotolérantes– Définition et classification.....	13
2.2.3 Adaptation au sel, bactéries halophiles/halotolérantes .....	15
2.2.4 Effet du sel sur un consortium bactérien – Phénomène de sélection .....	26
2.2.5 Adaptation ou acclimatation d’une population à un stress salin dans les traitements biologiques .....	26
2.3 Traitement biologique des effluents salins .....	35
2.3.2 Application des procédés biologiques aérobies pour le traitement d’effluents salins	38
2.4 Conclusion .....	49
3 MATÉRIEL ET METHODES.....	51
3.1.1 Programme expérimental, préparation et planification .....	51
3.1.2 Montage expérimental .....	52
3.1.3 Caractéristiques de l’affluent.....	56
3.1.4 Techniques expérimentales .....	56
3.1.5 Conditions de fonctionnement des biofiltres.....	62
4 RÉSULTATS ET INTERPRÉTATION.....	65

4.1.1	Présentation des résultats.....	65
4.1.2	Élimination du méthanol de la phase aqueuse.....	66
4.1.3	Perte du méthanol.....	66
4.1.4	La volatilisation et bio-élimination combinées.....	67
4.1.5	Analyse statistique des résultats.....	78
5	CONCLUSION.....	87
5.1	Contexte.....	87
5.2	Recommandations.....	88
5.3	Perspectives.....	90
	LISTE DES RÉFÉRENCES.....	93

# LISTE DES FIGURES

Figure 2.1 Représentation d'une bactérie soumise à différents schémas d'osmolarité .....	13
Figure 2.2 Mécanismes d'osmorégulation pour une bactérie en milieu hypersalin .....	20
Figure 2.3 Comparaison de l'augmentation du sel en fonction du temps pendant l'acclimatation [Yanghong, et al., 2011] .....	32
Figure 3.1 Schéma du montage expérimental des biofiltres .....	54
Figure 3.2 Médium plastique placé dans le biofiltre .....	55
Figure 3.3 Schéma des colonnes Bio1 et Bio2 .....	55
Figure 3.4 Localisation des points d'échantillonnage .....	59
Figure 4.1 Effet de la concentration en sel (g/L) sur l'élimination totale du méthanol, la charge bio-éliminée et volatilisée .....	69
Figure 4.2 Effet de la concentration initiale en méthanol (g/L) sur l'élimination totale, la charge bio-éliminée et volatilisée (g/L/j) .....	72
Figure 4.3 Efficacité d'élimination du méthanol en fonction de la charge organique (g/L/j) .....	75
Figure 4.4 Capacité d'élimination en fonction de la charge organique .....	76
Figure 4.5 Taux de production de CO <sub>2</sub> en fonction de la capacité d'élimination du système .....	78
Figure 4.6 Distribution des résidus par rapport à une distribution normale pour l'élimination totale .....	82
Figure 4.7 Distribution des résidus par rapport à une distribution normale pour la charge bio-éliminée .....	82
Figure 4.8 Distribution des résidus par rapport à une distribution normale pour la charge volatilisée .....	83





# LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 Coûts comparatifs de traitement physico-chimiques et biologiques [Environnement Industrie, 2013].....	2
Tableau 2.1 Exemples de limite inférieure d' $a_w$ pour la croissance de divers microorganismes (adapté de Hamaide (1984) et Grant (2004)) .....	11
Tableau 2.2 Classification des bactéries non-halophiles, halotolérantes et halophiles selon l'intervalle de salinité de croissance optimale [Kushner, 1978].....	15
Tableau 2.3 Besoins en sels de certaines bactéries en fonction de la température .....	17
Tableau 2.4 Exemples de solutés compatibles de bactéries halophiles et halotolérantes [Imhoff, 1992].....	23
Tableau 2.5 Exemples de solutés compatibles accumulés selon le type de bactérie (adapté de [Sleator & Hill, 2001] et [Zahran, 1997]).....	24
Tableau 2.6 Exemple de bactéries halophiles et halotolérantes isolées de milieux naturels (adapté de [Grant, 2004 ; Lozach, 2001]).....	28
Tableau 2.7 Comparaison des efficacités d'élimination et du taux d'élimination de la DCO en fonction du type d'organismes microbiens (adapté de [Kargi et Uygur, 1996]) .....	33
Tableau 2.8 Effet du sel sur une unité biologique par percolation dont l'inoculum épurateur est constitué des boues activées + <i>H. halobium</i> (adapté de [Kargi et Uygur, 1996]).....	34
Tableau 2.9 Composition des saumures utilisées pour la mise en conserve des légumes [Dan, 2001] .....	36
Tableau 2.10 Efficacités maximales obtenues lors de traitement d'effluents reels issus du secteur agroalimentaire et de textiles, ayant subit une acclimatation ou une bioaugmentation préalable de la biomasse épuratrice .....	42
Tableau 2.11 Procédés appliqués à des effluents contenant du pétrole brut à hautes salinités .....	45
Tableau 2.12 Traitement des effluents salins par le procédé SBR .....	47
Tableau 3.1 Paramètres des conditions expérimentales.....	51

Tableau 3.2 Conditions expérimentales d'éliminations triées selon l'ordre de réalisation des essais .....	53
Tableau 3.3 Caractéristique des eaux synthétiques à traiter .....	57
Tableau 3.4 Étape d'acclimatation .....	57
Tableau 3.5 Analyses effectuées et méthodes correspondantes .....	60
Tableau 4.1 Présentation des résultats .....	65
Tableau 4.2 Définition des facteurs de l'ANOVA .....	79
Tableau 4.3 ANOVA de l'élimination totale.....	79
Tableau 4.4 ANOVA de la charge bio-éliminée.....	80
Tableau 4.5 ANOVA de la charge de méthanol volatilisée.....	81

# LISTE DES ACRONYMES

<b>Acronyme</b>	<b>Définition</b>
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i> ou Analyse de Variance
COV	Composé Organique Volatil
DBO	Demande Biologique en Oxygène
DCO	Demande Chimique en Oxygène
DIS	Déchets industriels spéciaux
EC	<i>Elimination Capacity</i> ou Capacité d'élimination
MDOs	<i>Membrane Derived Oligosaccharides</i> ou Oligosaccharides dérivés de membrane
OLR	<i>Organic Load Rate</i> ou Charge organique
RBC	<i>Rotating Biological Discs</i> ou Contacteurs biologiques rotatifs
SBR	<i>Sequencing Batch Reactor</i> ou Réacteur biologique séquentiel
SBBR	<i>Sequencing Batch Biofilm Reactor</i> ou Réacteur biologique séquentiel à biofilm
TF	<i>Trickling Filter</i> ou Biofiltre percolateur
TOC	<i>Total Organic Carbon</i> ou Carbone organique total

# 1 INTRODUCTION GÉNÉRALE

## 1.1 Contexte

### 1.1.1 Problématique des effluents salins

Il existe plusieurs définitions de la salinité: une définition théorique ainsi que des définitions pratiques, liées aux méthodes de mesures. Théoriquement, la salinité est la quantité totale des résidus solides (en grammes) contenus dans 1kg d'eau de mer, quand tous les carbonates ont été transformés en oxydes, le brome et l'iode remplacés par le chlore et que toute la matière organique a été oxydée [Williams & Sherwood, 1994].

Il a été estimé que 5 % des effluents industriels mondiaux étaient des effluents salins [Le Bogne *et al.*, 2008]. En effet, de nombreux secteurs industriels sont susceptibles de générer des eaux usées très salées : il s'agit notamment des industries agro-alimentaires, du pétrole et du cuir. Le rejet de ces eaux usées contenant en même temps une forte salinité et une teneur élevée en matière organique sans traitement préalable nuit à la vie aquatique, à la potabilité de l'eau et à l'agriculture. Ainsi, la législation est de plus en plus strictes et le traitement des eaux usées salines, à la fois pour la matière organique et l'élimination de sel est aujourd'hui obligatoire dans de nombreux pays.

La difficulté de traitement des effluents salins réside dans la présence de composés organiques et minéraux à proportions variables. Les concentrations en sel peuvent atteindre les concentrations de saturation, soit 350 g/L en chlorure de sodium (NaCl) [Tuin *et al.*, 2006]. L'utilisation de procédés physico-chimiques est souvent le seul recours possible, malgré les coûts opératoires élevés tel que décrit dans le tableau 1.1. Celui-ci montre clairement l'avantage économique des procédés biologiques par rapport aux procédés physico-chimiques. Certaines industries diluent 20 à 30 fois leurs effluents afin de rendre possible le traitement biologique [Tuin *et al.*, 2006], ou à les rejeter sans traitement préalable dans les milieux naturels, se mettant ainsi en contravention avec la loi. Pour cette raison, d'autres systèmes pour le traitement de matières organiques sont de

nos jours de plus en plus l'objet de recherches. La plupart de ces systèmes impliquent un traitement biologique anaérobie ou aérobie. Bien que le traitement biologique de la pollution carbonée se soit avéré possible à des concentrations élevées en sel, le rendement obtenu dépend d'une bonne adaptation de la biomasse ou de l'utilisation d'organismes supportant ou nécessitant du sel pour leur croissance : les microorganismes halotolérants ou halophiles. C'est pour cette raison que la nécessité de la recherche dans le traitement biologique constitue une importance majeure.

Tableau 1.1 Coûts comparatifs de traitement physico-chimiques et biologiques  
[Environnement Industrie, 2013]

Procédé	Débit (m <sup>3</sup> /h)	Coûts d'opération (k\$)	
Coagulation, floculation, décantation, aéroflottation	<1	174-350	
	10-20	465-800	
	20-40	800-1160	
	40-60	1160-1744	
Échangeur d'ions	<1	17-35	
	1-10	58-174	
	10-20	175-300	
	20-40	300-465	
	40-60	465-700	
Techniques membranaires	<10	Microfiltration 30	Ultrafiltration 35
	10-30	45-70	58-81
	30-50	70-95	81-116
	50-100	95-125	116-150
Traitements biologiques aérobies	kg DCO/j	(\$)	
	<100	7000-9000	
	100-500	4600-7000	
	500-1000	2325-4650	
	1000-5000	1745-230	
>5000	700-1745		

### **1.1.2 Problématique du méthanol**

Le méthanol est un solvant organique volatil très sollicité par diverses industries, telles que l'industrie pétrolière, l'industrie de la chimie organique, les foyers de combustion, etc. Il est considéré comme l'un des substrats de départ les plus employés de l'industrie, et a été classé troisième composé chimique le plus rejeté dans l'environnement par les industries, dont 20% rejeté dans les sols, les eaux souterraines et de surface, ce qui constitue une menace des écosystèmes [Bennet, 2002].

Le méthanol est un composé facilement biodégradable par une large variété de bactéries méthylophiles aérobies et anaérobies, jusqu'à des concentrations de 3000 g/L [Bouziane, 2009]. C'est pourquoi, il a été choisi comme composé modèle, permettant d'effectuer une étude sur l'élimination de la matière organique contenue dans un liquide salin par biofiltration à percolation.

### **1.1.3 Avantages de la biofiltration**

Pendant longtemps, la majorité des usines d'épuration des eaux usées a utilisé un traitement par biomasse en suspension. Toutefois, la biofiltration, procédé biologique compact et efficace, a fait son apparition au Québec à partir des années 90 [Brouard, 1992] pour le traitement des eaux industrielles, comme ailleurs dans le monde en raison de ses nombreux avantages. D'abord, ce procédé demande nettement moins d'espace que d'autres procédés biologiques, tels que les boues activées, grâce à un temps de séjour réduit des eaux usées dans les biofiltres.

L'efficacité de cette technologie repose sur la fixation de microorganismes sur une surface de nature organique ou inorganique. Cet attachement permet le développement d'un biofilm très résistant aux fluctuations liées à la charge organique, ainsi qu'à la variété de polluants ciblés. Malgré la difficulté à expliquer théoriquement le comportement des biofiltres à cause de leur hydrodynamique interne ainsi que la biologie et l'écologie complexe des microorganismes, cette technologie s'impose dorénavant dans

le domaine du traitement des eaux, à cause de sa robustesse d'une part, et de ses faibles coûts d'opération et de maintenance d'autre part [Courtemanche, 1996].

## **1.2 Objectif de la recherche**

La plupart des recherches sur l'élimination du méthanol se sont concentrées sur son traitement à l'état gazeux, et le traitement biologique du méthanol à l'état liquide par biofiltration n'a quant à lui, jamais fait l'objet d'une étude à notre connaissance.

Dans ce contexte, l'objectif des recherches que l'on propose de conduire est donc d'étudier l'élimination du méthanol dans un effluent salin synthétique, par le biais de biofiltres percolateurs.

## **1.3 Structure du mémoire**

L'introduction présente une mise en contexte générale justifiant les motivations de ce travail, en introduisant la problématique liée au traitement des effluents salins, et à la nécessité de développer des procédés biologiques permettant de contourner les effets négatifs du sel, tout en rendant le traitement de substances dangereuses telles que le méthanol possible.

Le second chapitre présente une revue de littérature sur les effluents salins et leur traitement biologique.

Le troisième chapitre décrit les méthodes employées pour mener à bien notre recherche en laboratoire, les techniques d'analyses, ainsi que la description des appareillages utilisés pour la mesure des paramètres suivis.

Le quatrième chapitre propose l'analyse et la discussion des résultats d'efficacité d'élimination du méthanol en fonction des divers paramètres, tels que la concentration du



méthanol à l'entrée du biofiltre, les concentrations en sel, le débit liquide et les charges organiques appliquées.

Et enfin, le cinquième chapitre présente une conclusion du travail réalisé, évoque les limitations, puis les nouvelles perspectives à explorer.



# **2 REVUE DE LITTÉRATURE SUR LE TRAITEMENT BIOLOGIQUE DES EFFLUENTS SALINS**

## **2.1 Introduction**

La gestion des effluents salins constitue un problème dont l'importance est croissante dans le contexte de la réduction de l'impact des procédés sur l'environnement. Ces déchets liquides, qui appartiennent à la catégorie des Déchets Industriels Spéciaux (DIS), sont produits par divers secteurs industriels : chimique, pharmaceutique, agroalimentaire, textile,... de telle sorte, qu'ils constituent près de 5% des effluents mondiaux. Leur difficulté de traitement réside dans le fait que ces effluents soient très hétérogènes, et constituent un mélange complexe de composés organiques et minéraux à proportions variables [Singlande, 2010].

La présence du sel dans les eaux usées inhibe le bon fonctionnement des procédés biologiques [Kargi & Dincer, 1999], à tel point, que cette technique de traitement, pourtant très populaire pour le traitement de la matière organique, a été abandonnée au profit des procédés physico-chimiques, tels que les techniques thermiques, utilisées dans l'industrie du cuir, la coagulation-floculation et ultrafiltration pour l'industrie de transformation de fruits de mer. Ces procédés sont le plus souvent sollicités dans une étape de prétraitement d'enlèvement du sel, afin de rendre possible par la suite le traitement biologique. Mais en plus de ceux cités précédemment, l'osmose inverse, le procédé d'échange d'ion, les techniques membranaire, ou encore l'électrodialyse, sont des techniques dont les coûts énergétiques et d'entretien sont élevés.

Certaines industries ont recours à d'autres méthodes, le plus souvent nocives et inefficaces, telles que l'incinération de la matière organique, ou la dilution des effluents,

nécessitant des quantités considérables d'eau. D'autres industries rejettent leurs effluents sans traitement préalable. Aussi, cette approche dorénavant illégale constitue une sérieuse menace pour les écosystèmes marins.

Des travaux antérieurs ont montré que le sel affecte la cinétique des traitements biologiques, et provoquait une baisse significative des performances éliminatoires de la matière organique [Kargi et Dincer, 1998]. En effet, sans acclimatation préalable, les bactéries conventionnelles subissent un choc lorsque mises en contact avec le sel, induisant une violente rétraction du cytoplasme, et se vident rapidement de leurs eaux afin de compenser le choc osmotique, ce qui les conduit le plus souvent à la plasmolyse [Kargi et Dincer, 1996; Gharsallah *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2005].

Cependant, des recherches récentes ont conduit à de nouvelles alternatives permettant le traitement de la matière organique par des procédés biologiques malgré la présence des sels, par 1) une meilleure compréhension des mécanismes régissant le phénomène d'acclimatation, ceci pouvant conduire des boues activées conventionnelles à tolérer des concentrations en sel allant jusqu'à 30 g/L [Aloui, *et al.*, 2009] et 2) une recherche plus poussée sur les bactéries dites « halotolérantes » et « halophiles » [Diaz *et al.*, 2002]. Ces organismes se sont adaptés à travers un long processus d'évolution naturelle à des conditions extrêmes de salinités, en développant des mécanismes de survie complexes, leur permettant de tolérer des très larges intervalles de salinité et/ou d'avoir besoin de sel dans leur environnement pour se développer. Les potentiels biotechnologiques de ces bactéries extrémophiles, très peu connues alors, ont longtemps été mis en doute. Pourtant, il a été récemment démontré que leur utilisation comme souche pure, ou comme inoculum au sein d'une biomasse conventionnelle (bioaugmentation) augmentait considérablement l'efficacité d'élimination de la matière organique dans des effluents salins [Li *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2008].

La revue de littérature suivante se propose : (1) de révéler comment la présence des sels peut influencer les bactéries non-adaptées, (2) d'expliquer l'impact de la présence du sel sur les bactéries conventionnelles et les mécanismes mis en jeu lui permettant

d'outrepasser son effet délétère, (3) de faire une liste des secteurs industriels concernés par les effluents salins, (4) de résumer les dernières recherches en élimination de la matière organique en milieu salin.

## **2.2 Effet du sel sur les bactéries**

### **2.2.1 Le stress salin**

Un état de *stress* survient lorsqu'une bactérie est soumise brutalement à une condition à laquelle elle n'est *normalement* pas habituée. Comme il est difficile de définir des conditions *normales* pour une bactérie, l'on définira le stress comme étant tout changement dans l'environnement qui provoque un affaiblissement de la croissance et du potentiel de survie. S'ensuivent des modifications dans le génome et le protéome, visant à retrouver un schéma métabolique, permettant la survie, voire l'adaptation la cellule, dépendamment des conditions [Booth, 2002]. La survie bactérienne dans une situation « choc » dépend également de son état physiologique (faiblesse ou résistance de la membrane par exemple), ainsi que de la composition du milieu de culture [Booth, 2002]. Le stress salin, parfois dénommé « choc osmotique», correspond à 1) un affaiblissement en « activité de l'eau » (eau libre) (définie dans la section 2.2.1.A) de son environnement [Galinski, 1995] ; 2) une diminution ou une augmentation de l'osmolarité de l'environnement de la bactérie.

#### **L'activité de l'eau**

L'activité de l'eau décrit l'état d'énergie ou la tendance de migration de l'eau dans un échantillon. Elle exprime la liaison structurelle ou chimique de l'eau dans la matière [Grant, 2004].

Celle-ci est basée sur la loi de Raoult pour des solutions idéales, et est exprimée par l'équation (2.1) suivante :

$$a_w = \frac{P}{P_0} = \frac{n_1}{(n_1+n_2)} \quad (2.1)$$

Avec :  $a_w$  : Activité de l'eau,  $P$  : pression de vapeur de la solution,  $P_0$  : pression de vapeur de l'eau pure à la même température,  $n_1$  : le nombre de moles du solvant (eau);  $n_2$  : nombre de moles du soluté; [Grant, 2004].

L'activité de l'eau, représente donc l'eau thermodynamiquement disponible en fonction de sa fraction molaire dans un système hermétiquement fermé à l'équilibre contenant un produit, ou une solution hygroscopique (matière absorbant l'humidité). L'eau pure a une valeur de  $a_w=1$ , et les autres substances des valeurs inférieures à 1 [Grant, 2004]. Les organismes capables de se développer dans des conditions de faibles activités de l'eau sont appelés « xérophiles » ou « xérotolérants ». Il existe des organismes bactériens également xérophiles et xérotolérants capables de se développer à de faibles valeurs de  $a_w$ , mais spécifiquement induites par la forte présence d'ions, ce sont des organismes dits « halophiles » ou « halotolérants » [Grant, 2004].

Il existe des valeurs minimales de l' $a_w$  en-dessous desquelles l'organisme vivant ne peut se développer. En effet, lorsque  $a_w < 0,60$ , toute multiplication d'un micro-organisme est arrêtée [Lozach, 2001]. D'autre part, lorsque  $a_w < 0.55$  l'ADN est dénaturé [Hamaide, 1984]. Néanmoins, les limites réelles varient selon les espèces de micro-organismes. Par exemple, la plupart des espèces du genre *Pseudomonas* ont besoin d'une valeur minimale de  $a_w$  égale à 0.95 alors que certaines souches de *Staphylococcus aureus* peuvent croître à des valeurs d'activité de l'eau de 0.86  $a_w$  [Grant, 2004]. Le tableau 2.1 donne des exemples de valeurs d'activités d'eau minimale pour la croissance de certaines espèces procaryotes.

Parmi ces espèces procaryotes, ce sont les bactéries halophiles extrêmes qui tolèrent les plus faibles valeurs de  $a_w$  (jusqu'à 0.75) [Lozach, 2001; Grant, 2004], puisqu'elles présentent des relations différentes avec l'eau : elles prolifèrent aux basses valeurs d' $a_w$  et ont des exigences spécifiques en ions sodium (100 à 150 g/L de NaCl). De telles valeurs,

non seulement leur conviennent, mais en plus les halophiles sont incapables de se multiplier à des valeurs élevées de  $a_w$  : ce sont des osmophiles. Lorsqu'elles requièrent la présence de NaCl pour leur survie, on parle de bactéries halophiles strictes (ou obligatoires). *Halobacterium salinarium*, par exemple, exige une activité de l'eau  $a_w = 0.88$ , et ce, à des concentrations de sel (NaCl) d'environ 175 g/L. Les halophiles modérées quant à elles, exigent pour une croissance optimale des valeurs de  $a_w = 0.99$  à  $a_w = 0.98$  correspondant à des valeurs de NaCl de environ 12 à 30 g/L [Lozach, 2001].

Tableau 2.1 Exemples de limite inférieure d' $a_w$  pour la croissance de divers microorganismes (adapté de Hamaide (1984) et Grant (2004))

Espèces procaryotes	Limite inférieure tolérée pour $a_w$
<i>Klebsiella aerogenes</i>	0.94
<i>Salmonella typhimurium</i>	0.92
<i>Rhizobium</i>	0.96 – 0.98
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.93
<i>Clostridium spp.</i> <i>Pseudomonas spp.</i> <i>Escherichia spp.</i> <i>Bacillus spp.</i> <i>Citrobacter spp.</i> <i>Vibrio spp.</i>	0.95 – 0.97

### Osmose / Stress osmotique

Le phénomène d'osmose se manifeste par la diffusion spontanée d'un composé chimique au travers d'une membrane semi-perméable. Ce mécanisme se produit lorsqu'une substance est présente à des concentrations différentes de part et d'autre de la membrane, provoquant un excès de pression appelé : « pression osmotique ». Un phénomène de diffusion permet d'égaliser les concentrations. Sous l'effet de la pression osmotique, les composés dissous dans l'eau traversent spontanément la membrane de la solution la plus

concentrée vers la moins concentrée sans la moindre dépense énergétique. Ceci joue un rôle essentiel dans l'activité des cellules, puisque grâce à l'osmose, les cellules peuvent - entre autres - absorber les nutriments dont elles ont besoin [Baliarda, 2003].

Un environnement hyper-osmotique (figure 2.1a) provoque un abaissement de l'activité de l'eau extérieure. Celle-ci se traduit par une diminution de la pression de turgescence (pression exercée par le protoplasme contre la paroi rigide) et l'augmentation de la force ionique. Ces phénomènes induisent une libération rapide de l'eau à l'extérieur de la cellule puis une rétraction irréversible du cytoplasme : c'est la plasmolyse [Rodriguez-Valera, 1993]. Cette conséquence est l'une des réponses létales les plus rapides et les plus notables lors d'un choc osmotique [Koch, 1984].

Les chocs hypo-osmotiques *a contrario* se manifestent par une diminution rapide de l'osmolarité du milieu extérieur. Celui-ci provoque un afflux d'eau dans la cellule qui ne provoque qu'une faible augmentation du volume cellulaire (figure 2.1c).

La cinétique de la plasmolyse dépend de l'importance de la variation de l'osmolarité du milieu et de la nature des solutés employés (sels, sucres, etc.). Dans le cas d'un choc hyper-osmotique sévère, la brusque diminution de l'activité de l'eau du cytoplasme inhibe certaines fonctions cellulaires comme l'adsorption de nutriments, la réplication de l'ADN ou la biosynthèse de macromolécules (voir Csonka, 1989). En cas de choc hyper-osmotique modéré, la plasmolyse n'est qu'une étape transitoire. En effet, la cellule est capable de s'adapter à ces faibles variations de l'osmolarité du milieu.

Les effets négatifs du sel sur les bactéries dépendent également de la nature chimique des ions présents en solution, puisqu'ils agissent négativement sur les lipides constituant la membrane plasmique (déséquilibre dans les interactions hydrophiles et hydrophobes assurant la stabilité de la membrane), et sur les protéines (voir section 2.2.3.A.a) [Rodriguez-Valera, 1993 ; Lozach, 2001]. Ainsi, la survie d'une bactérie repose sur une adaptation profonde, et ce à l'échelle moléculaire, pour que les processus biochimiques perdurent, même dans des conditions hypersalines [Rodriguez-Valera, 1993], et une



bonne capacité « d'osmorégulation » pour qu'elle soit capable de répondre correctement aux variations de la concentration en sel dans le milieu.

