

N° d'ordre : 2515

THESE

présentée

pour obtenir

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE

École doctorale : Sciences Ecologiques Vétérinaires Agronomiques et Bioingénieries

Spécialité : Fonctionnement des Ecosystèmes et Agrosystèmes

Par Melle Claire-Emmanuelle MARCATO

ORIGINE, DEVENIR ET IMPACT DU CUIVRE ET DU ZINC DES LISIERS PORCINS. ROLE DE LA DIGESTION ANAEROBIE

Soutenue le 5 octobre 2007 devant le jury composé de :

| | | | |
|-----|--------------------|---|---------------------|
| M. | Nicolas BERNET | Directeur de recherche INRA | Rapporteur |
| M. | Philippe HINSINGER | Directeur de recherche INRA | Rapporteur |
| M. | Jean-Claude REVEL | Professeur, INPT-ENSAT | Président |
| M. | Eric PINELLI | Professeur, INPT-ENSAT | Membre |
| M. | Jean-Louis CRABOS | Directeur adjoint, APESA | Membre |
| Mme | Sylvie COTELLE | Maître de conférences, Université de Metz | Membre |
| Mme | Maritxu GUIRESSE | Maître de conférences, INPT-ENSAT | Directrice de thèse |

Les devises Shadok



EN ESSAYANT CONTINUELLEMENT
ON FINIT PAR RÉUSSIR. DONC:
PLUS ÇA RATE, PLUS ON A
DE CHANCES QUE ÇA MARCHE.

REMERCIEMENTS

Je me dois de remercier tout d'abord les organismes qui ont participé à la production de cette épopée des temps modernes : l'ANRT, l'ADÆSO puis l'APESA, l'ADEME et l'INPT.

Mais ce travail ayant été une telle aventure humaine, ne m'en veuillez pas de plutôt faire la part belle à ses protagonistes...

Il n'existe pas d'aventure sans aventurier. Et pas d'aventurier sans parents. Merci donc à vous deux pour avoir été présents du commencement à l'aboutissement de toutes mes entreprises, et y compris de celle-ci.

De plus, pour faire un bon conte fantastique, il convient d'avoir, outre des parents aimants, une méchante sorcière. Et pour faire face à cette dernière, que peut-il y avoir de mieux que 3 bonnes fées ? Maritxu, Philippe et Eric, je tiens à vous remercier le plus sincèrement pour l'attention et l'accompagnement qui ont été les vôtres et qui ont permis d'atténuer le mauvais sort.

Et que serait un voyage initiatique sans compagnons de route ?

Un très très très grand merci à mon Kéké et à Perrine grâce auxquels j'ai pu développer ma culture télévisuelle et cosmétique, ainsi que prendre un peu de repos pour mieux me relancer dans ma quête. Je ne sais pas comment je vous rendrai la pareille, mais mon amitié vous sera aussi fidèle que vos canapés ont été confortables !

Un tout aussi grand merci à Marie et à Geoff, pour leurs coups de pouce, leur patience, leur compréhension, leur présence, leur clic-clac, et tout le reste... Promis, je vous ferai autant de relectures que vous voudrez !!! Mais n'oubliez pas vos vitamines ! Et pardon Geoff pour Calicéo...

Une pensée également pour tous les occupants des doctotrons, et en particulier Tom, Aurore, Tim et Bouze, et un clin d'œil à Alain pour les heures passées à l'ICP...

Et je m'en voudrais d'oublier ces « petites mains » qui ont travaillé dans l'ombre (c'est la cas de le dire pour ceux qui ont passé des heures sur le microscope)... Merci donc aux différents stagiaires : Sandrine, Leslie, Véro, Alex, Cassien, Warren, Elisa (dans l'ordre d'apparition). Merci également à Eric et Blandine, techniciens de l'APESA, pour leur collaboration et leur autonomie sans lesquelles il aurait été impossible de mener à bien les différents projets.

Et puis, parmi les compagnons de route, il y a ceux de sang. Fred et Juju, je n'ai jamais pris le temps de vous dire merci pour votre présence fraternelle dans les bons (« on est là pour s'amuser, on est là pour s'amuser... ») et les moins bons moments (merci vraiment), alors voilà chose faite. Il y a également ceux qui, malheureusement, ne verront pas le bout du chemin. J'ai une pensée particulière pour tous ces collègues de la première heure, en espérant que leur reconversion forcée a été, est et sera une source de nouveaux épanouissements professionnels.

Remerciements

Et bien sûr, dans toute aventure fantastique, il y a des elfes, dont le rôle peut sembler mineur, mais qui vous donnent le coup de pouce qui va bien, vous tirent d'un mauvais pas et vous remettent sur le sentier de votre graal. Merci donc à l'ensemble des membres du labo et à ceux de ma famille, à Jérôme (SAMU), à Bruno et Claude (SOS-détresse-amitié !), à Amine, mon 3^{ème} frère, à Annette et son service statistique, à Laurette et ses équilibres acide-base, à Mag pour nos goûters du dimanche et tout le reste, et à tous les copains de Toulouse, de Pau et d'ailleurs, trop nombreux pour les citer !

Il est bien entendu impossible d'oublier les ancêtres... A-t-on jamais vu une telle expédition sans un vieux sage qui traîne pour vous prodiguer les riches enseignements de sa longue vie ? Merci donc à mes grands-parents, connus et inconnus, arrachés à leur terre natale et dont le travail et la volonté ont été le salut. A ces valeurs qu'ils nous ont transmises et sans lesquelles j'aurais jeté dix fois l'éponge.

Enfin, à quoi bon une telle quête si elle ne conduit pas à l'amour ? Merci Nanou de m'aider à écrire les dernières pages pour que nous puissions clore l'histoire par le traditionnel « ils vécurent heureux et eurent beaucoup d'enfants »...

AVANT-PROPOS

Ce doctorat a été réalisé entre milieu professionnel et milieu académique dans le cadre d'une convention CIFRE. Cette dualité m'a permis de poursuivre mon parcours professionnel d'ingénieur, entamé dès 2001 en bureau d'études, tout en complétant ma formation scientifique et de recherche. De plus, le projet a été marqué par différents événements de la vie d'une entreprise ou d'un laboratoire, avec leur lot d'enseignements humains. Ainsi, dès la deuxième année, l'ADÆSO (Association pour le Développement Agro-Environnemental du Sud-Ouest), premier partenaire industriel, dont les activités principales étaient l'expérimentation en élevage porcin et pour le traitement des déchets organiques a dû arrêter ses activités. Une cession de branche d'activité a alors été opérée pour les prestations relatives au traitement de la matière organique. L'APESA (Association Pour la Sécurité et l'Environnement en Aquitaine) ayant repris ces activités, elle est devenue le partenaire industriel d'une seconde convention CIFRE, avec une priorité donnée à la pollution des sols et à la bioindication, modifiant ainsi les orientations du projet. Puis, au cours de la troisième année, le laboratoire AEE (Agronomie Environnement Ecotoxicologie) de l'ENSAT (Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse) a fusionné avec les laboratoires LEH (Laboratoire d'Ecologie des Hydrosystèmes) et LadyBio (Laboratoire Dynamique de la Biodiversité) de l'UPS (Université Paul Sabatier, Toulouse), ainsi qu'avec une partie du LMTG (Laboratoire des Mécanismes et Transferts en Géologie) pour devenir l'unité mixte de recherche ECOLAB, laboratoire d'écologie fonctionnelle (UMR 5245 CNRS/UPS/INPT ENSAT). Enfin, le doctorat s'est déroulé entre deux régions, Aquitaine et Midi-Pyrénées, se traduisant par un excellent apprentissage du travail à distance, relativement aisé pour les opérations pratiquées en routine dans chacun des laboratoires, mais très délicat pour les expérimentations innovantes pour l'une ou l'autre des équipes.

Ce projet a permis de constituer un véritable pont entre les différentes structures. Les thèmes développés par une partie, tels que la méthanisation et le traitement biologique des déchets organiques (ADÆSO), la gestion des sols pollués (APESA), l'écotoxicologie (AEE) ou encore l'agronomie et le retour au sol des déchets organiques (ADÆSO, AEE), ont pu être valorisés mutuellement.

Ainsi, l'expérience de l'ADÆSO en terme d'élevage porcin et de gestion des lisiers (méthanisation, séparation, stockage et épandage) a servi de base au travail de doctorat. De même, les savoirs et savoir-faire de AEE en écotoxicologie, et en particulier pour l'évaluation de la génotoxicité chez *Vicia faba*, ont pu être utilisés par l'APESA dans le cadre de projets sur les sols pollués.

Au cours de la période correspondant au doctorat, j'ai ainsi pu participer à différents projets qui ont conduit à la publication par les différents partenaires de travaux relatifs au traitement de la matière organique et à la contamination des sols. Parmi ces publications, un article accepté pour parution dans la revue *Bioresource Technology* est présenté dans ce mémoire (chapitre 1 partie II).

Cependant, d'autres travaux n'ayant pas un lien direct avec le doctorat ne seront pas détaillés ici. Voici donc une liste non exhaustive des différentes publications de travaux auxquels j'ai participé depuis avril 2004.

Marcato C.E., Pinelli E., Pouech P., Winterton P., Guiresse M., 2007. Particle size and metal distributions in anaerobically digested pig slurry. *Bioresource Technology*, **in press**.

Marcato C.E., Pinelli P., Pouech P., Alric A., Guiresse M., 2007. Macro and micronutrients in anaerobic digested pig slurry: recovery of Ca and Mg-Phosphates and fate of Cu and Zn in fields. *In: OTEANE, 1st International Scientific Symposium on trace elements in animal production system*, 14-15 June 2007, Geneva.

Marcato C.E., Pouech P., Theobald O., Guiresse M., 2007. Influence de la méthanisation des lisiers de porcs sur la biodisponibilité du cuivre et du zinc. *Journée de la Recherche Porcine*, 39, 55-60.

APESA, 2006. Vers une double valorisation des résidus de l'industrie de la conserve végétale. Rapport final d'étude, 30 p.

APESA, ENSAT, 2006. Développement d'une méthode d'évaluation des effets génotoxiques d'un sol pollué sur des végétaux supérieurs par l'évaluation de la fréquence d'apparition de micro-noyaux chez *Vicia faba*. Rapport d'étude, 12 p.

CNTA, CENER, APESA, 2006. Hacia una doble valorización de los residuos de la industria de las conservas vegetales. Rapport d'étude, 113 p.

Marcato C.E., Pouech P., Crabos J.L., 2006. Amélioration du traitement par digestion anaérobie de résidus gras dans des boues d'assainissement. *4^{ème} Journée Technique Eaux et Déchets, « Quelles avancées pour la gestion des résidus solides et gazeux du traitement des eaux usées ? »*, Toulouse (France), 8 et 9 juin 2006.

APESA, ENSAT, UPPA, 2005. Méthavalorg, la méthanisation appliquée à la valorisation agricole des effluents d'élevage et de la matière organique. Rapport final d'étude, 96 p.

Pouech P., Coudure R., Marcato C.E., 2005. Intérêt de la co-digestion pour la valorisation des lisiers et le traitement de déchets fermentescibles à l'échelle d'un territoire. *Journées de la Recherche Porcine*, 37, 39-44.

Coudure R., Marcato C.E., Pouech P., Desauziers V., Hort C., Platel V., Pecheyran C., Pinel P., Dhuicq T., 2005. Etude d'un procédé de co-compostage à base de plumes et de fientes de volailles pour maîtriser le processus de biodégradation et les nuisances olfactives. *Journée partenariat Recherche-Industrie du Pôle Environnement Aquitain*, Talence (France), 14 juin 2005.

Enfin, ce travail a donné lieu à des stages de formation par la recherche que j'ai co-encadrés et qui se sont finalisés par des rapports et des soutenances :

BILLAULT Véronique, 2005. Etude de l'impact phytotoxique et génotoxique des éléments cuivre et zinc du lisier. Travail personnel encadré, Master Eau, sols et environnement, Université Paul Sabatier.

FLUCHERES Sandrine, 2004. Stage Cycle Préparatoire Polytechnique, Institut National Polytechnique de Toulouse.

LEBRUN Xavier, 2004. Valorisation de la Matière Organique et Energie Renouvelable. Stage ingénieur de fin d'études, Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse.

LOUBIERE-DESORTIAUX Cassien, 2006. Toxicité et génotoxicité du cuivre et du zinc chez *Vicia faba*. Stage Cycle Préparatoire Polytechnique, Institut National Polytechnique de Toulouse.

MOVIA Alexandre, 2006. Impact du lisier brut et méthanisé sur *Vicia faba* par l'action supposée du cuivre et du zinc – Evaluation du transfert sol-plante et de l'effet génotoxique. Diplôme de Recherche Universitaire, Institut National Polytechnique de Toulouse.

ROUSSEL Leslie, 2005. Digestion anaérobie d'effluents industriels en pilote continu et valorisation agronomique des digestats. Diplôme Universitaire de Formation Appliquée aux Sciences et Techniques, Université de Pau et des Pays de l'Adour.

ROUSSEL Leslie, 2004. Mise au point de méthodes pour l'analyse rapide d'effluents d'élevage par spectrophotométrie. Stage de maîtrise, Université de Pau et des Pays de l'Adour.

SAMPARA Warren, 2006. Développement d'une méthode d'évaluation de la génotoxicité du cuivre et du zinc par la détermination de la fréquence d'apparition de micro-noyaux sur les racines de *Vicia faba*. Stage, Ecole d'ingénieurs de Purpan.

TABLE DES MATIERES

| | |
|--|----|
| Liste des abréviations | 1 |
| Liste des illustrations | 3 |
| Liste des tableaux..... | 5 |
| | |
| Introduction générale..... | 7 |
| | |
| Partie I | |
| Chapitre I : Origine et enjeux environnementaux des lisiers porcins..... | 13 |
| 1. Présentation générale de la production porcine française | 13 |
| 2. l'Alimentation en élevage porcin..... | 14 |
| 2.1. Rations alimentaires | 14 |
| 2.2. Le cuivre et le zinc dans l'alimentation porcine | 15 |
| 2.2.1. Le cuivre | 15 |
| 2.2.2. Le zinc | 16 |
| 2.3. Carences et excès | 17 |
| 3. Composition des lisiers porcins | 18 |
| 3.1. Nature et composition des effluents | 18 |
| 3.2. Alimentation et diminution des rejets en cuivre et en zinc..... | 19 |
| 4. Enjeux environnementaux de la gestion des lisiers porcins | 20 |
| 4.1. Pollution de l'air | 21 |
| 4.2. Pollution de l'eau | 22 |
| 4.3. Pollution du sol | 22 |
| Chapitre II : La digestion anaérobie ou méthanisation | 25 |
| 1. Généralités sur la méthanisation..... | 25 |
| 1.1. Les bases biochimiques | 25 |
| 1.2. Paramètres controlant la méthanisation | 27 |
| 2. Devenir de la matière organique et des ETM..... | 30 |
| 2.1. Devenir de la matière organique | 31 |
| 2.2. Devenir des éléments traces métalliques..... | 33 |
| 3. La methanisation des lisiers porcins | 34 |
| 3.1. Intérêts de la digestion anaérobie des lisiers porcins..... | 35 |
| 3.2. Contraintes de la digestion anaérobie des lisiers porcins | 37 |
| Chapitre III : Cuivre et zinc dans le système sol-plante | 41 |
| 1. Dynamique du cuivre et du Zinc dans le sol | 41 |
| 1.1. Terminologie | 41 |
| 1.2. Distribution de Cu et Zn dans le sol..... | 42 |
| 1.3. La mobilité chimique de Cu et Zn | 44 |

| | | |
|---------------|--|----|
| 2. | Phyto-absorption et translocation du cu et du zn | 46 |
| 2.1. | Rôles du Cu et du Zn chez les végétaux..... | 46 |
| 2.1.1. | Cuivre | 46 |
| 2.1.2. | Rôle du zinc..... | 46 |
| 2.2. | Mécanismes d'absorption du cuivre et du zinc..... | 47 |
| 2.3. | Translocation du Cu et du Zn | 50 |
| 3. | Introduction à la notion de phytodisponibilité | 51 |
| 3.1. | Déterminants chimiques | 52 |
| 3.2. | Déterminants Physiques..... | 52 |
| 3.3. | Déterminants Biologiques..... | 53 |
| 3.4. | Particularités du zinc..... | 54 |
| Chapitre IV : | Evaluation de l'impact des apports anthropiques aux sols de Cu et Zn | 55 |
| 1. | Mobilité, Phytodisponibilité et risques de phytotoxicité | 55 |
| 1.1. | Approche chimique | 55 |
| 1.2. | Approche biologique | 60 |
| 2. | Stress oxydant et génotoxicité | 62 |
| 2.1. | Mécanismes du stress oxydant | 62 |
| 2.2. | Altérations de l'ADN du fait du stress oxydant | 65 |
| 2.3. | Tests à court terme d'évaluation de la génotoxicité | 67 |
| Conclusions | | 71 |

Partie II

| | | |
|--------------|--|----|
| Chapitre I : | Travaux préliminaires sur la répartition du cuivre et du zinc dans les lisiers | 75 |
| 1. | Introduction..... | 75 |
| 2. | Présentation générale du site d'élevage et de l'unité de méthanisation de Montardon | 75 |
| 3. | Particle size and metal distributions in anaerobically digested pig slurry | 78 |
| 3.1. | Introduction | 79 |
| 3.2. | Method | 80 |
| 3.2.1. | Anaerobic digestion unit and sample collection | 80 |
| 3.2.2. | Analysis | 81 |
| 3.2.3. | Calculations | 82 |
| 3.3. | Results and discussion | 82 |
| 3.3.1. | Nutrients and metals in the different slurries..... | 82 |
| 3.3.2. | Mass balances of micro and macro nutrients in the anaerobic digestion plant | 84 |
| 3.3.3. | Particle size and elemental distribution..... | 85 |
| 3.4. | Conclusion | 89 |
| 4. | Methodologie mise en Œuvre dans la suite de l'étude a partir de ces premiers résultats | 93 |
| 4.1. | Flux d'éléments apportés au sol par les épandages | 93 |

| | | |
|----------------|--|-----|
| 4.2. | Obtention des concentrés de lisiers | 94 |
| 4.3. | Autres éléments de matériel et méthode communs à l'ensemble de l'étude | 96 |
| 4.3.1. | Analyse des éléments métalliques par ICP-OES | 96 |
| 4.3.2. | Le sol | 96 |
| 4.3.3. | La fève | 97 |
| Chapitre II : | Caractérisation de la matière organique et distribution de Cu et Zn dans les « concentrés de lisiers » | 99 |
| 1. | Introduction | 99 |
| 2. | Matériel et méthode | 100 |
| 2.1. | Caractérisation de la matière organique des lisiers | 100 |
| 2.1.1. | Caractérisation fonctionnelle par spectroscopie infrarouge (FT-IR) | 100 |
| 2.1.2. | Caractérisation Biochimique de la Matière (CBM) et détermination de l'Indice de Stabilité Biologique (ISB) | 101 |
| 2.1.3. | Analyse élémentaire | 102 |
| 2.1.4. | Minéralisation du carbone en sol | 103 |
| 2.2. | Fractionnement chimique du cuivre et du zinc | 103 |
| 2.3. | pH et mise en solution du cuivre et du zinc | 105 |
| 3. | Résultats et discussion | 105 |
| 3.1. | Caractérisation de la matière organique des lisiers | 105 |
| 3.1.1. | Caractérisation fonctionnelle par spectroscopie infrarouge (FT-IR) | 105 |
| 3.1.2. | CBM et détermination de l'ISB | 107 |
| 3.1.3. | Analyse élémentaire | 109 |
| 3.1.4. | Minéralisation du carbone en sol | 111 |
| 3.2. | Fractionnement chimique du cuivre et du zinc | 112 |
| 3.3. | pH et mise en solution du cuivre et du zinc | 115 |
| 4. | Discussion | 117 |
| Chapitre III : | Evaluation de la phytodisponibilité du Cu et du Zn apportés au sol par épandage de lisiers brut ou méthanisé | 119 |
| 1. | Introduction | 119 |
| 2. | Matériels et méthodes | 120 |
| 2.1. | Préparation des supports de culture | 120 |
| 2.2. | Culture et récolte | 121 |
| 2.3. | Analyses et exploitation | 121 |
| 3. | Résultats et discussion | 122 |
| 3.1. | Biomasse et état nutritionnel en cuivre et zinc | 122 |
| 3.2. | Absorption et translocation du cuivre dans la plante | 126 |
| 3.3. | Absorption et translocation du zinc dans la plante | 129 |
| 4. | Conclusion | 133 |
| Chapitre IV : | Evaluation des effets génotoxiques | 135 |
| 1. | Introduction | 135 |

| | | |
|--------|---|-----|
| 2. | Matériel et méthode..... | 136 |
| 2.1. | Développement d'une méthode d'évaluation de la génotoxicité d'un sol par exposition directe | 136 |
| 2.1.1. | Mise en place d'un référentiel | 136 |
| 2.1.2. | Validation de la méthode d'évaluation de la génotoxicité d'un sol par contact direct – Application aux sols de Montardon (64) | 139 |
| 2.2. | Génotoxicité du Cuivre et du Zinc des lisiers | 141 |
| 3. | Résultats et discussion..... | 142 |
| 3.1. | Développement d'une méthode d'évaluation de la génotoxicité d'un sol par exposition directe | 142 |
| 3.1.1. | Mise en place d'un référentiel | 142 |
| 3.2. | Validation de la méthode avec les sols de Montardon | 145 |
| 3.2.1. | Analyses chimiques des sols de Montardon | 146 |
| 3.2.2. | Test des micronoyaux | 146 |
| 3.3. | Génotoxicité du Cuivre et du Zinc des lisiers | 148 |
| 3.3.1. | Composition des solutions de lisier..... | 148 |
| 3.3.2. | Test des micronoyaux | 149 |
| 4. | Conclusion | 155 |
| | Conclusion générale et perspectives | 157 |
| 1. | Caractérisation des lisiers avant et après traitement par méthanisation | 158 |
| 2. | Evaluation de la phytodisponibilité de Cu et Zn des lisiers brut et méthanisé | 161 |
| 3. | Evaluation de la génotoxicité de Cu et Zn des lisiers brut et méthanisé..... | 163 |
| | Références bibliographiques | 165 |
| | Annexes..... | 178 |

LISTE DES ABREVIATIONS

| | |
|---------|---|
| ADÆSO | Association pour le Développement Agro-Environnemental du Sud-Ouest |
| ADEME | Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie |
| ADF | Acid Detergent Fiber |
| ADL | Acid Detergent Lignin |
| ADN | Acides DésoxyriboNucléique |
| AFNOR | Association Française de NORmalisation |
| ANOVA | ANalysis Of VAriance |
| APESA | Association Pour l'Environnement et la Sécurité en Aquitaine |
| BCR | Bureau Communautaire de Référence |
| CA | Coefficient d'Absorption |
| CAU | Coefficient Apparent d'Utilisation |
| CBM | Caractérisation Biochimique de la Matière |
| CEC | Capacité d'Echange Cationique |
| CEW | Cellulose de Weende |
| CT | Coefficient de Translocation |
| DA | Digestion anaérobie |
| DM | Dry Matter |
| DMSO | Diméthul Sulfoxyde |
| DS | Digested Slurry |
| DTPA | Acide Diéthylène TriaminoPentaacétique |
| EDTA | Acide Ethylène DiaminoTétracétique |
| EEC | European Economic Community |
| ERO | Espèces Réactives de l'Oxygène |
| ETM | Elément Trace Métallique |
| F | Filtrat |
| F | Sol forestier (Montardon) |
| FS | Fraction solide |
| FT-IR | Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier |
| HAP | Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques |
| HEM | HEMicellulose |
| HM | Hydrazide Maléique |
| ICP-MS | Inducted Coupled Plasma – Mass Spectrometry |
| ICP-OES | Inducted Coupled Plasma – Optical Emission Spectrometry |
| IM | Indice Mitotique |
| INRA | Institut National de la Recherche Agronomique |
| ISB | Indice Biologique de Stabilité |
| L | Sol agricole avec apport de lisier (Montardon) |

| | |
|-----------------|--|
| LB | Lisier brut |
| LF | Liquid Fraction |
| LIC | Lignine |
| LM | Lisier méthanisé |
| LUFA | Landwirtschaftliche Untersuchungs- und Forschungs - Anstalt |
| MN | Micronoyaux |
| MO | Matière Organique ; obtenue par calcination à 550°C |
| MS | Matière Sèche ; obtenue par séchage à 105°C |
| MSV | Matière Sèche Volatile ; obtenue par calcination à 550°C |
| NADP | Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate; coenzyme d'oxydoréduction |
| NADPH | Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate (forme réduite) |
| NDF | Neutral Detergent Fiber |
| Nm ³ | Normo m ³ ; volume ramené aux conditions standards de pression et température (1 bar absolu et 273°K) |
| PB | Produit brut |
| PCB | Polychlorobiphényles |
| PM | Poids Moléculaire |
| RS | Raw Slurry |
| SEM-EDS | Scanning Electron Microscopy - Energy Dispersive X-ray Spectroscopy |
| SF | Solid Fraction |
| SL | Sol agricole sans apport de lisier (Montardon) |
| SOL | fraction SOLuble |
| SSA | Specific Surface Area |
| T | Témoin |
| VS | Volatil Solids |

LISTE DES ILLUSTRATIONS

| | |
|--|----|
| Figure 1 : Répartition de la production porcine française exprimée en nombre de porcs par canton (extrait de Agreste, 2002)..... | 13 |
| Figure 2 : Transformation de l'énergie d'un aliment et expressions de la valeur énergétique en % de l'énergie brute (extrait de Institut Technique du Porc, 2000)..... | 15 |
| Figure 3 : Différents types de pollution (air, eau, sol) liés aux activités d'élevage (extrait de Snell-Castro, 2004) | 21 |
| Figure 4 : Voies de dégradation de la matière organique sous conditions anaérobies méthanogène (d'après Zeikus, 1982 ; De La Farge, 1995 ; Marchaim, 1992)..... | 25 |
| Figure 5 : Composantes principales des digesteurs installés dans les exploitations agricoles (d'après Burton et Turner, 2003)..... | 29 |
| Figure 6 : Autres procédés que ceux utilisés pour la production de biogaz agricole (d'après Moletta, 2005). A : arrivée d'effluent à traiter ; S : sortie de l'effluent traité ; G : récupération du biogaz ; R : recyclage..... | 30 |
| Figure 7 : Classification de la matière organique selon le critère de Levine (d'après Shon et Vigneswaran, 2006) | 31 |
| Figure 8 : Diagrammes Eh-pH pour le cuivre et le zinc (extrait de Theis et Hayes, 1978)..... | 33 |
| Figure 9 : Similitude de fonctionnement entre les biotopes anaérobies naturels ou contrôlés (a) et les environnements intestinaux animaux (b). Extrait de Garcia <i>et al.</i> , 2000. Les pourcentages indiquent le flux de C, et les traits pointillés traduisent une diminution des flux dans la chaîne trophique | 35 |
| Figure 10 : Intérêts de la digestion anaérobie des lisiers porcins | 39 |
| Figure 11 : Courbe de croissance en réponse au statut nutritionnel de la plante en oligo-élément essentiel (Morard, 1995 ; Kabata-Pendias et Pendias, 1992) | 41 |
| Figure 12 : Phases porteuses des éléments traces métalliques dans le sol (Baize, 1997)..... | 42 |
| Figure 13 : Profils des teneurs totales et extractibles en Cu et Zn dans les sols de Boulbènes, Haute-Garonne (Gavalda, 2001). En noir ce sont les concentrations dans la matrice, en bleu dans les zones réduites, en rouge dans les zones oxydées..... | 43 |
| Figure 14 : Adsorption de différents cations bivalents aux oxy-hydroxydes de fer en fonction du pH (d'après Morel, 1998) | 45 |
| Figure 15 : Effet du pH du sol sur le passage en solution du cuivre et du zinc (extrait de Tyler & Olsson, 2001)..... | 45 |
| Figure 16 : Coupe longitudinale de racine ; principaux tissus..... | 48 |
| Figure 17 : Coupe d'une racine (d'après Bourbonnais, 2007) | 48 |
| Figure 18 : Structure de l'endoderme et passage des éléments par la voie symplastique du fait de la présence de cellules subérisées au niveau des bandes de Caspary (d'après Bourbonnais, 2007)..... | 49 |

| | |
|--|-----|
| Figure 19 : Concentration en Cu dans les racines et les parties aériennes de <i>Zea mays</i> en fonction de la concentration en cuivre extractible au CaCl ₂ (d'après Brun <i>et al.</i> , 2001)..... | 50 |
| Figure 20 : Facteurs influençant la phytodisponibilité du zinc pour les végétaux (extrait de Alloway, 2004)..... | 54 |
| Figure 21 : Concentration en Cu mesurée dans les parties aériennes de <i>Lepidium heterophyllum</i> (en MS) en fonction du Cu extrait à l'EDTA (d'après Zhang <i>et al.</i> , 2001)..... | 56 |
| Figure 22 : Voies de production et de destruction des ERO dans les tissus végétaux – Cycle de Halliwell-Asada (d'après Lagadic <i>et al.</i> , 1997)..... | 64 |
| Figure 23 : Mécanismes de stress oxydatif conduisant à l'apparition de micronoyaux par clastogénèse chez les végétaux | 66 |
| Figure 24 : Efficacité de séparation par centrifugation de la matière sèche, Cu et Zn des lisiers | 95 |
| Figure 25 : Spectres FT-IR des lisiers brut et méthanisé | 106 |
| Figure 26 : CBM des lisiers brut et méthanisé | 107 |
| Figure 27 : Cinétique de minéralisation du carbone des lisier brut et méthanisé | 111 |
| Figure 28 : Répartition du cuivre et du zinc dans les différentes fractions..... | 112 |
| Figure 29 : Efficacité de séparation du cuivre et du zinc par centrifugation des lisiers en fonction de la proportion d'élément extrait à la soude dans l'extraction séquentielle | 113 |
| Figure 30 : Mise en solution du cuivre et du zinc des lisiers en fonction du pH..... | 116 |
| Figure 31 : Quantité totale de Cu absorbé par la fève et le maïs en fonction de la biomasse totale..... | 128 |
| Figure 32 : Coefficient Apparent d'Utilisation du cuivre pour les deux cultures en fonction des organes | 129 |
| Figure 33 : Teneurs en zinc dans les parties aériennes en fonction du pH du milieu de culture..... | 131 |
| Figure 34 : Quantité totale de Zn absorbé en fonction de la biomasse totale produite par la fève et le maïs | 132 |
| Figure 35 : Coefficient Apparent d'Utilisation du zinc pour les deux cultures en fonction des organes | 132 |
| Figure 36 : Méthodologie pour la mise en place d'un référentiel pour l'évaluation de la génotoxicité d'un sol par contact direct..... | 137 |
| Figure 37 : Points de prélèvement des sols du « Triplet Montardon » (F : sol forestier ; SL : sol agricole fertilisation minérale ; L : sol agricole ayant reçu des lisiers méthanisés) | 139 |
| Figure 38 : Induction de micronoyaux en fonction du cuivre et du zinc total | 152 |
| Figure 39 : Induction de micronoyaux en fonction du cuivre dissous (< 0,45 µm)..... | 153 |
| | |
| Photo 1 : Système d'épandage avec enfouissement direct | 37 |
| Photo 2 : Provenance des lisiers de la station zootechnique..... | 76 |
| Photo 3 : Unité de méthanisation (digesteur)..... | 77 |
| Photo 4 : Gousse, tiges, feuilles et fleurs de <i>Vicia faba</i> | 97 |
| Photo 5 : Fèves à la récolte..... | 124 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|---|-----|
| Tableau 1 : Composition des lisiers porcins décrits par Béline F. (2001), Levasseur P. (2002), Snell-Castro (2004), Sanchez et Gonzalez (2005)..... | 18 |
| Tableau 2 : Teneur en cuivre et en zinc de lisiers porcins issus d'élevages français et européens selon différents auteurs..... | 19 |
| Tableau 3 : Teneurs maximales en cuivre et en zinc dans les aliments pour porcs..... | 19 |
| Tableau 4 : Principales réactions impliquées dans le processus de méthanisation..... | 27 |
| Tableau 5 : Abattements de la matière sèche volatile obtenus par digestion anaérobie pour différents substrats..... | 32 |
| Tableau 6 : Prélèvements de Cu et Zn par différentes cultures (Loué, 1993)..... | 51 |
| Tableau 7 : Principaux schémas d'extraction séquentielle utilisés pour évaluer la distribution des ETM en sol ou sur des produits organiques..... | 58 |
| Tableau 8 : Exemple de bioessais pour la détermination d'effets génotoxiques..... | 67 |
| Tableau 9 : Bilan des apports au champ par campagne d'épandage (kg.ha ⁻¹ .an ⁻¹)..... | 93 |
| Tableau 10 : Protocoles d'extraction des métaux en fonction du produit à analyser..... | 96 |
| Tableau 11 : Caractéristiques du sol utilisé pour les essais de phytodisponibilité et de minéralisation du carbone organique..... | 97 |
| Tableau 12 : Relations linéaires pour le calcul des groupements fonctionnels, avec X le degré de dépolymérisation (Tardy <i>et al.</i> , 2005)..... | 103 |
| Tableau 13 : Répartition du cuivre et du zinc dans les différentes fractions biochimiques..... | 108 |
| Tableau 14 : Analyse élémentaire des concentrés de lisier (% MS)..... | 109 |
| Tableau 15 : Groupements atomiques fictifs (moles) calculés à partir de l'analyse élémentaire..... | 109 |
| Tableau 16 : Groupes fonctionnels et poids moléculaires des concentrés de lisiers estimés par approche thermodynamique..... | 110 |
| Tableau 17 : Composition des supports de culture dans les essais d'évaluation de la phytodisponibilité..... | 120 |
| Tableau 18 : Biomasse et teneurs en Cu et Zn dans le maïs..... | 122 |
| Tableau 19 : Biomasse et teneurs en Cu et Zn dans la fève..... | 123 |
| Tableau 20 : Coefficients d'absorption et de translocation du cuivre..... | 127 |
| Tableau 21 : Coefficients d'absorption et de translocation du zinc..... | 130 |
| Tableau 22 : Caractéristiques des sols de l'essai..... | 136 |
| Tableau 23 : Caractéristiques des sols de l'étude..... | 140 |
| Tableau 24 : Concentration des solutions minérales de cuivre et de zinc..... | 142 |
| Tableau 25 : Résultats du test des micronoyaux selon la méthode normalisée..... | 143 |
| Tableau 26 : Résultats du test des micronoyaux par contact direct..... | 143 |
| Tableau 27 : Teneurs en éléments traces métalliques de sols et des lixiviats..... | 146 |
| Tableau 28 : Indice mitotique et micronoyaux induits par les sols de Montardon et leur lixiviat..... | 147 |

Tableau 29 : Compositions des fractions solides de lisier et des solutions résultantes148

Tableau 30 : Indices mitotiques et micronoyaux induits par les solutions de lisier et les
solutions minérales.....150

INTRODUCTION GENERALE

Au cours du XX^{ème} siècle, l'agriculture a connu les plus grandes évolutions de son histoire pour devenir une activité intensive. Cette mutation s'est opérée tant pour la culture que pour l'élevage, et en particulier l'élevage porcin, le paysan devenant agriculteur ou/et éleveur.

Dans le domaine de l'élevage, la modernisation et l'intensification ont conduit à une concentration géographique et à des changements radicaux des techniques. Parmi ces évolutions, l'apparition d'un logement des animaux sur caillebotis s'est traduit par la production de lisier (mélange liquide des fèces et des urines) et non plus de fumier. Cette technique permet un gain de temps de travail important du fait de la facilité de manutention du lisier par rapport à un produit solide, et présente un grand intérêt agronomique. Une autre transformation majeure de l'élevage a concerné l'alimentation des animaux qui bénéficient aujourd'hui de rations alimentaires très spécifiques, correspondant aux besoins (énergie, azote, minéraux et vitamines) de chaque stade de croissance. Parmi les minéraux indispensables, le cuivre et le zinc occupent une place importante, car ils jouent un rôle métabolique (synthèse de l'hémoglobine pour le cuivre, métabolisme protéique et énergétique pour le zinc). Le cuivre est ainsi ajouté aux rations alimentaires en tant que facteur de croissance, tandis que le zinc permet d'éviter tout risque de lésion cutanée (parakératose). Cependant, le taux d'assimilation de ces oligo-éléments par les animaux est faible, et ils doivent donc être apportés en excès, ce pourquoi ils se retrouvent en quantités importantes dans les déjections et donc dans les lisiers. Ainsi, malgré leurs avantages techniques évidents, le logement sur caillebotis et la production de lisier peuvent induire des nuisances olfactives et des pollutions par rapport au milieu récepteur lorsque les doses épandues dans les champs ne correspondent pas aux besoins des cultures.

L'épandage des déjections animales sur les terres agricoles contribue au recyclage d'éléments nutritifs comme l'azote et le phosphore ainsi qu'à l'apport de matière organique. C'est la raison pour laquelle cette pratique est ancestrale mais toujours d'actualité dans la mesure où elle s'inscrit dans le cadre d'un développement durable. L'épandage permet en effet de s'affranchir d'une dépense énergétique pour la production de fertilisants minéraux, mais également de stocker du carbone organique dans le sol. Cependant, à court terme, les apports massifs d'azote et de phosphore du fait de l'épandage de lisiers peuvent conduire à l'eutrophisation des milieux et des eaux en particulier. A long terme ce sont les oligo-éléments tels que le cuivre et le zinc qui s'accumulent dans les sols de surface et peuvent constituer un risque environnemental, lorsque les épandages se répètent sur un nombre d'années important. C'est la raison pour laquelle des procédés de traitement des lisiers ont été mis en œuvre dans les régions où l'activité d'élevage est importante, de façon à maîtriser au mieux les nuisances potentielles.

Parmi ces procédés, la digestion anaérobie, ou méthanisation, présente les avantages de désodoriser le lisier et de produire une énergie renouvelable sous forme de biogaz, un mélange de méthane et de dioxyde de carbone. Ce traitement résulte de plusieurs siècles de domestication de la production d'un gaz naturellement présent dans les milieux non aérés tels que les marais, où le

phénomène a été découvert par Shirley au XVII^{ème} siècle. Étudié au début du XIX^{ème} siècle d'un point de vue agronomique (évolution de la matière organique), il faudra attendre 1884 pour que Pasteur révèle l'intérêt du procédé en tant que source d'énergie utilisable pour le chauffage et l'éclairage. Dès lors, de nombreux travaux seront conduits pour l'optimisation et la maîtrise de la digestion anaérobie, conduisant à la mise en place d'unités dans les stations d'épuration dans un premier temps (milieu du XX^{ème} siècle) ; dans les élevages, la technique s'est développée à la fin des années 70, suite aux chocs pétroliers.

La digestion anaérobie a été énormément étudiée sous un angle de production d'énergie renouvelable. Cependant, peu d'études ont été réalisées sur les lisiers issus d'un traitement par digestion anaérobie, en particulier en ce qui concerne les éléments traces métalliques. Le présent travail vise donc à caractériser les impacts agronomiques et écotoxicologiques des épandages de lisiers générant des flux importants de cuivre et de zinc à des échelles de temps de plusieurs décennies ainsi que de préciser le rôle du traitement préalable des lisiers par méthanisation sur le devenir et l'impact de ces métaux. Ces problématiques ont été appréhendées en couplant une approche physico-chimique et une approche biologique. Sur le site d'étude, seuls des lisiers traités par digestion anaérobie ont été épandus depuis la mise en service de l'unité de traitement il y a plus de 20 ans. Ainsi, il était impossible de comparer, à partir d'échantillons de sols réels, les effets d'un épandage de lisier ou de lisier méthanisé. Le choix a donc été fait de simuler des décennies d'épandage. Devant cette situation, de nombreux auteurs ont fait le choix de doper la matrice d'étude au moyen de solutions de sels métalliques. Cependant, cette technique peut introduire un biais en modifiant la spéciation et la biodisponibilité des métaux étudiés. Ici, le choix a été fait de ne pas ajouter de métaux aux lisiers. En revanche, une méthode a été mise au point de façon à concentrer la matière organique et les éléments traces métalliques dans une fraction solide. Cette concentration devant permettre d'apporter au sol des doses de cuivre et de zinc équivalentes à plusieurs décennies d'épandage, tout en s'affranchissant d'une toxicité liée à l'azote par son élimination dans une fraction liquide non valorisée dans les travaux. Tous les essais réalisés avec des végétaux ont donc été mis en œuvre avec apport d'une fraction solide, et non avec le lisier d'origine.

Une première partie bibliographique synthétise l'état de l'art. Dans le premier chapitre, l'origine, la composition et l'écotoxicité des lisiers sont décrites. Une description générale du procédé de digestion anaérobie est présentée au cours du deuxième chapitre. L'application du procédé au traitement des lisiers, et ses effets sur la matière organique et les métaux qu'ils contiennent y sont également décrits. Dans le troisième chapitre, ce sont les conditions du transfert sol-plante du cuivre et du zinc qui sont abordées. Enfin, les connaissances acquises quant à l'évaluation de la biodisponibilité du cuivre et du zinc et à leur génotoxicité sur les végétaux supérieurs sont synthétisées dans le quatrième chapitre qui clôture cette première partie.

L'ensemble de la démarche expérimentale et des résultats expérimentaux est présenté dans une seconde partie. Le premier chapitre s'attache à décrire l'unité expérimentale de méthanisation et les flux d'éléments sur site et au champ. Ce chapitre détaille également le mode d'obtention des produits utilisés pour la suite des travaux. Le deuxième chapitre détaille les caractéristiques des

produits obtenus, tant en terme de matière organique que de métaux ; ce chapitre est un article qui a été accepté dans la revue Bioresource Technology et qui devrait être publié dans les semaines à venir. Une évaluation de la biodisponibilité du cuivre et du zinc provenant de lisiers bruts et méthanisés pour *Vicia faba* et *Zea mays* est présentée dans le troisième chapitre. Enfin, le quatrième chapitre décrit l'évaluation de la génotoxicité des lisiers et la mise au point d'un test d'évaluation en sol.

PARTIE I
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : ORIGINE ET ENJEUX ENVIRONNEMENTAUX DES LISIERS PORCINS

1. PRESENTATION GENERALE DE LA PRODUCTION PORCINE FRANCAISE

Au cours de la deuxième moitié du XX^{ème} siècle, le développement et l'intensification de l'élevage porcin se sont effectués par le passage à un système de production hors-sol. Les matières premières pour l'alimentation des animaux ne sont plus systématiquement produites sur l'exploitation, permettant à l'activité d'élevage de se développer sans contrainte de surface. Ainsi, la production peut se développer indépendamment des zones de production céréalière, et des zones très spécialisées se mettent en place. Elles regroupent tous les acteurs de la filière, des fournisseurs d'aliments aux transformateurs en passant par les éleveurs. Du fait de son positionnement géographique entre les ports atlantiques (importation de céréales) et la capitale, la Bretagne va occuper la première place dans le développement de la filière (Figure 1) ; au début des années 2000, 55% du volume national était produit en Bretagne (Agreste, 2002). La spécialisation de la Bretagne dans la production porcine se traduit par une densité d'animaux élevée (444 porcs.km² selon Martinez et Le Bozec, 2000) qui reste cependant en deçà des densités rencontrées dans d'autres régions européennes.

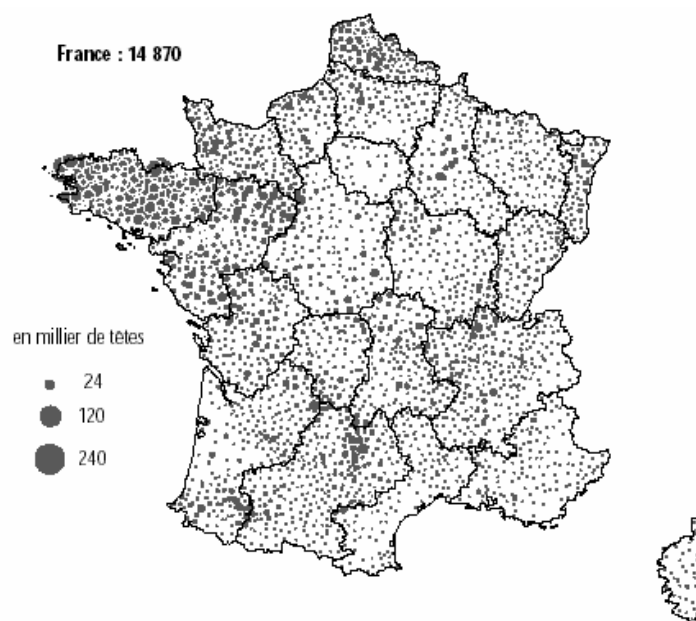


Figure 1 : Répartition de la production porcine française exprimée en nombre de porcs par canton (extrait de Agreste, 2002)

Les élevages français sont traditionnellement de trois types : naisseur, engraisseur ou naisseur-engraisseur (Institut Technique du Porc, 2000). De plus, ces élevages fonctionnent selon trois systèmes d'élevage (Texier C., 2001) :

- Un système non intensif où les porcs sont élevés en plein air (faible pourcentage de la production) ;
- Un système intensif sur litière, représentant environ 15% des élevages,
- Un système intensif sur caillebotis, regroupant 85% des élevages, et l'essentiel de la production.

Le système sur caillebotis, c'est-à-dire un plancher à lattes non jointives en métal ou en béton, permet l'écoulement des urines, des matières fécales, des eaux de lavage et également des débris d'aliments dans des pré-fosses situées sous le bâtiment. Les caractéristiques des lisiers récupérés sous ces caillebotis pourront varier en fonction du type d'animaux (porcelets, porcs ou truies), de la conduite d'élevage (mode d'alimentation, fréquence des lavages ou d'évacuation des lisiers...) (Levasseur, 1998). Les volumes de lisier produits sur les élevages ont été définis pour chaque type d'animaux et sont à prendre en compte pour le calcul des édifices de stockage. Ces volumes sont décrits par une circulaire du Ministère de l'Agriculture (12/11/1991) et par l'Arrêté du Ministère de l'Environnement (29/12/1992), et varient de 0,08 m³ par porcelet et par mois à 0,60 m³ par truie allaitante et par mois. Ainsi en 1998, les élevages français ont produit environ 20 millions de m³ de lisier, dont l'essentiel en Bretagne, en accord avec la répartition des élevages (Institut Technique du Porc, 2000). Ces quantités de lisiers, en légère diminution depuis le début des années 2000 du fait des évolutions de la production porcine française, représentent moins de 10% des déjections bovines évaluées à 243 millions de tonnes et moins de 6% de la matière organique restituée aux sols par épandage (David, 2004).

2. L'ALIMENTATION EN ELEVAGE PORCIN

2.1. RATIONS ALIMENTAIRES

Les deux principaux besoins alimentaires sont l'énergie et les protéines, et en particulier la lysine (Institut Technique du Porc, 2000). L'énergie d'un aliment peut être exprimée de différentes façons selon les étapes de transformation de l'aliment : énergie brute, énergie digestible, énergie métabolisable et énergie nette (Figure 2). Le besoin de l'animal est défini par les apports d'énergie et de protéines permettant d'atteindre des performances zootechniques définies.

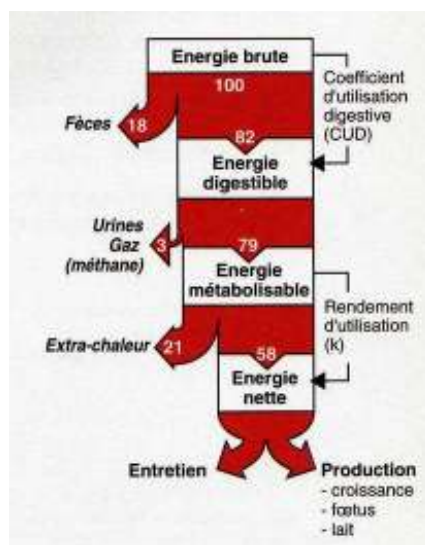


Figure 2 : Transformation de l'énergie d'un aliment et expressions de la valeur énergétique en % de l'énergie brute (extrait de Institut Technique du Porc, 2000)

Les besoins et les rendements d'utilisation des nutriments ont beaucoup été étudiés et des rations spécifiques au type d'animal (troupe, porc à l'engrais, porcelet...) ont été définies.

La formulation d'aliments équilibrés consiste alors à combiner différentes matières premières (céréales, protéagineux, oléagineux...) en tenant compte de leurs caractéristiques nutritionnelles. De plus, les rations sont complétées par des apports de minéraux (macro et oligo-éléments), de vitamines ou des additifs (probiotiques par exemple)

2.2. LE CUIVRE ET LE ZINC DANS L'ALIMENTATION PORCINE

Le cuivre et le zinc sont des oligo-éléments qui jouent un rôle vital dans la physiologie animale, ce pourquoi ils ont beaucoup été étudiés par l'INRA. Les paragraphes suivants reprennent les résultats présentés par Jondreville *et al.* (2003) et Revy *et al.* (2004).

2.2.1. Le cuivre

Le cuivre intervient dans de nombreuses fonctions physiologiques : croissance du fœtus et du nouveau-né, synthèse de l'hémoglobine, développement des tissus de connexion en particulier dans le système cardiovasculaire et dans les os, ainsi que dans les processus inflammatoires.

Le cuivre est ainsi impliqué dans de nombreuses fonctions biochimiques. De façon générale, *in vivo*, il est essentiellement lié à des cuproprotéines lui permettant d'exprimer ses fonctions physiologiques dont la principale est sans doute la protection contre les stress oxydants. La principale enzyme impliquée à ce niveau est la superoxyde dismutase (SOD) qui permet de catalyser la dismutation de l'ion superoxyde en peroxyde d'hydrogène ; ce dernier doit être ensuite détoxifié en

eau par d'autres enzymes, dont la céruloplasmine, qui seraient également régulées par le cuivre. Le maintien des fonctions immunitaires et l'implication dans la chaîne respiratoire cellulaire sont également des fonctions physiologiques primordiales du cuivre. Il existe un autre rôle majeur du cuivre, essentiel en conditions d'élevage : un effet stimulant sur la croissance. Chez le porc, ce phénomène a été observé pour les porcelets en post-sevrage, et diminue au fur et à mesure de la croissance de l'animal.

Afin de pouvoir remplir toutes ces fonctions, le cuivre doit être présent à un niveau minimum de concentration estimé à 2 mg.kg^{-1} de poids vif chez le porc. Pour atteindre ces niveaux, les concentrations nécessaires dans la ration alimentaire sont estimées entre 5 et 6 mg.kg^{-1} d'aliment.

Ces besoins pourraient être couverts par les matières premières (céréales et oléoprotéagineux) entrant dans la ration alimentaire. Cependant, de nombreuses interactions, mal comprises ou ignorées, influent sur la biodisponibilité du cuivre apporté par ces matières premières. A titre d'exemple, la digestibilité apparente du cuivre est relevée dans la littérature à des valeurs comprises entre -12% et 52% ; d'après Priem et Maton, (1980), seulement 25% du cuivre apporté dans l'alimentation porcine sont assimilés, dont une bonne partie est encore éliminée par voie biliaire et urinaire. Certains composés interagissent avec le cuivre et réduisent sa biodisponibilité, en particulier :

- Le zinc : il est connu pour son effet antagoniste sur la biodisponibilité du cuivre, sans doute par la séquestration de ce dernier au sein de protéines (méthionéines) dont la synthèse est activée par le zinc. Cet effet n'est observé que dans le cas où le zinc est très excédentaire (rapport 10 :1) par rapport au cuivre, apporté en quantité suffisante dans les aliments (100 à 300 mg.kg^{-1}). En revanche, pour de faibles apports de cuivre, des effets contradictoires ont été observés par différents auteurs, ne permettant pas de conclure de façon affirmative sur l'effet du zinc sur la biodisponibilité du cuivre.
- Le soufre et le calcium : le soufre aurait une action réduisant la biodisponibilité du cuivre, par la formation de sulfure de cuivre, tandis que le calcium pourrait entraîner une diminution de cette biodisponibilité par la précipitation d'hydroxydes insolubles.
- Les composés organiques de la ration alimentaire : les effets sont mal connus et controversés, mais les interactions avec les phytates, la matière grasse ou les fibres présentes dans les aliments peuvent être mentionnées.

2.2.2. Le zinc

Comme le cuivre, le zinc est essentiel à de nombreuses fonctions physiologiques. Il est impliqué dans le fonctionnement de plus de 300 enzymes intervenant dans les métabolismes fondamentaux tels que la synthèse et la dégradation de glucides, lipides, protéines et acides nucléiques. Le zinc peut alors jouer plusieurs rôles : structural, catalytique, régulateur ou mixte, c'est-à-dire un couplage de 2 rôles. Parmi les enzymes les plus importantes, on peut citer :

- la phosphatase alcaline (métabolisme osseux),

- l'anhydrase carbonique (élimination du dioxyde de carbone du sang),
- la SOD (lutte contre le stress oxydant).

Le zinc est également le garant de la stabilité et de l'activité de certaines hormones peptidiques telles que l'insuline. De plus, chez le porc, le zinc permet également de lutter efficacement contre une maladie cutanée, la parakératose, via la synthèse de collagène.

Chez le porc, le zinc est le micro-élément le plus abondant dans l'organisme après le fer. Dix fois plus concentré que le cuivre, sa teneur totale dans l'organisme varie de 15 à 25 g.kg⁻¹ de poids vif, les concentrations les plus importantes étant observées dans les poils et le foie.

Les besoins des animaux sont variables selon le stade de croissance, et vont en diminuant au cours du temps, passant de 100 mg.kg⁻¹ d'aliment chez le porcelet sevré à 50 mg.kg⁻¹ d'aliment en fin d'engraissement. Les apports par les matières premières sont estimés entre 35 et 45 mg.kg⁻¹ d'aliment, ce qui n'est pas suffisant pour couvrir les besoins, et ce d'autant que les phénomènes influant sur la biodisponibilité sont encore mal connus. Parmi ces phénomènes, nous pouvons citer le statut de l'animal en zinc (carence, excès), le stade physiologique ou le stress, mais la cause principale à l'origine de la variabilité de la disponibilité du zinc est la présence d'acide phytique dans les matières premières qui a une forte affinité avec le zinc et le complexe sous une forme stable mais non assimilable par l'animal. C'est la raison pour laquelle les aliments sont supplémentés à l'aide d'oxyde de zinc le plus souvent.

2.3. CARENCES ET EXCES

Les carences en cuivre chez les animaux conduisent à des perturbations physiologiques. Les symptômes associés peuvent être un retard de croissance, une anémie, une fragilité osseuse, des accidents cardiaques et vasculaires ou encore une baisse de la fertilité.

Le porc est assez tolérant aux excès de cuivre, et la résistance est étroitement liée à l'apport de zinc qui permet d'éviter l'apparition de symptômes tels qu'une nécrose du foie ou des ulcères gastriques. En effet, le zinc est indispensable à la synthèse des métallothionéines qui stockent le cuivre au sein du principal organe de détoxification, le foie. Dans le cas d'une exposition prolongée à un excès de cuivre de jeunes animaux privés de fer, une anémie peut apparaître. Enfin, une exposition à long terme peut induire une réduction de performance.

Les symptômes d'une carence en zinc sont le signal de la détérioration d'un ensemble de fonctions. Ils apparaissent prioritairement chez les jeunes animaux ou pendant les périodes de gestation et de lactation. Ces symptômes peuvent être une perte d'appétit, des diarrhées ou un retard de croissance. Dans un deuxième temps, la parakératose peut apparaître.

A l'inverse, la toxicité du zinc est faible. Chez l'adulte, les symptômes de toxicité n'apparaissent que pour des supplémentations très élevées en zinc ($\geq 5\ 000$ mg.kg⁻¹ d'aliment), ce qui explique qu'aucune toxicité n'a été observée en dehors de conditions expérimentales.

Le cuivre et le zinc remplissant de nombreuses fonctions métaboliques, les carences se traduisent par différentes pathologies. De façon à garantir une marge de sécurité et un apport de cuivre et de zinc suffisant aux animaux, les aliments sont donc supplémentés en ces deux oligo-éléments, le plus souvent sous forme de sulfate de cuivre et d'oxyde de zinc. Cependant, du fait des incertitudes quant à la biodisponibilité réelle de ces éléments, qu'ils proviennent des matières premières ou d'un complément minéral, il est aujourd'hui toujours impossible d'appliquer des doses ajustées au plus près des besoins, et les apports se font donc en excès. Ainsi, dans l'alimentation des porcelets en post-sevrage où le cuivre est utilisé comme facteur de croissance, il est ajouté à des niveaux 30 fois supérieurs aux besoins.

3. COMPOSITION DES LISIERS PORCINS

3.1. NATURE ET COMPOSITION DES EFFLUENTS

Comme cela a été décrit précédemment, le lisier est le résultat de la collecte sous caillebotis des urines, des matières fécales, des eaux de lavage et également des débris d'aliments. C'est un produit liquide contenant généralement moins de 10% de matière sèche, de pH neutre à légèrement alcalin (Tableau 1). La composition du lisier varie en fonction du type d'animaux et du régime alimentaire, mais il est toujours riche en éléments fertilisants (N, P, K, mais également Ca, Mg et S).