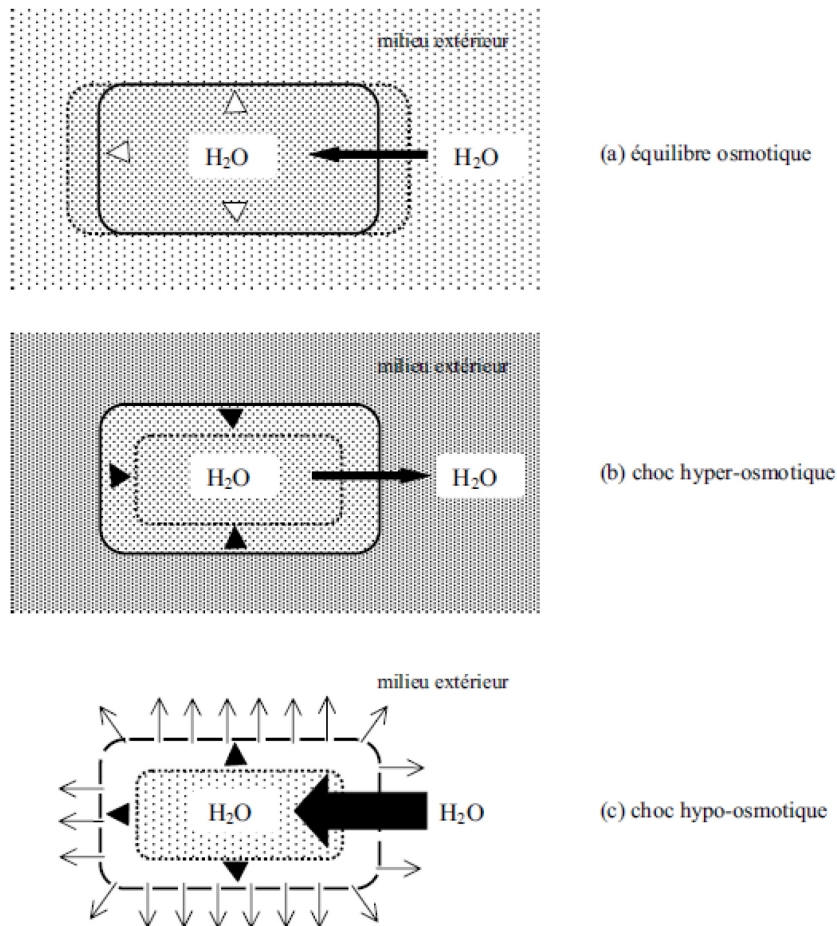


Figure 2.1 Représentation d'une bactérie soumise à différents schémas d'osmolarité

### 2.2.2 Les bactéries halophiles et halotolérantes - Définition et classification

La plupart des organismes vivant dans les eaux douces ou salines sont « sténohalins » (c.à.d: ne supportent que de faibles intervalles de salinité). Toutefois, certains microorganismes dont l'habitat naturel n'est pourtant pas hypersalin peuvent supporter des concentrations en sel relativement élevées, avec cependant une diminution du taux de

croissance : c'est l'halotolérance [Ventosa, *et al.*, 1998]. On peut retrouver les bactéries halotolérantes dans les milieux salins, mais elles restent tout de même affectées négativement par cet environnement puisque leur capacité d'adaptation au sel est limitée [Rodriguez-Valera, 1993]. Le cas des bactéries « halophiles » est quelque peu différent [Hamaide, 1984]. A l'inverse des halotolérantes, la présence du sel est nécessaire pour leur croissance, voire leur survie (voir section 2.2.3.A). La notion d' « halotolérance » et « d'halophilie » a été sujette à plusieurs interprétations selon les auteurs [Larsen, 1986; Kushner, 1978; Vreeland, 1987]. Plusieurs d'entre eux considèrent que le besoin en sel d'un organisme est une condition essentielle pour le classer comme « halophile ». Pourtant, il existe des bactéries qui évoluent dans des milieux non-salins, mais qui ont besoin d'une concentration en sel jusqu'à deux fois supérieure à celle de la mer pour croître de manière optimale [Ventosa, *et al.*, 1998]. Larsen (1962) est l'un des premiers scientifiques à avoir élaboré une classification. Reprise par Kushner (1978), cette classification répartit les microorganismes en 6 catégories: (1) non-halophile, (2) faible-halophile, (3) halophile-moderé, (4) halophile extrême limite, (5) halophile extrême, et (6) halotolérant (voir tableau 2.2).

Beaucoup de bactéries halophiles et halotolérantes peuvent se développer dans de larges gammes de concentrations en sel, avec un besoin et une tolérance au sel dépendant parfois des facteurs environnementaux et nutritionnels [DasSarma et DasSarma, 2012].

Par exemple, les bactéries modérément halophiles, ont un taux de croissance optimale pour des températures inférieures à 40°C, alors que les bactéries extrêmement halophiles ont un intervalle de température entre 38°C et 55°C pour des taux de croissances optimales. Les bactéries modérément halophiles quant à elles sont moins affectées par les basses températures, comparées aux halophiles extrêmes [Ramos-Cormenzana, 1993].

Ainsi, la température, par exemple, change parfois la réponse au sel de certaines bactéries, et permet même de déterminer la nature halophile ou non de certaines espèces, voir tableau 2.3 (adapté de [Kushner, 1978 ; Ventosa, *et al.*, 1998]).

Tableau 2.2 Classification des bactéries non-halophiles, halotolérantes et halophiles selon l'intervalle de salinité de croissance optimale [Kushner, 1978]

Classification	Zone optimale de croissance (g/L NaCl)
Non-halophile ou non-halotolérante	< 12
Faible halophile	12 – 30
Modérément halophile	30 - 117
Halophile extrême limite	117 - 176
Halophile extrême	176 - 234
Halotolérante	Bactérie non-halophile pouvant croître à de très fortes concentrations en sel allant jusqu'à 147 g/L (halotolérante extrême)

Les besoins nutritionnels chez les bactéries halophiles peuvent, au même titre que la température, influencer les intervalles de croissance optimale d'une bactérie : les bactéries halophiles ont tendance à avoir une plus grande tolérance vis-à-vis du sel présent lorsque cultivées dans des milieux de croissances complexes (démontré pour *Halomonas elongata*, *Micrococcus morrhuae* et *M. luteus*) [Kushner, 1994].

### 2.2.3 Adaptation au sel, bactéries halophiles/halotolérantes

Tous les microorganismes eucaryotes et procaryotes ont développé des stratégies d'adaptation efficaces qui leur permettent de vivre dans un habitat hypersalin, auxquelles on réfère souvent par : « osmorégulation », leur permettant d'adapter leur concentration

intracellulaire osmolytique à la concentration extracellulaire en sel, afin de réduire la pression de turgescence [Rodriguez-Valera, 1993] et ce, *via* une accumulation de sels, de molécules organiques, ou une combinaison des deux [Ventosa, et al., 1998].

L'osmorégulation est toute manifestation physiologique et adaptation génétique (transporteurs contrôlant l'afflux et l'efflux de solutés de la cellule) en réponse à l'augmentation du NaCl dans le milieu extérieur [Sleator et Hill, 2001]. En d'autres termes, c'est la capacité d'une bactérie à ajuster thermodynamiquement son environnement intracellulaire à l'environnement extracellulaire.

Ainsi, lorsqu'un microorganisme est sujet à un stress osmotique, on observe essentiellement trois étapes, dont la dernière qui représenterait un état d'adaptation complète de la bactérie [Hamaide, 1984] :

Étape 1 : Lorsque la bactérie se retrouve dans un milieu plus faible d' $a_w$ , elle procède à un ajustement, d'une durée de l'ordre de quelques minutes, voire quelques secondes, provoquant un flux d'eau sortant, puis un choc osmotique transitoire, qui selon le type de bactérie peut être léthal.

Étape 2 : Si l'organisme passe la première étape post-choc osmotique, il entre dans la seconde phase d'adaptation. Celle-ci se manifeste par des changements au niveau de son métabolisme, processus de transport, régulations et biosynthèses de ses enzymes. Ce réajustement physiologique est moins rapide que la phase précédente (l'ordre d'une génération) et, aussi plus coûteux énergétiquement.

Étape 3 : Passées ces deux étapes, le microorganisme est adapté à son nouvel environnement, et est phénotypiquement différent de ce qu'il était avant l'application du stress salin. C'est au cours de cette 3<sup>e</sup> étape, et par son aptitude à évoluer normalement que l'on est en mesure de déterminer s'il est halophile ou halotolérant.

Tableau 2.3 Besoins en sels de certaines bactéries en fonction de la température

Bactéries	Températures	NaCl (g/L)	Observations	Références
Souches de bactéries lactiques, <i>Pediococcus homari</i>	Incubation : 20°C à 35°C, et 25°C à 40°C	30	La croissance n'a pu être observée lorsque les ions de NaCl ont été remplacés par des ions de KCl, NaNO <sub>3</sub> ou autres sels	Goldman et al. (1963)
<i>Planococcus halophila</i>	25°C et plus	30	Même observation que pour les bactéries lactiques	Novitsky et Kushner, (1975, 1976)
48 souches de Eubacteria isolées de sites de sels solaires	35°C, 22°C et 27°C	50 et plus	Les concentrations optimales de NaCl de croissance pour la plupart de ces souches augmentent avec la température	Ishida, (1970)
<i>Marinococcus halophilus</i>	20°C 25°C	0.5 30	En réponse à une augmentation de 5°C, les besoins en sels de cette bactérie sont 60 fois plus élevés	[Ventosa, et al., 1998]
<i>Salinivibrio Costicola</i>	30°C 20°C	30 – 234 12	A 30°C, cette bactérie a besoin d'au moins 30 g/L pour assurer sa croissance, tandis qu'à 20°C, seulement 12 g/L sont nécessaires	[Ventosa, et al., 1998]

## Mécanismes d'osmorégulation

### Le « salt-in » et « organic-in »

Il existe deux principales stratégies d'osmorégulation [Oren, 1999 ; Galinski, 1995, Lozach, 2001 ; Gunde-Cimerman, *et al.*, 2005 ; Zahran, 1997 ; Oren, 2002 ; Sleator et Hill, 2001 ; Baliarda, 2003 ; Rodriguez-Valera, 1993 ; Roberts, 2005 ; Romeo, *et al.*, 2001] (figure 2.2) :

- 1) Le mécanisme dit « salt-in » cytoplasme (appelée aussi « halobacterial strategy ») : typique chez le règne des archées, cette méthode d'adaptation ne se manifeste qu'auprès de quelques groupes du règne des eubactéries. Grâce à ce mécanisme très peu coûteux énergétiquement, la cellule maintient une haute concentration intracellulaire en sels (plus de 400 g/L pour certaines espèces de *Halobacterium*), au moins équivalente osmotiquement à la concentration extérieure par accumulation de KCl.

La présence de sel dans le cytoplasme aura pour conséquence (i) de stabiliser les protéines en réduisant les forces de répulsions entre les charges négatives (ii) d'augmenter l'hydratation des protéines. Cette accumulation implique une totale adaptation de tout le système intracellulaire de la bactérie (protéines, fonctions métaboliques, activités enzymatiques), ce qui lui permet d'être active même à de très fortes concentrations. Une protéine est naturellement constituée d'une chaîne d'acides aminés qui doit se replier de façon précise dans l'espace pour assurer la stabilité de l'ensemble et assurer sa fonction dans la cellule. Or, l'hydratation de sa surface est nécessaire pour qu'elle puisse se replier convenablement. C'est pourquoi, si une protéine non-halophile est soumise à un stress salin, la couche d'hydratation nécessaire au repliement ne peut se former car les molécules d'eau sont toutes piégées par le sel du solvant (diminution de l'activité de l'eau).

La protéine devient insoluble et précipite. Ce n'est pas le cas des protéines halophiles, qui ont subi diverses substitutions acido-aminées, impliquant un enrichissement en aspartyl, et du glutamyl. À titre de comparaison, le malate

déhydrogénase (hMDH) de la *Halobacterium marismortui* a un excès de 20 mol % de résidus acides (donc chargé négativement), par rapport à seulement 6 mol% de son homologue non-halophile. Une protéine halophile associe environ 10 % de sa masse en KCl et 40 % en eau, comparativement à des protéines non halophiles qui donnent 0 % de KCl et 20 % à 40 % d'eau [Sleator & Hill, 2001]. Ainsi, au lieu de se protéger du sel, comme les protéines « conventionnelles », elles l'associent à leur structure et l'utilisent pour capturer les molécules d'eau nécessaires à leur repliement, leur stabilisation et leur solubilité. D'autre part, l'intégrité de l'enveloppe cellulaire des bactéries est respectée en présence de NaCl ou de KCl, puisque la paroi des espèces d'*Halobactérium* par exemple, possède une couche externe majoritairement constituée d'une couche de glycoprotéine sulfatée à haut poids moléculaire similaire à celle des eubactéries et qui serait responsable de la stabilité au sel. La surface bactérienne a également des sous-unités glycoprotéique dont l'intégrité dépend de la présence de sels.

C'est pourquoi sur des milieux dilués progressivement à partir du milieu de croissance, les cellules changent graduellement de forme et finissent par se lyser. La membrane cytoplasmique des archaebactéries est formée de solides éther-lipides, résistants aux stress environnementaux (ex. sel, chaleur, etc.). Ces lipides sont plus ramifiés que chez les Eubactéries. Alors que les bactéries halotolérantes doivent s'adapter phénotypiquement aux fortes salinités en augmentant la proportion de lipides anioniques (principalement du phosphatidylglycérol et/ou glycolipides), les archaebactéries seraient déjà génotypiquement et phénotypiquement adaptées à un environnement salin.

- 2) Le mécanisme d'accumulation intracellulaire de solutés osmotiquement actifs permettant de restaurer une pression de turgescence positive par accumulation d'ions  $K^+$  dans le cytoplasme, puis par production d'osmolytes organiques neutres au sein de la bactérie appelés « solutés compatibles ». Ceux-ci permettent de rétablir la pression osmotique. Pour les bactéries à Gram négatif, ces molécules dites « compatibles » vont passer au travers de la membrane cellulaire externe, par l'espace périplasmique, puis par la membrane plasmique

avant d'atteindre le cytoplasme. Chaque structure cellulaire (membrane externe et périplasma) a son propre mécanisme d'osmorégulation. Ainsi, la bactérie adapte sa « perméabilité » aux composés osmotiquement actifs grâce à des porines (pores protéiques) selon les besoins d'importation.

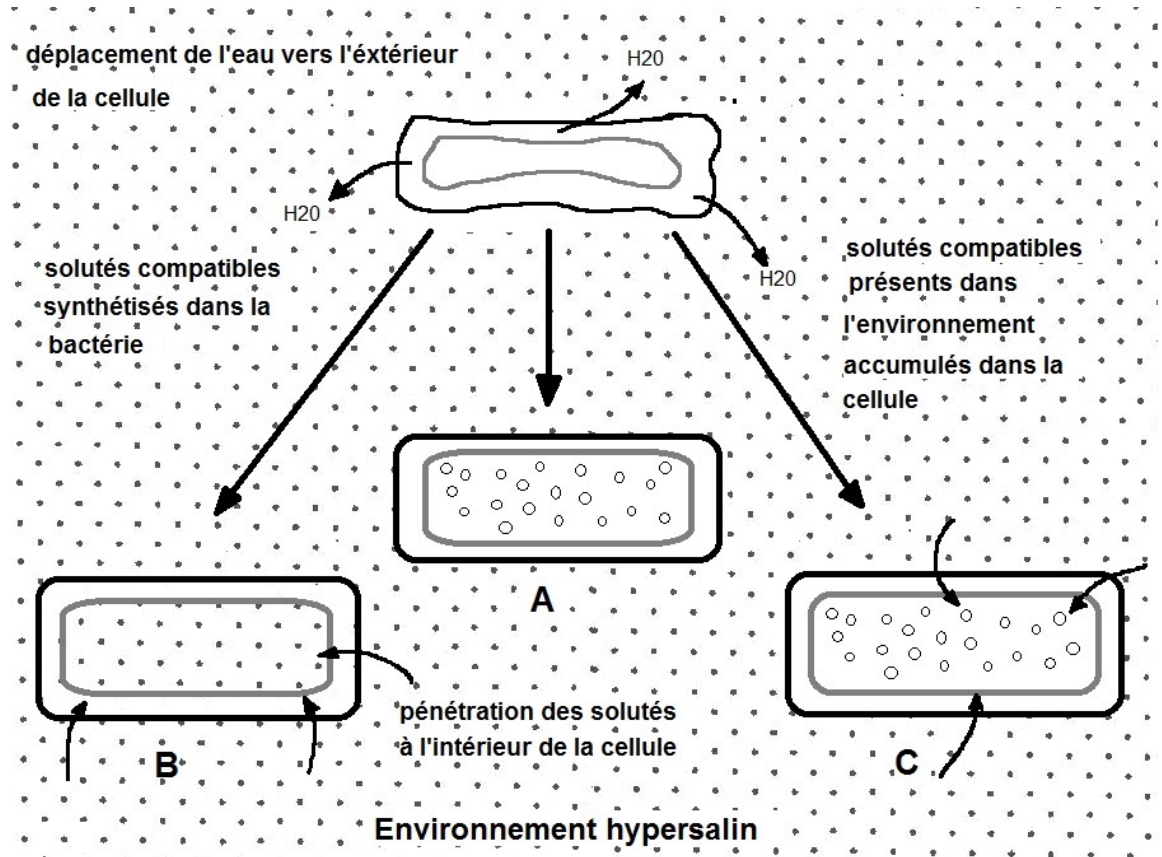


Figure 2.2 Mécanismes d'osmorégulation pour une bactérie en milieu hypersalin

2.i La réponse primaire : L'accumulation des ions  $K^+$  en réaction à une augmentation de la pression osmotique du milieu est le mécanisme majeur chez la plupart des espèces bactériennes, aussi bien non-halophiles, halotolérantes, halophiles modérées qu'halophiles, ou chez les bactéries à Gram positif et à Gram négatif, puisque ces ions participent essentiellement au maintien de la pression de turgescence (état d'une cellule sous pression en raison de son contenu en eau). Grâce à cette accumulation,



l'équilibre osmotique est rétabli, puisque les concentrations cytoplasmiques en KCl sont similaires à celles du milieu extérieur.

Lorsque des tests de stress salin ont été appliqués sur *Escherichia coli* (Orskov (1948)), il a été démontré que la plasmolyse pouvait rapidement être évitée si le milieu environnant contenait des ions  $K^+$ . Une portion de ces ions sert à neutraliser la charge nette des macromolécules cytoplasmiques, tandis que l'autre partie est équilibrée par un contre-ion, le glutamate, synthétisé par voie endogène, mais dont la vitesse d'accumulation est plus lente que celle de l'accumulation des ions  $K^+$ . Le même phénomène a été observé chez les entérobactéries, ce qui suggère que le  $K^+$  participe activement à l'osmorégulation en tant que réponse primaire pour le rétablissement de la pression de turgescence. Par contre, la nature des contre-ions compensant la charge du  $K^+$  peut varier d'une bactérie à l'autre, et ne sont pas encore connus.

En absence de stress osmotique, les bactéries à Gram positif possèdent au sein de leur cytoplasme plusieurs acides aminés, dont une large proportion de glutamate. Par ailleurs, les concentrations cellulaires de  $K^+$  chez les bactéries à Gram positif sont nettement supérieures à celles de leurs homologues à Gram négatif en absence de choc salin. Cette différence est également observable lorsque l'on compare leur pression de turgescence : 20 bars pour les bactéries à Gram positif, contre 3 – 10 bars pour celles à Gram négatif.

2. ii La réponse secondaire (les solutés compatibles) : À partir d'une certaine limite d'accumulation (environ 400 mM du couple  $K^+$ /glutamate), les bactéries à Gram négatifs observent une sorte de point d'arrêt de la réponse primaire (variable), à partir de laquelle l'augmentation de la concentration en sel déclenche la réponse secondaire. En fait, l'accumulation du  $K^+$  est une phase transitoire, durant laquelle ces ions agissent comme des messagers secondaires, induisant la seconde réponse : l'accumulation de solutés compatibles.

Contrairement aux ions accumulés durant la réponse primaire, ces composés peuvent atteindre des concentrations molaires à l'intérieur du cytoplasme sans causer d'effets

adverses physiologiques sur la cellule ou inhiber les fonctions cellulaires, permettant ainsi le rétablissement d'une pression de turgescence positive. Les solutés compatibles sont des molécules à faible poids moléculaire, polaires, très solubles, et non chargés ou zwitterioniques (composé neutre possédant en nombre égal des charges électriques formelles d'une unité et de signes opposés) aux pH physiologiques, exceptions faites à certains solutés compatibles négativement chargés, tels que le sulfotrèhalose, ou le diglycérolphosphate.

Au-delà de ces caractéristiques, ces osmolytes ont en fait très peu en commun d'un point de vue structurel. Certains de ces osmolytes semblent par contre plus efficaces que d'autres dans la protection des enzymes contre les expositions salines (d'où l'autre appellation « osmoprotecteurs »). Ainsi, les solutés compatibles principalement retrouvés chez les bactéries osmoadaptatives, classés par ordre décroissant d'importance, seraient : glycine, bétaine, carnitine, et proline. Ces osmolytes sont soit synthétisés par la cellule elle-même, ou assimilés à partir de l'environnement extracellulaire (voir tableau 2.5). La stratégie d'accumulation de solutés compatibles ne nécessite pas de protéines particulièrement adaptées. En fait, ce sont des solutés permettant aux enzymes de fonctionner correctement et ce même à de fortes concentrations en sel.

Il existe une large variété de solutés compatibles, encore en expansion jusqu'à présent, tel que le montrent les tableaux 2.4 et 2.5. Les osmolytes (autre appellation de « soluté compatibles ») ont la particularité d'être « cosmotropiques », c'est-à-dire ayant une aptitude de structuration protéinique. Ceci serait dû à l'exclusion immédiate des solutés compatibles de la surface polypeptidique hydratée, provoquant une diminution d'entropie, impliquant une hydratation préférentielle des surfaces protéiniques qui leur permet leur stabilisation.

Tableau 2.4 Exemples de solutés compatibles de bactéries halophiles et halotolérantes [Imhoff, 1992]

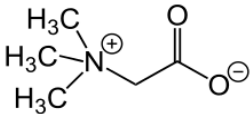
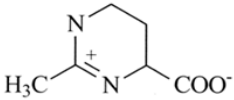
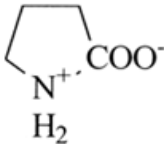
<b>Solutés compatibles</b>	<b>Exemples</b>
Acides aminés	Glutamate, Proline
Acides aminés et dérivés	Ectoine, proline bétaine
Petits peptides	N-acétylglutaminyglutamine amide
Méthylamine	Glycine bétaine, carnitine
Sulfates ester	Choline-O-sulfate
Polyols	Glycérol, glycosyglycérol, arabitol
Sucres	Tréhalose, sucrose

### **Porines de la membrane externe OmpC et OmpF**

Les porines OmpC et Ompf sont des protéines intervenant dans la perméabilité de la membrane externe, et participent aux transports transmembranaires [Baliarda, 2003].

Il existe chez les bactéries à Gram négatif des gènes osmorégulateurs encodant deux canaux protéinés de transport, impliqués indirectement dans l'accumulation de solutés compatibles : les OmpC et OmpF. Ceux-ci s'associent en homotrimères, formant ainsi des porines facilitant la diffusion de petites molécules hydrophiles (<500 Da) à travers la membrane [Baliarda, 2003 ; Sleator et Hill, 2001]. Les OmpC et OmpF ne réagissent pas exclusivement au stress salin, mais à toutes sortes de paramètres environnementaux tels que le pH du milieu, les carences en nutriments, diminution de la source de carbone ou disponibilité de l'oxygène.

Tableau 2.5 Exemples de solutés compatibles accumulés selon le type de bactérie (adapté de [Sleator & Hill, 2001] et [Zahran, 1997])

Soluté compatible	Structure	Bactéries	Commentaire
Bétaine		Majorité des procaryotes, bactéries halophiles ex : <i>Tetragenococcus halophilus</i>	Assmiliation d'un milieu externe complexe, varie en fonction de la concentration en sels, rarement synthétisé <i>de novo</i> , à l'exception de <i>Methanohalophilus, halomonas elongata</i> , par oxydation de la choline ou le méthylate de glycine
Ectoine		Large variétés de bactéries halophiles et halotolérantes : chimiohétérotrophes, méthylotrophes halophiles modérées <i>Methylarcula marina, M. terricola et Methylophaga sp.</i>	La concentration augmente avec l'augmentation du NaCl extracellulaire. Accumulation dépendante de la phase de croissance de la bactérie : pour chromohalobacter, l'ectoine n'a été accumulée que lors de la phase exponentielle, à des concentrations en sel supérieures à 35 g/L
Proline		Large variétés d'Eubactéries, <i>E Coli, Klebsiella pneumoniae, Salmonella typhimurium</i>	Accumulées à de fortes concentrations intracellulaires, les bactéries à Gram positif augmentent l'accumulation de proline par biosynthèse, tandis que les bactéries à Gram négatif favorisent son transport du milieu extracellulaire

### L'ajustement membranaire

Lors d'un stress osmotique, l'environnement intracellulaire de la bactérie (cytoplasme) subit le stress salin extérieur et y répond par accumulation de solutés compatibles, au même titre que l'environnement externe de la cellule, soit l'espace périplasmique, la

membrane externe chez les bactéries à Gram négatif, et doit donc subir un certain nombre de changements adaptatifs, tels que l'augmentation de phospholipides anioniques au lieu des composés zwitterioniques, impliquant un excès de charge négatives. Ceci permet de maintenir un niveau d'hydratation suffisant à sa surface [Baliarda, 2003 ; Sleator et Hill, 2001 ; Russell, 1995].

### **Les oligosaccharides dérivés de membranes (MDOs)**

L'espace périplasmique des bactéries à Gram négatif contient une forte proportion de polysaccharides anioniques, auxquels on réfère par MDOs (Membrane Derived Oligosaccharides) chez *E. coli* [Sleator et Hill, 2001]. Ces polymères anioniques (contenant entre 6 et 12 unités glucosées avec une charge moyenne de -5 [Kennedy, 1982] génèrent un potentiel électrique (appelé « potentiel Donnan ») à travers la membrane extérieures, impliquant une accumulation de cations à des concentrations supérieures dans le périplasma que dans le médium, puis une augmentation de la pression hydrostatique dans l'espace périplasmique ([Baliarda, 2003 ; Sleator et Hill, 2001; Kennedy, 1982].