Tableau 1 : Composition des lisiers porcins décrits par Béline F. (2001), Levasseur P. (2002), Snell-Castro (2004), Sanchez et Gonzalez (2005)

| Paramètres ramenés au produit brut | | |
|--|-------------|-----------------------------------|
| pH | 7,49 – 7,68 | |
| Matière sèche (MS) | 21,4 - 100 | g.kg ⁻¹ |
| Matières en suspension (MES) | 27 - 66 | g.L ⁻¹ |
| Matière organique (MO) | 14,4 - 36,3 | g.kg ⁻¹ |
| Demande Biochimique en Oxygène (DBO ₅) | 25 – 40 | g O ₂ .L ⁻¹ |
| Demande Chimique en Oxygène | 50 - 100 | g O ₂ .L ⁻¹ |
| Azote total (NTK) | 2,20 – 5,29 | g.kg ⁻¹ |
| Azote ammoniacal (N-NH ₄ ⁺) | 1,50 – 4,08 | g.kg ⁻¹ |
| Phosphore | 0,42 – 1,86 | g.kg ⁻¹ |
| Potassium | 0,74 – 4,85 | g.kg ⁻¹ |
| Calcium | 0,79 – 3,15 | g.kg ⁻¹ |
| Magnésium | 0,17 – 0,28 | g.kg ⁻¹ |
| Sodium | 0,12 – 0,44 | g.kg ⁻¹ |
| Soufre | 0,16 – 0,72 | g.kg ⁻¹ |

Les lisiers contiennent également des quantités importantes d'acides gras volatils (AGV) qui sont des sous-produits de la digestion. Les AGV principaux sont les acides acétique, propionique, butyrique et valérique, le premier représentant environ la moitié des quantités totales (Bernard et Héduit, 1979).

Dans le métabolisme porcin, le cuivre et le zinc sont éliminés principalement dans les fèces (Jondreville *et al.*, 2003 ; Revy *et al.*, 2004), l'urine présentant une faible proportion des rejets. Par conséquent, les teneurs en cuivre dans les déjections porcines sont relativement élevées (Tableau 2), en particulier pour les lisiers issus d'atelier de post-sevrage et d'engraissement.

Tableau 2 : Teneur en cuivre et en zinc de lisiers porcins issus d'élevages français et européens selon différents auteurs

| | Cu | Zn | |
|--------------------------------|------------|-------------|------------------------|
| L'Herroux <i>et al.</i> (1997) | 39 | 56 | mg.kg ⁻¹ MF |
| Sanchez et Gonzalez (2005) | 13,3 | 24,7 | mg.kg ⁻¹ MF |
| Nicholson <i>et al.</i> (1999) | 351 | 575 | mg.kg ⁻¹ MS |
| Levasseur (2002) | 98 – 837 * | 1185 - 1886 | mg.kg ⁻¹ MS |

* l'ampleur de la fourchette est liée au fait que quatre catégories d'animaux ont été considérées : truies en gestation ou en lactation, porcelets et porcs en engraissement.

3.2. ALIMENTATION ET DIMINUTION DES REJETS EN CUIVRE ET EN ZINC

Pour faire face aux risques environnementaux engendrés par le cuivre et les zinc des lisiers après épandage, la commission européenne a revu à la baisse les teneurs maximales en cuivre et zinc dans les aliments pour porcs. En effet des études ont montré que la réduction de l'incorporation de ces deux oligo-éléments dans les aliments doit permettre de garantir les performances d'élevage, tout en réduisant leurs rejets. Ainsi, Paboeuf *et al.* (2001) ont montré expérimentalement que l'abaissement de 150 à 90 mg Zn.kg⁻¹ d'aliment pour des porcs en engraissement permet de réduire de 40% les rejets de cet élément sans modifier les performances des animaux.

Le règlement européen CE n°1334/2003 modifiant les conditions d'autorisation de plusieurs additifs appartenant au groupe des oligo-éléments dans les aliments pour animaux est applicable depuis le 26 janvier 2004. Cette révision de la directive européenne 70/524/EE a pour but de respecter le plus fidèlement les prescriptions prévues à l'article 3A : satisfaire les besoins nutritionnels, améliorer la production animale, réduire les nuisances provoquées par les déjections animales et minimiser les effets néfastes de certains oligo-éléments sur la santé humaine et l'environnement.

Tableau 3 : Teneurs maximales en cuivre et en zinc dans les aliments pour porcs

| | Cu (mg.kg ⁻¹ aliment) | | Zn (mg.kg ⁻¹ aliment) | |
|--------------------------------|----------------------------------|-----------------------|----------------------------------|-----------------------|
| | Avant | Règlement n°1334/2003 | Avant | Règlement n°1334/2003 |
| Porcelet (jusqu'à 12 semaines) | 175 | 170 | 250 | 150 |
| Porc charcutier | 100 | 25 | 250 | 150 |
| Truies | 35 | 25 | 250 | 150 |

Une évaluation de l'efficacité de ces mesures sur la composition de lisiers de porcs charcutiers a été réalisée par l'Institut du Porc (Levasseur, 2005). Les résultats obtenus montrent que le règlement n'a pas d'impact sur les teneurs en zinc, les fournisseurs d'aliments et les éleveurs ayant anticipé la réglementation. En effet, la plupart des aliments complets respectaient déjà le plafond de 150 mg Zn.kg⁻¹ d'aliment au-delà duquel aucun avantage zootechnique n'avait été observé. En revanche, le règlement a impacté de façon notable la teneur en cuivre de lisiers. Sa mise en application a en effet permis de diviser par 3 à 8 la concentration en cuivre dans les lisiers d'engraissement. Les réductions réglementaires pour les porcelets et les truies sont moins marquées, et les concentrations de cuivre dans les lisiers devraient donc être moins impactées par l'application du règlement (Tableau 3).

Cette révision est un premier moyen pour maîtriser la contamination des sols par le cuivre, et dans une moindre mesure par le zinc, via l'épandage des lisiers porcins. En effet, les rejets de zinc ne sont pas significativement modifiés et les quantités épandues demeureront supérieures aux besoins des cultures. Pour le cuivre, il serait nécessaire de diviser par 8 les rejets pour équilibrer les apports par épandage et les besoins des cultures. Or, d'après les résultats rapportés par Levasseur (2005), cette réduction n'est possible que pour les lisiers de porcs en engraissement.

4. ENJEUX ENVIRONNEMENTAUX DE LA GESTION DES LISIERS PORCINS

De par leur composition (Tableau 1), les lisiers porcins représentent une valeur fertilisante de premier intérêt pour l'éleveur. Ils permettent en effet le recyclage d'éléments tels que l'azote et le phosphore nécessaires au développement des cultures, mais également d'autres macro et micro-éléments indispensables aux végétaux (Tableau 1).

L'épandage des lisiers est réglementé en fonction des seules quantités d'azote apportées au sol. Ainsi, la Directive européenne n°91/676, dite Directive Nitrates (1991), limite les apports d'azote par les effluents d'élevage à 170 kg .ha⁻¹.an⁻¹ pour les zones en excédent structurel (ZES¹), ainsi que les zones vulnérables² depuis 2003, ou à 210 kg.ha⁻¹.an⁻¹ dans les autres cas. Cette limitation permet de protéger les eaux contre la pollution par les nitrates à partir de sources agricoles. C'est le Code des Bonnes Pratiques Agricoles (CBPA) qui a été mis en œuvre en France pour faire appliquer cette Directive, fixant les règles d'épandage dans les zones vulnérables. Le lisier est considéré comme un fertilisant de type II, contenant de l'azote organique et à C/N bas (inférieur ou égal à 8). De plus, les

¹ ZES : canton sur lequel la quantité moyenne d'azote produite annuellement par l'ensemble du cheptel est supérieure à 170 kg par ha cultivé et susceptible de recycler ce lisier.

² Zone vulnérable : zones qui alimentent les eaux atteintes par la pollution dont la teneur en nitrates est supérieure à 50 mg.L⁻¹, ou les eaux menacées de pollution, dont la teneur en nitrates est comprise entre 40 et 50 mg.L⁻¹

élevages de plus de 450 animaux-équivalents³ sont également soumis à la réglementation des Installations Classées pour la Protection de l'Environnement (ICPE), et donc à un plan d'épandage limitant les apports d'azote à 170 kg .ha⁻¹.an⁻¹.

La gestion du phosphore dépend du contexte local. Le rapport N/P des lisiers étant inférieur à celui utilisé pour les fertilisants minéraux, le phosphore est appliqué en excès, les épandages étant effectués par rapport à l'azote (Burton et Turner, 2003).

Cependant, l'épandage des lisiers peut présenter des risques environnementaux. En effet, si l'intensification de l'élevage a été possible en dissociant l'alimentation des animaux des surfaces de production des matières premières des aliments, elle s'est faite en créant un déséquilibre entre les quantités de déjections produites et les surfaces d'épandage susceptibles de les recevoir. Ainsi, si les lisiers sont épandus en excès, la matière organique et les éléments fertilisants qu'ils contiennent peuvent présenter des risques environnementaux (Figure 3). Les nuisances générées peuvent être regroupées en 3 types : la pollution de l'air, les pollutions des eaux de surface et souterraines et la pollution du sol (Martinez et Le Bozec, 2000).

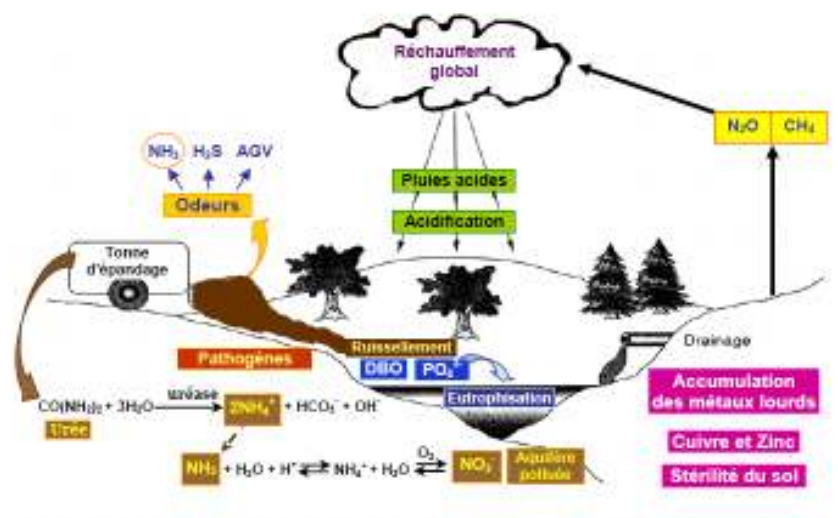


Figure 3 : Différents types de pollution (air, eau, sol) liés aux activités d'élevage (extrait de Snell-Castro, 2004)

4.1. POLLUTION DE L'AIR

Les premières nuisances dues aux épandages de lisier sont les émanations d'odeurs. Ces nuisances olfactives sont dues à la présence de composés malodorants qui sont les produits intermédiaires ou finaux de la dégradation de la matière organique par des activités microbiennes. Les

³ Les porcs à l'engrais, jeunes femelles avant la première saillie et animaux en élevage de multiplication ou sélection comptent pour 1 animal-équivalent. Les reproducteurs, truies (femelle saillie ou ayant mis bas) et verrats comptent pour 3 animaux-équivalents. Les porcelets sevrés (< 30 kg) comptent pour 0,2 animal-équivalent.

acides gras volatils (AGV), l'azote ammoniacal et l'hydrogène sulfuré sont parmi les composés principaux impliqués dans ce phénomène (Nham K.H., 2002). Mais d'autres composés participent également au phénomène : les aldéhydes, les alcools, les indoles, les mercaptans et les amines substituées (Martinez et Le Bozec, 2000), ou encore les phénols et le p-crésol (Mackie *et al.*, 1998).

L'émanation de gaz à effet de serre est également à considérer dans les pollutions de l'air. Le stockage des lisiers en fosse conduit à la formation de méthane (CH₄), tandis que l'épandage génèrera de l'ammoniac (NH₃) et du protoxyde d'azote (N₂O).

Enfin, certains modes d'épandage (buse à palette par exemple) peuvent conduire à la dispersion aérienne de microorganismes pathogènes contenus dans les lisiers. La contamination peut également avoir lieu suite à une pollution de l'eau par ruissellement ou lixiviation. Les risques pour la santé humaine sont les gastro-entérites à *Listeria*, *E. coli*, *Salmonella*, *Clostridium*, *Campylobacter* ou *Yersinia* (Sahlström L., 2003).

4.2. POLLUTION DE L'EAU

La pollution de l'eau suite aux épandages est liée au ruissellement de surface ou à la lixiviation en profondeur suite à des apports excessifs sur un sol.

Dans le sol, l'azote ammoniacal présent en grande quantité dans le lisier va être oxydé en nitrates qui peuvent être entraînés par lessivage (eaux souterraines) et par ruissellement (eaux de surface). La consommation de l'eau peut alors représenter un risque pour l'homme du fait du caractère cancérigène des nitrates, ce pourquoi la limite en nitrates de l'eau potable est fixée à 50 mg.L⁻¹. De plus, l'oxydation de l'azote ammoniacal qui se fait selon la réaction $NH_4^+ + 2O_2 \Leftrightarrow NO_3^- + H_2O + 2H^+ + \text{énergie}$ va entraîner une acidification du sol.

En ce qui concerne le phosphore, le risque est lié aux phosphates qui favorisent le développement d'algues dont la dégradation bactérienne dans les eaux plus profondes crée des conditions d'anoxie qui conduisent à l'eutrophisation des lacs et des rivières.

Enfin, les éléments traces métalliques peuvent également être exportés par les eaux en lien avec des phénomènes d'érosion. Arzul et Maguer (1990) ont ainsi établi en Bretagne une liaison directe entre le nombre de porcs produits par hectare à proximité des côtes et la teneur en cuivre des sédiments prélevés dans les estuaires.

4.3. POLLUTION DU SOL

Si le cuivre et le zinc sont des oligo-éléments essentiels pour le porc, ils peuvent également être un risque potentiel pour l'environnement dans le cas d'épandage intensif (Jondreville *et al.* 2002, Revy *et al.* 2003).

Les conséquences de l'épandage des effluents d'élevage sur les teneurs en métaux lourds du sol et des végétaux cultivés et sur la qualité des eaux souterraines ne font pas l'objet d'une réglementation particulière. Cependant, l'arrêté du 8 janvier 1998 relatif à l'épandage des boues

issues du traitement des eaux usées peut être pris comme référence. Ce dernier prévoit trois niveaux de contraintes pour l'accumulation des métaux traces (nous n'avons reporté ci-dessous que les contraintes concernant Cu et Zn, mais le texte concerne également Cd, Cr, Ni, Hg, Pb) :

- Des teneurs limites dans la matière sèche des produits épandus : 1 000 mg Cu.kg⁻¹ MS et 3 000 mg Zn.kg⁻¹ MS ;
- Des quantités cumulées sur 10 ans qui doivent rester inférieures à 15 kg Cu.ha⁻¹ et 45 kg Zn.ha⁻¹ ;
- des teneurs en cuivre et zinc des sols qui doivent respectivement rester inférieures à 100 mg.kg⁻¹ MS et 300 mg.kg⁻¹ MS.

Les teneurs données par le Tableau 2 montrent que la première condition est remplie pour les lisiers porcins. D'après Levasseur (2002), si l'on considère la composition d'un lisier de porc à l'engrais, l'épandage à hauteur de 170 kg N.ha⁻¹.an⁻¹ correspondrait à des flux d'environ 1,53 kg Cu.ha⁻¹.an⁻¹ et 2,38 kg Zn.ha⁻¹.an⁻¹ soit un cumul sur 10 ans de l'ordre du maximum autorisé pour le cuivre.

En revanche, ces apports de cuivre et de zinc par épandage de lisiers dépassent donc largement les besoins des cultures. Kabata-Pendias et Pendias (1992) relatent en effet des exportations de 20 à 30 g Cu.ha⁻¹ pour une culture céréalière, et inférieures à 500 g Zn.ha⁻¹. Plus récemment, Lamy *et al.* (2005) donnent une revue bibliographique des exportations annuelles en Cu et Zn par les différentes cultures et en fonction du niveau d'intensification des pratiques culturales : de 7 à 33 g Cu.ha⁻¹ et de 44 à 200 g Zn.ha⁻¹.

Lorsque les apports dépassent ces flux, le cuivre et le zinc apportés en excès sont peu mobiles par lessivage ou ruissellement. Il est donc admis que ces éléments, apportés par épandage de lisiers, s'accumulent dans la couche superficielle du sol.

Les premières études portant sur le devenir du cuivre et du zinc après épandage de lisiers ou de fumiers datent du début des années 1970. Ces travaux s'intéressaient plus particulièrement aux formes assimilables des métaux plutôt qu'aux teneurs totales et ont montré l'accumulation des métaux dans le sol (Batey *et al.*, 1972 ; McGrath, 1981, Christie et Beattie, 1989). En France, Coppenet (1981) fut le premier à montrer une augmentation des teneurs en métaux dans les sols agricoles bretons, par une étude de terrain à long terme. En effet, sur une période d'épandage de 20 ans, les teneurs en cuivre et zinc extractibles à l'EDTA (Acide Ethylène Diamine Tetraacétique) ont été corrélées aux quantités épandues. L'augmentation dans les sols sur la période d'essai a été estimée à 0,24 mg Cu-EDTA.kg⁻¹.an⁻¹ et 0,41 mg Zn-EDTA.kg⁻¹.an⁻¹ (Coppenet, 1993 ; Vertes, 1995). Plus récemment, L'Herroux *et al.* (1997) ont étudié l'évolution du cuivre et du zinc dans un sol brun limoneux sableux après 4 ans d'épandage de lisier. Les deux métaux se sont accumulés dans la couche superficielle (0-20 cm). Gavalda *et al.* (2005) ont également montré que des épandages de fumiers de bovins répétés sur un siècle conduisent à des accumulations de l'ordre de 55 et 63% des quantités de cuivre et de zinc naturellement présents dans l'horizon cultivé. Sur la même durée, des épandages de boues urbaines ont conduit à une accumulation du même ordre de grandeur pour le zinc, mais trois fois plus importantes pour le cuivre.

CHAPITRE II : LA DIGESTION ANAEROBIE OU METHANISATION

1. GENERALITES SUR LA METHANISATION

1.1. LES BASES BIOCHIMIQUES

La digestion anaérobie – ou méthanisation - est un processus biologique de dégradation de la matière organique en un mélange gazeux de méthane (CH_4) et de dioxyde de carbone (CO_2) appelé biogaz. Le biogaz produit peut-être récupéré, stocké et valorisé pour la production de chaleur et/ou d'électricité. La méthanisation est observé dans les milieux naturels pauvres en oxygène, et il existe trois types d'écosystèmes méthanogènes naturels (Garcia *et al.*, 2000) :

- Les sédiments marins et lacustres, les milieux inondés (marais, rizières), les boues et les digesteurs dans lesquels la matière organique est complètement dégradée ;
- Les appareils digestifs animaux et humains qui dégradent partiellement la matière et conduisent à la formation de produits intermédiaires assimilés comme éléments nutritifs ;
- Les eaux volcaniques, dans lesquelles la matière organique est absente et où seule la voie hydrogénéophile produit du biogaz.

La digestion anaérobie se déroule en trois étapes principales qui sont présentées par la Figure 4.

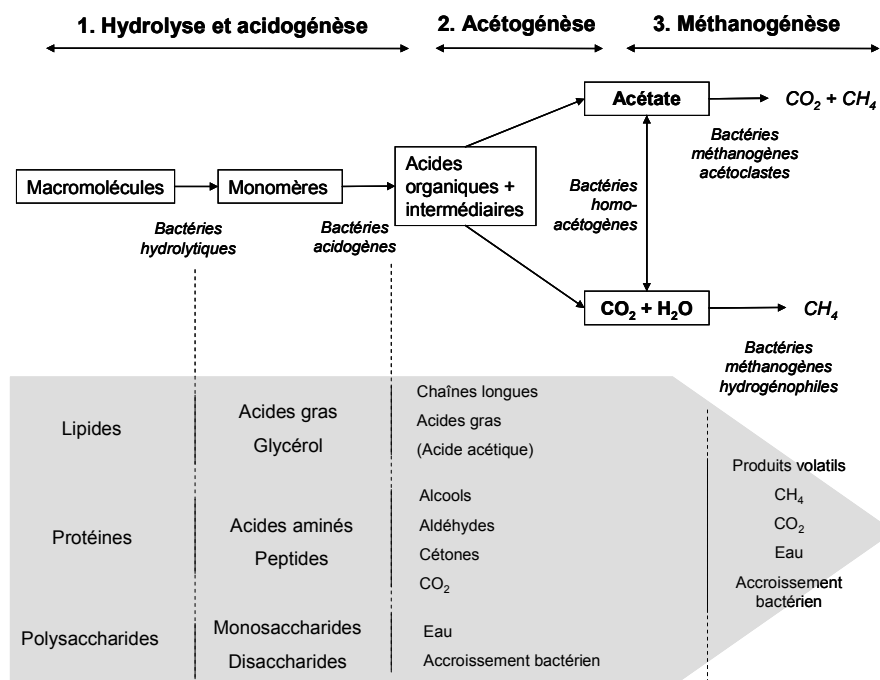


Figure 4 : Voies de dégradation de la matière organique sous conditions anaérobies méthanogènes (d'après Zeikus, 1982 ; De La Farge, 1995 ; Marchaim, 1992)

❖ HYDROLYSE ET ACIDOGÈNESE

Au cours de cette étape, les macromolécules (protéines, lipides, polysaccharides...) sont transformées en molécules plus simples (acides aminés, sucres simples...) pouvant pénétrer dans la cellule où ils seront dégradés, selon les voies classiques du catabolisme. Les monomères issus de l'étape d'hydrolyse sont transformés, au cours de l'acidogénèse, en acides organiques (acides gras volatils tels que l'acétate, le butyrate ou le propionate), en alcools (éthanol, glycérol ou méthanol) ou en cétones (acétone), avec une libération d'ammonium (NH_4^+), de dioxyde de carbone (CO_2) et d'hydrogène (H_2). Généralement, l'hydrolyse est le fait d'enzymes extracellulaires telles que des cellulases, hydrolases ou encore amilases (Bitton, 1994).

Cette première étape est effectuée par un ensemble varié de bactéries dites fermentatives et acidogènes, qui peuvent être anaérobies strictes ou facultatives. Les bactéries les plus fréquentes sont les *Clostridium* sp., mais d'autres sont également présentes : *Ruminococcus* sp., *Bacillus* sp....

❖ ACETOGENÈSE

Au cours de cette étape, les acides gras volatils (AGV), les alcools et les cétones (produits de l'acidogénèse) sont transformés en acétate (CH_3COO^-), CO_2 et H_2 qui sont les principaux substrats de la méthanogénèse. Ces réactions sont le fait de bactéries acétogènes. Trois types de bactéries peuvent être considérés :

- Les bactéries fermentatives : elles participent à l'hydrolyse de la matière organique ; de plus, lorsque la pression en hydrogène est faible dans le milieu, elles peuvent orienter leur métabolisme vers la production privilégiée d'acétate.
- Les bactéries productrices obligées d'hydrogène (OHPA, telles que *Syntrobacter* sp., *Syntrophomonas* sp.) : elles vivent en symbiose avec les bactéries méthanogènes et transforment les acides gras volatils en acétate, H_2 et CO_2 lorsque la pression en hydrogène est suffisamment faible (Bitton, 1994).
- Les bactéries homoacétogènes (*Clostridium* sp., *Acetobacterium* sp., *Sporomusa* sp....) : elles produisent de l'acétate comme seul métabolite à partir des acides gras volatils et du gaz de fermentation (CO_2 et H_2).

❖ METHANOGENÈSE

Au cours de cette ultime étape, l'acétate issu des étapes précédentes conduit à la production de biogaz, constitué de CO_2 et CH_4 . Cette transformation est le fait de microorganismes méthanogènes acétoclastes, principalement représentées par deux genres d'archaebactéries : les *Methanosarcina* sp., les *Methanosaeta* sp. ou encore les *Methanosaeta* sp.

Il existe également une production de biogaz par conversion simple du gaz de fermentation (CO_2 et H_2) en méthane. Cette voie est due à l'activité de bactéries méthanogènes hydrogénotrophes telles que les *Methanobrevibacter* sp., les *Methanospirillum* sp. et les *Methanobacterium* sp. Cette conversion a un double rôle : en éliminant l'hydrogène gazeux, elle régule la production d'AGV, et

elle contrôle la vitesse de catabolisme des acides propionique et butyrique. Ces bactéries sont des bactéries anaérobies strictes, très sensibles aux polluants toxiques et aux traces d'oxygène. De plus, elles sont les plus lentes du système, et ce sont donc elles qui régulent la vitesse globale de la digestion. En cas de dysfonctionnement du procédé (surcharge, variation de température ou de pH), la réponse se traduit par une accumulation des acides gras volatils dans le milieu et une inhibition de la méthanogénèse.

Tableau 4 : Principales réactions impliquées dans le processus de méthanisation

| | |
|---------------------------------|--|
| Hydrolyse et acidogénèse | |
| | $C_6H_{12}O_6 + 4 H_2O \rightarrow 2 CH_3COO^- + 4 H^+ + 2 HCO_3^- + 4 H_2O$ |
| Acétogénèse | |
| Voie acétogène | |
| | $4 CH_3CH_2COO^- + 3 H_2O \rightarrow 4 CH_3COO^- + 3 CH_4 + HCO_3^- + H^+$ |
| | $2 CH_3CH_2CH_2COO^- + H^+ + 2 H_2O \rightarrow 3 CH_3COO^- + 2 CH_4 + H^+$ |
| Voie homoacétogène | |
| | $4 H_2 + 2 HCO_3^- + H^+ \rightarrow CH_3COO^- + 4 H_2O$ |
| Méthanogénèse | |
| Voie acétoclastique | |
| | $CH_3COO^- + H_2O \rightarrow CH_4 + HCO_3^-$ |
| Voie hydrogénophile | |
| | $HCO_3^- + 4 H_2 + H^+ \rightarrow CH_4 + 3 H_2O$ |

1.2. PARAMETRES CONTROLANT LA METHANISATION

Du fait de la diversité des espèces bactériennes mises en jeu et de l'interdépendance des différentes étapes du processus, plusieurs paramètres sont primordiaux pour le bon déroulement de la digestion anaérobie (De La Farge, 1995 ; Trably, 2002).

❖ LA PRESENCE D'OXYGENE - LE POTENTIEL REDOX

La méthanogénèse se déroule en anaérobiose stricte, les populations méthanogènes et acétogènes étant les plus sensibles à l'oxygène et aux autres oxydants potentiels (nitrates, nitrites...). Il est donc indispensable de limiter la présence d'air dans le digesteur. Pour un développement normal des méthanogènes, il est admis que le potentiel d'oxydo-réduction du milieu doit être inférieur à - 300 mV. Il faut souligner que la majorité des micro-organismes participant à la phase d'hydrolyse-acidogénèse sont des anaérobies facultatifs et permettent une élimination rapide de l'oxygène pouvant être présent dans le milieu.

❖ LA TEMPERATURE

La digestion anaérobie peut se dérouler entre 5 et 65°C. Classiquement, trois plages de température autour d'une valeur optimale relative sont définies :

- la zone psychrophile, de 4 à 25°C : elle englobe les fermentations présentes dans les sédiments marins mais également les fosses septiques ou les stockages de lisier.
- la zone mésophile, de 35 à 45°C : c'est la zone la plus largement étudiée.
- la zone thermophile, de 55 à 65°C : elle permet un contrôle sur les populations bactériennes, car seules les souches thermotolérantes peuvent supporter de telles conditions.

L'augmentation de la température entraîne une augmentation des vitesses de dégradation, en particulier de la phase d'hydrolyse, sans influence particulière sur la biodégradabilité ou le rendement en méthane car les voies métaboliques restent les mêmes jusqu'à 65°C. Ainsi, l'hydrolyse de la cellulose est 5 à 6 fois plus rapide en phase thermophile qu'en phase mésophile.

Cependant, le processus de digestion anaérobie n'étant que faiblement exothermique, les conditions de température nécessaires pour un fonctionnement en zone mésophile ou thermophile doivent être créées par un chauffage externe. La production de biogaz est généralement utilisée en partie à ces fins.

❖ LE pH ET LES EQUILIBRES TAMPONS

La gamme des pH permettant un déroulement normal de la digestion anaérobie est liée aux conditions optimales de vie des micro-organismes responsables des différentes réactions métaboliques. Les acétogènes sont les plus sensibles aux variations de pH (optimum de croissance de 7,2) alors que les méthanogènes peuvent accepter des variations de pH entre 6,0 et 8,0. Les bactéries acidogènes s'adaptent facilement à des pH aux alentours de 4.

La principale cause d'une baisse de pH est l'accumulation dans le milieu des intermédiaires de fermentation (AGV, acide lactique...). Cette accumulation peut être due à différents phénomènes comme la biodégradation trop rapide d'un substrat organique et/ou l'inhibition de l'étape de méthanogenèse. Pour les méthanogènes et dans la majorité des cas, l'inhibition due aux AGV a un effet bactériostatique et non létal. Ces mécanismes sont importants à connaître et à prendre en compte dans le fonctionnement normal d'un digesteur industriel.

Pour que les fermentations soient stables, il convient de maintenir les variations de pH dans une fourchette entre 6,4 et 7,8. La régulation du pH est rendue possible grâce à la capacité tampon du milieu. Dans l'écosystème de la fermentation méthanique, cette régulation est assurée principalement par les bicarbonates (HCO_3^-) et, dans une plus faible mesure, par les ions phosphates (HPO_4^{2-}).

❖ PRESSION PARTIELLE EN HYDROGENE

La pression partielle en hydrogène (H_2) joue un rôle déterminant dans le déroulement du processus de fermentation méthanique. La production d'hydrogène est due aux populations bactériennes fermentatives lors de la production d'acétate. Cependant, si la pression partielle en H_2 est trop élevée dans le milieu, le relargage de H_2 est rendu impossible car la réaction est

endergonique. Les différents auteurs s'accordent pour donner comme limite une pression partielle comprise entre 0,1 et 10 Pa. Comme cela a été dit précédemment, ce sont les méthanogènes qui régulent la pression partielle en H_2 en l'utilisant au niveau de leur métabolisme.

❖ BESOINS EN NUTRIMENTS

Pour leurs activités, les microorganismes ont besoin d'un apport équilibré entre les différents éléments (C, N, P, S) et les éléments traces intervenant dans les enzymes (métaux, vitamines). Cependant, les populations anaérobies, du fait de leur faible production de biomasse, nécessitent moins d'éléments nutritifs que les populations aérobies. Le carbone contenu dans la matière organique est utilisé pour les besoins énergétiques et la synthèse des nouveaux constituants cellulaires. La consommation de carbone est 15 à 30 fois plus importante que celle de l'azote. Généralement, il est admis que le rapport optimal C/N doit être compris entre 20 et 30 (Bitton, 1994).

❖ PROCÉDES ET SYSTÈMES D'AGITATION

Sur les exploitations agricoles, les digesteurs sont généralement de type continu et infiniment mélangé, c'est-à-dire qu'ils sont alimentés au moins quotidiennement, que leur volume utile est constant et que la concentration de chaque élément du milieu est homogène dans l'espace et identique à celle du produit sortant (Burton et Turner, 2003).

Les digesteurs sont le plus souvent constitués de fosses en béton, aériennes ou enterrées, agitées par des systèmes mécaniques ou hydrauliques. Les différents compartiments d'une installation peuvent être combinés de diverses manières (Figure 5).

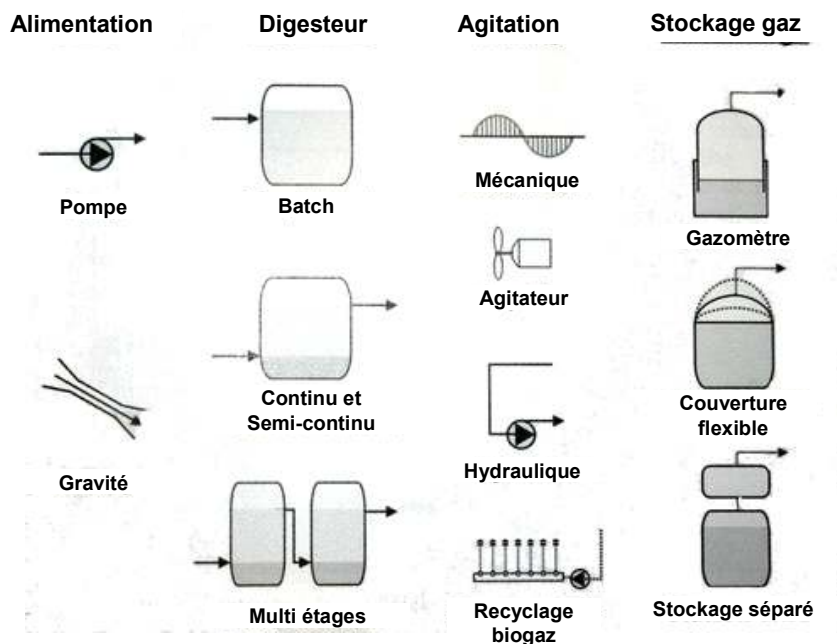


Figure 5 : Composantes principales des digesteurs installés dans les exploitations agricoles (d'après Burton et Turner, 2003)

Pour les applications non agricoles, et en particulier dans le domaine de l'agro-alimentaire, des procédés permettant de maintenir la biomasse dans le digesteur (par fixation, recyclage ou autre) sont généralement utilisés. Les différents principes de fonctionnement sont présentés par la Figure 6 (Moletta, 2005).

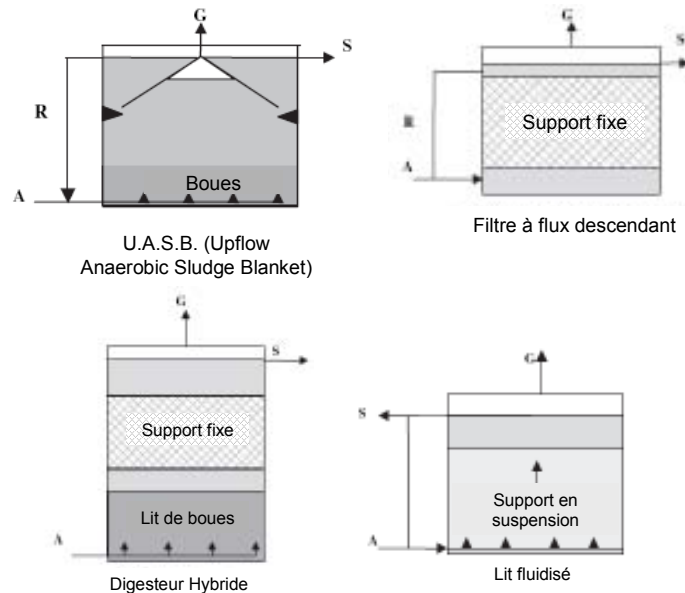


Figure 6 : Autres procédés que ceux utilisés pour la production de biogaz agricole (d'après Moletta, 2005). A : arrivée d'effluent à traiter ; S : sortie de l'effluent traité ; G : récupération du biogaz ; R : recyclage.

❖ CHARGE APPLIQUEE ET TEMPS DE SEJOUR

La charge organique appliquée au système et le temps de séjour du substrat dans le digesteur doivent être adaptés au produit traité de façon à éviter tout dysfonctionnement du processus par accumulation d'acides gras volatils. Les performances du digesteur dépendent en effet de l'équilibre entre production et dégradation de ces AGV. De plus, les méthanogènes sont particulièrement sensibles au temps de séjour car leur temps de génération est long, de l'ordre de 3 à 5 jours en régime mésophile, et jusqu'à 50 jours en régime psychrophile (Bitton, 1994). En culture libre, le temps de séjour est ainsi généralement compris entre 25 et 35 jours.

2. DEVENIR DE LA MATIERE ORGANIQUE ET DES ETM

La digestion anaérobie est un procédé biologique, ce qui implique de prendre en compte en parallèle les aspects physico-chimiques (conditions de pH et de température, équilibres chimiques) mais également les aspects biologiques, et plus particulièrement microbiologiques. Au cours des années 1970, les études en digestion anaérobie ont essentiellement porté sur la compréhension et la modélisation des réactions chimiques et biochimiques dans un but de maîtrise de la production d'énergie. Plus récemment, la digestion anaérobie a été étudiée dans une optique de maîtrise du

risque environnemental et de développement durable : dépollution, limitation des gaz à effet de serre et enfin maîtrise des flux de polluants.

Parmi les travaux recensés dans ce paragraphe, la grande majorité porte sur les boues de station d'épuration (STEP) après traitement par digestion anaérobie. En effet, les boues biologiques issues du traitement aérobie d'eaux usées (effluents domestiques et industriels) concentrent les micro-polluants métalliques. Or, ces boues sont très souvent digérées en anaérobie de façon à réduire leur volume, à les désodoriser et à stabiliser la matière organique (Solagro, 2001). Mais la méthanisation n'est pas un traitement ultime : il résulte de ce traitement des boues digérées qui doivent être épandues dans les champs et peuvent représenter un risque environnemental.

En revanche, très peu d'études ont été conduites sur le devenir des éléments traces métalliques des lisiers porcins traités par digestion anaérobie.

2.1. DEVENIR DE LA MATIERE ORGANIQUE

Le devenir de la matière organique lors du traitement d'effluents peut être abordé selon deux approches :

- une approche biochimique et/ou chimique, par l'analyse des composés étudiés et l'évaluation de leur abattement ou de leur production ;
- une approche physique par l'établissement de profils selon des classes de granulométrie.

Le critère de Levine (1985) est classiquement utilisé pour décrire la matière organique des eaux usées, et étudier l'effet de leur traitement. Les différentes catégories considérées sont établies sur la base de leur taille (en μm) ou de leur poids moléculaire, comme présenté par la Figure 7. Quatre classes ont été définies par Levine (1985) : fraction sédimentable ($> 100 \mu\text{m}$), supracolloïdes (1 à $100 \mu\text{m}$), colloïdes ($0,08$ à $1 \mu\text{m}$) et fraction dissoute ($< 0,08 \mu\text{m}$).

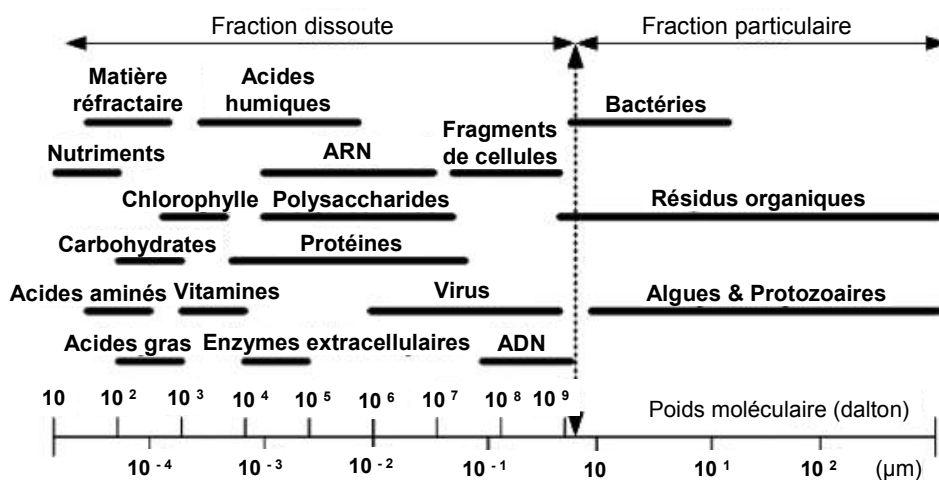


Figure 7 : Classification de la matière organique selon le critère de Levine (d'après Shon et Vigneswaran, 2006)

La digestion anaérobie permet la conversion de composés organiques en biogaz en suivant 3 étapes (Figure 4). Les lipides, protéines et polysaccharides, qui appartiennent à la fraction dissoute, sont donc des substrats privilégiés pour la méthanisation. Ainsi, pour les effluents essentiellement composés de DCO soluble, tels que les vinasses de distillerie, le traitement est généralement compris entre 80 et 98% d'abattement de la DCO initiale (Moletta, 2005). De plus, les charges pouvant être traitées sont importantes du fait de l'immobilisation de la biomasse (digesteurs de type UASB ou avec une biomasse fixée). Par ailleurs, dans le cas des effluents d'élevages qui sont riches en acides gras volatils, la digestion anaérobie permet un abattement efficace de ces composés, et une désodorisation durable des effluents (Hansen *et al.*, 2005).

En revanche dans le cas de résidus solides ou riches en matière organique tels que les boues de station d'épuration ou les lisiers, la proportion de la fraction dissoute est faible par rapport à la matière organique totale. Les taux d'abattement seront donc moins importants comme le montre le Tableau 5 qui regroupe les résultats d'essais conduits en réacteur infiniment mélangé, en régime mésophile et avec des temps de séjour compris entre 14 et 30 jours. Pour ce type de substrat, les performances seront préférentiellement exprimées par rapport à la MSV (Matière Sèche Volatile, obtenue par calcination à 550°C) plutôt que par rapport à la demande chimique en oxygène.

Tableau 5 : Abattements de la matière sèche volatile obtenus par digestion anaérobie pour différents substrats

| Produit traité | MSV (% PB) | Abattement (MSV) | Référence |
|---------------------|------------|------------------|--------------------------------|
| Ordures ménagères | 5,7% | 63 - 69% | Gunaseelan (1997) |
| Résidus de carottes | | 75% | Gunaseelan (1997) |
| Boues | 1,5 – 2,0% | 59 – 71% | Houghton <i>et al.</i> (2002) |
| Boues | 2,5% | 46% | Lake <i>et al.</i> (1985) |
| | 2,4% | 55% | |
| Lisier (bovins) | 7% | 55% | Callaghan <i>et al.</i> (1998) |
| Lisier (bovins) | 7,5% | 36,6% | De la Farge (1995) |
| | 5,2% | 52,3% | |
| Lisier (porcins) | 6,2% | 65,6% | De la Farge (1995) |
| | 8,7% | 37,6% | |
| | 3,2% | 43,2% | |

La conversion biochimique du carbone organique se traduit ainsi par des modifications physiques des particules comprises dans la fraction dissoute mais également dans la fraction particulaire. Au cours des dernières années, l'effet de la digestion anaérobie a été plus particulièrement étudié sous cet angle. Rodriguez Andara et Lomas Esteban (2002) ont étudié l'évolution de la taille des particules d'un lisier lors d'un traitement par digestion anaérobie sur 60 jours, en réacteur discontinu. Ces auteurs ont montré que la production de biogaz maximale apparaît après 20 jours, correspondant au moment où les 2/3 de la DCO se trouve dans la fraction dissoute (< 0,08 µm). Cette phase de production est précédée par une phase d'hydrolyse au cours de laquelle la matière sèche volatile passe de la fraction sédimentable (> 100 µm) vers les fractions de plus faible granulométrie. En fin d'essai les fractions les plus grossières sont à nouveau majoritaires du fait de la

conversion en biogaz des molécules de petite taille. Sophonsiri et Morgenroth (2004) ont également montré que la DCO d'un lisier porcin après stockage anaérobie en lagune était quasi totalement associée aux particules de plus de 10 μm , tandis que cette fraction ne représentait qu'environ 75% de la DCO du lisier frais.

2.2. DEVENIR DES ELEMENTS TRACES METALLIQUES

Les éléments traces métalliques en digestion anaérobie ont été particulièrement étudiés suivant deux approches :

- L'effet sur les performances du procédé par des approches biochimique et microbiologique ;
- La maîtrise des flux de ces éléments potentiellement dangereux dans les procédés de traitement des eaux usées par des approches physiques et chimiques.

Gould & Genetelli (1975) ont établi que les éléments traces métalliques présents dans les boues digérées peuvent se trouver sous 6 formes différentes : soluble, complexés à la matière organique, adsorbés, précipités, co-précipités dans des oxydes métalliques ou encore associés à des résidus biologiques. Hayes et Theis (1978) ont de plus montré que l'essentiel des métaux était quasi exclusivement réparti entre les précipités inorganiques et la biomasse microbienne. Comme cela a été dit au paragraphe 1.2 de ce chapitre, le potentiel d'oxydoréduction (Eh) du milieu doit être inférieur à -300 mV pour que la digestion anaérobie se déroule de façon optimale. A ces valeurs d'Eh, seules des formes réduites telles que des phosphates (PO_4^{3-}), des carbonates (CO_3^{2-}) et des sulfures (S^{2-}) pourront être précipitées (Theis et Hayes, 1978). Callander et Barford (1983) ont proposé des modèles pour l'estimation de la production des sulfures et des carbonates à partir des conditions du milieu de digestion et de la qualité du biogaz produit. La Figure 8 synthétise les équilibres chimiques et les formes majoritaires en fonction de l'Eh et du pH.

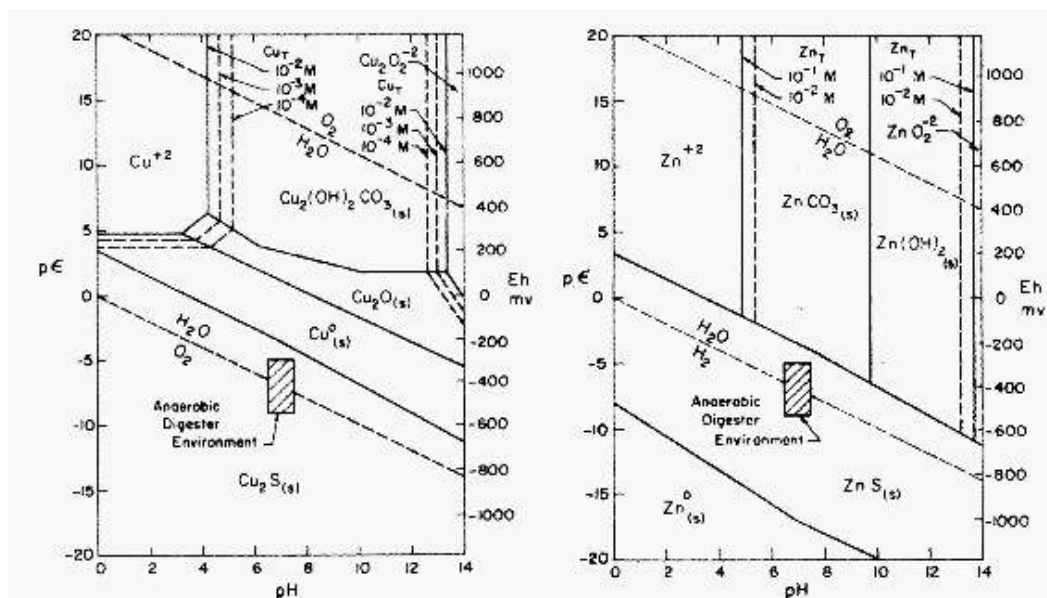


Figure 8 : Diagrammes Eh-pH pour le cuivre et le zinc (extrait de Theis et Hayes, 1978)

Une approche par extraction séquentielle sur des boues primaires et secondaires avant et après digestion anaérobie conduite par Lake *et al.* (1985) en digesteur de laboratoire a permis d'établir une répartition des métaux en 5 fractions ; échangeable, adsorbé, lié à l'organique, carbonate et sulfures. Ce travail a montré que la méthanisation modifie la répartition des métaux : les formes plus extractibles (échangeable, adsorbé) évoluent vers des formes plus stables. Cela est particulièrement vrai pour le cuivre dont la fraction « sulfures » devient la plus importante. En revanche, le zinc est apparu assez insensible à la digestion anaérobie, en demeurant essentiellement lié à la matière organique (environ 80% de la quantité totale). Ces résultats sur le zinc sont en accord avec ceux présentés par Hayes & Theis (1978). Ces auteurs ont montré que le zinc est majoritairement sous forme intracellulaire, suggérant que cet élément est prélevé par les bactéries grâce à un système de transfert actif (implication de molécules capables de chélater les métaux).

Par ailleurs, Gould & Genetelli (1978) ont placé des boues anaérobies au contact de solutions de sels métalliques (Cu, Zn, Cd et Ni) pour des pH allant de 5,0 à 8,0. Ils ont pu montrer que la répartition des métaux par rapport aux solides totaux semblait obéir à des lois d'adsorption tant que les concentrations en métaux n'induisaient pas de précipitation. De plus, ce comportement était étroitement lié avec le pH du milieu, et ce en particulier pour le zinc. D'après les auteurs, ce comportement peut s'expliquer par le fait que la matière organique constituant les boues contient des ligands faiblement acides (groupes phénoliques ou carboxyliques par exemple) qui permettent de complexer les cations métalliques, mais également les protons. Theis et Hayes (1978) ont déterminé des constantes d'affinité entre la biomasse anaérobie et les métaux. Les valeurs obtenues étaient élevées ($6,06 \times 10^{17}$ pour Cu et $1,26 \times 10^{15}$ pour Zn) traduisant le fait que la biomasse est véritablement active d'un point de vue chimique dans un digesteur. Ces auteurs ont également montré que la biodisponibilité des métaux pour les bactéries était contrôlée par la formation de sulfures.

Plus récemment, Artola *et al.* (2000) ont étudié l'adsorption de métaux sur des boues digérées. Ces auteurs ont montré que les boues pouvaient adsorber jusqu'à 1,5 mmol de cuivre et 0,6 mmol de zinc par gramme de solides. De plus, le cuivre est apparu comme l'élément ayant la plus grande affinité et pouvant même désorber le zinc.

3. LA METHANISATION DES LISIERS PORCINS

Les appareils digestifs animaux constituent un des trois écosystèmes anaérobies naturels (p.25 et Figure 9). Les lisiers issus de la digestion animale contiennent donc les microorganismes et le pH (Tableau 1) nécessaires au développement optimum de la digestion anaérobie. Ils présentent donc des conditions favorables à la méthanogenèse (Zehnder et Stumm, 1988). C'est la raison pour laquelle la digestion anaérobie des effluents d'élevage s'est développée, en particulier dans les pays en développement (Marchaim, 1992).

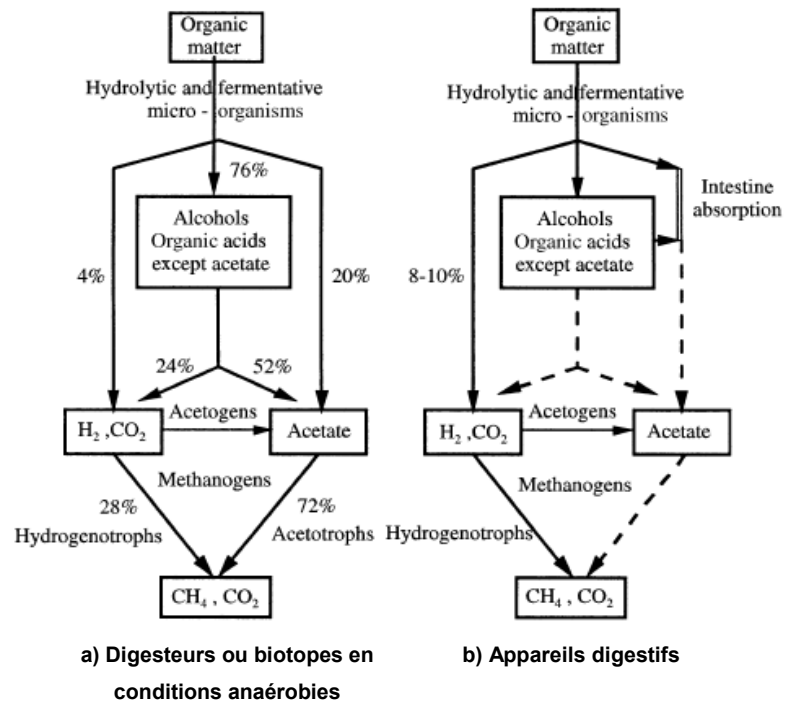


Figure 9 : Similitude de fonctionnement entre les biotopes anaérobies naturels ou contrôlés (a) et les environnements intestinaux animaux (b). Extrait de Garcia *et al.*, 2000. Les pourcentages indiquent le flux de C, et les traits pointillés traduisent une diminution des flux dans la chaîne trophique

3.1. INTERETS DE LA DIGESTION ANAEROBIE DES LISIERS PORCINS

❖ PRODUCTION D'UNE ENERGIE RENOUVELABLE

La valorisation des effluents d'élevage en méthanisation permet de limiter les émanations de gaz à effet de serre tels que le CH_4 au cours du stockage. Cet aspect n'est pas négligeable dans la mesure où les émissions de CH_4 d'origine agricole sont estimées à 28 Mt.an^{-1} , soit entre 6 et 10% des émissions totales d'origine anthropique (Martinez et Le Bozec, 2000).

De plus, le biogaz produit est une source d'énergie renouvelable valorisable sur site (chauffage et éclairage des bâtiments par exemple), ou valorisable pour la revente au réseau d'électricité (Burton et Turner, 2003).

❖ DESODORISATION

Du fait de la dégradation des phénols, des AGV et de la stabilisation de la matière organique, un lisier digéré présente une odeur moins désagréable qu'un lisier non traité. Powers *et al.* (1999) ont évalué cette diminution lors du traitement des effluents d'un élevage laitier anaérobie en réacteur infiniment mélangé (RIM) ou en réacteur à biomasse fixée (lit fixe). En RIM, l'odeur, évaluée par un jury de nez de 100 personnes, était atténuée proportionnellement au temps de rétention hydraulique entre 0 et 20 jours. La comparaison de ces résultats aux analyses chimiques des effluents a montré que la concentration totale en phénol était le paramètre le mieux corrélé à la perception de l'odeur.

Hansen *et al.* (2005) ont montré que la nuisance olfactive, exprimée en unités d'odeurs par m³, au dessus d'un stockage de lisier non agité, mais également après épandage, était divisée par 2 lorsque le lisier est traité par digestion anaérobie. De plus, ces auteurs ont observé une diminution de 15 à 25% des émanations d'ammoniac après épandage d'un lisier méthanisé par rapport à un lisier non traité. Les effets au champ ont été mis en relation avec la diminution de viscosité du lisier au cours du traitement et une meilleure infiltration dans le sol. Enfin, Rees *et al.* (1990) ont montré que la digestion anaérobie de lisiers porcins réduit les émissions d'odeur de 70 à 80% au cours des 6 premières heures suivant l'épandage.

❖ HYGIENISATION

Dans le paragraphe sur la pollution des eaux, les risques pathogènes pour l'homme ont été évoqués. De nombreuses études ont été conduites sur les différents pathogènes cités précédemment. Une revue de ces essais a été réalisée par Sahlström (2003), soulignant le rôle du couple température et temps de séjour sur l'inactivation des bactéries.

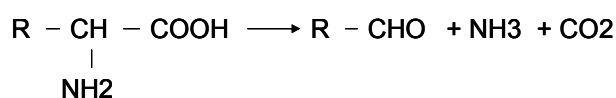
Dans les conditions de la plupart des réacteurs agricoles (environ 37°C et 20 jours de temps de séjour), toutes les espèces de *Salmonella* et *Y. enterocolitica* étaient inactivées, tandis que *L. monocytogenes* n'était que stressée. En revanche, les spores de *Cl. Perfringens* n'ont pas pu être inactivées, quelles que soient les conditions de température (essai sur 24 heures).

De plus, les systèmes discontinus sont plus efficaces en terme de réduction des pathogènes que les systèmes continus.

❖ VALEUR FERTILISANTE ET DEVENIR DE L'AZOTE

Les lisiers porcins sont riches en éléments fertilisants (p.18) qui vont être conservés au cours de la digestion anaérobie, maintenant l'intérêt agronomique de ces effluents.

L'azote des lisiers est majoritairement sous forme ammoniacale (p.18), et cette proportion va augmenter au cours de la méthanisation (Solagro, 2001). En effet, la protéolyse (fragmentation des protéines) va permettre la désamination puis la décarboxylation des acides aminés constituant la protéine selon la réaction :



Cette minéralisation de l'azote va permettre une gestion plus efficace des épandages dans la mesure où l'azote sera apporté sous une forme facilement utilisable par les végétaux. Ortenblad (2000) rapporte des essais au champ qui ont montré l'efficacité de lisiers méthanisés en terme de fertilisation azotée. Ainsi, l'épandage avec enfouissement direct sur culture de maïs à deux stades différents (avant semis et sur des plantes de 30 cm) a montré une augmentation des rendements par rapport à une fertilisation minérale. Inversement, les rendements étaient diminués lorsque le lisier n'était pas enfoui. Les lisiers méthanisés présentent ainsi une bonne valeur fertilisante à condition d'être apportés de façon adéquate. C'est une des raisons pour lesquelles différents systèmes d'épandage avec enfouissement direct se sont développés (Photo 1).



Photo 1 : Système d'épandage avec enfouissement direct

Par ailleurs, la stabilisation de la matière organique après digestion anaérobie a deux effets principaux sur le devenir de l'azote Ortenblad (2000). Dans le sol, la stabilisation de la matière organique se traduit par diminution de l'activité bactérienne. Ainsi, l'apparition de zones anaérobies du fait d'une consommation d'oxygène par la biomasse microbienne est limitée, permettant de réduire la dénitrification (réduction des nitrates NO_3^- en azote gazeux N_2). De même, le phénomène de « faim d'azote » dû à l'immobilisation de l'azote par la flore bactérienne du sol pour son métabolisme, et qui peut provoquer des carences pour la plante, sera également réduit.