### **Les osmoprotecteurs non-accumulés**

Certaines bactéries ont également la capacité de pallier au stress osmotique en usant d'osmoprotecteurs (osmolytes protégeant les enzymes contre les exposition au sel), mais sans accumulation, et ce, en usant de disaccarides (sucrose, maltose, cellobiose, gentibiose, turanose et palatinose). Contrairement aux osmoprotectants « conventionnels » (solutés compatibles tels que glycine ou proline), ceux-ci ne s'accumulent pas en tant qu'osmolytes précurseurs immédiats pour le cas de la bactérie *Sinorhizobium meliloti*, par exemple. En fait, ils proviennent de la catabolise durant la phase exponentielle de croissance qui contribuent ainsi à augmenter de manière endogène des osmolytes tels que le N-acetylglutaminylglutamine amide, permettant ainsi la croissance en conditions salines [Sleator & Hill, 2001 ; Gouffi, 2000].

## **2.2.4 Effet du sel sur un consortium bactérien – Phénomène de sélection**

Il existe des milieux naturellement salins, auxquels les bactéries se sont adaptées au fil des siècles malgré l'extrême concentration en sels qui peut atteindre la saturation, soit 360 g/L en NaCl [Le Borgne, *et al.*, 2008]. Outre les mers et océans, il existe de très nombreux écosystèmes naturellement salins à hypersalins sur la planète, dont la teneur en sels varie entre la concentration de l'eau de mer (35 g/L) et la concentration de saturation soit 350 g/L [Le Borgne, *et al.*, 2008]. Un environnement est considéré hypersalin lorsque sa concentration dépasse 35 g/L en sels inorganiques dissous [Le Borgne, *et al.*, 2008], ou à l'inverse non-salin, lorsque sa concentrations en sel dissous est inférieure à 3 g/L [Nielsen, *et al.*, 2003]. Il peut être d'origine naturelle ou anthropique (lacs salins, marais salants...etc.). Les environnements salins aquatiques peuvent être classés selon leur origine, soit : -thalassohalins (*thalasso*, du grecque, signifiant la mer), d'origine marine, tels que les lagons; -athalassohalins, d'origine non marine, tels que les lacs salés, dont la salinité résulte de la dissolution de sels d'origine continentale, ou par évaporation de l'eau douce dans un système dominé par le calcium, le magnésium et les sulfates (par opposition au sodium et aux chlorures dans l'océan) [Rodriguez-Valera, 1993].

Il a été observé par les chercheurs que le sel était un facteur déterminant dans la répartition des populations bactériennes dans ces milieux, et que son impact serait supérieur à d'autres facteurs environnementaux tels que la température, ou le pH, etc. [Nielsen, *et al.*, 2003 ; Herlemann, *et al.*, 2011]. Ainsi, il est possible d'isoler une large variété de bactéries halophiles ou halotolérantes de milieux naturels salins, tel que l'illustre le tableau 2.6.

## **2.2.5 Adaptation ou acclimatation d'une population à un stress salin dans les traitements biologiques**

### **Définition et mécanismes d'acclimatation d'une population bactérienne**

Des chercheurs se sont intéressés à adapter des communautés bactériennes mixtes au sel, afin de traiter des effluents salins et hypersalins. Cette adaptation est en fait un processus de sélection, durant lequel aura lieu le remplacement progressif de la population initiale par des microorganismes plus tolérants aux nouvelles conditions salines (halotolérants), qui étaient déjà présents dans le consortium [Bassin *et al.*, 2012]. À mesure que les concentrations en sel augmentent, la survie des bactéries non-halophiles va dépendre de leur capacité à équilibrer leur pression osmotique par accumulation de solutés compatibles, ainsi que de la nature de ces derniers, tel que décrit dans la section 2.2.3. Ceci s'explique de deux façons : (1) les cellules sont perméables au soluté, et la tolérance se mesurera par la résistance des enzymes intracellulaires à ce dernier, (2) les cellules sont imperméables au soluté, mais doivent donc compenser la pression osmotique croissante à l'échelle intracellulaire [Kirchner *et al.*, 1975] tel que décrit dans la section 2.2.3.

Ainsi, pour acclimater une population bactérienne, on lui applique un stress léger de façon incrémentale et prolongée. Pour ce faire, ces bactéries sont dans un premier temps inoculées dans un milieu modérément hostile (permettant quand même une croissance). Progressivement, le degré d'hostilité est augmenté, ce qui permet à cette population d'évoluer de manière appropriée. Un suivi de l'adaptation du consortium par divers moyens de contrôle de croissance permet alors de confirmer ces changements [Baliarda, 2003]. L'acclimatation trouve de plus en plus d'applications dans le domaine du traitement de contaminants difficiles à éliminer en laboratoire, puisqu'elle permet en théorie le développement d'une population plus adéquate pour les conditions de traitement voulues [Linaric *et al.*, 2013 ; Elías, *et al.*, 2010]. Le fait de soumettre un consortium à un « stress » de manière progressive, conduit à de meilleures efficacités de traitement (plus détaillé dans les sections suivantes).

Divers mécanismes surviennent pendant l'acclimatation [Buitrón et Capdeville, 1995 ; Kogut, 1980 ; Wiggins et Alexander, 1988 ; Baliarda, 2003 ; Rodhes, 2011] :

- 1) Enzymatiques : Un métabolisme fortuit a lieu lorsque un enzyme existant offre une activité catalytique adéquate au nouveau substrat.

- 2) Changements génétiques: Dans certains cas d'acclimatation surviennent des modifications génétiques ou des mutations. L'acclimatation peut être phénotypique ou génotypique. Dans le premier cas, l'information génétique au sein de la cellule demeure inchangé, c'est seulement le degré de l'expression des gènes qui est modifié. Dans le cas des changements génotypiques, la modification génétique est produite, et les gènes modifiés sont transmis à la cellule fille.

Tableau 2.6 Exemple de bactéries halophiles et halotolérantes isolées de milieux naturels (adapté de [Grant, 2004 ; Lozach, 2001])

Souche	Groupes	Environnement
Cyanobactéries	<i>Arthospira platensis</i>	Lac Soda, (U.S.A)
	<i>Halospirulina tapeticola</i>	Saltern marine (Mexique)
Protéobactéries	<i>Halomonas elongata</i>	Salterne marine (Espagne)
	<i>Halomonas halophila</i>	Sol salin (Espagne)
Pseudomonas	<i>Pseudomonas halophila</i>	Lac salé (U.S.A)
Halobacterium	<i>H. salinarium</i>	Bassin Badwater, (USA)
	<i>H. sodomense</i>	Mer morte

- 3) Les interactions intra-membres bactériens: sélection naturelle, et réduction de la population. La résistance d'un microorganisme face à un stress donné dépend de son état physiologique, de telle sorte que les bactéries en état de dormance, ou qui se développent lentement, ou qui sont en phase stationnaire, acquièrent un niveau



général de protection au stress supérieur à celui des cellules en phase exponentielles.

- 4) Le transfert génétique horizontal: Il s'agit du transfert du matériel génétique d'un organisme à un autre organisme. Comme l'acclimatation dépend non seulement du type de bactéries, mais aussi de la forme de culture bactérienne (libre ou fixée), l'on notera que les interactions les plus présentes dans les biofilms halophiles par exemple, sont les phénomènes de conjugaison.

D'une autre côté, l'acclimatation au sel dans le cadre du traitement biologique des eaux usées est effectuée dans le but de dégrader la matière organique polluante. Outre la nécessité de la présence de la matière organique comme substrat pour le développement normal de la biomasse, l'acclimatation à la source de carbone fournie est nécessaire si le composé a une structure complexe, s'il est difficile à biodégrader d'une part, et s'il doit être traité à des concentrations relativement élevées d'autre part [Wiggins et Alexander, 1988]. L'exposition des bactéries à des concentrations graduellement croissantes d'un substrat carboné implique son passage de l'extérieur vers l'intérieur de la bactérie, et ce, à travers la paroi cellulaire et la membrane intérieure. Celle-ci ne constitue pas une barrière puisque le contrôle du passage des composés carbonés est exercé au niveau de la membrane interne. Des ions tels que le sodium se diffusent en raison de leur concentration dans la liqueur mixte, qui est supérieure à celle de l'intérieur de la bactérie. Ils doivent ensuite être à nouveau pompés vers l'extérieur pour maintenir l'état d'équilibre interne [Davies, 2011].

Au même titre, les petites molécules organiques sont également soumises un gradient de concentration permettant leur diffusion à l'intérieur de la cellule, ou bien subissent divers mécanismes au niveau de la membrane interne leur permettant de passer à l'intérieur de la cellule. La plupart des composés à haut poids moléculaires en sont exclues. Afin d'utiliser ces dernières pour leur nutrition et leur croissance, les bactéries sécrètent des enzymes dans le milieu extracellulaire pour les digérer en petits monomères, qui peuvent alors passer dans la cellule. Les diverses espèces bactériennes sécrètent ces enzymes spécifiquement, ce qui détermine les types de produits chimiques que chaque bactérie

peut exploiter en tant que source de nourriture. La capacité à sécréter une enzyme particulière peut être latente. En d'autres termes, il est nécessaire que la bactérie soit mise en présence du composé chimique à traiter pour activer les gènes de synthèses d'enzymes nécessaires pour son assimilation. Ceci représente la base des processus d'acclimatation ou adaptation d'une population bactérienne (boues activées) [Davies, 2011].

### **Techniques d'acclimatation expérimentale**

L'acclimatation à l'échelle du laboratoire comme étape préparatoire à un traitement biologique est de plus en plus répandue. En effet, il a été démontré que le succès du traitement de la matière organique d'un effluent salin par un procédé biologique dépendait beaucoup de la pré-acclimatation des bactéries, et/ou de l'inoculation de souches halophiles/halotolérantes (la bioaugmentation) [Gharsallah, *et al.*, 2002 ; Hamoda et Al-Attar, 1995 ; Aloui, *et al.*, 2009]. Bien qu'il n'existe aucun protocole spécifique et précis d'acclimatation, il est possible de décrire les méthodes les plus utilisées, soit l'acclimatation progressive, ou la bioaugmentation. De manière générale, il s'agit de soumettre graduellement une population bactérienne aux conditions adéquates au traitement visé, en fournissant des nutriments adaptés aux besoins des bactéries halotolérantes et/ou halophiles, soit un rapport de C/N/P de 100/10/1 [Kargi et Uygur, 1996]. Le consortium qui servira d'inoculum pour les procédés biologiques peut être adapté et/ou isolé de deux façons différentes :

- L'acclimatation en milieu liquide (détaillée dans le paragraphe suivant)
- L'acclimatation (sélection) sur milieu gélosé

1) l'acclimatation progressive d'un consortium bactérien à la présence de sel: Il s'agit d'acclimater des bactéries mixtes simultanément au sel ainsi qu'au substrat à éliminer. Les bactéries sont prélevées d'un milieu riche en biomasse bactérienne tel que les bassins de boues activées issues de stations d'épuration, bactéries issues du compost, bactéries marines, sites de décharge de pollution [Lefebvre et Moletta, 2006 ; Xiao et Roberts, 2010]. Le choix des points de prélèvements s'effectue selon que les bactéries présentes *in-situ* soient exposées ou non à la pollution à traiter, et soumise aux conditions visées.

De manière générale, cette technique consiste en l'augmentation progressive de la concentration du NaCl proportionnellement au temps (dont l'incrément dépend de l'expérience du chercheur), jusqu'à atteindre la valeur maximale en sel qui sera stabilisée. Par la suite, lorsque les valeurs d'élimination de la DCO (Demande Chimique en Oxygène) se stabilisent dans le temps, l'on considère l'acclimatation achevée [Yanghong, *et al.*, 2011]. Cette technique qui est très largement utilisée.

D'autres chercheurs tels que Yanghong et al. (2011) ont proposé une nouvelle méthode d'acclimatation basée sur un incrément proportionnel au logarithmique du temps (voir figure 2.3), et l'ont par la suite appliquée à des effluents pétroliers, tout en comparant cette nouvelle méthode avec les techniques conventionnelles d'acclimatation (voir figure 2.3). Ils ont obtenu 82 % de taux d'élimination de la DCO, et 69 % de taux d'élimination d'hydrocarbures par la méthode logarithmique au lieu de 72 % et 61 % respectivement pour la méthode conventionnelle. Au 64<sup>e</sup> jour d'acclimatation par exemple, la variation de la salinité dans le réacteur acclimaté par la méthode logarithmique était de 8 g/L, soit deux fois la salinité dans le réacteur à acclimatation par la méthode proportionnelle (4 g/L).

Cette méthode d'incrément de la concentration en sel semblerait donc plus efficace que la méthode traditionnelle, en raison des faibles variations en sel d'un temps donné à un autre, comparativement à lorsque l'incrément de sel est proportionnel au temps. Ceci permet de diminuer l'effet inhibiteur du sel, et d'obtenir donc une meilleure acclimatation traduite par de meilleures efficacités d'enlèvement de la matière carbonnée.

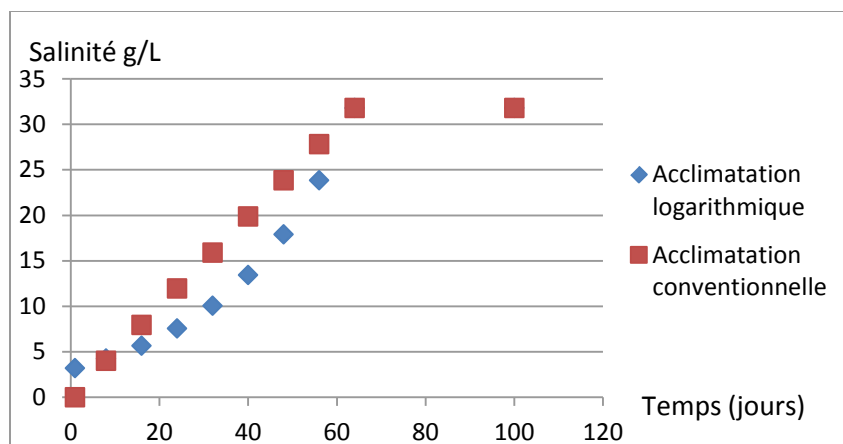


Figure 2.3 Comparaison de l'augmentation du sel en fonction du temps pendant l'acclimation [Yanghong, et al., 2011]

Selon [Lefebvre et Moletta, 2006], le succès de l'acclimation dépend de plusieurs facteurs, tels que le type, ainsi que la phase de croissance des bactéries à adapter, ainsi que la vitesse d'augmentation des concentrations en sels. Même si des études ont démontré que l'acclimation d'une population mixte de boues activées au sel était possible (80 – 85 % d'élimination de la DCO, Kargi et Dincer (1997)), une concentration limite de 50 g/L en sels a été observée, au-delà de laquelle les efficacités d'élimination dénotent une baisse. Conséquemment, l'inclusion d'organismes spécifiques à ces conditions extrêmes de salinité (halophiles) devient nécessaire : c'est la bioaugmentation.

2) La bioaugmentation d'un consortium : La bioaugmentation est l'utilisation d'organismes autochtones/allochtones ou génétiquement modifiés afin d'accélérer l'élimination des polluants indésirables, récalcitrants et/ou dangereux, par inoculation de souches efficaces dans la dégradation des polluants ciblés [Li, *et al.*, 2013]. Il a été prouvé que cette technique était un outil plus efficace pour traiter la matière organique en milieu salin, et a été testée en laboratoire sur des effluents issus d'usines pharmaceutiques, des industries de poissonneries, les usines de pâtes, et colorants [Ma, *et al.*, 2009] et agroalimentaire. La bioaugmentation des cultures de bactéries halophiles/halotolérantes peut être appliquée dans les systèmes à biomasse fixée ou libre [Panswad et Anan, 1999 ; Gharsallah, *et al.*, 2002 ; Wu, *et al.*, 2008 ; Li, *et al.*, 2013].

Les bactéries utilisées pour la bioaugmentation doivent répondre aux trois critères suivants [Li, *et al.*, 2013]: a) l'activité b) la persistance, c) la compatibilité.

Le succès de la bioaugmentation dépend de plusieurs facteurs tels que les propriétés chimiques, et la concentration du polluant. Il est également important d'effectuer des tests afin de vérifier que l'activité des bactéries halotolérantes reste égale après acclimatation, puisqu'elle a montré une tendance à diminuer lorsque les concentrations en sel augmentent dans certains cas [Li, *et al.*, 2013].

Il est à noter que dépendamment du type d'organisme (souche pure ou mélange de microorganismes) utilisé comme organisme épurateur, les efficacités, et les capacités d'éliminations vont varier, tel que l'ont observé Kargi et Uygur (1995) pour une colonne à percolation aérobie, traitant un affluent dont la DCO est égale à 5500 mg/L et la salinité à 10 g/L (voir tableaux 2.7 et 2.8).

Les plus basses valeurs d'efficacité d'élimination de la DCO ont été observées pour la souche d'*H.halobium*, qui s'explique par le fait que sa concentration optimale en sel est d'environ 150 g/L [Kargi et Uygur, 1996].

Tableau 2.7 Comparaison des efficacités d'élimination et du taux d'élimination de la DCO en fonction du type d'organismes microbiens (adapté de [Kargi et Uygur, 1996])

Type de souches	Efficacité d'élimination de la DCO (%)	Taux d'élimination (mg/l.h)
<i>Zooglea ramigera</i>	≈ 75	≈900
<i>Z. ramigera</i> + <i>halobium</i>	≈55	≈700
<i>Halobacter halobium</i>	≈45	≈600
Boues activées	≈80	≈1000
<i>H. halobium</i> + boues activées	≈90	≈1100

La suite des expériences a été poursuivie uniquement avec la biomasse présentant les meilleures efficacités d'élimination de la DCO, soit le mélange *H. halobium* + boues activées. Ceci s'explique par les effets et interactions synergétiques au sein du consortium [Kargi et Uygur, 1996].

Le tableau 2.8 présente donc les résultats obtenus pour le mélange cité précédemment, pour des concentrations en sel dans l'affluent variant de 10 à 50 g/L et des DCO initiales comprises entre 5000 et 5500 mg/L.

Tableau 2.8 Effet du sel sur une unité biologique par percolation dont l'inoculum épurateur est constitué des boues activées + *H. halobium* (adapté de [Kargi et Uygur, 1996])

Salinité (g/L)	Efficacité (%)	Capacité d'élimination (mg/L.h)
10	≈90	≈1100
20	≈90	≈1100
30	≈85	≈850
40	≈85	≈1000
50	≈80	≈620

L'efficacité d'élimination de la DCO est passée de 90 % à 80 % pour des salinités variant de 10 g/L à 50 g/L, quant au taux d'élimination, il a logiquement baissé (620 mg/l.h pour des salinités de 50 g/L).

Les observations sont les suivantes :

- Entre 10 et 20 g/L (NaCl), l'efficacité d'élimination de la DCO est élevée, à cause de l'action de boues activées, alors que l'*Halobacter* est moins active sous ces concentrations en sel;

- À 30 g/L (NaCl), les efficacités sont basses, ce qui est attribuée à l'effet inhibiteur de cette concentration aussi bien sur les boues activées, que sur l'*Halobacter*;

- À 40 g/L (NaCl), on note un regain d'efficacité, interprété comme une stimulation de l'*Halobacter*, dont l'activité a été suffisante pour accomplir près de 90% d'élimination.

### **Rôle des solutés compatibles**

Tel que vu précédemment dans la section 2.2.3, les solutés compatibles jouent un rôle déterminant dans le potentiel d'adaptation au sel d'une bactérie. En effet, il semblerait que la présence de solutés compatibles dans l'environnement direct de la bactérie lui permettrait d'outrepasser le choc lié à la présence délétère des ions sodium. Ceci qui pourrait s'expliquer par le fait qu'énergétiquement parlant, l'assimilation directe est plus favorable que la synthèse *de novo* (nouvellement synthétisé). Afin d'améliorer les techniques d'acclimatation bactérienne en réduisant les effets néfastes du sel sur les bactéries, des études ont été menées sur l'influence des solutés compatibles présents dans l'environnement direct d'une biomasse à adapter au sel. Les solutés appliqués étaient la glycine bêtaïne, l' $\alpha$ -glutamate, et le  $\beta$ -glutamate. Les conclusions suivantes ont été atteintes [Vyrides et Stuckey, 2009] :

- L'addition de solutés compatibles dans le médium a augmenté les performances de la biomasse;

- La glycine bêtaïne a été le soluté compatible le plus efficace pour contrer la toxicité du sodium, comparativement au  $\beta$ -glutamate puis au l' $\alpha$ -glutamate;

- La présence de la glycine bêtaïne entraîne un potentiel d'acclimatation supérieure à la biomasse que lorsqu'exposée pendant une longue période à une forte salinité (28 jours à 35 g/L).

## **2.3 Traitement biologique des effluents salins**

### **2.3.1 Industries rejetant des effluents salins**

Il a été estimé que plus de 5% des effluents mondiaux étaient salins [Le Borgne, *et al.*, 2008]. En effet, le sel (sous forme de NaCl) est très utilisé dans divers secteurs de

l'industrie : agroalimentaire, métallurgie [Perrodin, *et al.*, 2012], tannerie et textile, pétrochimique [Lefebvre et Moletta, 2006], pharmaceutique, pâte et papiers, pesticide, et herbicides [Abou-Elela *et al.*, 2010]. L'exploitation et le transport du pétrole causent également des déversements pétroliers (accidentels ou non) rejetés à quelques millions de tonnes chaque année en milieux marins, endommageant les écosystèmes marins [FEPS, 2008]. Ces effluents sont souvent des émulsions très stables, et constituent un mélange hétérogène complexe à traiter, à cause de la présence de sel [Kargi et Uygur, 1996 ; Woolard et Irvine, 1994 ; Mancini, *et al.*, 2010]. Certaines industries se voient contraintes à diluer entre 10 et 20 fois leurs effluents avant d'appliquer tout traitement, comme c'est le cas de certaines industries chimiques, ce qui nécessite des quantités d'eau considérables [Tuin, *et al.*, 2006] (plus détaillé dans les sections ci-dessous).

Par ailleurs, ces effluents industriels sont souvent rejetés dans les écosystèmes aquatiques, ce qui constitue un risque écologique majeur [Perrodin, *et al.*, 2012].

### **Industrie agroalimentaire :**

#### **Industrie des saumures**

Le sel est très utilisé dans les industries de mise en conserve des légumes pour l'amélioration du goût, pour la préservation, et le conditionnement. De ce fait, cette industrie génère des eaux usées composées de fortes concentrations en sel, tel que décrit dans le tableau 2.9 :

Tableau 2.9 Composition des saumures utilisées pour la mise en conserve des légumes [Dan, 2001]

Produit	Saumure, (g/L)
Asperges	21.5 – 24 sels
Haricots verts	19.2 – 27.5 sels
Choux	15.6 – 25.2 sels
Betteraves	24 sels – 24 sucres



Ces effluents sont rejetés dans les milieux naturels à des volumes compris entre 10 – 120 m<sup>3</sup>/tonne de produit. Ils contiennent de fortes concentrations en sel (de 30 à 200 g/L) et des concentrations en matière organique de l'ordre de 4000 mg/L [Dan, 2001].

## **2. Industrie poissonnière**

Ce secteur industriel est présent partout dans le monde. Le Canada possède l'un des plus longs littoraux (244,000 km) représentant 25 % de la longueur des littoraux mondiaux. De ce fait, le Canada exporte 75 % de sa production poissonnière vers près de 80 pays. Parmi les plus grands pays producteurs dans le monde, on citera également la Chine, les États-Unis, la Thaïlande et le Pérou, ainsi que le Vietnam. Des quantités considérables d'eau de mer sont utilisées depuis le processus d'exploitation et de transport, jusqu'à l'étape d'entretien et nettoyage des équipements impliqués, de l'ordre de 20m<sup>3</sup> d'eau de mer/tonne de poisson.

Le sel est utilisé dans l'industrie poissonnière dans le but de réduire l'activité de l'eau, et ainsi a un rôle majeur en tant qu'agent de stabilisation [Lozach, 2001 ; Lefebvre et Moletta, 2006].

Les rejets issus de cette industrie constituent un mélange de saumures et de rejets de poisson, riches en azote protéiques, en phosphates, ainsi qu'en matière organique, donc la DCO et les quantités d'ammonium varient entre 1 et 32 g/L et 0.039-1.94 g/L respectivement, pour des salinités comprises entre 13 et 39 g/L de NaCl [Xiao et Roberts, 2010 ; Lefebvre et Moletta, 2006].

## **Industrie du cuir**

Les industries de cuir représentent un pôle économique très important pour les pays sud-asiatiques et méditerranéens. Cependant, elles sont également une importante source de pollution pour les écosystèmes aquatiques : inhibition des processus de photosynthèse, toxicité pour la faune [Lefebvre et Moletta, 2006]. Ces rejets, en termes de DBO

(Demande Biologique en oxygène), contribuent significativement aux rejets totaux de l'Asie de l'est, avec 15 % pour la Chine, 25 % pour le Cambodge, 35 % pour la Thaïlande, et 64 % pour le Bangladesh. De 100 à 200 L d'eaux usées sont déchargées pour chaque kg de produit textile fabriqué [Xiao et Roberts, 2010]. Les effluents rejetés sont typiquement hypersalins, puisque le sel est additionné dans diverses étapes de procédés de transformation des peaux en produits de cuir finis, ayant des salinités pouvant varier entre 30 et 100 g/L [Xiao et Roberts, 2010 ; Lefebvre et Moletta, 2006].

### **Industrie du pétrole et du gaz**

Le pétrole brut est une mixture complexe, contenant des composés cycliques, aromatiques, et hydrocarbures aromatiques [Lefebvre et Moletta, 2006]. Il existe deux volets à ce secteur : l'exploration et la production de pétrole et de gaz d'une part, et le raffinage et la pétrochimie d'autre part. Ceux-ci ont des besoins importants en termes d'eau de procédés, de traitement des eaux usées et de recyclage [Suez environnement, 2014]. Les effluents, dans ce cas appelés « eau produite » se caractérisent par de larges volumes, divers polluants tels que des métaux lourds, du pétrole, ou des radionucléides. Les concentrations en matières dissoutes totales de 0.5 – 6 g/L pour les gisements gaz de houille, et plus de 100 g/L pour le gaz conventionnel non associé. Les eaux produites ont été estimées entre 2.23 et 2.86 milliards de mètres cubes d'eaux (2004), et les concentrations en pétrole dans les eaux rejetées de 25 mg/L [Xiao & Roberts, 2010]. L'industrie pétrolière est également responsable de déversements pétroliers (accidentels ou non) rejetés à quelques millions de tonnes chaque année en milieux marins.