3.2. CONTRAINTES DE LA DIGESTION ANAEROBIE DES LISIERS PORCINS

Cependant, les lisiers ont un potentiel de production de biogaz relativement faible. De plus, la mise en œuvre d'unités de digestion anaérobie à partir de lisiers de porcs demande une attention particulière du fait de la présence d'inhibiteurs (Marchaim, 1992 ; De La Farge, 1995) ou de déséquilibres :

- L'azote ammoniacal : les lisiers contiennent des quantités importantes d'azote (dus à la présence de protéines, voir p.18) qui vont être minéralisées lors de la digestion anaérobie. Dans le digesteur la formation d'ammoniac par désamination est rapide, et peut inhiber la méthanogenèse lorsque la concentration dépasse 80 mg.L^{-1} . Cependant, il semble que la forme libre (ammoniac, NH_3) soit plus toxique que la forme ionisée (ammonium, NH_4^+), qui est favorisée dans le digesteur d'après les conditions physico-chimiques. Le système peut alors tolérer des concentrations d'environ $3 \text{ g N-NH}_4.\text{L}^{-1}$, et jusqu'à $5 \text{ g N-NH}_4.\text{L}^{-1}$ après adaptation des microorganismes, tandis qu'une inhibition sévère est observée au delà de $500 \text{ mg N-NH}_3.\text{L}^{-1}$ (Mata-Alvarez *et al.*, 2000).
- Les antibiotiques (De La Farge, 1995) : dans le cas d'utilisation massive de ces composés au niveau de l'élevage, ils peuvent être excrétés et jouer leur rôle sur les microorganismes du digesteur. Ce cas est cependant de plus en plus rare du fait de la rationalisation de l'utilisation des antibiotiques dans les élevages.

- Les acides gras volatils (AGV) : ces sous-produits de la digestion animale contenus dans les lisiers (acétate, propionate et butyrate) sont associés à des effets toxiques, très vraisemblablement en raison de la baisse de pH que leur formation entraîne. Cependant, les lisiers présentent un excellent pouvoir tampon par rapport aux variations de pH du fait de la présence d'azote en quantités importantes. Ainsi, dans le digesteur, la formation de NH_4^+ couplée à la dissolution du CO_2 va conduire à un équilibre $\text{NH}_4^+ + \text{HCO}_3^- \Leftrightarrow \text{NH}_4\text{HCO}_3$ qui permettra le maintien du pH à des valeurs optimales pour les bactéries. Les risques d'acidification du fait de l'accumulation des AGV seront donc limités.
- Les éléments traces métalliques : Marchaim (1992) rapporte des travaux qui ont montré que les éléments traces métalliques sous forme ionisée inactivent les groupes sulfhydryles des enzymes bactériennes en formant des mercaptides. Theis et Hayes (1978) ont montré que la quantité de métaux liée à la biomasse microbienne est partiellement contrôlée par la teneur en soufre du milieu. Ainsi, pour limiter la toxicité des éléments métalliques, il est possible d'ajouter des sulfates de façon à favoriser la formation de sulfures métalliques insolubles. Un autre moyen est de contrôler les entrées de ces métaux, en épurant les substrats, ou en diluant les métaux par mélange de différents co-substrats.
- Les proportions de carbone, d'azote et de phosphore : pour une dégradation optimale, les microorganismes anaérobies nécessitent un rapport C : N : P de 400 : 7 : 1 tandis que le lisier possède en moyenne un rapport de 115 : 9 : 4 traduisant un excès d'azote et de phosphore. Les performances de traitement peuvent donc être améliorées par l'ajout d'une source de carbone.

La digestion anaérobie est donc un procédé adapté au traitement des lisiers porcins (Figure 10). Elle permet une désodorisation et une stabilisation des effluents tout en maintenant leur valeur fertilisante. Cependant, la méthanisation ne permet pas de réduire les quantités de lisier épandues, ni les quantités de cuivre et de zinc apportées au sol, ces éléments étant, tout comme l'azote, conservés par ce procédé. En ce qui concerne les éléments traces métalliques, le problème de leur accumulation dans les sols suite aux épandages reste donc entier.

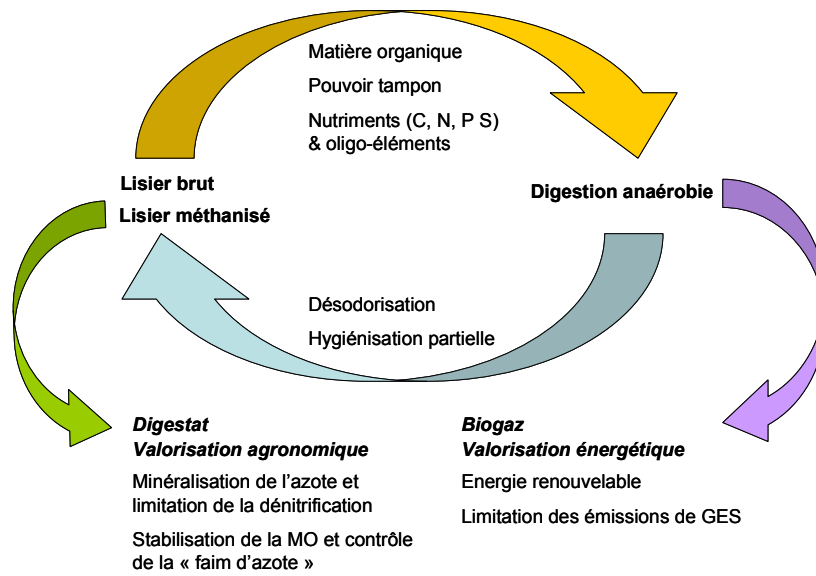


Figure 10 : Intérêts de la digestion anaérobie des lisiers porcins

CHAPITRE III : CUIVRE ET ZINC DANS LE SYSTEME SOL-PLANTE

1. DYNAMIQUE DU CUIVRE ET DU ZINC DANS LE SOL

1.1. TERMINOLOGIE

Dans le tableau périodique de Mendeleïev, le cuivre et le zinc sont deux éléments d'une même période, mais appartenant à 2 familles distinctes parmi les 10 qui constituent les métaux de transition. Ils sont présents de façon naturelle dans la croûte terrestre, mais leur concentration y est faible, le terme « élément-trace » pourra donc être utilisé pour les désigner d'un point de vue géologique ou géochimique. En effet, ce terme s'applique aux éléments dont la concentration massique dans la croûte terrestre est inférieure à 0,1 %.

D'un point de vue biologique, le cuivre et le zinc sont des « micro-éléments » ou oligo-éléments : ils sont indispensables au métabolisme des êtres vivants (végétaux et animaux), on les retrouve donc dans leur tissus mais à de plus faibles teneurs que dans les sols (< 0,01%). Cependant, aux fortes concentrations, ils pourront devenir toxiques, comme le montre la Figure 11. Ce phénomène justifiera alors l'appellation de micro-polluant métallique.

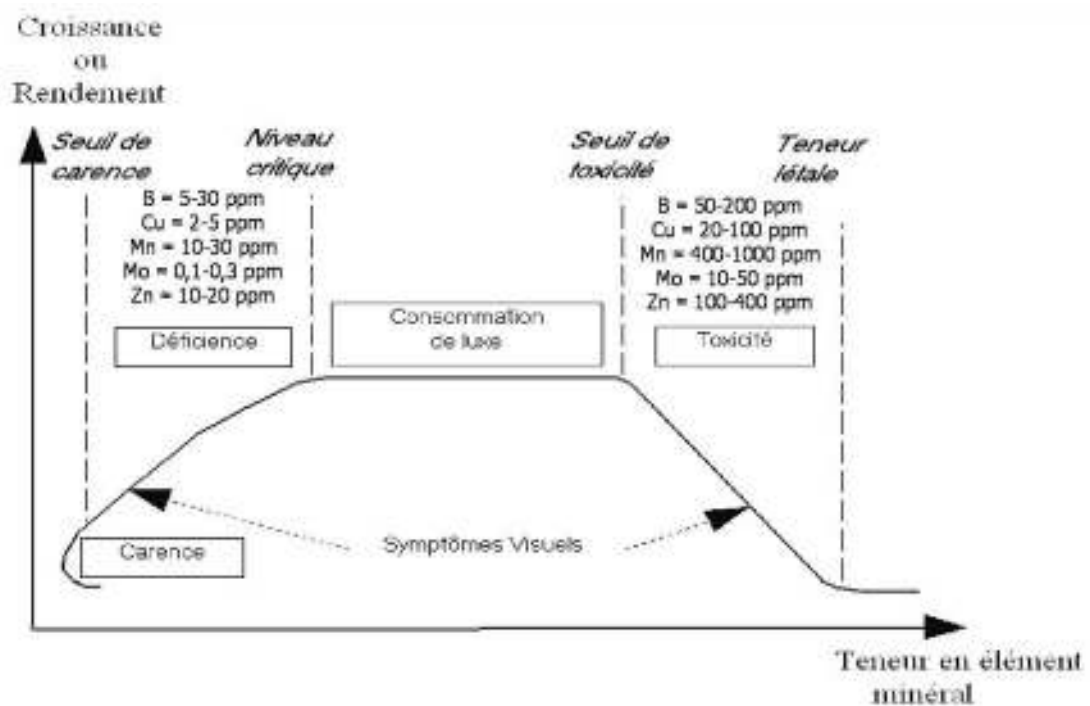


Figure 11 : Courbe de croissance en réponse au statut nutritionnel de la plante en oligo-élément essentiel (Morard, 1995 ; Kabata-Pendias et Pendias, 1992)

Dans la suite, le cuivre et le zinc pourront être indifféremment appelés élément trace métallique (ETM) ou oligo-élément. Le terme « métal lourd », qui désigne normalement les métaux formant des précipités insolubles avec les sulfures, peut induire de nombreuses confusions entre micropolluants métalliques, oligo-éléments, et métalloïdes, ce pourquoi il sera proscrit.

1.2. DISTRIBUTION DE CU ET ZN DANS LE SOL

Selon différents auteurs cités par Sterckeman *et al.* (2006) dans une synthèse bibliographique récente, la croûte continentale terrestre contient en moyenne, par kilogramme de sol, entre 14 et 32 mg de cuivre (et jusqu'à 70) et entre 52 et 71 mg de zinc (et jusqu'à 150). En fonction de la nature du matériau parental et de l'altération de ce matériau, on retrouve des concentrations légèrement inférieures ou légèrement supérieures à ces valeurs là, tant que les sols ne sont pas contaminés.

Dans les sols, le cuivre et le zinc se retrouvent, comme les autres métaux traces, au sein des différents constituants des sols (Figure 12) : dans les tétraèdres des silicates des minéraux primaires et secondaires ; au sein des autres édifices cristallins (ou gels amorphes) : phosphates, carbonates, oxy-hydroxydes de fer et de manganèse, sulfures ; dans la matière organique plus ou moins humifiée ou dans la biomasse microbienne. La fraction la plus accessible à la solution du sol sera celle adsorbée à la surface de chacun de ces constituants.

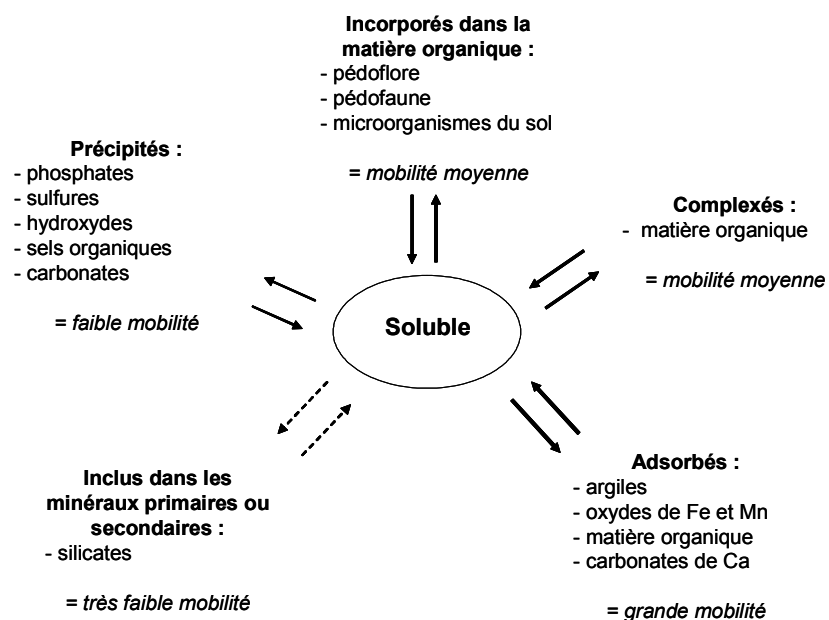


Figure 12 : Phases porteuses des éléments traces métalliques dans le sol (Baize, 1997)

Il existe une littérature très abondante sur cette compartimentation pédologique des métaux (Tessier *et al.*, 1979 ; Sposito *et al.*, 1982 ; Juste, 1988 ; Kabata-Pendias *et al.*, 1992 ; Alloway,

1995 ; Baize, 1997). Selon ces auteurs, dans les sols non calcaires et non contaminés, Cu et Zn présentent une très forte affinité avec le fer qui est un des éléments majeurs des sols.

Dans un ouvrage de synthèse, Sparks (1995) recense les séquences de sélectivité des cations métalliques divalents pour différentes formes de fer : le cuivre, le zinc et le plomb sont parmi les éléments qui ont la plus grande affinité pour le fer des hydroxydes amorphes ou bien cristallisés comme la Goethite ou la Magnétite.

Ces fortes affinités Fe-Cu et Fe-Zn se traduisent par le fait que la répartition des teneurs totales en cuivre et en zinc au sein des profils de sol est parallèle à celle du fer comme l'illustre la Figure 13, pour le cuivre. Plus récemment, d'autres auteurs ont fait le même constat dans d'autres types de sol (Sterckeman *et al.*, 2006 ; Soubrand-Colin *et al.*, 2007). Dans les zones de concrétionnement du fer, là où les teneurs en fer sont 10 fois supérieures à celles des autres horizons, Cornu *et al.* (2005) ont mesuré des concentrations 10 fois plus fortes en Cu et Zn que dans le reste des profils.

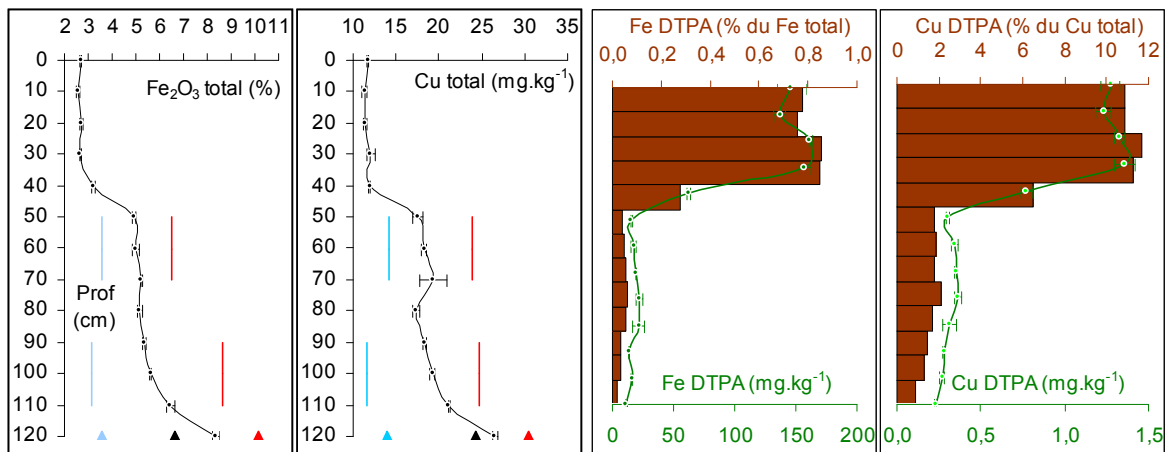


Figure 13 : Profils des teneurs totales et extractibles en Cu et Zn dans les sols de Boulbènes, Haute-Garonne (Gavalda, 2001). En noir ce sont les concentrations dans la matrice, en bleu dans les zones réduites, en rouge dans les zones oxydées.

Plusieurs auteurs ont donc proposé des modèles linéaires simples qui permettent de prévoir les teneurs en cuivre et en zinc issus du fond géochimique, à partir de celles en fer. Ces modèles permettent de différencier les métaux traces naturellement présents dans les profils de ceux apportés par des contaminations (Cecchi *et al.*, 2006 ; Lamy *et al.*, 2006).

D'autres auteurs soulignent un lien fort entre Cu et Zn et la matière organique des sols. Soubrand-Colin *et al.* (2007) ont mis en évidence que, dans les sols du Massif Central, la pédogenèse conduit à un enrichissement relatif en Cu et Zn qui suit celui de l'aluminium et de la matière organique suggérant que ces métaux sont immobilisés dans des complexes organo-métalliques.

Aux métaux endogènes s'ajoutent les apports anthropiques relativement récents.

Concernant le cuivre, les contaminations anthropiques sont essentiellement liées à l'épandage de déchets agricoles (55% des apports), de déchets urbains (28%) et aux retombées atmosphériques (16%) (Coppenet *et al.*, 1993 ; Baize, 1997 ; Bourrelier et Berthelin, 1998 ; Hlavackova, 2005). De part

ses propriétés antifongiques fortes, la « bouillie bordelaise » (mélange de sulfate de cuivre et de chaux) constitue un apport en Cu important essentiellement en viticulture, depuis 1885. Les flux sont estimés entre 10 et 15 kg Cu.ha⁻¹.an⁻¹ (Chaignon, 2001), et représentent des apports 10 fois supérieurs à ceux générés par les lisiers. Au début du siècle, le vignoble français couvrait 2 000 000 d'hectares contre 850 000 hectares actuellement : ces sols ont, dans la majorité des cas, des teneurs comprises entre 80 et 500 mg Cu.kg⁻¹ (Bourrelier et Berthelin, 1998) mais peuvent atteindre 1000 ppm selon Chaignon (2001).

Concernant le zinc, les contaminations anthropiques sont multiples : outre l'épandage agricole qui représente environ 40% des flux totaux d'après Nicholson *et al.* (2003), il existe également des sources minières et industrielles (métallurgie, incinération) ainsi qu'un apport par le trafic routier (Baize, 1997). Selon Juste *et al.* (1995) les seules retombées atmosphériques de zinc sont supérieures aux exportations par les récoltes et le lessivage. Selon Bourrelier et Berthelin (1998), la contamination atmosphérique diffuse dans le Sud Ouest de la France représenterait un flux de l'ordre de 30 g.ha⁻¹.an⁻¹. Le zinc est présent en quantités non négligeables dans tous les intrants agricoles : fumiers, lisiers, phosphates, chaux (Gavalda, 2001). Pour les sols du Pays de Galles et d'Angleterre, Nicholson *et al.* (1999) estiment que les fumiers et lisiers représentent 45 % des apports annuels de zinc et les retombées atmosphériques 35 %.

1.3. LA MOBILITE CHIMIQUE DE CU ET ZN

La mobilité chimique d'un élément dans les sols peut être définie comme l'aptitude de cet élément à être transféré vers les compartiments du sol où il est moins énergétiquement retenu ; le compartiment ultime est représenté par la solution du sol dans laquelle l'élément est immédiatement assimilable par les plantes (Loué, 1993 ; Juste *et al.* 1995).

Le passage en solution des métaux traces est essentiellement conditionné par des phénomènes de désorption de ces métaux, depuis la surface des argiles, de la matière organique ainsi que des oxy-hydroxydes de fer vers la solution du sol. La désorption est le processus inverse de l'adsorption. La quantité de métaux adsorbés est très dépendante des conditions de pH des sols (Figure 14).

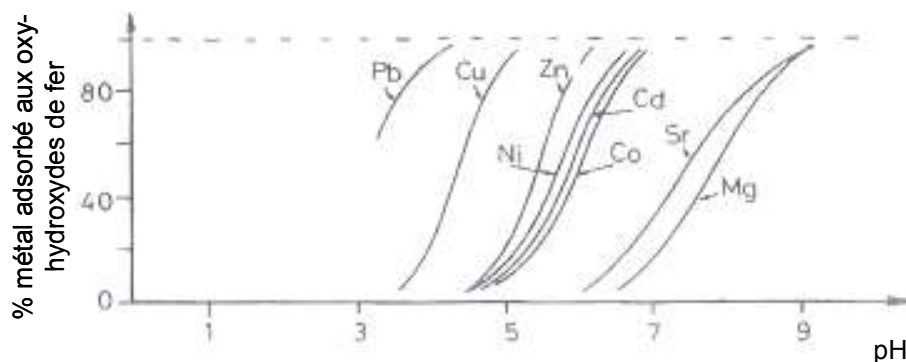


Figure 14 : Adsorption de différents cations bivalents aux oxy-hydroxydes de fer en fonction du pH (d'après Morel, 1998)

Finalement, les travaux de Tyler et Olsson (2001) montrent que si les teneurs en cuivre dans la solution du sol sont relativement faibles et peu influencées par le pH (Figure 15), en revanche, celles du zinc sont très dépendantes du pH du sol qui est le principal paramètre influant sur la mobilité du zinc dans le sol.

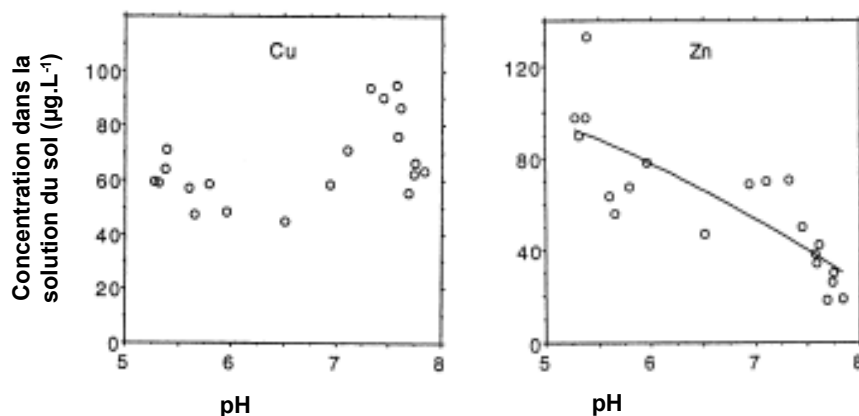


Figure 15 : Effet du pH du sol sur le passage en solution du cuivre et du zinc (extrait de Tyler & Olsson, 2001)

Globalement, le cuivre et le zinc rajoutés aux sols par les intrants agricoles s'accumulent en surface et ont une faible mobilité du fait de leur adsorption par les constituants du sol (oxydes de fer et matière organique en particulier), par l'intermédiaire des mécanismes de chimisorption et de physisorption (Kabata-Pendias et Pendias, 1992 ; Alloway, 1995). La chimisorption, ou adsorption spécifique, met en jeu des forces de liaisons fortes entre les ions et les constituants du sol (liaisons covalentes ou liaisons de coordination). La physisorption (échange cationique), ou adsorption non spécifique, met en jeu des forces d'attractions électrostatiques plus faibles que les précédentes (liaisons ioniques ou de Van der Waals, attraction / répulsion). Le cuivre et le zinc s'accumulant en surface, leur répartition au sein des profils est donc modifiée par les épandages. Alors que Gavalda (2001) a clairement montré que la répartition du cuivre et du zinc dans le profil d'un Alfisol non contaminé est corrélée à celle des oxydes de fer (Figure 13), Marsaux (2003) a obtenu le même résultat dans un Véracrisol de la région paloise où a été réalisée cette thèse. Elle a aussi montré que des épandages importants de lisier porcins méthanisés modifient la répartition de Cu et Zn, passant de formes majoritairement liées aux oxydes de fer à des formes liées majoritairement à la matière organique.

Finalement, de nombreux travaux rapportent une faible mobilité de Cu et Zn apportés aux sols par les intrants. Cependant, dans le cas d'épandage de lisiers, la force ionique des déjections animales (Japenga et Harmsen, 1990) et la quantité de matière organique soluble apportée au sol

peuvent être à l'origine d'une diminution du pH du sol (Christie et Beattie, 1989) qui favorise le passage dans la solution du sol du zinc en particulier.

2. PHYTO-ABSORPTION ET TRANSLOCATION DU CU ET DU ZN

2.1. ROLES DU CU ET DU ZN CHEZ LES VEGETAUX

2.1.1. Cuivre

Dès 1930, le cuivre est reconnu comme élément trace essentiel pour les végétaux (Alloway, 1995). Il joue un rôle important dans divers processus métaboliques, en participant à la constitution de différentes protéines (Marschner, 1995) :

- la plastocyanine pour la photosynthèse ;
- les superoxydes dismutases pour la lutte contre le stress oxydant ;
- les peroxydases pour la lignification ;
- les oxydases pour l'oxydation de composés tels que les ascorbates, les diamines, les phénols ;
- les cytochromes oxydases pour la respiration cellulaire.

De plus, le cuivre joue également un rôle sur la viabilité des pollens (Loué, 1993).

La teneur moyenne de cuivre dans les végétaux est généralement inférieure à $20 \mu\text{g.g}^{-1}$ MS (Kabata-Pendias et Pendias, 1992). En deçà d'une concentration de 2 à $5 \mu\text{g.g}^{-1}$ MS dans les parties végétatives, les symptômes de carence en cuivre sont observés : croissance ralentie, déformation et blanchissement des jeunes feuilles, nécrose de l'apex... De nombreux processus métaboliques sont alors affectés (Loué, 1993) : métabolisme des hydrates de carbone, de l'azote ou encore des parois cellulaires. Inversement, au delà de 20 à $100 \mu\text{g.g}^{-1}$ MS, ce sont les symptômes de toxicité qui apparaissent, inhibant la croissance de racines avant celle des parties aériennes. Cette toxicité peut se traduire par une déficience en fer et une chlorose en conséquence du dérèglement de la peroxydation des lipides et de la destruction des membranes. En sol, la toxicité du cuivre est rarement observée du fait des fortes liaisons du métal pour les différentes composantes du sol.

Les végétaux disposent d'un mécanisme de tolérance aux éléments traces métalliques. Pour le cuivre, les mécanismes principaux sont la compartimentation de complexes solubles ou non, dans le cytoplasme ou les vacuoles (Marschner, 1995). La toxicité peut être induite à des concentrations très différentes, selon la plante et le sol étudiés.

2.1.2. Rôle du zinc

Le zinc entre dans la composition d'un très grand nombre d'enzymes (plus de 300), au sein desquelles il remplit trois types de fonctions : catalytiques, co-catalytiques ou structurales. Le zinc est

particulièrement important pour le métabolisme des sucres, des protéines et des phosphates, mais il joue également un rôle par rapport à l'ADN, via des métalloprotéines impliquées dans la réplication et la transcription de l'ADN, et donc la régulation de l'expression des gènes. De plus, le zinc influence également l'intégrité et la perméabilité des membranes, et permet la protection des lipides et protéines membranaires du stress oxydant.

La teneur moyenne de zinc présent dans les végétaux est très variable, mais elle est généralement comprise dans une fourchette allant de 15 à 70 $\mu\text{g.g}^{-1}$ MS. De plus, dans les plantes cultivées sur des sols contaminés, la concentration peut dépasser 100 $\mu\text{g.g}^{-1}$ MS, une grande proportion du métal étant concentrée dans les racines.

Chez les végétaux, une carence en zinc entraîne des modifications morphologiques des feuilles (taille réduites, déformations), et chez les dicotylédones, un raccourcissement de l'entre-noeud, conduisant à un raccourcissement de la tige. Les niveaux critiques de carence dans les feuilles sont estimés entre 10 et 20 $\mu\text{g.g}^{-1}$ MS.

Différents facteurs imposés par le sol peuvent être à l'origine d'une déficience en zinc : des teneurs en zinc faibles, une nature calcaire et un pH supérieur à 7, une faible teneur en matière organique, une inactivation par les microorganismes. De plus, l'assimilation du zinc peut être réduite par les difficultés d'exploration du sol par les racines et des températures basses, ou encore des effets antagonistes (avec le cuivre, le fer ou le phosphore par exemple). Enfin, le seuil de carence est variable entre les espèces végétales.

Les concentrations considérées comme toxiques sont estimées entre 100 et 400 $\mu\text{g.g}^{-1}$ MS (Kabata-Pendias et Pendias, 1992). Cette toxicité se traduit par une réduction de la croissance des racines et des feuilles, suivie d'une chlorose des jeunes feuilles pouvant être induite par une carence en fer ou magnésium. Le principal mécanisme de tolérance au zinc consiste en l'immobilisation du métal dans les vacuoles (Marschner, 1995).

2.2. MECANISMES D'ABSORPTION DU CUIVRE ET DU ZINC

Avant d'être absorbés par le végétal, les éléments traces métalliques doivent être transférés à proximité de la racine, dans la rhizosphère. Ce mouvement peut être réalisé par simple diffusion selon un gradient de concentration dans la solution du sol, ou par flux de masse du fait de l'absorption de quantités d'eau importantes par les racines pour compenser les quantités perdues par évapotranspiration au niveau des parties aériennes.

Une racine présente, en partant de son extrémité (Figure 16), une zone méristématique (embryonnaire), appelé également point végétatif ou apex, qui constitue le pôle de croissance où a lieu la division cellulaire, protégée par une coiffe conique composée de cellules subérisées se renouvelant constamment. Cette coiffe, par la sécrétion de polysides (mucilages), a un rôle lubrifiant afin de permettre une meilleure pénétration de la racine dans le sol. Vient ensuite une zone d'élongation, limitée à quelques millimètres, où les cellules formées au niveau du point végétatif s'allongent et où les tissus racinaires se différencient. Puis la racine comprend une zone pilifère ou rhizoderme, étendue sur quelques centimètres et dont la durée de vie est limitée. Dans cette dernière

zone, chaque poil absorbant est constitué d'une seule cellule très allongée à grande vacuole, dont les parois nues permettent l'absorption de l'eau et des sels minéraux par osmose. Enfin, après dégradation du rhizoderme, un nouveau tissu cortical de cellules subérisées se forme : l'exoderme.

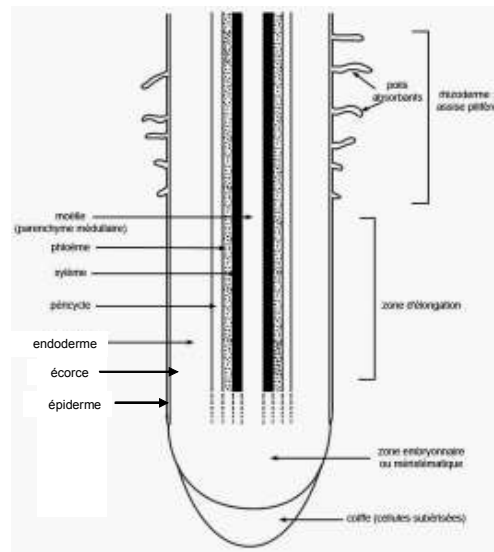


Figure 16 : Coupe longitudinale de racine ; principaux tissus

Pour entrer dans le végétal, les éléments traces métalliques doivent donc traverser la membrane plasmique des cellules au niveau des poils absorbants (Figure 17) : c'est la voie symplastique qui permet l'absorption des éléments traces. Les éléments peuvent également demeurer à l'extérieur des cellules, dans l'espace les séparant ou à leur surface : c'est la voie apoplastique (Figure 17).

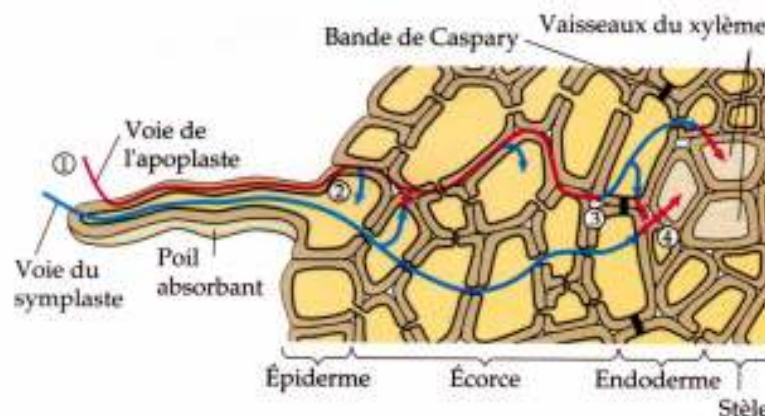


Figure 17 : Coupe d'une racine (d'après Bourbonnais, 2007)

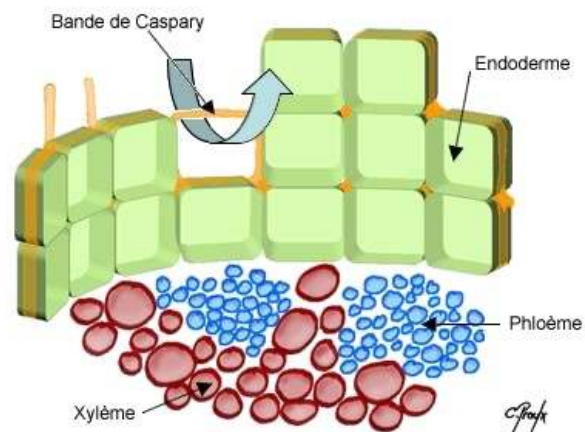
L'absorption par la voie symplastique peut s'effectuer selon 3 modes principaux :

- Une absorption passive, c'est-à-dire une diffusion selon un gradient électrochimique ne demandant pas d'énergie ;

- Une absorption passive demandant de l'énergie du fait par exemple du fonctionnement d'une pompe à protons ;
- Une absorption active demandant de l'énergie et utilisant un transporteur.

Le prélèvement des éléments traces par la voie apoplastique est un phénomène passif. Il s'arrête au niveau de l'endoderme du fait de la présence de cellules dont la paroi est imperméabilisée par la subérine, formant les barrières de Caspary (Figure 18). L'élément doit alors passer par la voie symplastique pour entrer dans les cellules et être absorbé par le végétal. La voie apoplastique peut représenter une part importante pour des cations métalliques qui entrent difficilement dans la cellule et se lient facilement aux parois cellulaires chargées négativement. De façon générale, les monocotylédones accumulent moins les métaux que les dicotylédones à ce niveau du fait d'une charge négative plus faible au niveau des parois : Mench (1990) rapporte des capacités d'échange cationique de 29 mEq.100 g⁻¹ MS pour le maïs contre 54 mEq.100 g⁻¹ MS pour le haricot. Cathala et Salsac (1975) ont montré que la fixation du cuivre sur les parois pectocellulosiques est plus importante chez le tournesol que chez le maïs, en relation avec une CEC des racines qui est près de 4 fois supérieure.

Figure 18 : Structure de l'endoderme et passage des éléments par la voie symplastique du fait de la présence de cellules subérisées au niveau des bandes de Caspary (d'après Bourbonnais, 2007)



L'assimilation du cuivre est un phénomène actif, bien qu'une diffusion passive puisse également avoir lieu, dans la gamme de concentrations toxiques par exemple. Cependant, les mécanismes d'absorption sont encore mal connus. Il semble qu'il ne soit pas assimilé sous la forme Cu^{2+} , tandis qu'il a été montré que Cu^{2+} peut se lier aux phytosidérophores. En effet, Roberts et al. (2004) ont montré que le transporteur YS1 (Yellow Stripe 1), connu pour son rôle dans l'assimilation du fer via les phytosidérophores, est également impliqué dans l'assimilation du cuivre par les graminées. Dans la plante, 98 à 99% du cuivre sont complexés et les concentrations en Cu^{2+} et Cu^+ sont très faibles, y compris dans le xylème.

Bien que les taux d'absorption du cuivre soit parmi les plus faibles, et malgré la complexité des mécanismes impliqués, des relations ont pu être montrées entre la concentration en cuivre extractible et celle de la plante (Figure 19).

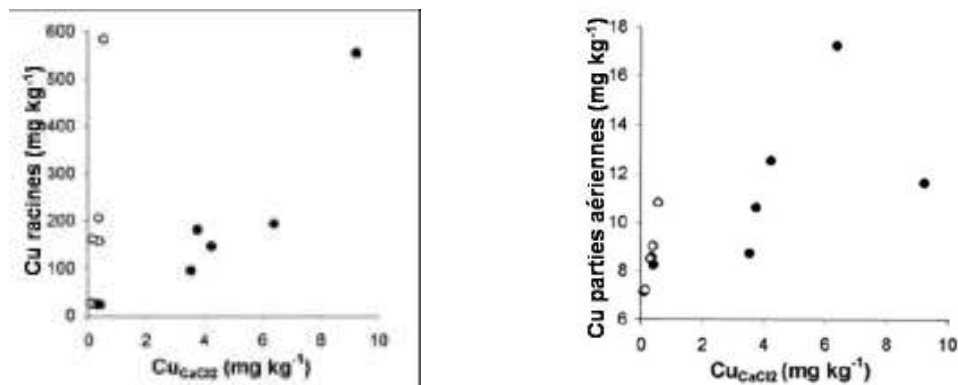


Figure 19 : Concentration en Cu dans les racines et les parties aériennes de *Zea mays* en fonction de la concentration en cuivre extractible au CaCl₂ (d'après Brun *et al.*, 2001)

D'anciens travaux indiquaient que le zinc est assimilé de façon majoritaire sous la forme Zn²⁺, qui est également la forme sous laquelle il est transporté dans la plante. Kabata-Pendias et Pendias (1992) avaient ainsi rapporté une relation linéaire entre la concentration dans la solution du sol, ou le sol, et la concentration dans la plante. Puis, les travaux de Von Wiren *et al.* (1996) ont proposé deux voies pour l'assimilation du zinc par les graminées : le transport du cation libre ou l'assimilation sous forme chélatée aux phytosidérophores. Plus récemment, les gènes codant pour les transporteurs du zinc, appelés de façon générale ZIP (Zinc-regulated transporters, Iron-regulated transporter-like Protein), ont été identifiés et séquencés. Ces travaux ont été conduits sur des plantes hyperaccumulatrices ou non (*Thlaspi caerulescens* et *Arabidopsis thaliana*) par différentes équipes (Grotz *et al.*, 1998 ; Lasat *et al.*, 1999 ; Van der Zaal *et al.*, 1999). Depuis, il a été montré que ces ZIP sont également impliqués dans le transport d'autres métaux (Guerinot, 2000 ; Wintz *et al.*, 2003).

2.3. TRANSLOCATION DU CU ET DU ZN

La translocation est le transport des éléments traces métalliques au sein de la plante. Elle peut varier considérablement en fonction du métal, mais également de l'espèce végétale. Le déplacement des racines vers les parties aériennes est effectué dans le xylème (Figure 17), par circulation de la sève brute.

Le cuivre est peu mobile au sein de la plante, ses déplacements dépendant étroitement de l'état nutritionnel général, et en particulier du métabolisme de l'azote (Loué, 1993) : le cuivre est relativement immobile pour les plantes souffrant de carence, tandis que sa mobilité est maximale dans le cas d'une consommation de luxe (Kabata-Pendias et Pendias, 1992). Les racines ont en effet une forte capacité à immobiliser le cuivre, au niveau des parois cellulaires, et les mécanismes de translocation sont encore mal connus. Dans les feuilles, le cuivre semble principalement lié aux plastocyanines, tandis que dans le xylème et le phloème, où les concentrations sont de l'ordre de traces, les concentrations sont liées à celles d'acides-amino. Sur une culture de maïs, Jarausch-

Wehrheim *et al.* (1996) ont montré que le cuivre était dans un premier temps accumulé au niveau des racines, puis, après 14 semaines de culture, l'élément était mobilisé vers les parties aériennes.

Le zinc est plus mobile au sein de la plante que le cuivre, cependant, les racines contiennent de plus grandes quantités que les parties aériennes, en particulier lorsque les apports sont importants. Dans le cas d'une consommation de luxe, le zinc peut être déplacé des racines vers les parties aériennes où ils se concentrent dans les chloroplastes, les vacuoles et les membranes cellulaires. Lors de la translocation, le zinc est chélaté à des acides organiques (Tremel-Schaub et Feix, 2005).

L'interaction entre le zinc et le phosphore sur la translocation du zinc a été rapportée par différents auteurs. Ainsi, des déficiences en zinc peuvent être induites avec des faibles doses de phosphore du fait d'une inhibition de la translocation du zinc plus qu'une réduction de l'absorption et de la teneur dans les racines (Loué, 1993).

Les quantités d'élément transporté vers les parties aériennes sont donc fonction de l'élément, mais elles dépendent également du végétal (Tableau 6) et/ou de l'organe considéré ainsi que des conditions du milieu.

Tableau 6 : Prélèvements de Cu et Zn par différentes cultures (Loué, 1993)

| | Cu (g.ha ⁻¹) | Zn (g.ha ⁻¹) |
|-----------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Céréales | 30 - 75 | 250 - 500 |
| Maïs | 25 - 90 | 300 - 600 |
| Pommes de terre (tubercule) | 55 - 90 | 90 - 180 |
| Betterave | 97 - 160 | 95 - 300 |
| Luzerne | 100 | 200 |
| Vigne (raisin) | 60 - 120 | 100 - 200 |

Dans la plupart des sols, les prélèvements de cuivre et de zinc par les cultures sont faibles par rapport aux quantités totales d'éléments présents dans le sol. En ce qui concerne le cuivre, il existe peu de risque de contamination de la chaîne alimentaire dans la mesure où l'élément est peu mobile dans la plante. Ainsi, le cuivre du sol est généralement toxique pour le végétal avant de l'être pour le consommateur (Jondreville *et al.*, 2002). En revanche, malgré des quantités d'élément importantes en sol, des carences peuvent être observées : le facteur limitant sera alors la phytodisponibilité.

3. INTRODUCTION A LA NOTION DE PHYTODISPONIBILITE

Selon Hinsinger *et al.* (2005), est biodisponible « la fraction d'un élément susceptible d'être absorbée par un être vivant donné, c'est-à-dire par la racine dans le cas des végétaux ». Donc, il n'existe pas une biodisponibilité, mais des biodisponibilités, en fonction des propriétés du sol, de l'élément trace et de l'espèce cible considérée. Notre étude ne s'intéressant qu'à la biodisponibilité

pour les végétaux, le terme de phytodisponibilité sera préféré pour décrire la quantité d'un élément qui pourra être transféré dans la plante au cours de son développement (Tremel-Schaub et Feix, 2005).

La phytodisponibilité dépend d'un ensemble de paramètres permettant le transfert d'un élément de la phase solide du sol jusqu'au végétal (Morel, 1998 ; Hinsinger *et al.*, 2005) : la disponibilité ou mobilité chimique, l'accessibilité ou mobilité physique et l'assimilabilité ou mobilité biologique. Hinsinger *et al.* (2005) parlent de « déterminants [...] de l'acquisition et de la biodisponibilité des nutriments dans le sol ».

3.1. DETERMINANTS CHIMIQUES

D'après Hinsinger *et al.* (2005) différents facteurs déterminent la mobilité chimique définie en p.44. La forme des nutriments dans le sol, et en particulier leur spéciation, c'est-à-dire la distribution d'un élément donné au sein des différentes espèces chimiques qu'il peut présenter en solution, est un des facteurs principaux à prendre en considération. Les alcalino-terreux (Ca, Mg) et les métaux de transition peuvent former des complexes inorganiques (phosphates, sulfates...) et organiques (avec des ligands organiques), et leur spéciation sera dépendante du pH (p.45), mais également de la réactivité des différentes espèces avec les constituants du sol (p.42). Pour les nutriments entrant dans la composition de molécules organiques tels N, P ou S, la transformation des molécules complexes en molécules plus simples et leur passage en solution nécessitent une batterie de réactions biochimiques. Pour les nutriments n'entrant pas dans la composition de telles molécules organiques, les processus de surface et les processus de dissolution/précipitation participent à la détermination de la mobilité des éléments.

Quatre facteurs chimiques majeurs seront donc déterminants pour la mobilité chimique des éléments :

- la loi d'action de masse, c'est-à-dire le maintien de l'équilibre de la concentration d'un élément donné dans la solution du sol (désorption/dissolution de l'élément si la concentration diminue ou au contraire adsorption ou précipitation si la concentration augmente) ;
- le pH, particulièrement important pour des éléments tels que P, Fe, Mn, Zn et Cu ;
- le potentiel d'oxydoréduction qui intervient sur les nutriments susceptibles de présenter différents niveaux d'oxydation, et en particulier pour les éléments associés aux oxydes de fer ou de manganèse ;
- l'activité enzymatique, pour les nutriments entrant dans la composition de molécules organiques.

3.2. DETERMINANTS PHYSIQUES

En l'absence de transfert des nutriments dans le sol, la racine ne peut accéder qu'aux éléments se trouvant à sa proximité immédiate : c'est l'interception. Ce phénomène est souvent négligeable pour l'acquisition des nutriments. La part la plus importante de l'absorption est liée au flux

de masse, et à la diffusion dans une moindre mesure. Le flux de masse est dû à l'absorption d'eau pour compenser la transpiration du végétal et s'accompagne d'un flux de nutriments présents dans la solution du sol. Le flux de masse est particulièrement important pour N, Ca ou Mg, tandis que pour des éléments tels que P, K ou les oligo-éléments, c'est la diffusion qui couvre la plus grande partie des besoins du végétal. La diffusion repose sur l'appauvrissement de la solution du sol en un élément donné à proximité de la racine, et donc à un flux diffusif permettant de rééquilibrer les concentrations selon le gradient qui a été créé.

Le flux de masse est donc dépendant des propriétés physiques du sol qui déterminent la transfert de l'eau dans le sol : la porosité, la texture, la structure... L'absorption dépend en particulier de la teneur en eau et de la tortuosité des pores, mais également du pouvoir tampon. Ce pouvoir tampon est défini, pour un élément donné, comme la dérivée de la concentration volumique de l'élément diffusible dans le sol (phase solide et solution) par rapport à la concentration dans la solution du sol (Hinsinger *et al.*, 2005). Enfin, les facteurs physiques limitant la colonisation du sol par la microflore ou la microfaune du sol réduisent également l'accès aux ressources : compaction, saturation en eau, hétérogénéité spatiale des nutriments...

3.3. DETERMINANTS BIOLOGIQUES

Hinsinger *et al.* (2005) répertorient trois stratégies mises en œuvre par les végétaux pour acquérir les nutriments du sol :

- Le développement d'une grande capacité d'absorption grâce à un équipement physiologique complexe au niveau des surfaces d'absorption (membranes des cellules racinaires de l'épiderme et du cortex).
- Le développement d'une surface d'absorption importante, qui est particulièrement essentielle pour l'acquisition des nutriments dont l'absorption est contrôlée par la diffusion (P et oligo-éléments), par l'étendue et la ramification du système racinaire. Cette surface de contact peut également être augmentée par la symbiose entre racines et champignons mycorhiziens.
- Les processus rhizosphériques : cet ensemble de processus physico-chimiques et biochimiques permet la mobilisation des nutriments dans la rhizosphère, c'est-à-dire le volume de sol soumis à l'influence de l'activité racinaire (Chaignon, 2001). Parmi ces phénomènes, la modification du pH par exsudation de H_3O^+ ou HO^- , ou exsudation d'anions organiques, ou production de CO_2 donnant de l'acide carbonique H_2CO_3 qui acidifie la rhizosphère joue un rôle important (Hinsinger *et al.*, 2003). Morel *et al.* (1986) ont également montré que les exsudats produits par la racine jouent un rôle sur les flux d'éléments traces métalliques dans les racines de maïs. Le rôle de ces ligands organiques sur le statut des métaux dans la rhizosphère a été largement décrit par les auteurs cités par Pampura et Ustinin (1999).

3.4. PARTICULARITES DU ZINC

La phytodisponibilité du zinc est particulièrement sensible aux conditions du milieu. Alloway (2004) a établi une liste des paramètres affectant cette phytodisponibilité et permettant de prendre en compte tout risque de carence en zinc pour les cultures, dont les plus sensibles sont le maïs, les haricots, le riz, le café, le sorgho ou encore des arbres fruitiers. Ces paramètres regroupent différentes caractéristiques des sols dont leur nature, teneurs en sels et des pH élevés, des conditions anaérobies (dans le cas de sols inondés par exemple), des faibles teneurs en matière organique et en zinc, et une fertilisation phosphatée dans le cas de sols pauvres.

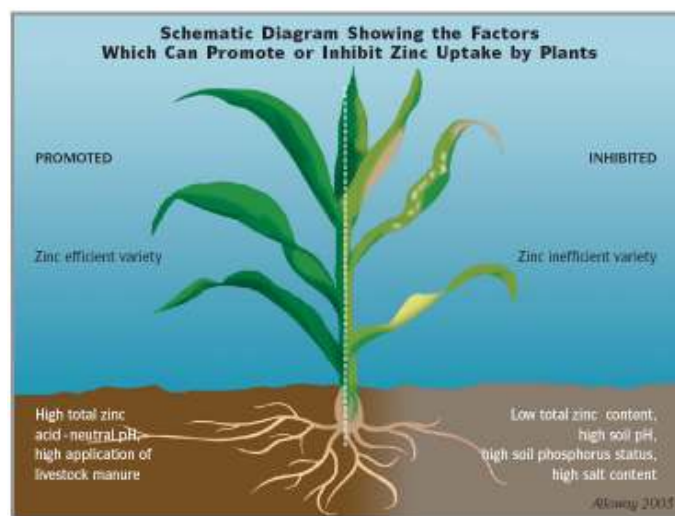


Figure 20 : Facteurs influençant la phytodisponibilité du zinc pour les végétaux (extrait de Alloway, 2004)

Au cours des dernières années, la phytodisponibilité des éléments traces métalliques a été particulièrement étudiée dans un souci de sécurité alimentaire. Cette évaluation est généralement réalisée selon une ou deux approches, en accord avec les processus impliqués dans la phytodisponibilité : une approche chimique qui mesure l'extractibilité de l'élément au moyen de réactifs chimiques (Lebourg *et al.*, 1996) et/ou une approche biologique par analyses de la concentration de l'élément dans la plante (Juste, 1988).

CHAPITRE IV : EVALUATION DE L'IMPACT DES APPORTS ANTHROPIQUES AUX SOLS DE CU ET ZN

1. MOBILITE, PHYTODISPONIBILITE ET RISQUES DE PHYTOTOXICITE

1.1. APPROCHE CHIMIQUE

Il est admis que la phytodisponibilité d'un élément dépend de sa mobilité chimique¹, et que sa concentration dans la solution du sol apporte une information sur cette phytodisponibilité (Brümmer *et al.*, 1986). Cependant, cette dernière donnée n'est pas suffisante pour estimer la quantité de métal biodisponible dans la mesure où les fractions adsorbées non spécifiquement ou faiblement complexées à la matière organique peuvent également être biodisponibles (Loué, 1993).

L'extraction chimique peut être utilisée pour mettre en solution une fraction de l'élément présent dans la phase solide du sol. De nombreuses stratégies d'extraction ont donc été développées, utilisant différents réactifs chimiques et différents protocoles d'extraction. Certaines méthodes sont plutôt adaptées à l'analyse des sols, et d'autres aux produits organiques destinés à l'épandage. Les extractions « uniques » sont les plus simples et consistent à simuler chimiquement ce qu'un organisme peut extraire d'une matrice solide. Les extractions « séquentielles » extraient successivement différentes fractions d'un élément, de la plus labile à la plus stable.

❖ EXTRACTIONS SIMPLES

Il s'agit ici d'évaluer la quantité d'élément biodisponible par utilisation d'un seul extractant tel que :

- Les complexants organiques : l'EDTA (Acide Ethylène DiaminoTétraacétique) et le DTPA (Acide Diéthylène TriaminoPentaacétique) sont les plus utilisés.
- Les solutions salines non tamponnées : CaCl_2 , NH_4NO_3 , NaNO_3 . Ces réactifs extraient les métaux par des réactions d'échanges cationiques.

Les extractions simples permettent également d'étudier les phénomènes d'adsorption/désorption des métaux dans le sol selon les variations de divers paramètres (pH, potentiel rédox).

Les travaux de Feng *et al.* (2005) ont comparé l'efficacité de l'EDTA, du DTPA, du NaNO_3 et du CaCl_2 pour évaluer la phytodisponibilité du cuivre et du zinc pour une culture d'orge. Pour le cuivre, aucun des réactifs n'est apparu performant pour estimer les concentrations dans les parties aériennes, et dans les racines, les concentrations n'ont été corrélées qu'à la fraction extraite par le

¹ aptitude de l'élément à être transféré vers les compartiments du sol où il est moins énergétiquement retenu

DTPA. Pour le zinc, les extractants ont donné de meilleurs résultats, avec des bonnes corrélations entre les fractions DTPA et EDTA et les concentrations dans les feuilles et les racines. Barona et Romero (1997) ont également montré une relation entre le Zn extrait à l'EDTA ou au DTPA et l'assimilation de zinc par les végétaux. Singh *et al.* (1996) ont comparé différents extractants ($\text{NH}_4\text{OAc-EDTA}$, DTPA, NH_4OAc , HCl , CaCl_2) pour évaluer la quantité de métaux assimilables par les plantes. La corrélation entre la quantité de métaux extraits chimiquement et ceux extraits par les plantes était moins bonne avec le CaCl_2 pour Cd, Mg et Zn. En revanche, ces auteurs n'ont trouvé aucune corrélation pour Cu et Pb quel que soit le réactif utilisé. Enfin, dans les travaux de Lavado *et al.* (2007), l'extraction à l'EDTA n'a pas permis de prédire l'assimilation du cuivre ou du zinc par des cultures de maïs et de blé sur des sols ayant reçu un amendement organique.

Ainsi, selon les sols, les végétaux et les types de contaminants considérés, les résultats de la littérature sont très différents. Cependant, il est admis que le zinc assimilable peut être correctement évalué à partir d'extraits à l'EDTA, ce qui n'est pas le cas d'après les travaux de Zhang *et al.* (2001) dont la Figure 21 montre les résultats.

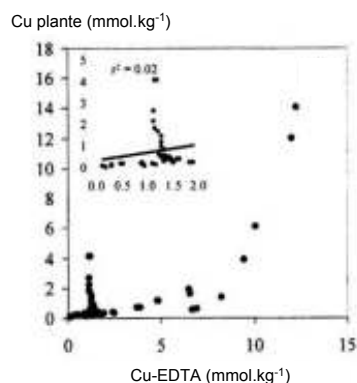


Figure 21 : Concentration en Cu mesurée dans les parties aériennes de *Lepidium heterophyllum* (en MS) en fonction du Cu extrait à l'EDTA (d'après Zhang *et al.*, 2001)

En France, la norme AFNOR NF X 31-120 (2003) propose une solution de $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 0,01 M dissous dans l'acétate d'ammonium molaire afin d'estimer la quantité de Cu, Zn et Mn présents dans le sol et susceptibles d'être prélevés par les végétaux. Une autre norme AFNOR (NF X 31-121, 1993) permet de déterminer le Cu, Zn, Mn, Fe et d'autres métaux comme Pb, Cr, Ni présents dans un sol sous forme extractibles par le DTPA, à l'aide d'une solution de DTPA à 0,005 M ajusté à pH = 7,3. Ces deux normes s'adressent essentiellement aux sols agricoles.

❖ EXTRACTIONS SEQUENTIELLES

Les extractions séquentielles constituent un fractionnement chimique permettant de connaître la distribution ou la compartimentation des éléments traces métalliques, qui est en relation avec leur spéciation chimique. Les différentes méthodes les plus couramment utilisées sont présentées dans le Tableau 7. Elles comportent toutes une première étape qui permet d'extraire les fractions les plus mobiles car solubles à l'eau ou échangeables avec un sel (chlorure de magnésium, chlorure de

calcium ou nitrate de potassium). Dans les étapes suivantes, des réactifs de plus en plus agressifs conduisent à extraire successivement les différentes formes de métaux : les formes acido-solubles présentes essentiellement dans les carbonates, les formes dites « réductibles » car piégées dans les oxydes métalliques (de fer ou de manganèse surtout), les formes dites « oxydables » car distribuées dans la matière organique. Enfin, les sulfures métalliques et les formes les plus résistantes dites « résiduelles » sont extraits à l'aide d'acides forts.

Tableau 7 : Principaux schémas d'extraction séquentielle utilisés pour évaluer la distribution des ETM en sol ou sur des produits organiques

| Méthode | Etape 1 | Etape 2 | Etape 3 | Etape 4 | Etape 5 | Application d'origine |
|--|------------------------|-----------------------------|--|---|------------------------------------|-----------------------|
| Tessier et al. (1979) | | | | | | Sédiments de rivière |
| Phases | Echangeable | Carbonates | Oxydes | Organique | Autres | |
| Fraction | Echangeable | Acido-soluble | Réductible | Oxydable | Résiduel | |
| Réactif | MgCl ₂ , 1M | HOAc 0,6M / NaOAc 1M | NH ₂ OH-HCl 0,04M / CH ₃ COOH 25% (v/v) | HNO ₃ 0,02M / H ₂ O ₂ 30% CH ₃ COOH 3,2M HNO ₃ 20% (v/v) | HF / HCl après calcination (550°C) | |
| Sposito et al. (1982) | | | | | | Sol + boues |
| Phases | Echangeable | Adsorbés | Organique | Carbonates | Résiduel | |
| Fraction | KNO ₃ | H ₂ O | NaOH | EDTA | HNO ₃ | |
| Réactif | KNO ₃ 0,5M | H ₂ O | NaOH 0,5M | EDTA 0,05M | HNO ₃ 4M | |
| Stover et al. (1976) | | | | | | Boues |
| Phases | Echangeable | Adsorbés | Organique | Carbonates | Sulfures | |
| Fraction | Echangeable | Adsorbés | Organique | Carbonates | Sulfures | |
| Réactif | KNO ₃ 1M | KF 0,5M | Na ₄ P ₂ O ₇ 0,1M | EDTA 0,1M | HNO ₃ 1M | |
| Quevauvillier et al. (1997) - BCR | | | | | | Sédiments de rivière |
| Phases | Echangeable | Oxydes | Organique & sulfures | Autres | | |
| Fraction | Soluble & échangeable | Oxydes | Organique & sulfures | Résiduel | | |
| Réactif | HOAc 0,11M | NH ₂ OH-HCl 0,1M | H ₂ O ₂ 8,8M + HOAc 1M + HF / HNO ₃ | HNO ₃ concentré | | |
| McGrath et Cegarra (1992) | | | | | | Sol et boues |
| Phases | Echangeable | Organique | Carbonates | Autres | | |
| Fraction | Soluble & échangeable | Organique | Carbonates | Résiduel | | |
| Réactif | CaCl ₂ 0,1M | NaOH 0,5M | Na ₂ EDTA 0,05M | Eau régale | | |

Ces méthodes suscitent cependant beaucoup de controverses, en particulier la méthode de Tessier. Roger (1986) a, en effet, comparé l'influence de l'ordre des attaques avec une autre méthode d'extraction séquentielle. Alors que la quantité de métaux extraits à la première étape est identique, par la suite, l'ordre des attaques étant différent, le comportement des métaux se trouve modifié d'une méthode à l'autre. De plus, l'auteur met en évidence des phénomènes de réadsorption des métaux (complexation, précipitation, coprécipitation) libérés lors des premières attaques. Ce phénomène est confirmé par l'étude réalisée par Yousfi et Bermond (1997) sur deux sols pollués, sur la fraction extraite par l'hydroxylamine.