### **2.3.2 Application des procédés biologiques aérobies pour le traitement d'effluents salins**

Le sel a un effet négatif sur les bactéries conventionnelles, et compromet donc le bon fonctionnement des procédés biologiques de traitement des eaux usées biologiques. D'abord, la capacité d'adaptation des cultures conventionnelles est limitée pour des concentrations supérieures à 30 - 50 g/L. Cette adaptation est par ailleurs perdue, lorsque

la population adaptée est exposée à un environnement non-salin. D'un autre côté, les changements rapides de concentration des effluents à traiter entraînent des effets adverses sur les bactéries présentes dans ces procédés. D'autre part, le sel provoque une diminution de la cinétique de dégradation des composés organiques, ainsi que le transfert de composés chimiques entre le milieu extracellulaire et la cellule microbienne [Kargi et Dincer, 1996 ; Deorsola, *et al.*, 2011 ; Gharsallah, *et al.*, 2002]. Pourtant, dès 1940, des résultats ont montré qu'il était possible d'obtenir des rendements d'élimination similaire entre des boues activées exposées à une eau marine et une eau douce, puis c'est à partir de 1990 que l'intérêt pour la dégradation halophile est survenue, avec des expériences menées sur des effluents synthétiques dont la salinité a varié entre 10 et 150 g/L.

C'est notamment Kargi et Dincer (1997) qui ont contribué de manière très significative aux recherches liées au traitement biologique des effluents salins. D'abord, en étudiant l'effet du sel sur un procédé biologique en fed-batch à boues-activées, traitant un effluent synthétique, à des concentrations en sel allant jusqu'à 50 g/L, et des ratios de DCO/N/P de 100 :10 :1. Les efficacités d'élimination de la DCO sont passées de 85% à 59% lorsque les salinités sont passées de 0 à 50 g/L. Par la suite, des recherches sur les disques biologiques rotatifs (RBC, *rotating biological disc*) ont été menées (dont le nombre et la surface ont varié) pour traiter un effluent synthétique en condition d'halophilie pour un effluent dont la salinité variait entre 0 et 100 g/L. Les efficacités d'éliminations de la DCO ont atteint 80% tant que la salinité ne dépassait pas 50 g/L [Kargi et Dincer, 2001].

### **Industrie poissonnière**

Même si les recherches ont montré que les procédés anaérobies sont plus adaptés au traitement des effluents issus de l'industrie poissonnière, des recherches ont été menées sur des divers procédés biologiques aérobies, tels que les boues activées, les RBC, le SBR (réacteur biologique séquentiel, *sequencing batch reactor*), ou les filtres percolateurs (TF, *Trickling filter*) [Chowdhury, *et al.*, 2010].

Gharsallah et coll (2002) ont montré qu'il est possible d'appliquer un traitement à biofilm fixé sur un effluent salin issu d'une industrie poissonnière tunisienne, et ont observé des

efficacités d'éliminations supérieures à 56 % pour des charges organiques faibles et fortes (250 et 1000 mg DCO/L.j), et ce malgré les fluctuations des charges organiques et concentrations en sel d'entrée (voir tableau 2.10).

Aloui et coll (2009) quant à eux, ont appliqué le procédé de boues activées sur le même effluent traité par les chercheurs cités précédemment, et ont démontré l'importance de la pré-acclimatation des bactéries épuratrices pour le traitement d'un effluent salin, même pour des concentrations atteignant 40 g/L, mais avec des charges organiques inférieures à 855 mg/L.j, et ont obtenu des résultats supérieurs à ceux de leurs collègues, avec 97 % d'efficacité d'élimination pour des charges organiques comparables (voir tableau 2.10).

### **Industrie de la tannerie**

Il a été prouvé que les traitements biologiques anaérobies sont plus favorables aux traitements des effluents issus d'industries textiles et tanneries, puisqu'ils sont moins coûteux énergétiquement, et moins demandant en opérations de maintenance [Durai et Rajasimman, 2011]. Cependant, des procédés aérobies tels que les boues activées ont été appliqués par divers chercheurs aux eaux usées d'industries textile [Jawahar, *et al.*, 1998 ; Kadam, 1990].

Sivaprakasam, et coll. (2008) ont mené des recherches sur des effluents salins issus d'une tannerie commerciale, et ont préalablement enrichi des boues activées par des bactéries halotolérantes, puis ont comparé les efficacités d'élimination de la DCO selon les souches halotolérantes utilisées. Celles-ci étaient sous forme de souche pure, ou d'un mélange de souche durant les expériences. Leur capacité épuratoire a été comparée pour un traitement par boues activées. Les meilleures efficacités ont été obtenues pour le mélange des souches de *P. aeruginosa*, *B. flexus*, *E. homiense*, et *s.aereus*, soit 80 % d'efficacité d'élimination de la DCO, lorsque les salinités étaient de 80 g/L, prouvant ainsi la possibilité de traitement d'un effluent de tannerie par bioaugmentation de bactéries halotolérantes. L'augmentation de la salinité à 100 g/L a causé une détérioration du procédé de traitement, ainsi qu'une baisse d'efficacité d'élimination de la DCO (60 %) (voir tableau 2.10).

Lefebvre et al. (2005) ont, quant à eux, mené des recherches sur la faisabilité du traitement des effluents de tanneries par des bactéries halophiles, issues de bassins d'épurations de diverses usines d'épuration d'effluents de tannerie, via un procédé de SBR. Le sel a été principalement le facteur affectant les performances du système : 50 g/L ont été les concentrations limites supérieures pour lesquelles le procédé a fonctionné de manière convenable. Malgré cela, 95 % d'efficacité d'élimination de la DCO ont été obtenues pour de faibles charges organiques 0.6 kg DCO/m<sup>3</sup>.j pour des concentrations de 34 g/L en NaCl. Ils ont ainsi obtenu des résultats supérieures à celles obtenues lors du traitement d'effluents de tannerie par boues activées halotolérantes, prouvant ainsi l'efficacité et la faisabilité du traitement d'effluents de tannerie par SBR, avec cependant, une moindre tolérance aux concentrations élevées en sel (50 g/L concentration limite, contre 80 g/L par des boues activées enrichies par des souches halotolérantes) (voir tableau 2.10).

### **Industrie pétrolière**

Les eaux produites par l'industrie pétrolière sont particulièrement difficiles à traiter en vue du mélange huiles et sels. Ainsi, des études ont prouvé qu'il était recommandé d'utiliser de microorganismes halophiles/halotolérants pour le traitement d'effluents pétroliers. Diaz et coll (2000), ont observé que la biodégradation du pétrole brut était supérieure pour des basses salinités, comparé à des hautes salinités atteignant parfois le double de la concentration de l'eau de mer, même si la dégradation est tout de même restée significative pour des concentrations aussi élevées que 100 g/L de NaCl. Le tableau 2.11 résume quelques procédés appliqués à des effluents contenant du pétrole.

Ward et Brock (1978), ont observé une diminution dans le taux de dégradation des hydrocarbures avec l'augmentation des sels (33-284 g/L NaCl). Mille et al. (1991) ont quant à eux observé une augmentation de l'huile dégradée avec l'augmentation des sels jusqu'à 23.3 g/L, puis une inversion de la tendance, soit une diminution de la dégradation avec l'augmentation des sels.

Tableau 2.10 Efficacités maximales obtenues lors de traitement d'effluents réels issus du secteur agroalimentaire et de textiles, ayant subi une acclimatation ou une bioaugmentation préalable de la biomasse épuratrice

Secteur industriel	Type d'effluent	Type d'acclimatation	Types de bactéries	Origine des bactéries	Intervalles de salinité / carbone	Charge organique	Efficacité d'élimination	Référence
Industrie poissonnière	Industrie poissonnière, CALEMBO Co, SOCEPA Co, Sfax, Tunisie	Progressive, à l'effluent	Adaptées au NaCl	-	7.6 – 34.5 g/L NaCl	0.250-1 g DCO/L.j	> 56 %	[Gharsallah, <i>et al.</i> , 2002]
	Industrie poissonnière SOPECA Co, Sfax, Tunisie	Progressive, DCO et sels	mixtes	Station d'épuration, Sfax, Tunisie	0 – 2.5% (m/v) NaCl, 0.4 – 3.2 g DCO/L	0.4 – 3.2 g DCO/L.j	> 97 %	[Aloui, <i>et al.</i> , 2009]
Industrie de la tannerie	Tannerie commerciale, Chromepet, Chennai, Inde	Isolations sur boîte de pétri	Halotolérantes	Milieus naturels (eau de mer, sol marin, lac salins argileux, Mahabilipuram et Aydar Beach, Chennai, Inde)	0 – 100 g/L NaCl, 2500 ppm DCO	-	>80 %	[Sivaprakasam, <i>et al.</i> , 2008]
	Système de drainage d'une tannerie, Chennai, Inde	Bioaugmentation de souches halophiles par quadruple inoculation	Boues activées + halophiles	Station de traitement de Nesapakkam, Pallavaram, Tirupur, et Kelambakkam	NaCl moyen : 37 g/L 2200 mg/L DCO	0.6 g DCO/L.j Et 1.1 g DCO/L.j	95 %	[Lefebvre, <i>et al.</i> , 2005]

Même s'il est possible d'isoler des souches bactériennes à partir d'environnements naturels, capables de dégrader des hydrocarbures à travers un large intervalle de salinités, il existe parfois des limitations, telles que l'ont observé Bertrand et al. (1990) : en extrayant un consortium bactérien issu de marais salants, la dégradation des hydrocarbures n'a été possible qu'à partir de concentrations très élevées en sel (100 g/L), puis dans un autre essai [Bertrand *et al.*, 1993], le consortium n'a été capable de se développer ni en absence de sels, ni à des concentrations en sel supérieures à 116 g/L.

L'objectif des recherches plus récentes a été de mettre au point un consortium bactérien plus versatile à de larges variations de salinité, tout en étant actif en absence et en présence de sel, et ce par des méthodes d'acclimatation, ou d'enrichissement de souches pures (voir tableau 2.10). Diaz *et al.* (2000), ont été capables d'utiliser un consortium dans les conditions de versatilité citées précédemment, puisque la dégradation de pétrole brut a été possible en absence/présence de sel, et à des concentrations aussi élevées que 220 g/L. La comparaison entre l'efficacité d'élimination d'une biomasse libre et d'une biomasse fixée a montré qu'elle était similaire pour du sel allant de 0 à 20 g/L. Pour la biomasse fixée, l'efficacité est passée de 49 % à 4 % lorsque le sel est passé de 20 à 180g/L, comparé à la biomasse fixée dont l'efficacité est restée significative (de 65.4 % à 26.8 %). L'utilisation de bactéries halophiles extrêmes s'est avérée très efficace pour diverses concentrations en sel.

La comparaison entre une même souche bactérienne libre ou fixée a montré que cette dernière était plus efficace, du fait de la formation d'un biofilm. Ainsi, Diaz et coll (2002), ont montré l'efficacité des bactéries halophiles extrêmes dans le traitement des hydrocarbures, et ont comparé les efficacités d'élimination de la matière organique entre un procédé à biomasse fixée et un autre à biomasse libre : elles étaient similaires pour les concentrations en sel de 0 à 20 g/L. Pour la biomasse libre, l'efficacité est passée de 49% à 4% lorsque le sel est passé de 20 - 60 à 180 g/L, comparé à la biomasse fixée dont l'efficacité est restée significative (de 65 % à 27 %), ce qui prouve donc l'efficacité

supérieure de cette dernière, combinée à la présence d'un biofilm, permettant de supporter de plus larges variations en sel.

Lai et coll (1999) ont montré que la biodégradation des hydrocarbures était possible lorsque le consortium était acclimaté au préalable, et ce, même pour des concentrations en sels atteignant 40 g/L. Ils ont ainsi obtenu plus de 90 % d'efficacité lorsque les sels dépassaient 20 g/L, et lorsque les charges étaient de 1.5 kg TOC/m<sup>3</sup> j.

### **Les réacteurs biologiques séquentiels**

Les réacteurs biologiques séquentiels (SBR *sequencing batch reactor*) sont des procédés connus pour être particulièrement robustes, et peuvent supporter des conditions extrêmes [Lefebvre & Moletta, 2006]. C'est pourquoi, beaucoup de recherches sur les effluents salins se sont orientées sur ce type de procédé (voir tableau 2.12).

Woolard et Irvine (1994), ont été parmi les premiers à inoculer un réacteur biologique séquentiel à biofilm (SBBR, *sequencing batch biofilm reactor*) avec des bactéries modérément halophiles isolées du grand lac salé (USA), et ce, pour traiter une eau synthétique contenant 150 g/L de sels. L'efficacité d'élimination du phénol a dépassé 99 %, dont la concentration d'entrée était de 120 mg/L. L'expérience a été reprise un an plus tard par les mêmes chercheurs, obtenant cette fois-ci 99.5 % d'efficacité d'élimination. En 2004, c'est Uygur et Kargi (2004) qui ont utilisé le procédé de SBR pour l'élimination de la matière organique dans un effluent synthétique. L'efficacité d'élimination de la DCO est passée de 90 à 32 % lorsque la salinité est passée de 0 à 60 g/L. Tel que vu précédemment, [Lefebvre, *et al.*, 2005] ont été capables de traiter par un SBR un effluent salin issu d'une tannerie, et ont pu atteindre 95 % d'efficacité.



Tableau 2.11 Procédés appliqués à des effluents contenant du pétrole brut à hautes salinités

Procédé	Effluent	Acclimatation/types de bactéries	Origine des bactéries	Intervalle de salinité	Concentrations de carbone	Efficacité d'élimination	Référence
Biomasse fixée / libre	Pétrole brut, plateforme Alwyn, Total	MDP-M consortium, halotolérantes extrêmes	Sédiments de racines de mangroves, Colombie	0 – 180 gr/L	-	-	[Diaz <i>et al.</i> , 2002]
Biofiltre submergé + biofiltre percolateur	Synthétique + diesel émulsifié par un dispersant CPC OD-10	Pré-acclimatées	Rivière Cheng-Jenn (Taiwan), exposée à des déversements pétroliers	34, 36, 38,40 g/L	300 et 1000mg TOC/L	< 90 %	[Yang, <i>et al.</i> , 1999]
Boues activées	Eau produite, d'une unité de séparation de pétrole, nouveau Mexique	Enrichies	Eau produite des unités de séparation de pétrole, nouveau Mexique	35 g/L	431 mg DCO/L	-	[Telleza, <i>et al.</i> , 2002]

## **Les biodisques rotatifs**

Les biodisques rotatifs (RBC, *rotating biological disc*), appelés également disques rotatifs, sont une alternative aux procédés de boues activées, puisqu'ils bénéficient d'un médium solide, permettant le développement de la biomasse en biofilm statique. Le RBC est placé dans un bassin qui reçoit les eaux usées à purifier. Le bassin supporte un arbre rotatif. Un ou plusieurs étages d'ensembles disques rotatifs purifient progressivement les eaux usées entrantes. Chaque étage est orienté transversalement à l'arbre et comporte une pluralité d'ensembles disques. Le principal avantage du procédé biologique à biofilm réside dans le fait qu'il puisse mieux supporter les hautes charges organiques et chocs toxiques comparé aux cultures libres [Hassard, *et al.*, 2014].

Kinner et al. (1962) ont étudié l'efficacité d'élimination de la DCO d'eaux usées domestiques à des concentrations d'environ 35 g/L en NaCl, et n'ont obtenu que 60 % d'élimination de la DCO. Aérer la phase liquide dans les RBC n'était pas une pratique très commune auparavant, résultant en des limitations dans le transfert de l'oxygène aux hautes charges organiques [Kargi et Dincer, 1999]. Mais par la suite, Dincer et Kargi (2001) ont élaboré un procédé innovant, permettant de tester l'efficacité du RBC (dont le nombre et la surface étaient variables) en présence d'halophiles aérobies. L'effluent était synthétique, et était traité à des concentrations en sels variant de 0 à 100 g/L, obtenant une efficacité d'élimination de la DCO dépassant les 80 % pour des concentrations en sels inférieures à 50 g/L.

Tableau 2.12 Traitement des effluents salins par le procédé SBR

Procédé	Effluent	Sels	Concentrations en sel	Biomasse	Composé traité	Concentration pollution	Performances	Références
SBR	Synthétique	NaCl, KCl, CaCl <sub>2</sub> , MgCl <sub>2</sub>	20, 40 et 60 g/L	Usine de traitement des eaux municipales, graduellement adaptée	DCO	2000 mg/L	80 % à 60 g/L de sel	[Deorsola, <i>et al.</i> , 2011]
SBBR	Synthétique	NaCl	150 g/L	bactéries modérément halophiles isolées du grand lac salé (USA)	Phénol	120 mg/L	99 %	[Woolard et Irvine, 1994]
SBR	Synthétique	NaCl	80 g/L	Bassin biochimique de l'usine pétrochimique Sinopec Gaoqiao, Shangai (Chine), acclimatées à 80g/L	Phénol	400-1200 mg/L	dégradation complète de 1200mg/L de phénol en 9 jours	[Wang, <i>et al.</i> , 2014]
SBBR	Synthétique	NaCl	5 – 35 g/L	Boues activées station d'épuration de Zibo (Chine)	DCO	500-3000 mg/L	88 %	[Lu <i>et al.</i> , 2014]



## 2.4 Conclusion

Dans cette revue de littérature, il a été montré que le traitement biologique de différentes eaux usées industrielles salines voire hypersalines était possible, tout en obtenant de hautes efficacités. Cependant, il n'existe qu'un nombre restreint d'études sur le traitement biologique des effluents salin, et les chercheurs se heurtent souvent à une concentration plafond, limitant le taux de dégradation. De ce fait, la concentration limite en sels à ne pas dépasser afin d'avoir une bonne élimination biologique varie d'un auteur à l'autre et n'est donc pas actuellement bien définie.

Il est dorénavant certain que certains paramètres jouent un rôle majeur dans le succès des traitements biologiques, tels que le type de biomasse mis en jeu, les conditions opératoires (types d'effluents, charges organiques, concentration en sel).

Les conclusions majeures sont donc les suivantes :

- Le choix de la biomasse et la pré-acclimatation préalable sont des étapes déterminantes pour le succès du traitement biologique d'un effluent salin;
- Il est possible de sélectionner des souches halophiles/halotolérantes à travers l'acclimatation d'une population bactérienne mixte à des salinités élevées;
- Les bactéries halophiles/halotolérantes possèdent des potentiels épuratoires comparables aux bactéries non-halophiles;
- La bioaugmentation ou l'isolation de souches pures de bactéries halophiles ou halotolérantes augmentent significativement l'efficacité de traitement, comparativement à un système acclimaté à partir d'une population non-halophile;
- L'utilisation de bactéries autochtones est préférable à l'inclusion de bactéries extérieures. Ce qui consiste à prélever des bactéries déjà existantes dans un milieu ayant des caractéristiques analogues à celui que l'on veut traiter.



# 3 MATÉRIEL ET METHODES

## 3.1.1 Programme expérimental, préparation et planification

Le programme expérimental a été établi en vue de l'analyse de l'efficacité de réduction de la concentration en méthanol. Ceci à l'aide de deux biofiltres en plexiglas, identiques, de diamètres et de longueurs similaires, garnis par le même type de médium (voir section 3.1.2). Chaque biofiltre (fonctionnant en aérobie) était doté de points d'alimentation en eau et en air permettant une opération à contre-courant, et pouvant subir diverses conditions de charge.

L'expérience consistait à suivre l'élimination du méthanol dans diverses conditions salines et opérationnelles (débit et concentration de l'affluent en matière organique sous forme de méthanol), afin de déterminer l'efficacité du procédé. Les eaux usées traitées étaient synthétiques, et contenaient du méthanol, du sel (NaCl) (voir tableau 3.1). Des nutriments étaient également ajoutés dans les eaux synthétiques. Les biofiltres contenaient des supports en plastique (voir section 3.1.2), permettant aux bactéries de s'y développer. Le consortium bactérien est issu des boues activées provenant de la station d'épuration de Magog (Qc), prélevées au niveau du bassin d'aération. Les bactéries ont subi une pré-acclimatation au sel ainsi qu'au méthanol avant d'êtreensemencées dans les colonnes d'épuration (voir section 3.1.4.A).

Tableau 3.1 Paramètres des conditions expérimentales

Sel - [NaCl], (g/L)	Méthanol - [CH <sub>3</sub> OH], (g/L)	Débit liquide (L/j)
3	5	5
30	20	20

Huit expériences sont effectuées sur chaque biofiltre, pour une période variant entre 25 et 35 jours par expérience selon les conditions opératoires utilisées.

Nous avons suivi un plan factoriel complet 2<sup>3</sup>, trois facteurs : la teneur à l'entrée en méthanol (facteur A), le débit liquide à l'entrée (facteur B), et la teneur initiale en sel (facteur C), et deux

réplicats. Deux blocs ont été utilisés, car deux biofiltres ont permis de réaliser les essais simultanément. L'utilisation de blocs permet donc de pallier au biais résultant des différences inhérentes à chaque biofiltre [Mongomery, 2005].

L'expérience étant longue, un nombre supérieur de réplicats aurait requis une période d'essais plus longue, c'est pourquoi nous avons effectué deux essais.

Le logiciel Design-Expert 6.0.11 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, Minnesota) a été utilisé pour la détermination de l'ordre de réalisation des essais. Ceci, afin de conserver la distribution aléatoire des essais, qui est un principe fondamental de la conception expérimentale et qui permet d'obtenir des résultats non-biaisés. Le tableau 3.2 représente les expériences à mener ainsi que leur ordre de réalisation.

Cet ordre n'est pas identique à l'agencement standard, qui est conforme aux différents niveaux de chaque paramètre et qui pourrait biaiser les résultats obtenus en fin d'expérience par rapport à ceux obtenus à son début à cause d'une amélioration de la technique de prise des mesures ou inversement, une décroissance de la qualité technique, entre autres.

### **3.1.2 Montage expérimental**

Chaque montage comprend une colonne cylindrique, un réservoir d'alimentation liquide, un drain pour récupérer les eaux de sortie, une alimentation en air, ainsi qu'une pompe péristaltique permettant d'alimenter les colonnes. L'alimentation se fait par le haut de la colonne, tel que schématisée sur la figure 3.1. Il est à noter que l'eau d'alimentation était l'eau du robinet, et qu'aucune précaution de stérilisation n'a été prise dans le corps du réacteur, ni dans les réservoirs, afin de reproduire des conditions de traitement réalisables à l'échelle industrielle, une stérilisation antérieure au traitement serait difficilement réalisable et très contraignante.



Tableau 3.2 Conditions expérimentales d'éliminations triées selon l'ordre de réalisation des essais

Essai	Bloc	Facteur 1 : [meth]in (g/L)	Facteur 2 : Q (L/j)	Facteur 3 : [NaCl] (g/L)
1	Bloc 1	20	5	3
2	Bloc 1	5	5	3
3	Bloc 1	20	20	3
4	Bloc 1	5	20	3
5	Bloc 1	20	20	30
6	Bloc 1	20	5	30
7	Bloc 1	5	20	30
8	Bloc 1	5	5	30
9	Bloc 2	5	20	30
10	Bloc 2	5	5	3
11	Bloc 2	5	5	30
12	Bloc 2	20	5	30
13	Bloc 2	20	5	3
14	Bloc 2	20	20	3
15	Bloc 2	5	20	3
16	Bloc 2	20	20	30

Les fonctions des différentes unités sont décrites ci-dessous :

### Réservoirs R1 et R2

Ces réservoirs sont identiques, en plastique, et de capacité de 10L chacun. Le R1 contient les eaux synthétiques qui seront traitées (voir section 3.1.1), tandis que le R2 est le drain qui récupère à la sortie les eaux traitées par le biofiltre. Les réservoirs R1 étaient rincés entre chaque alimentation par l'eau du robinet à haute pression afin d'éliminer la biomasse indésirable qui s'était développée à cause de la présence du méthanol.

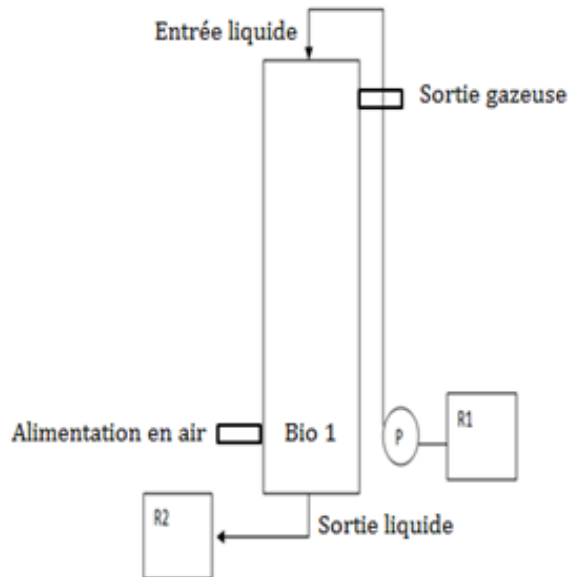


Figure 3.1 Schéma du montage expérimental des biofiltres

### Colonnes Bio1 et Bio2 :

Ces colonnes aérobies sont alimentées par le haut à contre-courant avec l'air, et constituent la structure qui maintient l'ensemble biofilm bactérien et l'effluent à traiter en contact. Leur alimentation liquide se fait grâce aux pompes péristaltiques P1 et P2 à un débit donné.

Les colonnes Bio1 et Bio2 sont des cylindres en plexiglas ayant une longueur totale de 110 cm, et un diamètre de 7.2 cm. Ils opèrent comme des réacteurs à écoulement piston. Ils disposent d'une ouverture située sur le haut de la colonne (figure 3.1) permettant la percolation du liquide à traiter dans la colonne, qui, par la suite s'écoule vers le bas, verticalement. Ils disposent aussi d'une ouverture à la base, permettant l'aération. L'évacuation des gaz et de la mousse se fait par une autre ouverture située dans le haut du réacteur. Le volume total des colonnes vides est de 3.5 L, et le volume occupé par le médium filtrant est de 1.6 L.

Le médium est de type bioflow 9 (RVT Company, Knoxville, Tennessee, U.S.A) sphérique et de nature plastique polyéthylène. Il occupe l'intérieur de la colonne et est retenu par un filet en plastique (voir figure 3.2). Ses propriétés sont les suivantes :

Porosité = 0.74

Densité = 145 kg/m<sup>3</sup>



Figure 3.2 Médium plastique placé dans le biofiltre

La figure 3.3 illustre les dimensions des biofiltres identiques et l'emplacement du médium.

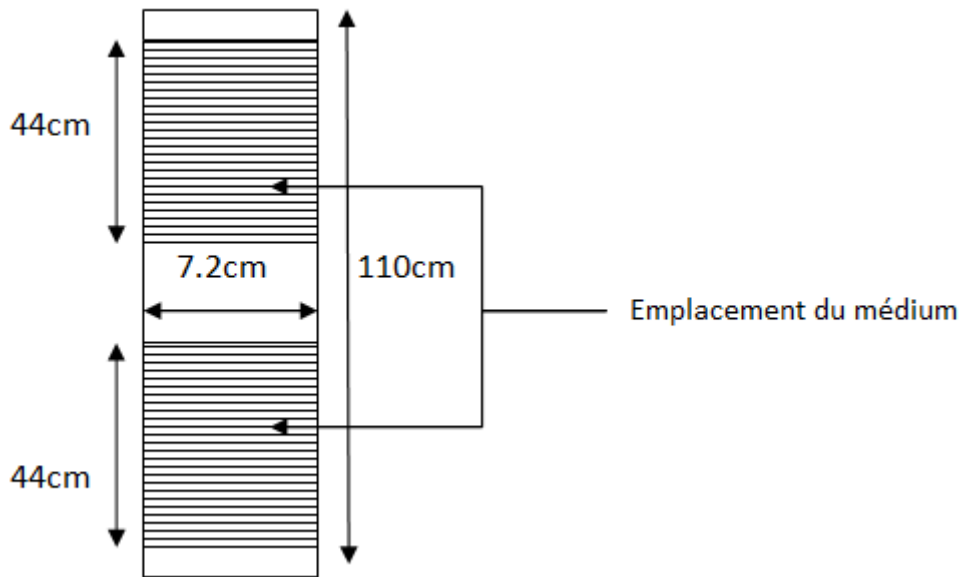


Figure 3.3 Schéma des colonnes Bio1 et Bio2

### **3.1.3 Caractéristiques de l’affluent**

L’affluent est synthétique et préparé en laboratoire. Les concentrations en nutriments ont été inspirées d’articles où le méthanol était dégradé biologiquement dans des conditions aérobies [Gvozdyak, *et al*, 1986 ; Bouziane, 2009] tout en respectant le ratio théorique C/N/P : 100/10/1, recommandé pour les bactéries soumises à des conditions de salinité [Kargi & Uygur, 1996] (voir tableau 3.3)

### **3.1.4 Techniques expérimentales**

#### **Pré-acclimatation en réacteur batch**

Des bactéries issues d’un bassin d’aération de la station d’épuration des eaux usées de Magog, (Québec, Canada) ont été prélevées puis mises progressivement en contact avec du sel et du méthanol, dans le but de les pré-acclimater. Cette étape s’est effectuée en laboratoire dans un réacteur en batch de 2L de volume en condition aérobie, et en agitation continue. Leur concentration au point de prélèvement était de 3535 mg/L (donnée fournie par la station d’épuration de Magog,(Qc)), puis ont été diluées à un ratio de 1:3 avec de l’eau de robinet (ville de Sherbrooke).

Le volume total du mélange biomasse, eau, éléments nutritifs et sel (sous forme de NaCl) était maintenu constant, soit 2L. Les concentrations de méthanol et de sel étaient augmentées progressivement (voir tableau 3.4). Un soutirage de 100 ml était réalisé quotidiennement afin de permettre à la nouvelle biomasse de se développer, et était remplacé par 100 ml d’un mélange d’éléments nutritifs, de méthanol, et de sels. Étant donné sa volatilité, un volume de compensation de méthanol était ajouté 6 h après chaque alimentation.

#### **Ensemencement des biofiltres**

Le médium a été submergé dans l’eau pour une période de 12 h (une nuit) pour en assurer le mouillage, et une meilleure adhésion de la biomasse. Par la suite, il a été introduit à l’intérieur de la colonne. L’ensemencement de la biomasse a été effectué en alimentation continue (recirculée à un ratio 1 :1) par les bactéries acclimatées pendant une période de 12 h.

Tableau 3.3 Caractéristique des eaux synthétiques à traiter

Composition	Composés	Plage de concentration
Matière organique (g/L)	CH <sub>3</sub> OH - liquide	0 – 20
Nutriments (mg/L)	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1070 - 2140
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	210 – 420
Elements traces (mg/L)	ZnSO <sub>4</sub>	13.6
	CoCl <sub>2</sub>	0.6
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.2
	MoO <sub>3</sub>	1.2
	NiSO <sub>4</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.24
	CaCl <sub>2</sub>	27.70
	MgSO <sub>4</sub>	152
	FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	14.51
Sel (g/L)	NaCl	0 – 30
pH	-	7 – 8

Tableau 3.4 Étape d'acclimatation

Étape 1 Acclimatation au méthanol, [NaCl]= 0 g/L		Étape 2 Acclimatation au sel	
[CH <sub>3</sub> OH] g/L	Durée de la période (jours)	[NaCl] g/L	Durée de la période (jours)
1	7	0.5	7
2	7	1	7
5	7	2	7
10	5	5	5
15	5	10	5
20	5	15	5
		20	5
		30	5

## **Lavage des biofiltres**

Des lavages à co-courant périodiques sont effectués de manière à empêcher la biomasse de s'accumuler à l'intérieur des bioréacteurs. Ceci permet de maintenir le système en équilibre à sa capacité de traitement optimale. Les lavages des biofiltres assurent une réduction de la formation de chemins préférentiels et le colmatage du médium. Ainsi, le lavage des biofiltres a été effectué sur une base régulière, en moyenne une fois par 30 jours d'opération, ou plus selon les conditions opératoires.

L'opération de lavage se fait selon la morphologie du biofilm qui variera selon les conditions, dont le suivi se fera en termes de teneur en CO<sub>2</sub> mesuré à l'intérieur de la colonne (indicateur de l'activité bactérienne). On a noté pour certaines conditions une croissance bactérienne rapide, menant à un grossissement du biofilm, et donc au phénomène de colmatage. Celui-ci conduit à une baisse de l'activité bactérienne, observée par les mesures de CO<sub>2</sub>.

Le lavage a été effectué de deux façons, selon la grosseur du biofilm :

- Par jet d'un débit d'eau d'environ 60 L/j à la fin de chaque expérience
- Par récupération du médium plastique, et rinçage superficiel afin d'éliminer le surplus de biomasse, puis ré-inoculation dans la colonne.

## **Échantillonnage et méthodes d'analyse**

Lorsque, pour une condition donnée, plusieurs valeurs consécutives de CO<sub>2</sub> mesurées à la sortie se stabilisent (à 15% de variation près), on considère le système en équilibre. À partir de là, on effectue un échantillonnage de la phase liquide. Celle-ci se fait à l'entrée du biofiltre, donc par le point d'entrée liquide, ainsi qu'à la sortie du biofiltre, par le point de sortie liquide (voir figure 3.4). Pour collecter des échantillons de 15 ml à la sortie du bioréacteur. L'intérêt de mesurer les concentrations à l'entrée du biofiltre est de déterminer la concentration réelle du méthanol dans le réacteur, en tenant compte de sa volatilité, ainsi que de sa possible biodégradation spontanée dans le réservoir, ce dernier n'étant pas stérilisé, tel que mentionné précédemment. La phase gazeuse est, quant à elle, analysée quotidiennement, à partir du haut de la colonne, soit au point de sortie des gaz, tel qu'illustré dans la figure 3.4.

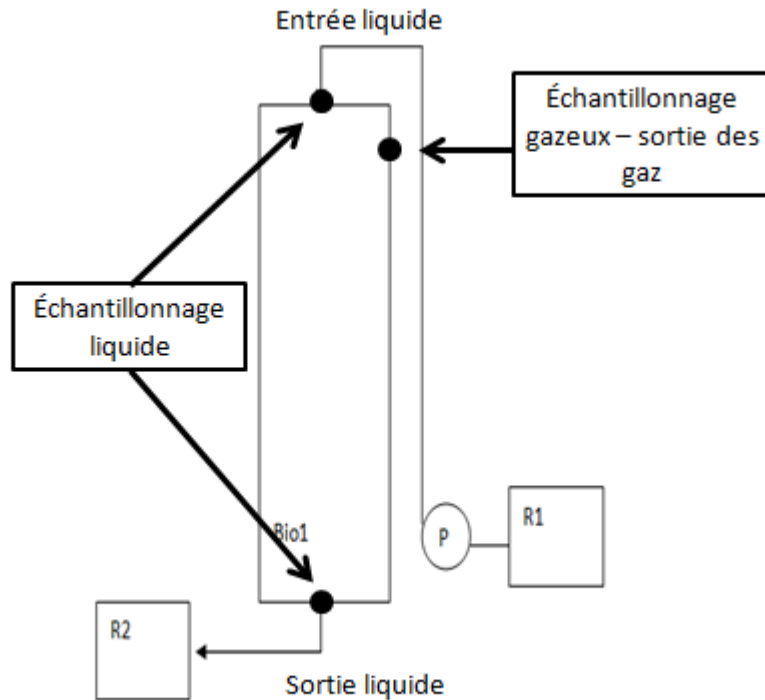


Figure 3.4 Localisation des points d'échantillonnage

Afin de vérifier le bon déroulement de chaque condition, ainsi que l'établissement de l'équilibre du système, certaines mesures sont effectuées quotidiennement, telles que : l'analyse qualitative et quantitative des gaz présents dans la colonne, le pH, ainsi que la concentration en sel à la sortie de l'effluent traité. Lorsque le système atteint l'équilibre, des échantillonnages liquides sont effectués sur une période allant de deux à trois jours, selon la stabilité du système, puis analysés. Le tableau 3.5 suivant récapitule les analyses effectuées.

Après prélèvement, les échantillons liquides sont récoltés à la sortie de chaque réacteur, passés à travers un filtre Millipore (0.45  $\mu\text{m}$ ) et analysés dans la journée, sinon conservés dans un contenant hermétiquement fermé à 4°C afin de minimiser toute volatilisation ou décomposition du méthanol.

### *Mesure du pH et de l'oxygène dissous*

Le pH a été mesuré avec un pH-mètre (HI 4521-01 Hanna Instruments, (U.S.A)). L'électrode est de type HI 1131B avec un corps en verre, à jonction simple, et rechargeable. L'oxygène dissous est mesuré avec une sonde à multi-paramètres SevenGo Duo (U.S.A).

Tableau 3.5 Analyses effectuées et méthodes correspondantes

Analyses	Phase du biofiltre	Appareillage	Objectif	Fréquence	Référence
CO <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub> OH, autres gaz potentiellement présents	Gazeuse	FTIR	Contrôler la croissance bactérienne, volatilisation du méthanol.	Quotidienne	
NaCl, pH, oxygène dissous	Liquide	Dosage des chlorures par titrage au nitrate d'argent. pH-mètre	Contrôler la constance de concentration de sel entre l'entrée et sortie, vérifier la neutralité des eaux	Hebdomadaire	[Rice & Bridgewater, 2012]
Méthanol, CH <sub>3</sub> OH	Liquide	HPLC	Mesurer la concentration de méthanol à l'entrée et à la sortie du système	À l'équilibre du système	

### *Analyse de la phase gazeuse, FTIR*

Le spectromètre FT-IR (Bruker Tensor 27, Bruker Optics, Inc., Billerica, Massachusetts, U.S.A) était équipé d'une cellule infrarouge, d'un détecteur DTGS (sulfate de tri-glycine deutéré), d'une source à IR (4000-400 cm<sup>-1</sup>), d'un diviseur de faisceau KBr avec une résolution maximale de 1 cm<sup>-1</sup>



et connectés au logiciel du système d'exploitation OPUS (logiciel optique de l'utilisateur, la version 6.0). Celui-ci était utilisé pour l'analyse simultanée des gaz CH<sub>3</sub>OH et CO<sub>2</sub>. Concernant l'analyse quantitative, le spectromètre FT-IR était étalonné par rapport au volume de la cellule IR de gaz, en utilisant des gaz purs (CO<sub>2</sub> et CH<sub>3</sub>OH). Le méthanol a été évaporé à partir d'un échantillon liquide pur, puis soigneusement récupéré sous forme gazeuse à l'aide d'une seringue. Une large gamme de concentrations de gaz a ainsi été élaborée afin d'effectuer les courbes d'étalonnage. Avant l'analyse, l'interféromètre et les compartiments de la cellule à gaz ont été purgés avec du N<sub>2</sub> de très haute pureté.

Afin de protéger les fenêtres de KBr de l'humidité, un gaz servant de purge est passé à travers un sécheur à membrane Nafion (PERMA PURE, ME-110-4t8Comp-4) avant d'entrer dans la cellule à gaz pour l'analyse IR. Les spectres FTIR sont effectués avec 16 balayages avec une résolution de 4 cm<sup>-1</sup> dans les régions de fréquence entre 4000 cm<sup>-1</sup> et 400 cm<sup>-1</sup>. Ces spectres ont été déduits d'un spectre d'air. Les résultats ont été enregistrés en tant que valeurs d'absorbance, en duplicats.

### ***Analyse de la phase liquide par HPLC-RID***

L'HPLC (High-performance liquid chromatography) consistait en une pompe Agilent 1100 series couplée à un détecteur RID (*refractive index detector*). L'analyse de la fraction de méthanol a été effectuée avec une colonne de type Aminex HPX87H. Celle-ci contient une matrice à base de polymère (polystyrène divinylbenzène). Elle sépare les composés par la technique de chromatographie de partage d'ions modéré. La température interne de la colonne était de 50°C. L'éluent consistait en une solution de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.005 M, dont le débit était de 0.6 ml/min. 20 µL de solution à analyser étaient injectés, avec des duplicats pour chaque essai.

### 3.1.5 Conditions de fonctionnement des biofiltres

#### Aération

L'aération a été maintenue constante tout au long de l'opération des bioréacteurs, avec un débit d'1 L/min, assurant une concentration en oxygène dissous suffisante (mesurée) pour maintenir des conditions d'aérobiose (oxygène dissous supérieure à 2 mg/L)

#### Température

Les expériences ont été menées à température ambiante du laboratoire. Celle-ci a oscillé entre 20 et 22°C.

#### Débits et concentrations

Un des objectifs étant d'observer la réaction d'un biofiltre opérant en milieu salin, ce sont donc de hautes charges organiques par rapport à de plus faibles charges organiques, ainsi que des basses et hautes concentrations en sel qui ont été appliquées tout au long des expérimentations tel que décrit dans le tableau 3.1.

### 3.1.6 Évaluation des performances de la biofiltration

Les performances de la biofiltration seront présentées dans les termes suivants :

OLR<sub>in</sub>: charge organique volumétrique à l'entrée du biofiltre, exprimée en (g.L<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>) :

$$OLR_{in} = \frac{[\text{méthanol}]_{in} \times Q}{V} \quad (3.1)$$

% Élimination (ou efficacité globale) :

$$\%E = \frac{[\text{méthanol}]_{in} - [\text{méthanol}]_{out}}{[\text{méthanol}]_{in}} \quad (3.2)$$

EC : Charge d'élimination totale ( $\text{g.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) :

$$EC = \text{OLR}_{\text{in}} \times \%E \quad (3.3)$$

$P_{\text{CO}_2}$  : Production de dioxyde de carbone ( $\text{g.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) :

$$P_{\text{CO}_2} = \frac{[\text{CO}_2] \times Q_{\text{liquide}}}{V} \quad (3.4)$$

CV : Charge volatilisée ( $\text{g.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) :

$$CV = \frac{[\text{CH}_3\text{OH}_{\text{volatilisée}}] \times Q_{\text{air}}}{V} \quad (3.5)$$

Avec :

- $[\text{méthanol}]_{\text{in}}$  : Concentration du méthanol à l'entrée de la colonne en  $\text{g.L}^{-1}$
- $[\text{méthanol}]_{\text{out}}$  : Concentration du méthanol à la sortie de la colonne en  $\text{g.L}^{-1}$
- $[\text{CO}_2]$  : Concentration en dioxyde de carbone en  $\text{g/L}$
- $Q_{\text{liquide}}$  : Débit du liquide en  $\text{L.j}^{-1}$
- $Q_{\text{air}}$  : Débit de l'air en  $\text{L.j}^{-1}$
- $V$  : Volume du biofiltre en L



# 4 RÉSULTATS ET INTERPRÉTATION

## 4.1.1 Présentation des résultats

Durant nos expériences il a été observé deux phénomènes principaux participant à l'élimination du méthanol de la phase liquide de l'effluent à traiter : 1) la bio-élimination, 2) la volatilisation.

Les résultats ont été exprimés en termes de pourcentage d'élimination du méthanol à l'entrée et à la sortie du dispositif du traitement, de charges globales d'élimination (bio-élimination combinée à la volatilisation), et de charge de méthanol volatilisées et bio-éliminées par les bactéries présentes à l'intérieur de notre biofiltre. Le tableau 4.1 suivant présente ces résultats.

Tableau 4.1 Présentation des résultats

Q (L/J)	[Methanol] <sub>in</sub> (g/L)	[NaCl] (g/L)	Charge organique à l'entrée du biofiltre (g/L/j)	Charge du méthanol bio-éliminé (g/L/j)	Charge du méthanol volatilisé (g/L/j)	Élimination totale du méthanol (%)
20	5	3	56	13	6	31
5	20	3	52	30	10	46
5	5	3	14	7	3	37
20	5	30	61	13	6	42
5	20	30	32	20	9	45
20	20	3	235	26	11	15
20	20	30	163	31	14	23
5	5	30	15	7	3	54

De manière générale, l'on peut observer du tableau 4.1 que les hautes concentrations de méthanol à l'entrée du bioréacteur favorisent les charges de volatilisation de ce dernier (14, 11, et 10 g/L/j).

D'autre part, les plus hauts pourcentages d'élimination du méthanol obtenus ont été de 54 % et 46 % pour un même débit d'alimentation liquide de 5 L/J. Ceci pourrait s'expliquer d'une part par les temps de contacts hydrauliques favorisant l'action des bactéries épuratrices par rapport à la volatilisation (30 g/L/j de méthanol bio-éliminé et 10 g/L/j de méthanol volatilisé, pour une efficacité d'élimination de 46 %, et 7 g/L/j de méthanol bio-éliminé et 3 g/L/j de méthanol volatilisé, pour une efficacité d'élimination de 54 %). D'autre part, la contribution des pertes de méthanol dues

à la dégradation spontanée du méthanol au sein du réservoir d'alimentation ont réduit la quantité de méthanol à l'intérieur du biofiltre.

#### **4.1.2 Élimination du méthanol de la phase aqueuse**

#### **4.1.3 Perte du méthanol**

De manière générale, cette étude montre qu'en dehors du processus de biodégradation du méthanol, d'autres mécanismes ont été responsables de la diminution des teneurs en méthanol dans la phase liquide à l'entrée du biofiltre. Le premier étant l'élimination spontanée du méthanol dans le réservoir d'alimentation en eaux synthétiques. Ceci aurait pu être évité, en partie, par la stérilisation, mais celle-ci n'a pas été possible en raison du type de plastique du réservoir, qui a subi une déformation après autoclave.

Le deuxième mécanisme majeur intervenant dans l'élimination du méthanol de la phase liquide est le phénomène de volatilisation. Celui-ci a intervenu dans le réservoir d'alimentation ainsi que dans la colonne de biofiltration.

La littérature estime que la volatilisation du méthanol est un phénomène présent lorsque le méthanol est sous forme liquide, étant donné sa nature de composé organique volatil (COV), mais sans être un facteur majeur dans son élimination dans la phase liquide [Malcolm Pirnie Inc, 1999]. Pourtant, notre étude démontre le contraire (voir les sections suivantes), et est corroborée par d'autres données de la littérature ayant porté de l'intérêt à la dégradation du méthanol en phase liquide, reportant que les taux de volatilisation du méthanol pouvaient être significatifs [Clary, 2013 ; Bennet, 2002].

Une perte en méthanol atteignant jusqu'à 50 % de la concentration initiale (qui est égale à 5 g/L ou 20 g/L) a été observée lors de l'étape d'acheminement des eaux synthétiques du réservoir d'alimentation au point d'entrée du liquide dans la colonne de biofiltration. Cette perte serait due au phénomène de volatilisation dans le réservoir combinée à la dégradation spontanée du méthanol.

Nous allons donc, à partir de la prochaine section (4.1.4), nous concentrer uniquement sur les phénomènes de volatilisation et de bio-élimination ayant lieu entre le point d'entrée et de sortie de la colonne de biofiltration. L'on se référencera à la concentration initiale en méthanol théorique (théoriquement de 5 et 20 g/L) avant toute élimination comme  $[\text{méthanol}]_{\text{in}}$ , en (g/L).

#### 4.1.4 La volatilisation et bio-élimination combinées

Nous allons à présent examiner et analyser l'influence des paramètres opératoires tels que : le sel sous forme de NaCl, la concentration mesurée à l'entrée du biofiltre, les débits liquides d'alimentation de la colonne, et la charge organique appliquée :

- 1- sur l'efficacité globale d'élimination du méthanol de la phase aqueuse;
- 2- sur la contribution de la volatilisation du méthanol en tant que facteur d'élimination du méthanol de la phase liquide (sous forme de charge volatilisée (g/L/j)).
- 3- sur la bio-élimination du méthanol en phase liquide

Lorsque le liquide pénètre dans la colonne de biofiltration, il percole par écoulement vers le bas. À partir de là deux phénomènes principaux sont notés :

- la volatilisation du méthanol;
- la bio-élimination du méthanol.

La volatilisation est un phénomène influencée par les facteurs suivants :

- 1- La nature du COV;
- 2- La concentration du COV dans la phase liquide (voir équation (4.1));
- 3- La variation de température;
- 4- La densité du COV.

Lorsqu'un COV est présent dans un système biphasique eau + COV en équilibre, il obéit à la loi de Henry décrite par l'équation 4.1 suivante [Green et Perry, 2008] :

$$P_i = k_i \times x_i \quad (4.1)$$

où :  $P_i$  : pression partielle du constituant  $i$  dans la phase gazeuse (atm);

$k_i$  : constante de Henry du constituant  $i$ , paramètre dépendant de la température ainsi que de la nature du composé (mol/atm);

$x_i$  : fraction molaire du constituant  $i$  dans la phase liquide (mol/mol).

Ceci explique la proportionnalité entre la quantité du gaz (exprimée en termes de pression) dans la phase gazeuse avec sa concentration en phase aqueuse. Plus la température augmente, plus la constante de Henry augmente, et plus la volatilité du gaz augmente.

Les pourcentages d'enlèvement du méthanol varient d'un minimum de 15 % à un maximum de 54 % selon les conditions. Globalement, ils ont augmenté avec les concentrations en sels, et diminué avec les charges organiques et les concentrations en méthanol. Les taux de volatilisation indiquent que ce phénomène a joué un rôle non négligeable dans l'enlèvement du méthanol liquide.

### **Effet du sel**

La figure 4.1 représentent les charges de méthanol bio-éliminées et évaporées (en g/L/j), ainsi que l'efficacité totale d'élimination (%) en fonction du sel sous forme de NaCl (3 et 30 g/L) pour une concentration initiale de méthanol de 5 et 20 g/L, et des débits d'alimentation en eau à traiter de 5 et 20 L/j.

Lorsque la concentration initiale du méthanol à l'entrée était de 5 g/L, les efficacités épuratoires du méthanol ont augmenté avec les concentrations en sel, et sont passées de 37 % à 54 % pour les débits d'alimentation de l'affluent liquide à l'entrée de la colonne de 5 L/j, puis de 31 à 42 % lorsque les sels sont passés de 3 à 30 g/L, pour des débits liquides de 20 L/j (voir figure 4.1).

La bio-élimination quant à elle a augmenté avec la concentration en sel, et était de 7 et 13 g/L/j pour 3 et 30 g/L de NaCl (respectivement), et a également augmenté lorsque le débit d'alimentation est passé de 5 L/j à 20 L/j, avec 12 et 15 g/L/j pour des concentrations de NaCl de 3 et 30 g/L.

Lorsque la concentration initiale du méthanol à l'entrée était de 20g/L, pour un débit d'alimentation liquide de 5 L/j, les efficacités épuratoires du méthanol ont montré une constance (45 %), puis ont diminué lorsque le débit est passé à 20 L/j (26 et 31 %) pour des concentrations en sel de 3 et 30 g/L respectivement (voir figure 4.1).