Il est rare de voir une méthode appliquée sans être modifiée, et beaucoup d'auteurs ont élaboré leur propre protocole d'extraction séquentielle. Les réactifs, l'ordre des extractions ainsi que les conditions opérationnelles (rapport masse de sol/volume de solution, temps de contact) et le nombre d'extractions proposé varient selon les différentes études et influencent les résultats. De plus, un même schéma n'est pas nécessairement pertinent pour tous les types de produits analysés (sol, sédiments, boues...). Il conviendra donc de choisir une procédure d'extraction en fonction du produit à analyser.

Bien que le manque d'uniformité entre les procédures ne permette pas de comparer les résultats obtenus par les différents auteurs et malgré toutes les réserves émises sur les extractions séquentielles, elles constituent, avec les extractions simples, des approches expérimentales intéressantes pour appréhender la mobilité potentielle des métaux associés aux sédiments, aux sols et aux produits organiques tels que les boues et les composts. Elles permettent aussi de préciser quelles modifications physico-chimiques du milieu sont susceptibles de libérer des fractions initialement peu mobiles, et dans quelles proportions. De ce fait, dans les travaux expérimentaux présentés en partie II de ce mémoire, un protocole d'extraction séquentielle a été mis en œuvre sur lisier porcin avant et après traitement par méthanisation.

La méthode initialement proposée par Stover *et al.* (1976), modifiée par Sposito *et al.* (1982) puis par McGrath et Cegarra (1992) nous a semblé être plus adaptée à des matrices essentiellement constituées de matière organique. En effet, les sols sont, en général, des milieux non saturés dont le potentiel d'oxydo-réduction est favorable à la formation d'oxydes de fer et de manganèse. Ces oxydes jouent un rôle prépondérant dans le piégeage des métaux traces, comme cela a été décrit dans le chapitre précédent. C'est pourquoi dans les protocoles développés pour l'analyse des sols et des sédiments, des solutions réductrices sont souvent utilisées lors de la troisième étape pour dissoudre les oxydes métalliques (Tableau 7). A l'inverse, dans les appareils digestifs des animaux, les conditions sont plutôt favorables à la formation de carbonates et de sulfures métalliques (milieux anaérobies), ainsi qu'aux phénomènes de « biosorption » par les nombreuses bactéries du tractus intestinal. Toutes ces raisons expliquent pourquoi nous avons choisi d'appliquer plutôt la stratégie de McGrath et Cegarra (1992) aux lisiers porcins dans la partie expérimentale qui suivra.

1.2. APPROCHE BIOLOGIQUE

Depuis des décennies, de nombreux travaux ont été conduits sur des sols contaminés. Deux types de contamination sont généralement évalués : les contaminations sur sites industriels (mines, usines, décharges), et les contaminations sur parcelles agricoles dues à des épandages de boues, de composts ou de lisiers. Certains essais sont conduits *in situ* de façon à évaluer les conséquences d'une contamination sur une culture, permettant ainsi d'évaluer le devenir des éléments traces métalliques dans la chaîne alimentaire, par l'analyse de végétaux arrivés à maturité. D'autres essais, conduits en conditions contrôlées (serre ou phytotron), s'attachent plus particulièrement à décrire les phénomènes de biodisponibilité, en permettant la comparaison d'un plus grand nombre de traitements.

Parmi les travaux les plus récents concernant des essais à grande échelle, ceux de Jarausch-Wehrheim *et al.* (1996, 1999) se sont intéressés à la phytodisponibilité du cuivre et du zinc apportés après une vingtaine d'années d'épandage de boues digérées ou de fumier pour une culture de maïs. Les différents traitements n'ont montré aucune différence significative par rapport au rendement de la plante entière, mais l'apport de boues à hauteur de 100 t MS.ha⁻¹ pendant 2 ans a conduit à une réduction du développement des racines par rapport à un apport de boue et de fumier de 10 t MS.ha⁻¹. En début de culture, la concentration en cuivre dans les plantes entières après apport de boues à la plus haute dose était augmentée, du fait de la concentration dans les racines essentiellement. Après environ 14 semaines de culture, le cuivre a été mobilisé vers les parties aériennes dans lesquelles la concentration était maximale au stade « ensilage » mais n'ont pas dépassé le seuil de toxicité. En revanche, après apports de boues, des concentrations élevées dans certaines parties de la tige ont entraîné une diminution de la biomasse de ces parties. A la récolte, les concentrations dans les épis étaient faibles et les grains pouvaient être utilisés pour l'alimentation animale. En ce qui concerne le zinc, les concentrations ont été augmentées significativement pour l'apport de boues à 100 t MS.ha⁻¹ pendant toute la durée de la culture, atteignant jusqu'à 500 mg.kg⁻¹ MS dans les parties basses de la tige. A ces concentrations, de l'ordre du seuil de toxicité (p.46), une réduction de la biomasse a été observée. Le zinc était essentiellement présent dans les feuilles et les tiges, et les concentrations dans les grains s'élevaient à 50 mg.kg⁻¹ MS.

Gavalda *et al.* (2005) ont étudié l'effet d'un apport unique de boues séchées sur un Alfisol pour une culture de maïs. La biomasse et les concentrations en cuivre et en zinc des parties aériennes des plantes récoltées à la maturité étaient significativement supérieures après apport de boues par rapport à un témoin n'ayant reçu aucune fertilisation. En revanche, par rapport à des plantes fertilisées avec de l'urée et un engrais ternaire, seule la concentration en zinc était significativement augmentée. Cimino et Toscano (1993) ont étudié l'effet de l'apport de boues digérées entre 5 et 20 t.ha⁻¹ sur des cultures de fève et de pois par rapport à une fertilisation minérale ou une absence de fertilisation. Les boues ont permis une amélioration de l'indice de germination et des rendements pour les deux cultures, avec une augmentation des concentrations en cuivre dans les graines et dans les cosses, ces dernières tendant à plus accumuler les ETM que les fruits. Cependant, même dans le cas d'un dopage des boues apportées avec une solution de sulfate de

cuivre, l'accumulation de cuivre dans les parties comestibles aboutissait à des concentrations compatibles avec la réglementation en vigueur pour la consommation humaine.

Mantovi *et al.* (2005) ont étudié les effets de différentes boues (digérées, déshydratées et compostées en mélange avec de la paille) apportées à 5 et 10 t.ha⁻¹ sur des parcelles avec la rotation culturale blé / maïs / betterave sucrière. Les auteurs n'ont pas rapporté d'effet du traitement sur l'absorption des métaux par les plantes, mais des augmentations des concentrations en cuivre et en zinc ont été observées dans les parties comestibles des 3 cultures (maïs et blé : grain ; betterave : racine), à l'exception du zinc dont la concentration a été réduite dans les grains de maïs après apport de boues. Ces résultats peuvent être rapprochés de ceux obtenus par Rupa *et al.* (2003) et Jung et Thronton (1996). Rupa *et al.* (2003) qui ont montré que la translocation du zinc, apporté par un fumier, des racines vers les parties aériennes de blé cultivé pendant 60 jours était inhibée par des apports de phosphore. Par ailleurs, sur site contaminé, à proximité d'une mine, Jung et Thornton (1996) ont étudié l'assimilation de zinc par différentes cultures (tabac, maïs, soja, oignon, poivron) et ont montré que le maïs accumulait peu le métal dans le grain.

Planquart *et al.* (1999) ont évalué en lysimètre la phytodisponibilité de Cu, Pb et Zn apportés par des composts de boues digérées et déchets verts pour une culture de colza. Les teneurs en cuivre et en zinc dans les feuilles ont augmenté avec les apports de composts, l'augmentation de la concentration en zinc étant fonction de la dose apportée. Des résultats similaires ont été présentés par Pichtel et Anderson (1997) pour une culture d'avoine conduite en phytotron sur 30 jours. Les concentrations en zinc et en cuivre dans les plantes à la récolte augmentaient avec la dose de compost, l'effet n'apparaissant pour le cuivre qu'aux plus fortes doses. De plus, ces auteurs ont pu établir des corrélations entre le fractionnement biochimique, réalisé selon le protocole de Sposito *et al.* (1982), des métaux et leur concentration dans les végétaux. De telles corrélations avaient été présentées par Sims et Kline dès 1991 après application de la même méthode d'extraction séquentielle à trois sols amendés à quatre doses de compost de boues et pour des cultures de blé et de soja, conduites en serre. Cette étude a également montré que le chaulage des sols, de façon à obtenir une gamme de pH allant de 5,3 à 7,2 entraînait un passage du cuivre et du zinc des 3 premières fractions vers des formes plus stables (formes liées aux carbonates et résiduelles). Les concentrations en cuivre et en zinc dans les parties végétatives du blé et du soja étaient dans la gamme d'oligo-élément et non de phytotoxique. Enfin, une augmentation du zinc avait également été observée dans les graines de soja suite aux apports de compost ; cependant, le chaulage avait un effet inverse : les concentrations en zinc dans les graines diminuaient lorsque le pH augmentait. Plus récemment, Su et Wong (2003) ont montré que les concentrations en cuivre et en zinc dans les parties aériennes de plantes de maïs cultivées pendant 42 jours étaient corrélées aux éléments de la phase « oxydes » obtenus par le protocole d'extraction séquentielle de Tessier *et al.* (1979). Chaignon (2001) a étudié la biodisponibilité du cuivre dans des sols viticoles en couplant des analyses des sols par extractions simples à des analyses de végétaux cultivés dans des dispositifs permettant de séparer physiquement les racines du sol. Ces travaux ont montré que la translocation du cuivre est

restreinte, les concentrations dans les parties aériennes n'étant pas un bon indicateur de la biodisponibilité. De même, aucun des extractants testés n'est apparu pleinement satisfaisant. En revanche, dans des sols calcaires, les concentrations de cuivre dans les racines et dans les sols étaient proportionnelles. Par ailleurs, sur un panel de 18 sols européens, Rooney *et al.* (2006) ont montré que la toxicité du cuivre dépend principalement du calcium échangeable et de la capacité d'échange cationique.

Afin de prendre en compte ces différentes interactions, l'activité des ions libres a été proposée pour prédire l'absorption des métaux par les plantes (McGrath *et al.*, 1999). Cependant, les travaux les plus récents montrent qu'il existe différentes exceptions à un tel modèle dans la mesure où les complexes organiques peuvent avoir différentes conséquences sur la phytodisponibilité des ETM. Song *et al.* (2004) ont montré que le carbone organique dissous (COD) diminue la phytodisponibilité du cuivre en le complexant. Inversement, pour une même activité de l'ion libre, le COD augmente la quantité de métal absorbé par le végétal. Les résultats de Degryse *et al.* (2006) vont dans le même sens en montrant que l'assimilation du cuivre et du zinc ne se fait pas seulement par diffusion de l'ion libre, mais également par l'absorption de complexes organométalliques.

L'ensemble de ces travaux indique que le cuivre et le zinc apportés au sol (matières organiques exogènes et apports inorganiques) sont plus ou moins phytodisponibles pour les végétaux supérieurs. De plus, le zinc est plus sensible aux conditions physico-chimiques du sol telles que le pH ou la présence de phosphore en quantité importante. Enfin, cette phytodisponibilité est variable entre les espèces et entre les organes du végétal, les grains accumulant généralement peu les éléments métalliques, protégeant ainsi la chaîne alimentaire.

Des interrogations demeurent sur la proportion de métaux contenus dans les amendements organiques susceptibles d'être absorbés par les végétaux et sur les conditions de ce transfert. En particulier, l'impact du traitement préalable par méthanisation des lisiers porcins sur la mobilité des métaux vis-à-vis des végétaux cultivés a été très peu étudié.

2. STRESS OXYDANT ET GENOTOXICITE

2.1. MECANISMES DU STRESS OXYDANT

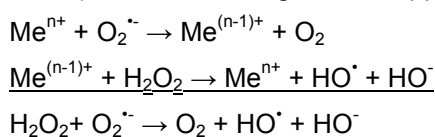
Le stress oxydant a été défini comme un déséquilibre entre les systèmes prooxydants et antioxydants en faveur des premiers, et source d'effets toxiques potentiels (Sies, 1991). Pour Halliwell (1987), le « stress oxydant implique la production d'espèces réactives de l'oxygène et est synonyme de dommages ».

Les espèces réactives de l'oxygène, abrégées ERO ou ROS, sont les différentes formes actives de l'oxygène ainsi que leurs précurseurs. Ces composés sont normalement produits dans les cellules, mais cette production est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense.

Parmi les ERO, voici quelques formes majeures, présentées par réactivité croissante :

- O₂, oxygène moléculaire qui peut être réduit par les métaux de transition.

- $^1\text{O}_2$, oxygène singulet qui est formé au niveau des pigments biologiques (chlorophylle par exemple).
- O_2^- , anion superoxyde qui résulte de la capture d'un électron par la molécule d' O_2 . Chez les végétaux, il fait partie de la chaîne de transport d'électrons du chloroplaste et est essentiellement formé au niveau des membranes où il est très stable car hydrophobe, et peut participer à la destruction des phospholipides membranaires. Il peut se comporter comme un oxydant ou un réducteur dans le cas des métaux de transition. Enfin, par dismutation il peut donner du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et peut conduire à la formation de HO^\bullet .
- H_2O_2 , peroxyde d'hydrogène. Il est formé par voie enzymatique, à partir de l' O_2 par l'action d'oxydases, ou de l' O_2^\bullet par la superoxyde dismutase. Il est modérément actif, mais diffuse très facilement, franchit les barrières membranaires et est capable d'inhiber l'activité de certaines enzymes en inactivant les groupements thiols.
- HO^\bullet , radical hydroxyle. Un radical libre est un atome ou une molécule présentant un ou plusieurs électrons célibataires qui sont source d'instabilité et de réactivité (oxydation de protéines et de l'ADN, peroxydation lipidique). Le radical a tendance à capter ou à céder un électron, et les mécanismes de cycle redox jouent un rôle important dans sa production. Ainsi, des métaux tels que le chrome, le cuivre et la vanadium, ainsi que le cuivre et le fer libre, génèrent des radicaux HO^\bullet à partir de l'anion superoxyde par auto-oxydation suivi d'une réaction dite de Fenton (l'ensemble est également appelé réaction d'Haber-Weiss Fenton) :



Me : métal.

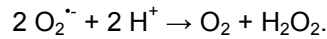
Si le cuivre et le fer peuvent catalyser la production de radicaux HO^\bullet et accentuer les dommages associés au stress oxydant, d'autres métaux peuvent également participer à l'apparition d'un stress en inactivant de façon totale ou partielle certaines enzymes. Cette inactivation peut être mise en oeuvre selon deux modes d'action (Schützendübel et Polle, 2002) : par fixation sur un groupe fonctionnel de l'enzyme (le cadmium a par exemple un effet sur les groupes sulfhydryles) ou par déplacement d'ions métalliques essentiels à l'enzyme (Zn^{2+} déplace Mg^{2+} au niveau de la ribulose-1,5-bisphosphate-carboxylase/oxygénase).

D'autres facteurs peuvent être à l'origine de la formation d'ERO chez les végétaux, tels que les stress environnementaux qui limitent la fixation de CO_2 (sécheresse, stress salin, ozone, ultra violets, fortes ou faibles températures...). Il y a alors formation de radicaux superoxydes O_2^- dans le chloroplaste. Enfin, les ERO peuvent être générés par les réactions de détoxification catalysées par les cytochromes (surtout le P450 dans le cytoplasme et le réticulum endoplasmique), ou encore par la NADPH oxydase des membranes plasmiques, ainsi que par les différentes peroxydases, qui sont des sources d'ERO dans l'apoplaste (Vranova *et al.*, 2002).

Pour faire face à ce stress oxydant, les plantes disposent de deux grands types de défenses : d'une part un ensemble d'enzymes hautement régulées visant à détruire les ERO, et d'autre part des macromolécules capable de piéger ces ERO.

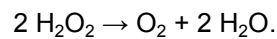
Parmi la batterie d'enzymes du système antioxydant visant à détruire les intermédiaires réactifs de l'oxygène et les peroxydes (Figure 22), il existe 3 types majeurs :

- les superoxydes dismutases (SOD) qui sont capables d'éliminer l'anion superoxyde $O_2^{\cdot -}$ par dismutation :

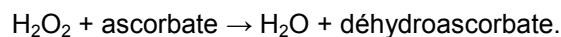


Le mécanisme réactionnel est catalysé par un métal de transition (Fe, Mn ou Cu) situé au cœur de l'enzyme. Chez les végétaux, la Cu-ZnSOD, dont l'atome de Zn ne sert qu'à stabiliser le site actif, se trouve au niveau du chloroplaste et du cytosol.

- Les catalases qui détruisent le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 généré dans les peroxyosomes par les oxydases en catalysant la dismutation du peroxyde d'hydrogène en O_2 et H_2O :



- Les peroxydases qui détruisent également le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 en formant de l'eau. Dans le chloroplaste, c'est l'ascorbate peroxydase qui intervient :



Le déhydroascorbate est ensuite pris successivement en charge par la déhydroascorbate réductase et la glutathion réductase.

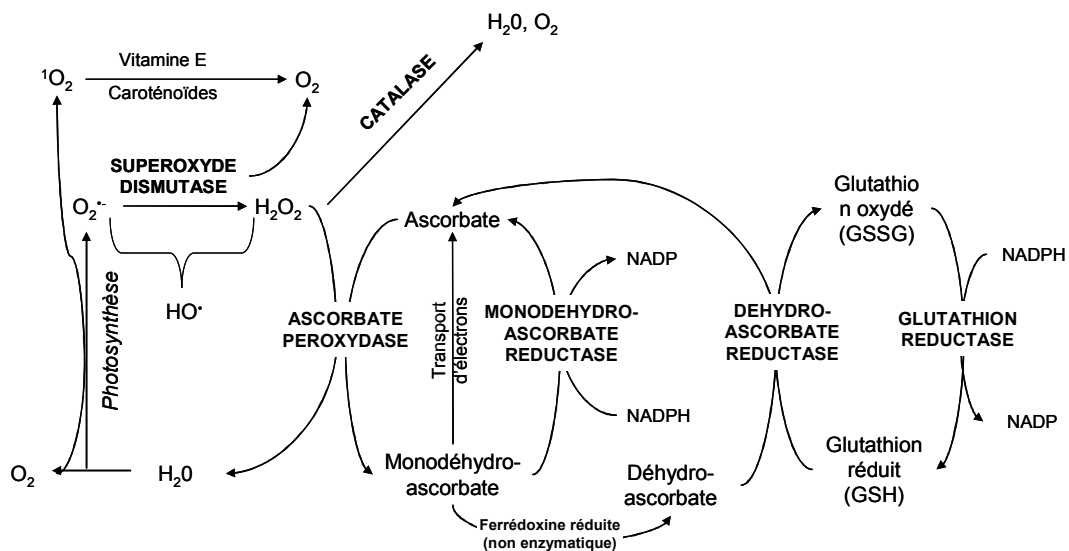


Figure 22 : Voies de production et de destruction des ERO dans les tissus végétaux – Cycle de Halliwell-Asada (d'après Lagadic *et al.*, 1997)

Par ailleurs, deux molécules capables de piéger les ERO grâce à une fonction thiol libre participent également au système de défense antioxydant (Lagadic *et al.*, 1997) :

- le glutathion est le plus abondant dans les organismes vivants, majoritairement sous forme réduite. chez la plante, le glutathion réduit forme la source de pouvoir réducteur pour la déhydroascorbate réductase (Figure 22).
- l'acide lipoïque est impliqué dans la formation de l'acétyl coenzyme A à partir du pyruvate. Il est un réducteur puissant sous sa forme réduite, capable de désactiver l'oxygène singulet.

Il existe d'autres capteurs d'oxyradicaux au sein des membranes biologiques permettant de piéger les espèces radicalaires dès leur formation et d'interrompre les réactions en chaîne : l' α tocophérol (vitamine E) qui fournit un atome d'hydrogène aux espèces radicalaires et est régénéré par l'ascorbate (vitamine C) à l'interface membrane/cytosol, le β -carotène (vitamine A) et les caroténoïdes en général, dont l'intérêt supplémentaire est de désactiver l'oxygène singulet, l'ubiquinol (au niveau des membranes mitochondriales) et d'autres molécules dont les flavonoïdes.

Lorsque le stress est important, la production est supérieure aux capacités du système antioxydant. C'est l'excès de radicaux qui va provoquer des lésions directes de molécules telles que les protéines, les lipides, les glucides ou encore l'ADN. Au niveau physiologique, chez la plante, ce déséquilibre va entraîner un ralentissement de la croissance, un brunissement de la plante et si le stress est trop important, la mort de l'organisme.

2.2. ALTERATIONS DE L'ADN DU FAIT DU STRESS OXYDANT

L'ADN est particulièrement sensible à l'attaque des radicaux libres HO[•], du fait de la sensibilité des bases (et en particulier la guanine) à l'oxydation. Il existe six types principaux de dommages oxydatifs (Favier, 2003) :

- les bases oxydées par attaque radicalaire directe ;
- les sites abasiques qui surviennent lorsque le radical attaque la liaison entre la base et le désoxyribose ;
- les cassures « simple brin » lorsque le désoxyribose est attaqué directement ;
- les cassures « double brin » ;
- la formation d'adduit sur les bases de l'ADN suite à la peroxydation des lipides ;
- les pontages de protéines en contact avec l'ADN (histones, enzymes intervenant dans la réplication et la transcription de l'ADN) lorsque ce sont ces dernières qui sont attaquées.

A noter que les différents métaux (Fe, Mg, Cu, Zn,...) liés à l'ADN du fait de la présence de charges négatives (l'ADN est un polyanion) jouent un rôle fondamental dans l'amplification de ces lésions du fait de réaction de type Haber-Weiss Fenton.

Ces lésions peuvent conduire jusqu'à la rupture de chromosomes en fragments acentriques, et la formation, lors de la division cellulaire, de micronoyaux, c'est-à-dire des entités nucléaires indépendantes qui se retrouvent hors du noyau, dans le cytosol, à côté du noyau principal (Lagadic *et*

al., 1997). Ce phénomène est appelé clastogénèse (Figure 23). Il existe également d'autres effets clastogènes tels que des aberrations chromosomiques entraînant d'importants réarrangements de l'ADN (délétions ou translocations) ou des échanges de chromatides sœurs qui sont des interchangements d'ADN au même *loci*.

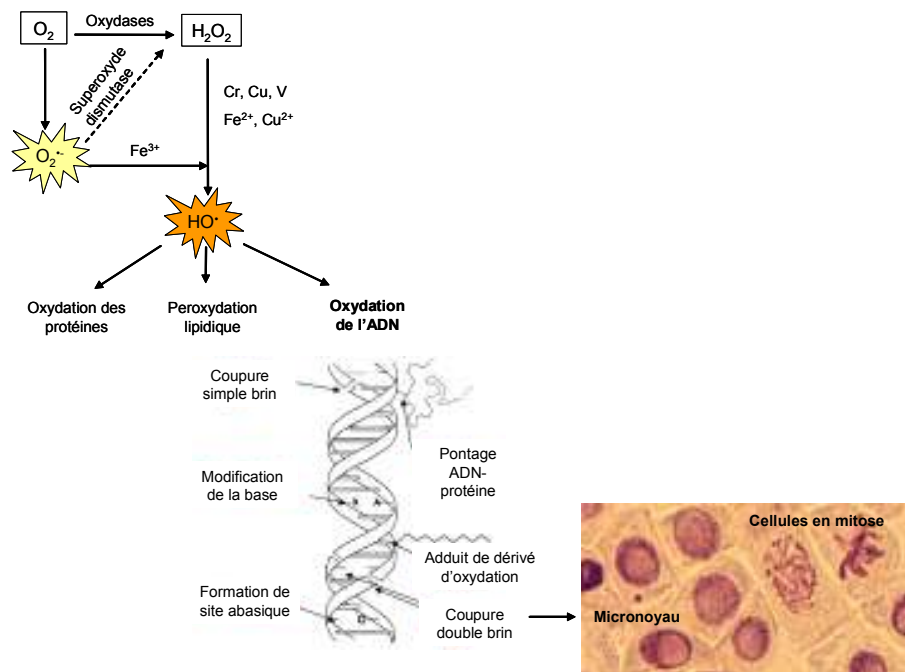


Figure 23 : Mécanismes de stress oxydatif conduisant à l'apparition de micronoyaux par clastogénèse chez les végétaux

Les micronoyaux peuvent être également le résultat d'un dysfonctionnement gênant la migration de chromosomes entiers au cours de la division cellulaire. Cette perte de chromosomes, le plus souvent par altération de l'appareil mitotique, est appelée aneugénèse.

Les effets clastogènes et aneugènes, qui constituent des modifications morphologiques de la structure globale des chromosomes, sont regroupés sous le terme de « mutations chromosomiques ». Ces mutations sont à différencier de deux autres grandes classes de mutations génétiques : les mutations ponctuelles ou géniques qui consistent en la modification d'une ou de quelques séquence(s) de nucléotides d'un segment codant à l'intérieur d'un gène, et les mutations génomiques qui sont une modification du nombre de chromosomes, ce pourquoi elles ont également appelées aberrations numériques (Chenon, 2001).

Les composés qui sont capables de générer des mutations génétiques (géniques, chromosomiques ou génomiques) sont dits génotoxiques. En affectant le patrimoine génétique des espèces, les composés génotoxiques peuvent à terme avoir un impact sur la reproduction, le développement des populations ainsi que sur leur biodiversité. Les composés qui ont un impact à court terme et qui sont capables d'altérer la cellule dans son ensemble (jusqu'à sa destruction) sont dits cytotoxiques.

Le caractère génotoxique des polluants constitue la composante majeure de leur toxicité à long terme, c'est-à-dire des perturbations lentes mais irrémédiables (mutations somatiques, aberrations chromosomiques, formation de micronoyaux) dues à une exposition prolongée des populations à des contaminations, même à de très faibles niveaux. Il est donc apparu important de développer des outils pour l'évaluation des différentes mutations génétiques.

2.3. TESTS A COURT TERME D'ÉVALUATION DE LA GENOTOXICITE

Au cours des 30 dernières années, plus de 200 tests à court terme ont été développés pour l'identification des agents génotoxiques pour l'homme. Ces tests sont classés en deux groupes selon le système biologique utilisé et la cible génétique détectée : les bioessais procaryotes et eucaryotes.

Les bioessais procaryotes sont mis en œuvre sur des bactéries. Du fait de la structure procaryote des cellules, ils ne permettent donc que la détection des mutations géniques et des dommages primaires de l'ADN. Parmi ces tests, le plus utilisé pour évaluer la mutagenicité des produits purs ou de mélanges est le test d'Ames (Ames *et al.*, 1973). Ce test est conduit avec des souches de *Salmonella typhimurium* dont un des gènes codant pour la voie de synthèse de l'histidine a subi une mutation empêchant la synthèse de l'histidine. Une seconde mutation, due au(x) polluant(s) étudié(s) permet de retrouver cette fonction. Cependant, ces bioessais procaryotes sont peu représentatifs des phénomènes observés chez les mammifères, ce pourquoi des essais eucaryotes ont été développés.

Les bioessais eucaryotes sont mis en œuvre sur différents organismes : champignons, plantes et cellules de mammifères en culture ; ils permettent une détection des diverses mutations génétiques.