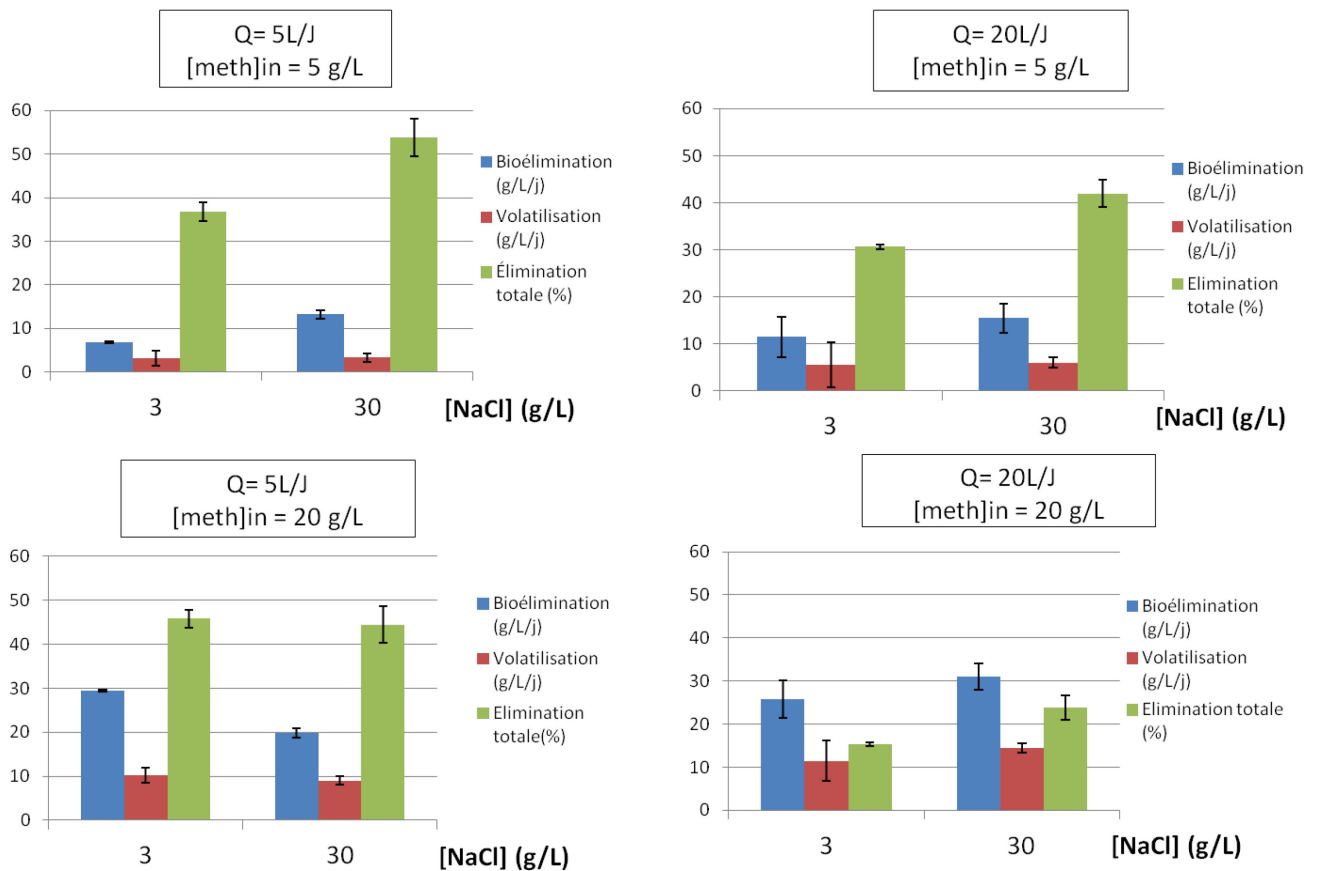


Figure 4.1 Effet de la concentration en sel (g/L) sur l'élimination totale du méthanol, la charge bio-éliminée et volatilisée

La bio-élimination quant à elle est passée de 30 à 20 g/L/j lorsque le sel (NaCl) est passé de 3 à 30 g/L, puis de 26 à 31 g/L/j pour des débits d'alimentation de 5 puis de 20 L/j respectivement.

A partir de la figure 4.1, il est possible d'énoncer les observations suivantes :

- l'élimination totale a été constante pour les conditions de débit d'alimentation de 5 L/j, et une concentration de méthanol de 20 g/L.

- La volatilisation a montré une certaine constance durant chaque expérience, mais néanmoins une légère augmentation avec les concentrations en sels sous forme de NaCl. Les plus hautes charges de méthanol volatilisées ont été observées pour des hautes charges organiques, soit pour un débit de 20 L/j couplé à une concentration de méthanol de 20 g/L (12 et 14 g/L/j pour des concentrations en sel de 3 et 30 g/L respectivement). Ceci pourrait permettre d'expliquer les faibles

rendements d'élimination totale observé à ces conditions (15 et 23 % pour des concentrations en sel de 3 et 30 g/L respectivement).

- La bio-élimination a augmenté avec les concentrations en sels sous forme de NaCl (comportement d'halophilie).

Ce comportement d'halophilie pourrait s'expliquer par la présence de bactéries halophiles et/ou halotolérantes, dont la capacité épuratoire est meilleure pour des concentrations élevées en sels, qui se sont développées durant la phase de pré-acclimatation.

Lors de cette étape, la population bactérienne subit un changement dans sa composition microbienne. En effet, plusieurs études ont prouvé que le sel étant un facteur de déterminant sur la composition d'une population bactérienne [Nielsen, *et al.*, 2003]. L'acclimatation effectuée au préalable a permis d'effectuer un remplacement progressif de la population bactériennes par des taxons plus résistants au sel : c'est le phénomène de sélection [Raeid, *et al.*, 2007 ; Nielsen, *et al.*, 2003 ; Herlemann, *et al.*, 2011]. Lors d'exposition à diverses concentrations en sel, c'est la concentration finale qui a un impact sur le type de population bactérienne prédominante, ainsi les espèces dominantes présentes correspondent aux microorganismes qui arrivent à se développer dans ces concentrations-là [Yan et Marschner, 2012]. La population qui s'était développée dans les biofiltres n'a pas été affectée par les changements de conditions, soit par le passage de 3 g/L à 30 g/L dans un schéma aléatoire, ou d'un biofiltre à un autre, ce qui laisse supposer que la population bactérienne a donc été homogène durant toutes les conditions appliquées. Ceci a été observé expérimentalement, puisque la double répétition non-consécutive d'une condition a présenté des efficacités d'éliminations similaires.

L'hypothèse que l'on a posée au départ, selon laquelle l'acclimatation au sel d'une population bactérienne mixte engendre une population halophile/halotolérante est vérifiée par plusieurs arguments. D'abord, il est possible d'enrichir un échantillon bactérien et de procéder à une sélection sur la simple base d'augmentation de la salinité. Cette méthode a été utilisée par Ventosa et coll, (1984) pour identifier des bactéries extrêmement halophiles, puis ces derniers ont procédé à la sélection de souches modérément halophiles, qui se sont fortement développées jusqu'à des concentrations de 150 g/L et ont constitué la population dominante jusqu'à des concentrations de 200 g/L. D'autre part, ce phénomène est également observé dans la répartition des bactéries dans les

estuariers, milieux naturels caractérisés par de forts gradients de salinité dû au mélange d'eau douce et d'eau de mer. Le changement de la population bactérienne y est drastique, notamment entre 5 et 15 g/L, concentrations à partir desquelles on est forcément en présence de bactéries halotolérantes et/ou halophiles [Combe, *et al.*, 2003]. Ceci confirme ce que l'on a observé : la population bactérienne présente dans le biofiltre avait une efficacité opératoire supérieure pour des concentrations élevées en sels. Une sélection s'est effectuée au sein de la population bactérienne du biofiltre, impliquant une prédominance d'espèces bactériennes halotolérantes pouvant tolérer de faibles concentrations en sels, ce qui explique la faible épuration de l'ordre de 15% pour des salinités de l'ordre de 3 g/L, mais plus stimulées lorsque les salinités étaient de l'ordre de 30 g/L, ce qui explique leur augmentation.

L'hypothèse selon laquelle la population bactérienne soit prédominée par une population halotolérante aurait pu être confirmée par l'identification de la flore bactérienne. Cependant, ceci n'était pas dans les perspectives de notre étude, qui s'est intéressée à la faisabilité d'un traitement organique appliqué à un effluent salin, à partir d'une biomasse mixte et facilement accessible, telle que les boues activées.

Il semblerait que le sel ait eu un impact sur la volatilisation du sel, notamment combiné à une forte charge organique. La plus haute charge de méthanol volatilisée (14 g/L/J) a été observée pour des concentrations en sels élevées (30 g/L). Ceci pourrait être expliqué par le fait que la constante de Henry augmente avec la concentration en sel sous forme de NaCl. En effet, [Bullock et Teja, 2003] ont démontré que la présence de sel sous forme de NaCl dans un système eau + méthanol augmentait la constante de Henry, augmentant ainsi la volatilisation des gaz.

### **Influence de la concentration initiale du méthanol**

La figure 4.2 montre l'effet de la concentration initiale en méthanol à l'entrée sur l'efficacité d'élimination des biofiltres. Elle représente les charges de méthanol bio-éliminées et évaporées (en g/L/j), ainsi que l'efficacité totale d'élimination (%) en fonction de la concentration initiale du méthanol liquide (5 et 20 g/L) pour une concentration en sel sous forme de NaCl de 3 et 30 g/L, et des débits d'alimentation en eau à traiter de 5 et 20 L/j.

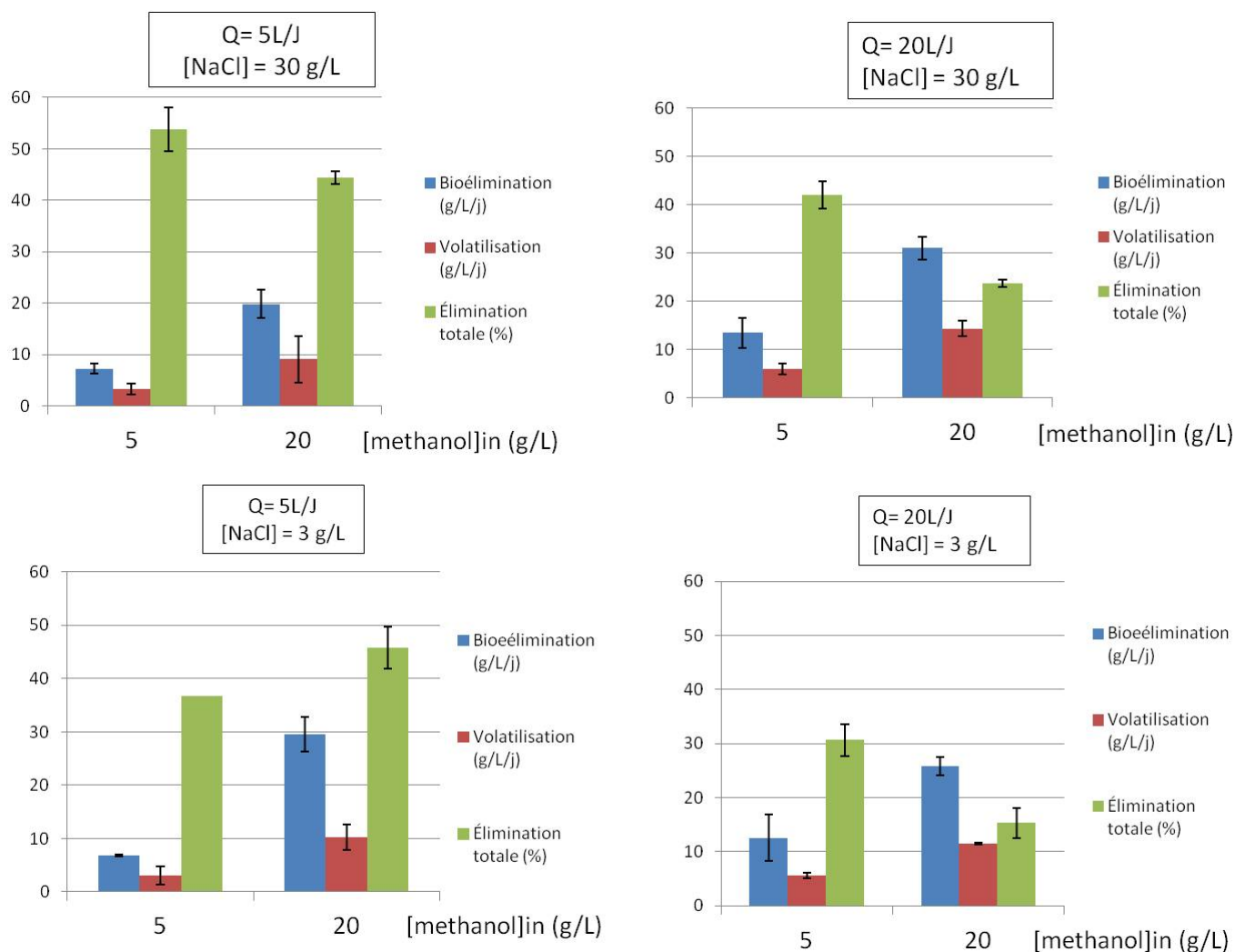


Figure 4.2 Effet de la concentration initiale en méthanol (g/L) sur l'élimination totale, la charge bio-éliminée et volatilisée (g/L/j)

Lorsque la concentration en sel était de 3 g/L, les efficacités d'élimination totale sont passées de 37 à 46 % pour un débit d'alimentation de 5 L/j, puis de 31 à 26 % pour un débit de 20 L/j lorsque les concentrations initiales de méthanol sont passées de 5 à 20 g/L.

Lorsque la concentration en sel était de 30 g/L, les efficacités d'élimination totale sont passées de 54 à 45 % pour un débit d'alimentation de 5 L/j, puis de 42 à 23 % pour un débit de 20 L/j lorsque les concentrations initiales de méthanol sont passées de 5 à 20 g/L.

Lorsque la concentration en sel était de 3 g/L, les charges de bio-élimination sont passées de 7 à 30 g/L/j pour un débit d'alimentation de 5 L/j, puis de 13 à 26 g/L/j pour un débit de 20 L/j lorsque les concentrations initiales de méthanol sont passées de 5 à 20 g/L.

Lorsque la concentration en sel était de 30 g/L, les charges de bio-élimination sont passées de 7 à 20 g/L/j pour un débit d'alimentation de 5 L/j, puis de 13 à 31 g/L/j pour un débit de 20 L/j lorsque les concentrations initiales de méthanol sont passées de 5 à 20 g/L.

À partir de ces résultats, il est possible d'énoncer les observations suivantes :

- Les efficacités d'élimination ont tendance à baisser lorsque les concentrations initiales en méthanol passent de 5 à 20 g/L, sauf pour le cas où le débit d'alimentation était de 5 L/j, et la concentration en sel de 3 g/L.

- la concentration de méthanol initial a une influence supérieure sur la bio-élimination à celle du sel. Celle-ci montre une claire tendance à augmenter avec les concentrations initiales de méthanol.

- Le méthanol influence grandement la volatilisation du méthanol, celui-ci étant parfois deux fois plus élevées lorsque la concentration initiale en méthanol est de 20 au lieu de 5 g/L.

Les observations relatives à la baisse d'efficacité d'élimination totale peuvent être expliquées par les propriétés du méthanol ainsi que celles des microorganismes présents dans le consortium épuratoire. En effet, le méthanol est considéré comme un composé facilement biodégradable [Bouziane, 2009 ; Malcolm Pirnie Inc, 1999]. Cependant, les travaux effectués par Bennet, (2002), Bouziane, (2009), et Smith, (2002) indiquent qu'il existe une concentration seuil, au-delà de laquelle le méthanol devient toxique pour les bactéries. Ce phénomène de toxicité a été observé chez les bactéries indigènes des sols ou des eaux de surface exposées à des concentrations de méthanol comprises entre 3000 et 10 000 ppm, avec une dégradation encore possible jusqu'à 50 000 ppm [Bouziane, 2009]. Ceci pourrait expliquer la diminution d'efficacité à des concentrations élevées de méthanol à l'entrée. D'autre part, cette concentration pourrait représenter une limite aux capacités épuratoires des bactéries présentes dans le biofiltre.

D'autres facteurs interviennent lorsqu'un biofiltre est exposé à de hautes concentrations de substrat carboné [Novak, *et al*, 1987 ; Chaudhary, *et al.*, 2003 ; Li, *et al.*, 2013] :

- Limitation cinétique due à un temps de contact insuffisant;
- Limitation des transferts de masse dans le biofilm, et formation d'une couche anaérobie voire anoxique, limitant également le transfert du substrat.

Dans le cas où le débit d'alimentation était de 5 L/j et la concentration en sel de 3 g/L, il est possible d'expliquer la tendance inverse de l'efficacité d'élimination totale à augmenter (comparativement aux restes des expériences) par un plus long temps de contact. Celui-ci pourrait permettre à certains groupements de bactéries présents dans le consortium de favoriser leur activité en présence d'une faible quantité de sel (3 g/L) [Lu, *et al.*, 2014].

Cela dit, il est à noter que la concentration en substrat peut difficilement être prise en compte indépendamment du débit. C'est pourquoi, de l'intérêt a été porté à la charge organique, qui permet d'étudier l'effet combiné de ces deux paramètres et c'est donc ce qui est détaillé dans la section suivante.

### **Effet de la charge organique sur l'efficacité totale d'enlèvement du méthanol**

La figure 4.3 montre l'effet de la charge organique réelle sur l'efficacité d'élimination. La plus haute efficacité d'élimination (54 %) du méthanol a été observée pour la plus faible charge organique de 15 g/L/j, et la plus faible efficacité de 15 % a été observée pour la plus haute charge organique de 236 g/L/j.

L'efficacité du système a donc diminué avec l'augmentation de la charge organique. D'autre part, pour des charges organiques similaires de 14.10 et 15.06 g/L/j pour des salinités de 3 et 30 g/L respectivement, on observe que les efficacités augmentaient de 37 % à 54 %, en ayant un temps de contact similaire (50 h). Ce qui indique que le système supporte mieux les charges organiques élevées pour le haut niveau de salinité (30 g/L). En effet, les hautes concentrations en sel pourraient favoriser la transformation métabolique du substrat par le consortium présent dans notre colonne de biofiltration, tandis que les plus faibles faciliteraient la prolifération bactérienne et sa multiplication. Ceci sera explicité dans la section suivante.

En outre, les charges appliquées durant les expérimentations ont été comprises entre 15 et 235 g/L/j. L'efficacité du système a été affectée par ces larges variations, et a montré un comportement de

baisse linéaire avec l'augmentation des charges organiques appliquées à l'entrée, avec un coefficient de corrélation plus élevé pour les concentrations de 30 g/L de NaCl ( $R^2 = 0.9614$ ), tel qu'illustré dans la figure 4.3.

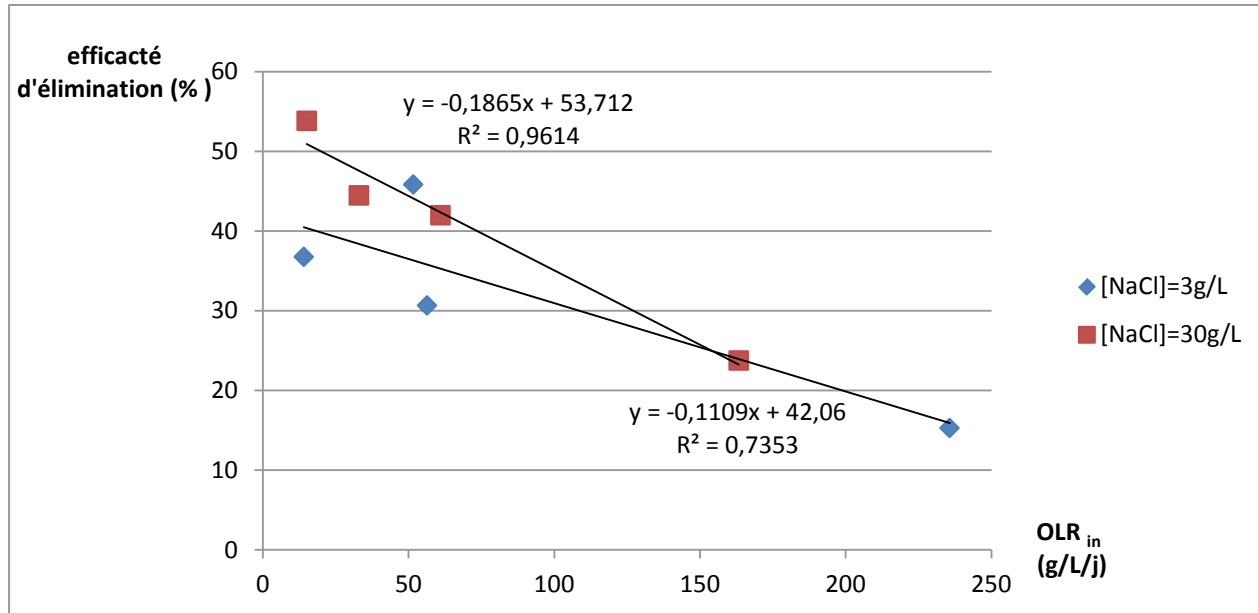


Figure 4.3 Efficacité d'élimination du méthanol en fonction de la charge organique (g/L/j)

Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les capacités épuratoires des bactéries qui étaient supérieures pour des plus hautes concentrations en sels (30 g/L) ont été plus affectées par les hautes charges appliquées. D'autre part le temps de contact pour les débits élevés dont la valeur est de (49.7 h) entre le liquide contenant le substrat et la flore épuratrice était plus faible que pour des débits de 5 L/j (12.4h).

De plus, les hautes concentrations en méthanol appliquées à l'entrée pourraient constituer un facteur inhibiteur sur l'efficacité épuratoire des bactéries, notamment lorsque couplé à un temps de contact plus faible. Ce comportement a aussi été observé chez [Aloui *et al.*, 2009], qui ont observé une augmentation de la concentration de l'effluent lorsque les charges organiques ont été augmentées. Celles-ci sont passées de 855 mg/L.j à 1170 mg/L.j pour des salinités comprises entre 20 et 60 g/L, pour le traitement par boues activées pré-acclimatées, d'un effluent contenant 3400 mg/L.

[Lu, *et al.*, 2014] ont également observé une diminution de l'efficacité avec l'augmentation de la charge organique, lorsqu'ils ont traité des eaux synthétiques par procédé de SBBR (réacteur en batch

séquentiel à biofilm), dont les concentrations en termes de DCO à l'entrée étaient comprises entre 500 et 3000 mg/L. Les salinités variaient entre 5 et 35 g/L, et les bactéries utilisées avaient été préalablement acclimatées. Les efficacités d'élimination de la DCO étaient passées d'environ 80% à 65% lorsque les charges organiques étaient passées de 0.24 à 1.44 g DCO/L/j [Lu, *et al.*, 2014].

La figure 4.4 illustre le comportement du système lorsque les charges organiques sont augmentées, par rapport à un système effectuant théoriquement 100 % d'élimination.

On observe que les charges organiques dont les valeurs sont comprises entre 0 et 50 g/L/j sont celles qui se rapprochent le plus d'un système idéal. Notre procédé s'éloigne du modèle idéal pour des charges organiques croissantes et semble plafonner pour des valeurs de l'ordre de 50 g/L/j en termes de capacité d'épuration. La charge organique a donc eu une influence majeure sur la performance du système.

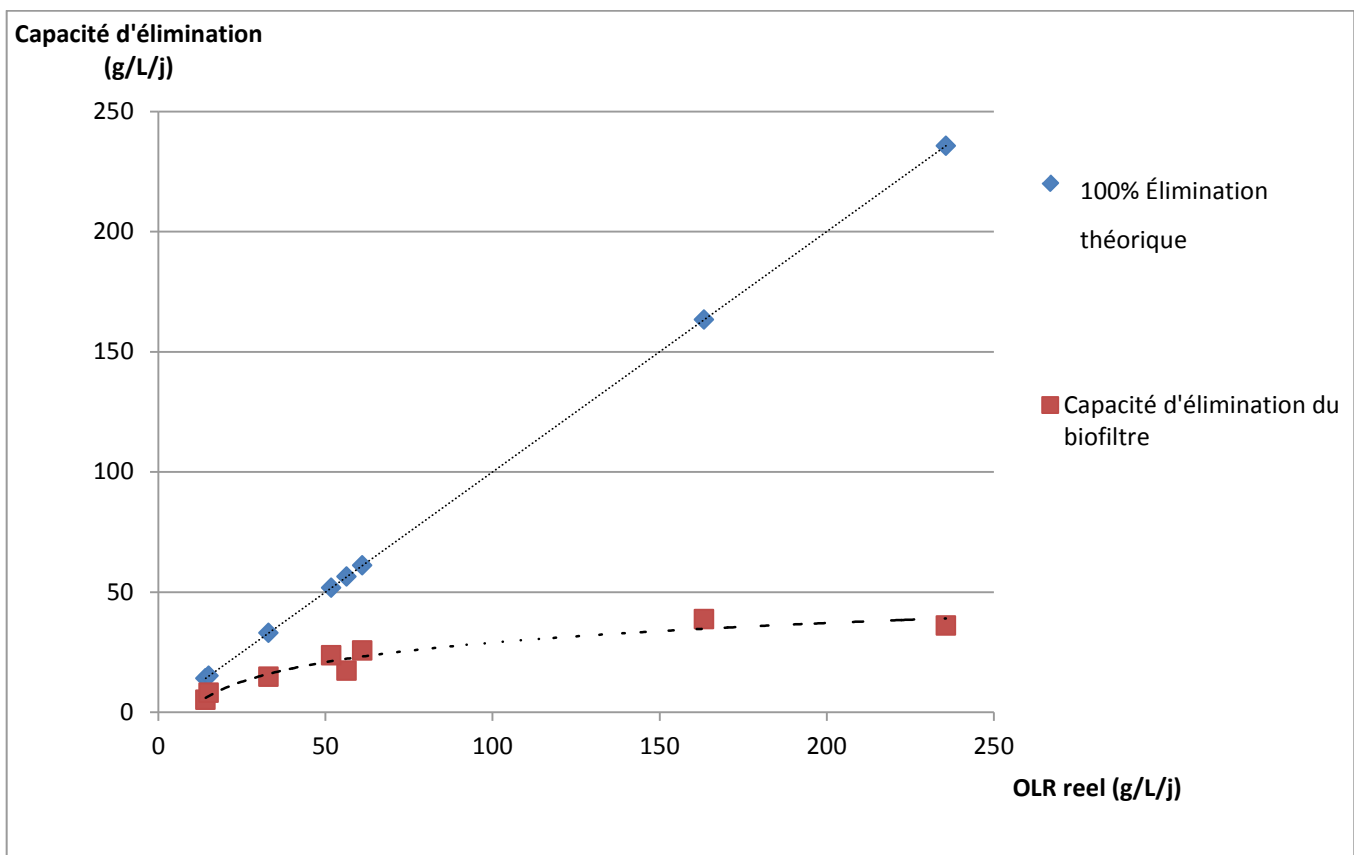
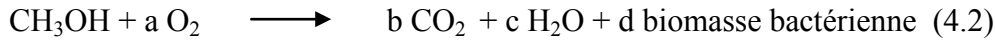


Figure 4.4 Capacité d'élimination en fonction de la charge organique



## Production de CO<sub>2</sub>

Le taux de production du CO<sub>2</sub> est proportionnel au taux de croissance des bactéries épuratrices présentes dans le biofiltre. La dégradation biologique du méthanol est donnée par la réaction chimique suivante :



On a :

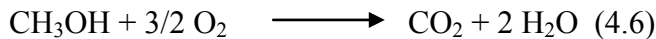
$$OLR_{in} = \frac{[\text{méthanol}]_{in} \times Q}{V} \quad (4.3)$$

$$P_{CO_2} = \frac{[CO_2] \times Q}{V} \quad (4.4)$$

$$EC = OLR_{in} \times \%E \quad (4.5)$$

Dans le cas idéal d'une oxydation totale de la matière organique :

1) On considère l'absence de génération de biomasse, on obtient ainsi, et après équilibre de l'équation les coefficients stœchiométriques théoriques:  $a = 3/2$ ,  $b = 1$ ,  $c = 2$ ,  $d=0$ . L'équation (2) devient donc :



2) L'efficacité d'élimination en termes adimensionnels  $E = 1$ , donc en remplaçant dans l'équation (4.5), on obtient :

$$EC = OLR_{in} = \frac{[\text{méthanol}]_{in} \times Q}{V} \quad (4.7)$$

Ainsi, à partir du rapport des équations (4.4) et (4.5), et en considérant l'équation chimique (4.6) comme un cas idéal, on peut obtenir l'équation reliant la production de CO<sub>2</sub> avec la capacité d'élimination dans le cas idéal posé précédemment par le ratio massique du CO<sub>2</sub> avec le CH<sub>3</sub>OH.

Ce ratio massique est donc  $\frac{P_{CO_2}}{EC} = \frac{44}{32} = 1.375$ .

La figure 4.5 illustre le taux de production du CO<sub>2</sub> ( $P_{CO_2}$ ), en g/L/j, en fonction de la capacité d'élimination exprimée également en g/L/j.

On observe une faible production de CO<sub>2</sub> par gramme de méthanol éliminé. Ceci s'explique par l'utilisation préférentielle du substrat par les bactéries pour leur prolifération sur le médium. Ceci a pu être observé visuellement par une augmentation de l'épaisseur du biofilm présent à la surface du support utilisé d'une part, et par les fréquents lavages effectués à cause des phénomènes de colmatage.

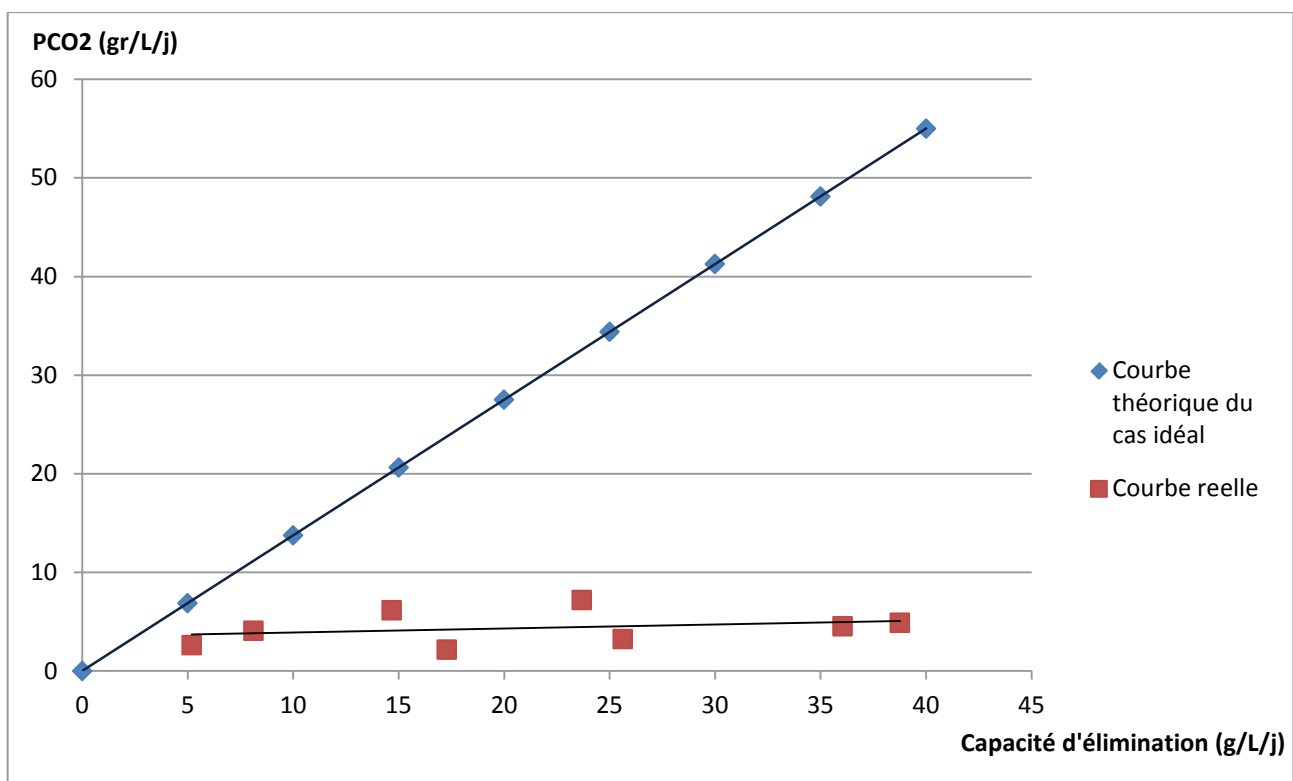


Figure 4.5 Taux de production de CO<sub>2</sub> en fonction de la capacité d'élimination du système

#### 4.1.5 Analyse statistique des résultats

Afin d'étudier l'effet des différents paramètres sélectionnés sur l'efficacité d'élimination totale du méthanol, de la charge bio-éliminée, ainsi que la charge volatilisée, une planification expérimentale et une étude statistique ont été réalisés comme le montre l'analyse de variance (ANOVA, *analysis of*

variance), (les facteurs étant définis par le tableau 4.2) décrite dans les tableaux 4.3, 4.4 et 4.5 ci-dessous :

Tableau 4.2 Définition des facteurs de l'ANOVA

Facteur	Définition
A	Concentration initiale en méthanol (g/L)
B	Débit d'alimentation (L/j)
C	Concentration en sel (g/L)

Tableau 4.3 ANOVA de l'élimination totale

Response: Elimination totale					
ANOVA for Selected Factorial Model					
Analysis of variance table [Partial sum of squares]					
Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Block	10.79	1	10.79		
Model	2150.79	7	307.26	97.39	< 0.0001 significant
A	347.08	1	347.08	110.01	< 0.0001
B	1085.37	1	1085.37	344.02	< 0.0001
C	382.98	1	382.98	121.39	< 0.0001
AB	219.78	1	219.78	69.66	< 0.0001
AC	80.46	1	80.46	25.50	0.0015
BC	0.13	1	0.13	0.040	0.8473
ABC	34.99	1	34.99	11.09	0.0126
Residual	22.09	7	3.16		
Cor Total	2183.67	15			

The Model F-value of 97.39 implies the model is significant. There is only a 0.01% chance that a "Model F-Value" this large could occur due to noise.

Std. Dev.	1.78	R-Squared	0.9898
Mean	36.12	Adj R-Squared	0.9797
C.V.	4.92	Pred R-Squared	0.9469
PRESS	115.38	Adeq Precision	30.156

Tableau 4.4 ANOVA de la charge bio-éliminée

Response: Charge bioéliminée					
ANOVA for Selected Factorial Model					
Analysis of variance table [Partial sum of squares]					
Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Block	0.94	1	0.94		
Model	1861.06	7	265.87	33.64	< 0.0001 significant
A	449.23	1	449.23	56.84	0.0001
B	1237.28	1	1237.28	156.55	< 0.0001
C	0.078	1	0.078	9.920E-003	0.9235
AB	71.06	1	71.06	8.99	0.0200
AC	64.56	1	64.56	8.17	0.0244
BC	37.03	1	37.03	4.68	0.0672
ABC	1.82	1	1.82	0.23	0.6457
Residual	55.32	7	7.90		
Cor Total	1917.33	15			

The Model F-value of 33.64 implies the model is significant. There is only a 0.01% chance that a "Model F-Value" this large could occur due to noise.

Std. Dev.	2.81	R-Squared	0.9711
Mean	15.43	Adj R-Squared	0.9423
C.V.	18.22	Pred R-Squared	0.8492
PRESS	289.04	Adeq Precision	14.060

Cela dit, avant d’approfondir les interprétations liées à cette étude, il est nécessaire de vérifier la validité des hypothèses nécessaires à la réalisation d’une ANOVA, en particulier l’hypothèse de normalité qui suppose que les résidus sont distribués selon la loi normale. On remarque sur les figure 4.6, 4.7 et 4.8 qui comparent la distribution des résidus obtenus à une distribution normale, que la plupart des valeurs semblent se rapprocher d’une distribution normale, et qu’aucun point ne s’écarte de manière particulière de la droite normale.

Tableau 4.5 ANOVA de la charge de méthanol volatilisée

Response: Charge volatilisée

ANOVA for Selected Factorial Model

Analysis of variance table [Partial sum of squares]

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Block	12.69	1	12.69			
Model	1313.36	7	187.62	30.48	< 0.0001	significant
A	1091.15	1	1091.15	177.29	< 0.0001	
B	94.72	1	94.72	15.39	0.0057	
C	2.33	1	2.33	0.38	0.5576	
AB	5.28	1	5.28	0.86	0.3852	
AC	8.28	1	8.28	1.35	0.2841	
BC	58.71	1	58.71	9.54	0.0176	
ABC	52.89	1	52.89	8.59	0.0220	
Residual	43.08	7	6.15			
Cor Total	1369.14	15				

The Model F-value of 30.48 implies the model is significant. There is only a 0.01% chance that a "Model F-Value" this large could occur due to noise.

Std. Dev.	2.48	R-Squared	0.9682
Mean	18.27	Adj R-Squared	0.9365
C.V.	13.58	Pred R-Squared	0.8341
PRESS	225.09	Adeq Precision	13.993

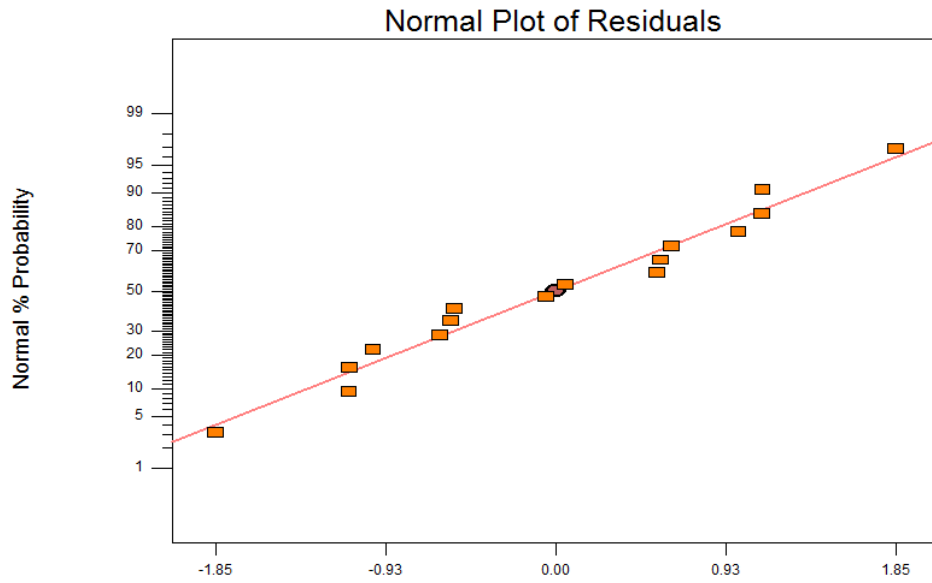


Figure 4.6 Distribution des résidus par rapport à une distribution normale pour l'élimination totale

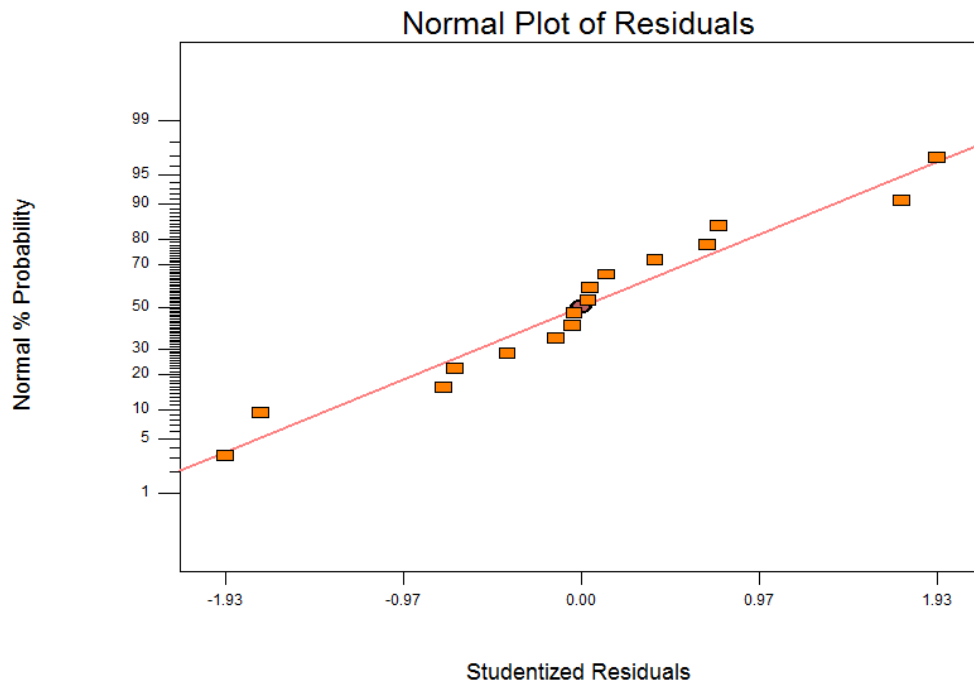


Figure 4.7 Distribution des résidus par rapport à une distribution normale pour la charge bio-éliminée

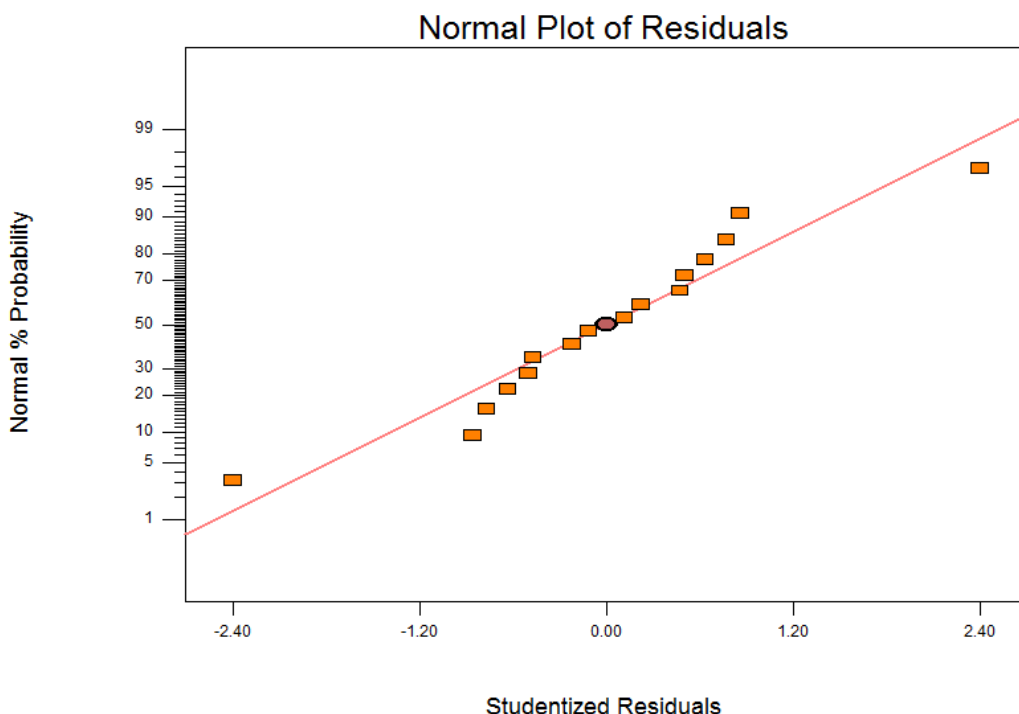


Figure 4.8 Distribution des résidus par rapport à une distribution normale pour la charge volatilisée

Une fois l'hypothèse de normalité vérifiée, on peut s'atteler à l'étude des résultats de l'ANOVA. En effet, les tableaux 4.3, 4.4 et 4.5 montrent que les modèles que nous avons choisis sont significatifs : il y a moins de 0.0001 % de chance que de tels modèles soit dûs au bruit, ce qui confirme que parmi les facteurs du modèle certains sont réellement importants, et sont capables d'expliquer les variations des résultats en dehors de la simple variation au sein de la population.

### Élimination totale

Les facteurs prouvés statistiquement à 95 % de confiance, et qui ont un effet significatifs sur les résultats, selon l'ANOVA sont, en premier lieu le facteur A qui représente la concentration du méthanol liquide, B qui représente le débit d'entrée, et en second lieu les facteurs A et C qui sont les teneurs à l'entrée en méthanol et en sel respectivement et aussi les interaction AB, AC entre le débit et la concentration en méthanol, et la concentration en méthanol et la concentration en sel respectivement, et enfin, l'interaction ABC représentant la concentration en méthanol, le débit d'alimentation, et la concentration en sel.

Ces résultats statistiques sont en adéquation avec les résultats de notre étude expérimentale, durant laquelle il a été possible de voir l'évolution de l'élimination totale en fonction des divers paramètres tels que le débit d'alimentation, la concentration en méthanol et en sel.

Ainsi, l'équation (4.7) du modèle décrivant l'efficacité d'élimination totale en fonction de la concentration de méthanol, du débit d'alimentation, de la concentration en sel est exprimée comme suit :

$$\text{Efficacité totale} = +31.92 + 0.96969 * [\text{méthanol}] + 0.11262 * Q + 0.93257 * [\text{NaCl}] - 0.046490 * [\text{methanol}] * [\text{NaCl}] + 1.94733E - 003 * [\text{méthanol}] * Q * [\text{NaCl}] \quad (4.7)$$

### **Charge bio-éliminée**

Les facteurs prouvés statistiquement à 95% de confiance, et qui ont un effet significatifs sur les résultats, selon l'ANOVA sont, en premier lieu les facteurs A et B, représentant la concentration en méthanol et le débit d'alimentation, puis AB et AC représentant les interactions entre le débit d'alimentation et la concentration en méthanol, et la concentration en sel avec la concentration en méthanol.

Ainsi, la concentration en méthanol et le débit d'alimentation ont été les effets les plus influents, tel qu'observé durant notre étude expérimentale. Ainsi, l'équation (4.8) du modèle décrivant la charge bio-éliminée est exprimée comme suit :

$$\text{Charge bioéliminée} = -4.25667 + .65719 * [\text{méthanol}] + 0.54793 * Q + 0.030133 * [\text{méthanol}] * Q - 0.025395 * [\text{méthanol}] * [\text{NaCl}] \quad (4.8)$$

### **Charge volatilisée**

Les facteurs prouvés statistiquement à 95 % de confiance, et qui ont un effet significatifs sur les résultats, selon l'ANOVA sont, en premier lieu les facteurs A et B, représentant la concentration en méthanol et le débit d'alimentation, puis AB et AC représentant les interactions entre le débit d'alimentation et la concentration en méthanol, et la concentration en sel avec la concentration en méthanol.



Tel qu'attendu à travers nos résultats expérimentaux, le méthanol, le débit sont les facteurs les plus influents sur la charge volatilisée du méthanol. Ainsi, l'équation (4.9) du modèle décrivant la charge évaporée du méthanol est exprimée comme suit :

$$\text{Charge volatilisée} = -4.41772 + 1.893977 * [\text{méthanol}] + 0.63369 * Q - 0.011008 * Q * [\text{NaCl}] + 2.39424 E - 003 * Q * [\text{NaCl}] \quad (4.9)$$

A l'issue de cette analyse statistique, il a donc pu être établi que les conclusions préalablement tirées de l'étude paramétrique s'avèrent robustes d'un point de vue statistique. Tout d'abord les hypothèses nécessaires à l'étude statistique ont été vérifiées. Ceci nous a permis d'utiliser les résultats de cette analyse qui montrent un effet notable du débit en premier lieu, puis des facteurs primaires considérés. En l'occurrence, la teneur en méthanol et la teneur en sel à l'entrée du biofiltre.



# 5 CONCLUSION

## 5.1 Contexte

La gestion des effluents salins est d'importance majeure, puisque ceux-ci sont générés par diverses industries, dont chimiques, agroalimentaires, pétrolières, textiles, cuir et tanneries. Ces rejets sont particulièrement complexes puisqu'ils sont constitués d'un mélange riche en matière organique et en sel sous forme de NaCl (typiquement 3 à 360 g/L), inhibant le bon fonctionnement des procédés biologiques. Face à la problématique que constitue le traitement de ces effluents, beaucoup d'industries se voient contraintes de diluer leurs effluents afin de rendre le traitement biologique possible. D'autres industries rejettent ces effluents sans traitement au préalable, ce qui constitue un sévère danger pour l'environnement.

Cependant, depuis les années 2000, des mesures environnementales ont été prises à l'égard de la problématique des effluents salins, (Directive de l'Union Européenne (2000/60/EC)), visant à réduire l'impact environnemental négatif causé par ce type d'effluents. Face à ces nouvelles restrictions, les industries se sont penchées sur les traitements physico-chimiques. Certains de ces traitements tels que l'osmose-inverse peuvent s'avérer efficaces pour l'élimination de la matière organique des effluents salins, mais posent cependant beaucoup de problèmes : (1) d'ordre opératoires, puisque la durée de vie et l'efficacité des membranes est très affectée par la présence des sels et des quantités élevées de matière en suspension, (2) d'ordre économique, puisque ces procédés sont énergétiquement voraces, et coûteux en termes d'opération et de maintenance. Conséquemment, ces opérations de traitement ont été abandonnées au profit des traitements biologiques, plus avantageux.

C'est dans ce contexte que l'on a mené cette étude portant sur la dégradation du méthanol dans des conditions salines. Étant donné sa structure simple, le méthanol a été utilisé comme composé modèle, et a fait l'objet d'expérimentations dans un biofiltre percolateur aérobie à contre-courant sous diverses conditions de débits, de concentrations d'entrée en méthanol et de sel sous forme de NaCl. À travers nos recherches, nous avons montré que l'élimination de ce composé de la phase aqueuse était possible, malgré l'obstacle que représente le sel dans l'élimination de la matière organique.

L'analyse de nos résultats expérimentaux a montré que :

- La volatilisation a joué un rôle important dans l'enlèvement du méthanol de la phase liquide

- la dégradation du méthanol à l'état liquide à de fortes concentrations (5 et 20 g/L) était possible en présence de sel. Cependant, sa biodégradabilité reportée comme facile dans la littérature, a été affectée par divers paramètres opératoires. Les efficacités d'élimination du méthanol obtenues pour les fortes concentrations en sel (30 g/L) étaient supérieures à celles obtenues pour de plus faibles salinités (3 g/L).

- une efficacité de 54 % a été obtenue lorsque le méthanol était de 5 g/L, et le débit de l'influent de 5 L/j, avec un temps de contact de 50 h.

- la dégradation du méthanol a été inhibée lorsque le débit de l'influent, et la concentration du méthanol liquide étaient élevées, soit de 20 L/j et 20 g/L respectivement, et une valeur de salinité de 3 g/L. L'efficacité obtenue était de l'ordre de 15 %. Ceci serait lié à la concentration élevée en méthanol, combiné au haut débit d'entrée du liquide, impliquant de fortes charges. La basse concentration de la salinité dans cette condition aurait pu également inhiber le consortium bactérien présent dans le biofiltre.

- l'analyse de la capacité d'élimination du système en fonction de la charge organique élevée a révélé une valeur limite de l'ordre de 30 g/L/j afin de se rapprocher d'un système réalisant une élimination totale.

## 5.2 Recommandations

Malgré l'étape de pré-acclimatation, le système de biofiltration a été affecté d'une part par les concentrations élevées d'entrée en méthanol, d'autre part, par les concentrations d'entrée en sel. Les bactéries utilisées sont issues d'une station d'épuration de traitement d'eaux urbaines. La diversité des bactéries présentes dans le bassin de boues activées par lequel a été effectué le prélèvement serait supposément lié au profil des effluents traités. Les quantités de sel présentes dans les bassins d'aération de la station de Magog (Qc) traitant des effluents municipaux ne permettraient pas le développement de bactéries halophiles plus performantes à des concentrations élevées en sels. Il

serait donc intéressant d'effectuer une caractérisation microbiologique du consortium afin de mettre en évidence les causes réelles de ce comportement.

Des chercheurs ont évalué l'impact de l'origine du prélèvement bactérien sur les efficacités de traitement biologique de la matière organique en milieu salin. Pour cela, leurs prélèvements bactériens se sont effectués soit dans des sites salins déjà contaminés par la pollution à traiter, et ont procédé à un enrichissement de la culture. D'autres chercheurs ont évalué l'impact de l'inoculation de souches pures de bactéries halophiles ou halotolérantes capables de dégrader le composé visé aux concentrations de sels ciblées : c'est la bioaugmentation. L'efficacité cette méthode a été comparée aux méthodes conventionnelles d'acclimatation de boues activées non soumises aux conditions visées, et s'est révélée supérieure, et pourrait ainsi dans notre cas, atteindre des efficacités supérieures à celles obtenues (54 %). Il serait donc intéressant de mener des recherches sur l'isolation de bactéries méthylophiles aérobies (bactéries utilisant comme seule substrat des substances carbonées réduites ne possédant aucune liaison carbone-carbone) halophiles ou halotolérantes afin d'améliorer les performances épuratoires du système.

Lors de notre étude, on a observée que d'autres facteurs intervenaient dans l'élimination du méthanol en phase liquide. D'une part sa biodégradabilité relative qui a été observée dans les réservoirs d'alimentation de l'affluent liquide. D'autre part, la volatilisation, due à sa nature de composé organique volatil. De nouvelles recherches ont révélé le rôle du sel dans ce phénomène, et ont démontré que la constante de Henry augmentait lorsque la concentration des sels augmentait. Le phénomène biodégradabilité spontanée qui a été observée dans le reservoir d'alimentation contenant le méthanol a contribué à 50% de l'enlèvement du méthanol de la phase liquide dans des conditions opératoires, durant lesquelles la concentration en méthanol et en sel était élevée (20 g/L, 30 g/L respectivement), et le débit d'alimentation liquide de 5 L/j.

La volatilisation est entrée en compétition avec la bioélimination par le consortium épurateur présent dans la colonne, ce qui expliquerait les efficacités globales inférieures à 54 %, malgré l'étape de pré-acclimatation. Ce phénomène a donc contribué de manière significative dans l'enlèvement du méthanol dans la phase liquide.

Ce phénomène non-destructif ne permet qu'un transfert de la pollution. Étant donné la nécessité de concevoir un procédé permettant une élimination respectueuse de l'environnement et des réglementations concernant les émissions de COV dans l'air, il serait nécessaire d'améliorer notre procédé de diverses manières :

- par ajout d'une colonne de biofiltration traitant le méthanol volatilisé : il a été prouvé qu'il était possible d'obtenir plus de 99 % d'efficacité d'élimination de méthanol gazeux par des biofiltres contenant du compost comme biomasse épuratrice, pour des concentrations aussi élevées que 8 g/m<sup>3</sup>, et pour des débits gazeux de 0.026 m<sup>3</sup>/h [Arulneyam & Swaminathan, 2003];

- par récupération du gaz à la sortie de la colonne de biofiltration, et de procéder à une adsorption sur charbon actif;

- injecter de l'oxygène pur dans les colonnes au lieu d'air, permettant un débit plus faible, et une réduction des phénomènes de stripping.

### **5.3 Perspectives**

En 2000, l'INPR (Inventaire National des Polluants Rejetés au Canada) a estimé les rejets de méthanol à plus de 2116.6 tonnes/an sous forme gazeuse dans les airs, et 624 tonnes/an sous forme liquide. En particulier, en Saskatchewan (Canada), le méthanol est le deuxième composé le plus rejeté après l'ammoniac. D'autre part, l'une des industries majeures rejetant ce polluant est l'industrie pétrolière canadienne. Celle-ci est l'un des joueurs les plus importants dans le secteur de l'énergie de pays. Elle représente plus de 12 % du produit national brut du pays. C'est l'une des plus importantes richesses naturelles que le Canada possède, mais en voie d'exploitation. Ceci souligne clairement l'importance que revêt le traitement de ce polluant. Le travail réalisé dans notre étude pour le traitement du méthanol s'avère donc de première importance. Cette large production de méthanol sous forme de déchet offre donc de nombreuses opportunités d'application du procédé développé dans le cadre de cette étude. Il serait donc intéressant de l'appliquer aux différents cas évoqués, ceci en tenant compte des caractéristiques propres à chaque industrie et en réalisant une mise à l'échelle appropriée.

A priori, les procédés biologiques sont plus avantageux que les procédés physico-chimiques, aussi bien d'un point de vue pratique (faible emprise au sol, facilité de gestion technique),

qu'économique. Pourtant, les industries préfèrent mettre en priorité les procédés physico-chimiques lorsqu'il s'agit de traitement des effluents salins. Une étude technico-économique s'impose donc pour déterminer si à long terme, les rendements sont supérieurs, ainsi que pour mettre en évidence les enjeux techniques associés à ce type de traitements.





# LISTE DES RÉFÉRENCES

- Abou-Elela, S. I., Kamel, M. M., & Fawzy, M. E. (2010). Biological treatment of saline wastewater using a salt-tolerant microorganism. *Desalination*, volume 250, p. 1-5.
- Aloui, F., Khoufi, S., Loukil, S., & Sayadi, S. (2009). Performances of an activated sludge process for the treatment of fish processing saline wastewater. *Desalination*, volume 246, p. 389-396.
- Baliarda, A. (2003). *Evaluation de la reponse au stress chez les bacteries lactiques appartenant aux genres pediococcus et tetragenococcus approches physiologiques et genetiques*. Thèse de doctorat, Université Bordeaux 1., Bordeaux, France, 394 p.
- Bassin, J. P., Kleerebezem, R., Muyzer, G., Rosado, A. S., van Loosdrecht, M. C., & Dezotti, M. (2012). Effect of different salt adaptation strategies on the microbial diversity, activity, and settling of nitrifying sludge in sequencing batch reactors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, volume 93, p. 1281-1294.
- Bennet, S. M. (2002). *An evaluation of the potential for the biodegradation of methanol in the fraser river, BC*. Mémoire de maîtrise, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada, 123 p.
- Bertrand, J., Almallah, M., Acqaviva, M., & Mille, G. (1990). Biodegradation of hydrocarbons by an extremely halophilic archaeobacterium. *Letters in Applied Microbiology*, volume 11, numéro 5, p. 260-263.
- Bertrand, J., Bianchi, M., Mallah, M., Acqaviva, M., & Mille, G. (1993). Hydrocarbon biodegradation and hydrocarbonoclastic bacterial communities composition grown in seawater as a function of sodium chloride concentration. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, volume 168, numéro 1, p. 125-138.
- Booth, I. R. (2002). Stress and the single cell : Intrapopulation diversity is a mechanism to ensure survival upon exposure to stress. *International Journal of Food Microbiology*, volume 78, numéro 1-2, p. 19-30.
- Bouziane, M. (2009). *Biodégradation du méthanol en réacteur batch et étude de l'influence des paramètres physico-chimiques sur la cinétique*. Mémoire de maîtrise, Université Mantouri, Constantine, Algérie, 141 p.

- Buitrón, G., & Capdeville, B. (1995). Enhancement of the Biodegradation Activity by the Acclimation of the Inoculum. *Environmental Technology*, volume 16, numéro 22, p. 1175-1184.
- Bullock, K. R., & Teja, A. S. (2003). Henry's constants of volatile organic compounds in aqueous salt solutions. *Industrial Engineering chemistry research*, volume 42, numéro 25, p. 6494-6498.
- Chaudhary, D. S., Vigneswaran, S., Ngo, H.-H., Shim, W. g., & Moon, H. (2003). Biofilter in Water and Wastewater Treatment. *Korean Journal of Chemical Engineering*, volume 20, numéro 6, p. 1054-1065.
- Chowdhury, P., Viraraghavan, T., & Srinivasan, A. (2010). Biological treatment processes for fish processing wastewater – A review. *Bioresource Technology*, volume 101, numéro 2, p. 439-449.
- Clary, J. J. (2013). *The toxicology of methanol*. John Wiley & Sons, INC., Midland, Michigan U.S.A, 287 p.
- Combe, M., Bouvier, T., Pringault, O., Rochelle-Newall, E., Bouvier Corinne, A. M., & Pham The, T. (2003). Freshwater prokaryote and virus communities can adapt to a controlled increase in salinity through changes in their structure and interactions. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, volume 133, numéro 20, p. 58-66.
- Courtemanche, M. (1996). *Traitement des eaux usées d'une usine de pâtes et papiers par le procédé de biofiltration ACTICONTACT*. Mémoire de maîtrise, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, 140 p.
- Csonka, L. N. (1989). Physiologic and Genetic responses of Bacteria to Osmotic Stress. *Microbiological Reviews*, volume 53, numéro 1, p. 121-147.
- Dan, N. P. (2001). *Biological treatment of high salinity wastewater using yeast and bacterial systems*. Thèse de doctorat, Asian institute of Technology, School of Environment, Resources and Development, Bangkok, Thailand, 170 p.
- DasSarma, S., & DasSarma, P. (2012). Halophiles. Dans eLS Citable reviews in the life sciences. <http://www.els.net/WileyCDA/ElsArticle/refId-a0000394.html> (page consultée le 15 Janvier 2013).
- Davies, P. S. (2005). The Biological Basis of Wastewater Treatment. Dans Interline Systems BV. <http://www.s-can.nl/media/1000154/thebiologicalbasisofwastewatertreatment.pdf> (page consultée le 28 Septembre 2014).

- Deorsola, A. B., Camarinha, G. C., Carvalho, D. D., & Sant'Anna Jr, G. L. (2013). Biological treatment of saline wastewaters in an aerobic sequencing batch reactor. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, volume 32, numéro 2, p. 198-205.
- Diaz Piedad, M., Boyd, K. G., & Grigson, S. J. (2002). Biodegradation of crude oil across a wide range of salinities by an extremely halotolerant bacterial consortium MPD-M, immobilized onto polypropylene fibers. *Biotechnology and Bioengineering*, volume 79, numéro 2, p. 145–153.
- Diaz, M., SJW, G., Peppiatt, C., & Burgess, J. (2000). Isolation and characterisation of novel hydrocarbon degrading euryhaline consortia from crude oil and mangrove sediments. *Marine Biotechnology*, volume 2, p. 522-532.
- Dincer, A. R., & Kargi, F. (2001). Performance of rotating biological disc system treating saline wastewater. *Process Biochemistry*, volume 36, numéro 8-9, p. 901-906.
- Durai, G., & Rajasimman, M. (2011). Biological treatment of tannery wastewater - A review. *Journal of Environmental Science and Technology*, volume 4, numéro 1, p. 1-17.
- Eliás, A., Barona, A., Gallastegi, G., Rojo, N., & Gurtubay, L. (2010). preliminary acclimation strategies for successful startup in conventional biofilters. *Journal of Air & Waste Management Association*, volume 60, numéro 8, p. 959–967.
- Environnement Industrie. (2013). *Association inter-professionnelle des industries*. Dans Environnement-Industrie.  
<http://www.environnementindustrie.com/IMG/RSDE/Information%20en%20PACA/FichesTraitement.pdf> (page consultée le 15 Septembre 2014).
- Safe Drinking Water Foundation (2008). *Déversement marin, Fondation de l'Eau Potable Sûre*. Dans Safe Drinking Water Foundation.  
<http://www.safewater.org/PDFS/resourcesknowthefacts/Feuille+de+Faits+deversement+marin.pdf> (page consultée le 18 Juin 2014).
- Galinski, E. (1995). Osmoadaptation in bacteria. *Advances in microbial physiology*, volume 37, p. 273-319.
- Gharsallah, N., Khannous, L., Souissi, N., & Nasri, M. (2002). Biological treatment of saline wastewaters from marine-products processing factories by a fixed-bed reactor. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, volume 77, numéro 8, p. 865 - 870.

- Goldman, M., Deibel, R., & Niven, C. (1963). Interrelationship between temperature and sodium chloride on growth of lactic acid bacteria isolated from meat-curing brines. *Journal of Bacteriology*, volume 85, p. 1017-1021.
- Gouffi, K. (2000). Is the accumulation of osmoprotectant the unique mechanism involved in bacterial osmoprotection?. *International Journal of Food Microbiology*, volume 55, p. 171–174.
- Grant, W. D. (2004). Life at low water activity. *Biological Sciences*, volume 359, numéro 1448, p. 1249-1267.
- Green, D. W., & Perry, R. H. (2008). *Perry's chemical engineers handbook*, 8e edition. Mc Graw Hill, New-York, USA, 2700 p.
- Gunde-Cimerman, N., Oren, A., & Plementinas, A. (2005). *Cellular origin, life in extreme habitats and astrobiology-adaptation to life at high salt concentrations in archaea, bacteria and eukarya*. Springer, Dordrecht, Hollande, 575 p.
- Gvozdyak, P., Denis, D. A., Mogilevich, N., Tsinberg, N. B., Grishchenko, N. I., & Erzikova, O. N. (1986). Bacterial removal of methanol from wastewater. *Khimiya i Tekhnologiya vody*, volume 8, numéro 5, p. 95-97.
- Hamaide, F. (1984). *Dépendance énergétique et halotolerance du transport d'acide alpha-aminoisobutyrique chez la bactérie halophile modérée Vibrio costicola*. Thèse de doctorat, Université d'Ottawa, Ottawa, Canada, 266 p.
- Hamoda, M., & Al-Attar, M. (1995). Effects of high sodium chloride concentrations on activated sludge treatment. *Water science*, volume 31, p. 61-72.
- Hassard, F., Biddle, J., Cartmell, E., Jefferson, B., Tyrrel, S., & Stephenson, T. (2014). Rotating biological contactors for wastewater treatment - A review. *Process Safety and Environmental Protection*, volume 94, p. 1-21.
- Herlemann, D. P., Labrenz, M., Jurgens, K., Bertilsson, S., Waniek, J. J., & Andersson, A. F. (2011). Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *International Society for Microbial Ecology journal*, volume 5, p. 1571-1579.
- Imhoff, J. F. (1992). Osmotic adaptation in halophilic and halotolerant microorganisms. Dans R. H. Vreeland, & L. I. Hochstein, *The biology of halophilic bacteria*, CRC Press, Floride, USA, p. 211-253.

- Ishida, Y. (1970). Growth behavior of halobacteria in relation to concentration of NaCl and temperature of environments. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish*, volume 36, p. 391-396.
- Jawahar, A., Chinnadurai, M., Ponselvan, J., & Annadurai, G. (1998). Pollution from tannery industry and options from treatment of effluent. *Industrial Journal of Environment Protection*, volume 18, p. 672-672.
- Kadam, R. (1990). Treatment of tannery wastes. *Industrial Journal of Environment Protection*, volume 10, p. 212-212.
- Kargi, F., & Dincer, A. R. (1996). Effect of salt concentration on biological treatment of saline wastewater by fed-batch operation. *Enzyme and microbial technology*, volume 19, p. 529-537.
- Kargi, F., & Dincer, A. R. (1997). Biotechnological treatment of saline wastewater by fed batch operation. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, volume 69, p. 167-172.
- Kargi, F., & Dincer, A. R. (1998). Saline wastewater treatment by halophile-supplemented activated sludge culture in an aerated rotating biodisc contactor. *Enzyme and Microbial Technology*, volume 22, p. 427-433.
- Kargi, F., & Dincer, A. R. (1999). Salt inhibition effects in biological treatment of saline wastewater in RBC. *Journal of Environment Engineering*, volume 125, numéro 10, p. 966-971.
- Kargi, F., & Uygur, A. (1996). Biological treatment of saline wastewater in an aerated percolator unit utilizing halophilic bacteria. *Environmental Technology*, volume 17, numéro 3, p. 325-330.
- Kennedy, E. (1982). Osmotic regulation and the biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides in *Escherichia Coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, volume 79, numéro 4, p. 1092-1095.
- Kinner, N., Bishop, P., & Asce, M. (1962). Treatment of saline domestic wastewater using RBCs. *Journal of Environmental Engineering*, volume 108, numéro 4, p. 650-663.
- Kirchner, H., Glaser, M., & Herberman, R. B. (1975). Role of amino-acids in osmoregulation of non-halophilic bacteria. *Nature*, volume 257, p. 398-400.
- Kogut, M. (1980). Microbial strategies of adaptability. *Trends in Biochemical Sciences*, volume 5, numéro 2, p. 47-50.

- Kushner, D. J. 1978. Life in high salt and solute concentrations: halophilic bacteria. Dans D. J. Kushner, *Microbial life in extreme environments*. Academic Press, Londres, Angleterre, p. 317–368.
- Kushner, D. J. (1994). Growth and nutrition of halophilic bacteria. Dans R. H. Vreeland, & L. I. Hochstein, *The Biology Of Halophilic Bacteria*, CRC Press, Floride, U.S.A, p. 87-103.
- Lai, M., D.R., Y., & Cuang, M. (1999). Regulatory factors associated with synthesis of the osmolyte glycine betaine in the halophilic methanoarcheon *Methanohalophilus portucalensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, volume 65, numéro 2, p. 828-833.
- Larsen, H. (1962). Halophilism. Dans S. R. Gunsalus IC, *The bacteria, vol IV*, Academic Press, New-York, USA, p. 297-342.
- Larsen, H. (1986). Halophilic and halotolerant microorganisms - an overview and historical perspective. *FEMS Microbiology Reviews*, volume 39, numéro 1-2, p. 3-7.
- Le Borgne, S., Paniagua, D., & Vazquez-Duhalt, R. (2008). Biodegradation of organic pollutants by halophilic bacteria and archaea. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, volume 15, p. 74-92.
- Lefebvre, O. et Moletta, R. (2006). Treatment of organic pollution in industrial saline wastewater : a literature review. *Water research*, volume 40, numéro 20, p. 3671 - 3682.
- Lefebvre, O., Vasudevan, N., Torrijos, M., Thanasekaran, K., & Moletta, R. (2005). Halophilic biological treatment of tannery soak liquor in a sequencing batch reactor. *Water research*, volume 39, numéro 8, p. 1471 - 1480.
- Li, Q., Feng, J., Zhang, W., Wang, Y., Gu, Y., Song, C., Wang, S. (2013). Treatment of high-salinity chemical wastewater by indigenous bacteria – bioaugmented contact oxidation. *Bioresource Technology*, volume 144, p. 380–386.
- Linaric, M., Markic, M., & Sipos, L. (2013). High salinity wastewater treatment. *Water Science & Technology*, volume 68, numéro 6, p. 1400-1405.
- Lozach, E. (2001). *Le sel et les microorganismes*. Thèse de doctorat, Faculté de médecine de Créteil, Paris, France, 146 p.
- Lu, J., Yan, X., Ma, Y.F., Tian, C.X., & Ding, J.C. (2014). Impact of salinity on treatment of saline wastewater by sequencing batch biofilm reactor process. *Journal of Central South University*, volume 21, p. 1989-1994.

- Ma, F., Guo, J.B., Zhaoc, L.J., Chang, C.C. (2009). Application of bioaugmentation to improve the activated sludge system into the contact oxidation system treating petrochemical wastewater. *Bioresource Technology*, volume 100, numéro 2, p. 597–602.
- Malcolm Pirnie Inc. (1999). *Evaluation of The Fate and Transport of Methanol in The Environment*. Dans Malcolm Pirnie, Inc.  
<http://www.methanol.org/Environment/Resources/Environment/MP-Methanol-Fate.aspx>  
(page consultée le 15 Janvier 2011).
- Mancini, G., Lanciotti, E., & Bruno, M. (2010). Chemical-physical and biological treatment of high salinity wastewaters contaminated by oily xenobiotic compounds. *Chemical Engineering transactions*, volume 20.
- Mille, G., Almallah, M., Bianchi, M., Van Wambeke, F., & Bertrand, J. (1991). Effect of salinity on petroleum biodegradation. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, volume 339, p. 788-791.
- Mongomery, D. C. (2005). *Design and analysis of experiments*. 6e édition, John Willey and sons, Inc, Hoboken, New-Jersey, USA, 643 p.
- Nielsen, D. L., Brock, A. A., Rees, G. N., & Baldwin, D. S. (2003). Effects of increasing salinity on freshwater ecosystems in Australia. *Australian Journal of Botany*, volume 51, p. 655-665.
- Novak, J. T., Goldsmith, C. D., Benoit, R. E., & O'Brien, J. H. (1987). Biodegradation of methanol and tertiary butyl alcohol in subsurface systems. *Water Science Technology*, volume 17, numéro 9, p. 71-55.
- Novitsky, T. J., & Kushner, D. (1975). Influence of temperature and salt concentration on the growth of a facultatively halophilic *Micrococcus* sp. *Canadian Journal of Microbiology*, volume 21, p. 107-110.
- Novitsky, T., & Kushner, D. (1976). *Planococcus halophilus* sp.nov., a facultatively halophilic coccus. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, volume 26, numéro 1, p. 53-57.
- Oren, A. (1999). Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, volume 63, numéro 2, p. 334-348.
- Oren, A. (2002). Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology, and applications. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, volume 28, numéro 1, p. 56-63.

- Panswad, T., & Anan, C. (1999). Specific oxygen, ammonia, and nitrate uptake rates of a biological nutrient removal process treating elevated salinity wastewater. *Bioresource Technology*, volume 70, numéro 3, p. 237–243.
- Perrodin, Y., Volatier, L., Bazin, C., & Boisson, J.-C. (2012). Assessment of ecological risks linked to the discharge of saline effluents into a river. *Environmental Science Pollution Research*, volume 20, numéro 3, p.1450-1460.
- Raeid, A. M., Kohls, K., & de Beer, D. (2007). Effect of salinity changes on the bacterial diversity, photosynthesis and oxygen consumption of cyanobacterial mats from an intertidal flat of the Arabian Gulf. *Environmental Microbiology*, volume 9, numéro 6, p. 1384–1392.
- Ramos-Cormenzana, A. (1993). Ecology of moderately halophilic bacteria. Dans R. H. Vreeland, & L. I. Hochstein, *The biology of halophilic bacteria*, CRC Press, Floride, USA, p. 55-103.
- Rice, E. W., & Bridgewater, L. (2012). *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 22e édition. American Public Health Association, Washington, D.C., USA, 1080 p.
- Roberts, M. F. (2005). Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic. *Saline Systems*, volume 1, numéro 5, p. 1-5.
- Rodhes, M. E. (2011). *The diversity and Coping Mechanisms Of Life Inhabiting The Hypersaline Dead Sea*. Thèse de doctorat, Pennsylvania State University, Pennsylvania, USA, 143 p.
- Rodriguez-Valera, F. (1993). *Introduction to saline environments*. Dans R. H. Vreeland, & L. I. Hochstein, *The biology of halophilic bacteria*, CRC Press, Floride, USA, p. 1-23.
- Romeo, Y., Bouvier, J., & Guitierrez, C. (2001). La réponse au stress osmotique des bactéries lactiques *Lactococcus lactis* et *Lactobacillus plantarum*. *Lait*, volume 81, numéro 1-2, p. 49-55.
- Russell, N. (1995). Membranes as a target for stress adaptation. *International journal of food and Microbiology*, volume 28, numéro 2, p. 255-261.
- Singlande, E. (2010). *Procédés intégrés couplant l'electrodialyse et le traitement biologique : influence de la composition ionique et application au traitement des effluents salins*. Thèse de doctorat, Université Paul Sabatier, Toulouse, France, 190 p.
- Sivaprakasam, S., Mahadevan, S., Sekar, S., & Rajakumar, S. (2008). Biological treatment of tannery wastewater by using salt-tolerant bacterial strains. *Microbial Cell Factories*, volume 7, numéro 15, p. 1-7.



- Sleator, R. D., & Hill, C. (2001). Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiology Reviews*, volume 26, p.49-71.
- Smith, L. M., Molson, J. & Maloney, K. (2002). *Potential impacts on Groundwater of Pure-Phase Methanol releases*. Dans Methanol institute.  
<https://info.ngwa.org/GWOL/pdf/022676595.PDF> (page consultée le 10 Février 2011).
- Suez environnement, S. (2014). *La gestion de l'eau dans l'industrie du pétrole et du gaz*. Dans Suez environnement. <http://www.emag.suez-environnement.com/gestion-eau-industrie-petrole-gaz-25093> (page consultée le 11 Juillet 2014).
- Telleza, G. T., Nirmalakhandanb, N., & Gardea-Torresdeyc, J. L. (2002). Performance evaluation of an activated sludge system for removing petroleum hydrocarbons from oilfield produced water. *Advances in Environmental Research*, volume 6, numéro 4, p. 455-470.
- Tuin, B., Geerts, R., Westerink, J. B., & van Ginkel, C. (2006). Pretreatment and biotreatment of saline industrial wastewaters. *Water Science and Technology*, volume 53, numéro 3, p. 17-25.
- Uygun, A., & Kargi, F. (2004). Salt inhibition on biological nutrient removal from saline wastewater in a sequencing batch reactor. *Enzyme and Microbial Technology*, volume 34, p. 313-318.
- Ventosa, A., Nieto, J. J., & Oren, A. (1998). Biology of Moderately Halophilic Aerobic Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, volume 62, numéro 2, p. 504.
- Vreeland, R. H. (1987). Mechanisms of halotolerance in microorganisms. *Critical Reviews in Microbiology*, volume 14, numéro 4, p. 311–356.
- Vyrides, I., & Stuckey, D. C. (2009). Adaptation of anaerobic biomass to saline conditions : Role of compatible solutes and extracellulaire polysaccharides. *Enzyme and Microbial Technology*, volume 44, numéro 1, p. 46-51.
- Wang, J.-L., Zhan, X.-M., Feng, Y.-C., & Qian, Y. (2005). Effect of salinity Variations on the Performance of Activated Sludge System. *Biomedical and Environmental Sciences*, volume 18, p. 5-8.
- Wang, Y.-F., Wang, X.-L., L, H., Lin, K.-F., Wang, P., Yang, J., et al. (2014). Treatment of high salinity phenol-laden wastewater using a sequencing batch reactor containing halophilic bacterial community. *International Biodeterioration & Biodegradation*, volume 93, p. 138-144.
- Ward, D., & Brock, T. (1978). Hydrocarbons biodegradation in hypersaline environments. *Applied and Environmental Microbiology*, volume 35, numéro 2, p. 353-359.

- Wiggins, B. A., & Alexander, M. (1988). Role of protozoa in microbial acclimation for mineralization of organic chemicals in sewage. *Canadian journal of Microbiology*, volume 34, numéro 5, p. 661 - 666.
- Williams, W. D., Sherwood, J. E. (1994). Definition and measurement of salinity in salt lakes. *International Journal of Salt Lake Research*, volume 3, p. 53-63.
- Woolard, C. R., & Irvine, R. L. (1994). Biological treatment of hypersaline wastewater by a biofilm of halophilic bacteria. *Water Environment Research*, volume 66, numéro3, p. 230-235.
- Wu, G., Guan, Y., & Zhan, X. (2008). Effect of salinity on the activity, settling and microbial community of activated sludge in sequencing batch reactors treating synthetic saline wastewater. *Water science and technology*, volume 58, numéro 2, p. 351- 358.
- Xiao, Y., & Roberts, D. (2010). A review of anaerobic treatment of saline wastewater. *Environmental Technology*, volume 31, numéro 8-9, p. 1025-1043.
- Yan, N., & Marschner, P. (2012). Response of microbial activity and biomass to increasing salinity depends. *Soil Biology & Biochemistry*, volume 53, p. 50-55.
- Yang, L., Lai, C.-T., & Shieh, W. K. (1999). Biodegradation of dispersed diesel fuel under high salinity conditions. *Water research*, volume 34, numéro 13, p. 3303-3314.
- Yanghong, L., Qinglin, X., Xuehong, Z., Yanpeng, L., Zongqiang, Z., & Taiming, S. (2011). Study on new method of microorganism Acclimation for biological treatment of high-salinity oilfield wastewater. Dans Institute of Electrical and Electronics Engineers, International Conference on Computer Distributed Control and Intelligent Environmental Monitoring, IEEE, Changsha, Hunan, Chine, p. 1760 - 1763
- Zahran, H. H. (1997). Diversity, adaptation and activity of the bacterial flora in saline environments. *Biology and Fertility of Soils*, volume 25, p. 211-223.