Tableau 8 : Exemple de bioessais pour la détermination d'effets génotoxiques

| Organismes | Type de mutation | | Références |
|-----------------------------------|------------------|---------------|---|
| | Génique | Chromosomique | |
| Champignons | | | |
| <i>Aspergillus nidulans</i> | x | x | Scott <i>et al.</i> (1978) Kafer <i>et al.</i> (1982) |
| Levures | | | |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | x | | Brusik et Mayer (1973) |
| Végétaux | | | |
| <i>Allium cepa</i> | | x | Ma <i>et al.</i> (1995) |
| <i>Vicia faba</i> | | x | Ma <i>et al.</i> (1995) |
| <i>Tradescantia</i> | | x | Ma <i>et al.</i> (1994) |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> | x | | Muller (1965) |
| Mammifères (cultures cellulaires) | | | |
| Hamster chinois (ovaire) « CHO » | x | x | O'Neill <i>et al.</i> (1977) Latt <i>et al.</i> (1977) |
| Souris (lymphocyte) | x | x | Clive <i>et al.</i> (1979) |

Parmi les bioessais procaryotes, le test de numération des micronoyaux a été proposé comme marqueur biologique de mutations chromosomiques *in vivo*. Cet essai de génotoxicité est bien validé pour étudier le pouvoir génotoxique de milieux naturels liquides ou de lixiviats obtenus à partir de solides tels que des sols ou des sédiments (Ohe *et al.*, 2004, White et Claxton, 2004).

Sur les plantes entières, trois bioessais sont bien connus pour l'évaluation des effets génotoxiques de matrices liquides (eaux, lixiviats...) ou solides (sol, déchets...) :

- un sur *Vicia faba* (fève), réalisé par observation microscopique des cellules des racines ;
- un sur *Allium cepa* (oignon) également réalisé sur les racines ;
- un sur les grains de pollen de *Tradescantia*. Ce test est très sensible dans la mesure où il utilise les cellules germinales, ce pourquoi il est très utilisé pour évaluer la contamination de sols, pour contrôler leur réhabilitation ou pour évaluer l'impact des traitements utilisés en agriculture sur la pollution des sols (Békeart, 1999).

A l'échelle internationale, le test de micronoyaux sur *Vicia faba* a été largement utilisé sur des matrices liquides depuis une dizaine d'années, du fait de sa sensibilité et de sa simplicité. Les racines de la plante sont placées au contact de la solution à tester pendant quelques heures, puis les cellules sont fixées, colorées et examinées sous microscope. Les chromosomes de *Vicia faba* étant grands, les dommages sont aisément repérés. En France, ce test a été normalisé par l'AFNOR en 2004.

Les chercheurs chinois ont particulièrement utilisé le test de micronoyaux sur *Vicia faba* pour étudier la clastogénicité d'eaux de rivière ou lacustres, mais également de lixiviats de décharges. Ainsi, Miao *et al.* (1998) ont pu établir une relation entre les analyses chimiques et l'induction de micronoyaux sur une portion de rivière contaminée par différentes activités industrielles (minières, papetières, chimiques). Duan *et al.* (1999) ont observé une génotoxicité des eaux du lac Dianchi plus élevée en saison sèche qu'en saison humide. Enfin, Sang et Li (2004) ont également observé un effet de saison sur la génotoxicité de lixiviats de décharge, en lien étroit avec la demande chimique en oxygène du produit.

Le test a également montré une bonne sensibilité pour l'analyse de matrices solides (sols, déchets, boues...) contaminées par des métaux, par exposition des racines dans un lixiviat obtenu à partir de la matrice. Ainsi, Wang (1999) a pu reconstituer une « cartographie » de la contamination en chrome de sols voisins d'un site industriel, l'induction de micronoyaux chez *Vicia faba* évoluant de façon linéaire avec la contamination en chrome. Cotelle *et al.* (1999) ont mis en évidence un effet dose pour des lixiviats de sol contaminé en ETM et PCB (polychlorobiphényles) prélevé sur un site industriel, ainsi qu'un site contaminé essentiellement en HAP (hydrocarbures aromatiques polycycliques). Dans le second cas, l'effet n'est apparu qu'aux plus faibles dilutions.

Le test des micronoyaux appliqué aux sols via leur lixiviat semble donc performant pour l'évaluation des contaminations métalliques. En revanche, cela n'est pas aussi net pour les contaminations par des produits organiques tels que les HAP. Comme cela a été dit précédemment, sur des lixiviats de sols contaminés en HAP, Cotelle *et al.* (1999) n'ont observé d'effet qu'aux plus

fortes contaminations. De plus, Song *et al.* (2006) n'ont pas pu établir de lien entre les teneurs en HAP, PCB et métaux de sols contaminés et l'augmentation de la fréquence d'apparition de micronoyaux chez *Vicia faba*. Pour ce type de composés, la norme française (AFNOR, 2004) relative à la qualité des sols recommande la réalisation du lixiviat au moyen d'un solvant (DMSO, diméthyl sulfoxyde). Cependant, le passage par une étape de lixiviation, à plus forte raison au moyen d'un solvant, peut introduire un biais sur la représentativité du test. Aucun travail n'a été publié sur un tel effet dans le cas du test des micronoyaux sur *Vicia faba*, mais Courty *et al.* (2004) ont décrit les effets du protocole de lixiviation sur l'induction de l'activité mutagène de sols urbains sur *Salmonella typhimurium* (adaptation du test de Ames). Cette activité augmentait avec la température et la durée de l'extraction (37°C / température ambiante et 24 h / 4 h), ainsi qu'avec le ratio sol / extractant (1 : 2 / 1 :10).

Plusieurs auteurs se sont donc intéressés à la réalisation d'un test des micronoyaux sur *Vicia faba* dans lequel l'exposition des racines est effectuée directement en sol, ce type d'exposition permettant en effet d'éviter l'étape de lixiviation et ainsi de travailler dans des conditions les plus proches de la réalité de terrain. Knasmüller *et al.* (1998) ont exposé pendant 72 heures des racines de fève à trois sols industriels (contaminations métalliques : Pb et Zn pour 2 sols, et As et Sb pour le troisième) et un sol alpin riche en arsenic. Ces auteurs n'ont pas observé l'induction de micronoyaux après exposition de *Vicia faba* par contact direct à un sol contaminé par des micropolluants métalliques tandis que le test conduit avec *Tradescantia* donnait des résultats positifs. De la même façon, Minissi et Lombi (1997) ont travaillé sur des sédiments du Tibre, contaminés en éléments traces métalliques, dilués de moitié avec de la vermiculite. Leurs essais n'ont pas permis de mettre en évidence une induction de la génotoxicité, vraisemblablement en raison du pH alcalin, compris entre 7.7 et 8.5 (Minissi et Lombi, 1997). En revanche, Minissi *et al.* (1998) ont appliqué le même protocole sur des sédiments issus de la même rivière et ont constaté des augmentations significatives de la fréquence d'apparition des micronoyaux. Cependant, ces réponses n'ont pas pu être reliées aux analyses chimiques des sédiments (concentrations en HAP et en métaux). Jain *et al.* (2004) ont évalué la génotoxicité d'une gamme de dilution de cendres issues d'un incinérateur dans un mélange de sol et de fumier. L'essai a montré un effet dose avec des augmentations du nombre de micronoyaux significatives pour les doses supérieures à 40%, bien que le nombre de cellules micronucléées soit inférieur à 1 sur toute la gamme.

Enfin, De Simone *et al.* (2000) ont testé des composts incorporés à différentes doses dans le sol, allant de 50 à 1200 t.ha⁻¹, soit environ entre 1,5 et 40%. Sur 6 produits testés, 2 ont donné lieu à une augmentation significative du nombre de micronoyaux pour la dose à 20%, la plus haute dose étant phytotoxique. De plus, De Simone *et al.* (2005) sont les seuls à avoir comparé les effets d'un même produit par lixiviation ou par contact direct, en travaillant sur des composts. En sol, les composts ont été appliqués à 3 doses, le maximum étant de 150 t.ha⁻¹, soit environ 5%. En parallèle, les plantes ont été exposées au contact direct d'un sol humidifié avec un lixiviat à l'eau ou au DMSO (diméthyl sulfoxyde), et en solution, dans le lixiviat à l'eau. Seuls les résultats obtenus en sol à la plus haute dose d'apport de compost et avec apport de lixiviat au DMSO ont pu être corrélés. Enfin les réponses en sol ont pu être estimées ($r^2 = 0,92$) au moyen d'une régression multiple considérant les

résultats avec les 3 différents lixiviats, les teneurs en éléments traces métalliques et la teneur en substances humiques.

Cette revue bibliographique confirme que le test des micronoyaux sur *Vicia faba* est sensible et fiable, en particulier pour les contaminations métalliques. Cependant, l'utilisation de lixiviats à l'eau ou au DMSO n'est pas toujours représentative de la génotoxicité d'un sol ou d'une matrice solide, comme l'ont montré les travaux de De Simone *et al.* (2005). Cela est à prendre en considération pour l'évaluation de la génotoxicité de produits à forte teneur en matière organique tels que les composts. La matière organique limitera en effet l'extraction des éléments traces métalliques et le test sur lixiviat sous-estimera l'effet réel du produit. Il en sera de même pour des composés hydrophobes tels que les HAP.

CONCLUSIONS

La digestion anaérobie est un procédé biologique naturel qui a lieu dans les milieux dépourvus d'oxygène tels que les milieux inondés (marais, sédiments) ou les systèmes digestifs animaux. Ce procédé biologique permet la conversion de la matière organique en un gaz composé majoritairement de méthane (CH₄) et de dioxyde de carbone (CO₂). Du fait de cette production de biogaz, la digestion anaérobie présente un intérêt énergétique. En effet, le méthane qu'il contient peut être utilisé pour la production d'énergie électrique et/ou thermique. La digestion anaérobie présente donc un double intérêt : le traitement de la matière organique couplé à la production d'une énergie ; c'est la raison pour laquelle le processus naturel de digestion anaérobie a été domestiqué et optimisé au fil des siècles par l'homme. Dans les dernières décennies, le développement de la digestion anaérobie a été particulièrement conditionné par le contexte et les politiques énergétiques. Ainsi, de nombreuses études ont été conduites à la fin des années 70 suite aux chocs pétroliers ; en France, des programmes d'aides à l'investissement dans des unités de méthanisation ont également été mis en place au début des années 80. Plus récemment, l'Allemagne est un excellent exemple de la relation entre digestion anaérobie et politique énergétique. En effet, la loi allemande sur les sources d'énergie renouvelable d'avril 2000 a fixé pour 20 ans le tarif de rachat de l'électricité produite par valorisation du biogaz. En 5 ans à partir de son entrée en vigueur, cette loi a conduit à multiplier par 2,5 le nombre d'unités en Allemagne, mais surtout à décupler la puissance installée. En France, un arrêté est paru le 6 juillet 2006 fixant les conditions de rachat de l'électricité produite par les installations valorisant le biogaz. Même si les conditions françaises sont à ce jour moins attractives que celles rencontrées en Allemagne, de nombreux acteurs s'intéressent à la digestion anaérobie, et l'on peut s'attendre à une augmentation importante des unités de méthanisation.

Par ailleurs, le développement et la concentration des élevages porcins au cours de la seconde moitié du XX^{ème} siècle a conduit à la généralisation du système d'élevage sur caillebotis, c'est-à-dire un plancher de lattes non jointives à travers lequel s'écoulent les urines, les matières fécales, les eaux de lavage et les résidus d'alimentation qui vont former le lisier. De plus, dans un contexte de productivité, l'alimentation des animaux a été optimisée par l'ajout de compléments tels que des oligo-éléments nécessaires au métabolisme. Cette supplémentation permet en effet une amélioration des performances d'élevage en terme de production de viande mais également de conditions sanitaires. Ainsi, le cuivre intervient dans de nombreuses fonctions métaboliques, et joue notamment un rôle positif sur la croissance des porcelets. Le zinc permet de lutter contre la parakératose, une maladie cutanée. C'est la raison pour laquelle ces deux éléments sont ajoutés à l'alimentation des porcs. Dans la mesure où le pourcentage d'assimilation par l'animal de ces 2 oligo-éléments est faible, et que le porc montre une tolérance élevée à des apports excessifs (grâce à sa forme de stockage hépatique notamment) les ajouts de Cu et Zn sont réalisés en excès. De ce fait, l'essentiel des quantités ajoutées se retrouve dans les déjections, et donc les lisiers. Ainsi, selon les auteurs, les lisiers peuvent contenir jusqu'à 1000 mg.kg⁻¹MS de Cu et 2000 mg.kg⁻¹MS de Zn. Le zinc est utilisé à même dose quel que soit le stade physiologique de l'animal, tandis que le cuivre est

surtout utilisé chez les porcelets pour favoriser leur croissance ; sur un élevage naisseur-engraisseur, les lisiers sont donc plus riches en zinc qu'en cuivre.

Les lisiers porcins représentent également une valeur fertilisante de premier intérêt pour l'éleveur. Riches en azote, en phosphore, en potassium ou encore en calcium, leur épandage sur les surfaces agricoles permet le recyclage de ces éléments nutritifs nécessaires au développement des cultures, mais également d'autres macro- et micro-éléments indispensables aux végétaux, tels que le cuivre et le zinc. C'est la raison pour laquelle cette pratique ancestrale, qui s'inscrit dans le cadre d'un développement durable, est toujours d'actualité. Cependant, l'épandage des lisiers est réglementé en fonction des seules quantités d'azote apportées au sol. Ainsi, selon la composition des lisiers, les flux de certains éléments peuvent être excédentaires par rapport aux besoins des cultures ; ils pourront alors être lessivés et entraînés dans les eaux de surface ou profondes, ou encore s'accumuler dans les sols, comme cela a été montré par Coppenet (1993) en Bretagne, sur des sols ayant reçu des lisiers pendant 20 ans.

Les lisiers sont également un substrat pour la digestion anaérobie, bien qu'ils présentent un potentiel de production de biogaz relativement faible. En effet, l'appareil digestif duquel sont issus les fèces est un écosystème anaérobie, et les lisiers contiennent ainsi les microorganismes impliqués dans le processus. De plus, l'hydrolyse de l'urée contenue dans les urines en ammonium et carbonates confère un pouvoir tampon important par rapport aux variations de pH. Ainsi, parmi les unités construites en France au début des années 1980, de nombreuses installations fonctionnaient pour le traitement de lisiers porcins. Ces lisiers traités par digestion anaérobie sont également épandus, et la méthanisation ne semble pas modifier les quantités de lisiers apportés au champ.

Cette revue bibliographique a permis de montrer que peu de travaux ont été menés sur le devenir des oligo-éléments des lisiers porcins par rapport aux macro-éléments ainsi que sur les modifications de spéciation des métaux au cours du traitement par digestion anaérobie. Or ces modifications peuvent entraîner des changements en terme de biodisponibilité du cuivre et du zinc apportés au sol par un lisier brut ou un lisier méthanisé. La partie expérimentale qui suit vise donc à apporter de nouvelles références sur :

- le devenir de Cu et Zn lors d'un traitement des lisiers porcins par digestion anaérobie,
- l'impact de Cu et Zn vis-à-vis des végétaux cultivés après le retour au sol par épandage de lisiers brut ou méthanisé.

Pour cela, une approche chimique puis une approche biologique sont mises en œuvre. L'approche chimique doit permettre d'étudier le devenir des éléments biogènes par l'établissement d'un bilan de masse d'un digesteur, ainsi que par la caractérisation de la répartition granulométrique, du passage en solution en fonction du pH et de la compartimentation chimique du cuivre et du zinc. L'approche biologique comprend deux volets pour évaluer les effets du cuivre et du zinc apportés au sol par un lisier brut ou un lisier méthanisé. L'étude de la phytodisponibilité doit permettre d'évaluer des effets visibles par l'analyse du transfert des deux éléments au sein de végétaux. L'évaluation de la génotoxicité permet d'avoir une vision prospective d'effets cachés sur le matériel génétique des plantes pouvant se répercuter à long terme sur les communautés et affecter la biodiversité.

PARTIE II
TRAVAUX EXPERIMENTAUX

CHAPITRE I : TRAVAUX PRELIMINAIRES SUR LA REPARTITION DU CUIVRE ET DU ZINC DANS LES LISIERS

1. INTRODUCTION

Ce chapitre décrit la provenance des lisiers étudiés dans les expérimentations. Tout d'abord, le site d'élevage et l'unité de méthanisation de Montardon sont décrits.

Puis, un article accepté pour publication à Bioresource Technology reprend le descriptif de l'unité et des techniques de prélèvements des lisiers au niveau du procédé de traitement pour leur caractérisation. Il établit un bilan de masse des éléments majeurs (P, K, Ca, Fe, Mg and S) et des éléments mineurs (Al, Cu, Mn and Zn) de l'unité de méthanisation. Cet article décrit également la distribution granulométrique des particules et du cuivre et du zinc des lisiers. Un résumé en français de cet article est présenté en p.78. L'extrapolation de ces premiers résultats présentée dans le paragraphe « Conclusions et perspectives » de ce chapitre (p.93) a permis d'établir la méthodologie du reste de l'étude :

- les flux d'éléments apportés au sol lors des épandages ont permis d'établir les doses de métaux nécessaires pour l'évaluation des impacts agronomique et génotoxique liés à des décennies d'épandage ;
- la répartition granulométrique du cuivre et du zinc dans les lisiers nous a permis de proposer une méthode de séparation pour extraire des lisiers la fraction solide la plus riche en cuivre et zinc afin de simuler les apports cumulés à moyen et long terme.

Le bilan de masse du digesteur ayant montré des pertes significatives en P, Mg et Ca, des cristaux prélevés sur les parois ont été prélevés. Les résultats de l'observation par microscopie à balayage électronique couplé à une sonde EDS, ainsi qu'une analyse du diffractomètre des rayons X ont été présentés lors du symposium OTEANE (1st international scientific Symposium on Trace Element in Animal Production Systems, Geneva, 14-15 June 2007). Le poster et le résumé associé sont présentés en Annexe 1.

2. PRESENTATION GENERALE DU SITE D'ELEVAGE ET DE L'UNITE DE METHANISATION DE MONTARDON

L'élevage porcin de Montardon comprend 5 bâtiments d'élevage. Les lisiers collectés sous caillebotis dans chacun des bâtiments d'élevage, sont dirigés, grâce à un réseau souterrain de canalisations (Photo 2), vers une fosse dite « fosse d'introduction ». Cette fosse, d'une capacité de 20 m³, est couverte afin de limiter les émanations d'odeurs et permet le mélange des lisiers pour constituer le substrat de méthanisation qui sera appelé dans la suite « lisier brut » (LB).

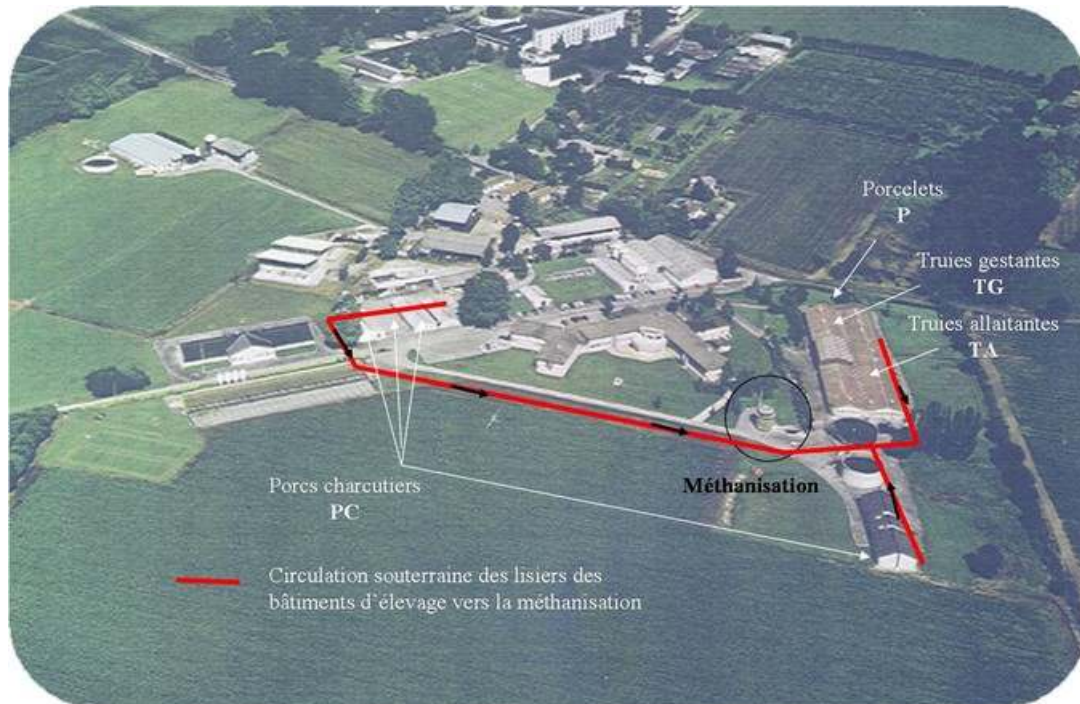


Photo 2 : Provenance des lisiers de la station zooteknique

L'unité de méthanisation de Montardon est en activité depuis le début des années 80 dans le but de traiter les effluents générés par l'élevage porcin présent sur le site (réduction des odeurs, production d'énergie, ...). L'installation est instrumentée de façon à contrôler l'ensemble des paramètres de fonctionnement et des flux permettant d'établir le bilan de fonctionnement de l'unité. De plus, elle est automatisée et entièrement contrôlée par un logiciel permettant l'acquisition de données.

La station de méthanisation fonctionne en semi-continu : le lisier brut est introduit quotidiennement dans le digesteur (Photo 3). Le digesteur, ou fermenteur, est une fosse en béton de type infiniment mélangé de 6 m de haut, de volume utile 150 m³. Il est équipé de 3 agitateurs mécaniques à hélice placés au sommet des colonnes constituant l'échangeur thermique. Le digesteur est calorifugé grâce à une mousse de polyuréthane et maintenu à 37°C par une circulation d'eau chaude dans la double paroi des colonnes. Le digesteur est surmonté d'un gazomètre qui stocke le biogaz produit. Le gazomètre est constitué d'une cloche mobile métallique pourvue de 4 rails hélicoïdaux et reposant sur des galets de façon à tamponner les variations de production au long d'une journée. La cloche monte et descend suivant la production et la consommation du gaz et garantit une pression permettant la valorisation du biogaz en chaudière (eau chaude utilisée pour le maintien en température du digesteur).



Photo 3 : Unité de méthanisation (digesteur)

Le lisier en sortie de réacteur (lisier méthanisé, LM) est stocké temporairement dans une fosse dite « fosse de sortie » avant d'être repris pour subir une séparation de phase liquide/solide (voir le digramme de principe en p.81). Celle-ci est effectuée mécaniquement au moyen d'un tamis centrifuge Demoisy équipé d'une grille de 250 μm . La fraction liquide, ou filtrat (F), est stockée en fosse jusqu'à épandage sur culture de maïs. La fraction solide (FS) est mise en andain sur la plateforme de compostage afin de subir une maturation aérobie pour l'obtention d'un amendement organique. La campagne d'échantillonnage a été établie selon la méthodologie présentée en p. 80.

3. PARTICLE SIZE AND METAL DISTRIBUTIONS IN ANAEROBICALLY DIGESTED PIG SLURRY

Claire E. Marcato^{1,2}, Eric Pinelli¹, Philippe Pouech², Peter Winterton³, Maritxu Guiresse¹

¹: Agronomy Environment and Ecotoxicology Laboratory, National School of Agronomy - Toulouse (ENSAT) BP 32607, Auzeville-Tolosane, 31326 Castanet-Tolosan, France

²: APESA, Hélioparc, 64053 Pau Cedex, France

³: Université Paul Sabatier, 118, route de Narbonne, 31062 Toulouse, France

Abstract

Particle size distribution and trace element patterns were studied in a full-scale anaerobic digestion plant treating pig slurry. Mass balance was established for major (N, P, K, Ca, Fe, Mg and S) and minor (Al, Cu, Mn and Zn) elements. Most of the elements were conserved through the process but part of the P, Ca, Mg and Mn was deposited as crystals lining the digester. In the dry matter of the slurry, Cu and Zn occurred at between 170 and 2600 mg kg⁻¹ due to pig diet supplements. Analyses of particle size distributions in raw and digested slurries showed a general shift in distribution towards larger sizes due to degradation of small and easily degradable particles as well as formation of large microbial filaments. Graded sieving of digested slurry showed metals to be mainly present on 3 to 25 µm particles. Less than 2% Cu and Zn was removed by passage through a 250 µm rotary screen.

Keywords: copper, zinc, specific surface area, macroelements, mass balance.

Résumé

La distribution granulométrique des particules et la répartition des éléments traces métalliques ont été étudiés sur une unité de digestion anaérobie traitant des lisiers de porcs. Dans un premier temps, le bilan de masse de l'unité a été établi pour les éléments majeurs (N, P, K, Ca, Fe, Mg et S) et mineurs (Al, Cu, Mn et Zn). La plupart de ces éléments sont conservés par le procédé à l'exception de P, Ca, Mg et Mn dont les quantités sont réduites significativement dans le digestat du fait de la formation de cristaux sur les parois métalliques de digesteur. Dans un second temps, l'analyse de Cu et Zn a montré des concentrations comprises entre 170 et 2600 mg kg⁻¹ selon l'effluent considéré. L'analyse de la distribution granulométrique dans le lisier brut et méthanisé a montré un déplacement de la distribution vers les plus grosses particules du fait de la dégradation des plus petites molécules d'une part, ainsi que de la formation de floccs bactériens. Dans le lisier méthanisé, le Cu et le Zn se trouvaient essentiellement associés aux particules de diamètre compris entre 3 et 25 µm. Moins de 2% de ces éléments étaient séparés avec un tamis de 250 µm.

¹ Tel.: + 33-5-62-19-39-37; fax: + 33-5-62-19-39-01

E-mail address: guiresse@ensat.fr

3.1. INTRODUCTION

Biogas production from the biological conversion of waste is receiving increasing attention as a source of energy (Rodriguez and Lomas, 2002; Pouech *et al.*, 2005). Furthermore, anaerobic digestion reduces the total amount of dry matter while stabilizing the remaining organic material, leading to a reduction of odour emissions (De la Farge *et al.*, 1983). These are the reasons why such treatment is frequently used to treat animal slurries and wastewater and has been the object of numerous studies (Lake *et al.*, 1985; Elmitwalli *et al.*, 2001; Rodriguez and Lomas, 2002). Some have dealt with the link between particle size distribution and biogas production but without analysing the different constituents of the digested effluent, while others have focused on the transfer of macronutrients such as nitrogen and phosphorus. However, heavy metal transfer and distribution have rarely been considered (Theis and Hayes, 1978).

Nevertheless, Cu and Zn are essential micronutrients for pigs' metabolism and their feed is supplemented with these elements. Due to their poor bioavailability, Cu and Zn are added at levels that largely exceed physiological requirements (Jondreville *et al.*, 2003). As a consequence, most of the dietary supply is excreted so the slurries contain high concentrations of Cu and Zn (French agricultural and environment ministries, 2003). When the slurries are spread on arable land, the Cu and Zn they contain may generate an environmental risk by accumulating in the topsoil (L'Herroux *et al.*, 1997; Gavalda *et al.*, 2005). Lowering the dietary supply of these elements to pigs would be one way to control the environmental impact of Cu and Zn. However, further studies must be performed before the levels can be lowered without adversely affecting growth performance (Jondreville *et al.*, 2003).

A few studies have dealt with the effect of anaerobic digestion on heavy metal distribution in sewage sludge (Lake *et al.*, 1985) but scarcely any with livestock slurry. Firstly, studies on heavy metals in anaerobic digestion mostly focused on their impact on biomass inhibition (Leighton and Forster, 1997) or biomass accumulation (Ginter and Grobicki, 1995). Secondly, the works dealing with the distribution and availability of metals examined sludge spiked with an inorganic salt (Lake *et al.*, 1985; Bolan *et al.*, 2003). However, according to Bolan *et al.* (2003), the behaviour of the spiked metals must be different from that of the sludge-born metals. Finally, works performed on unmodified anaerobic digested sludge often compared two biosolids (one digested and one not) coming from different treatment plants (Lavado *et al.*, 2005). In the current work, a single pig slurry was studied before and after anaerobic digestion without spiking.

In all previous works (Theis and Hayes, 1978; Beline *et al.*, 2004) metals were found to be associated with the organic matter in liquid wastewater or manure. We therefore investigated how anaerobic digestion modifies the organic matter firstly by measuring the size distribution of the particles in the raw and digested slurries. In the same way, the level of metals and macronutrients and their fate during the anaerobic treatment was determined by mass balance calculated over the treatment unit.

Moreover, the anaerobic digestion step is not the last stage in the process; the treated slurry still contains organic matter and is usually spread on the fields. To reduce ammonia loss at the time of spreading, the slurry must be spread on the surface of the soil or directly worked into the soil by

means of the spreading injectors. Unfortunately, these instruments are liable to clog so the slurry is pre-treated before spreading to remove the larger particles.

Sedimentation, mechanical screen techniques or centrifugation are then frequently used. This also reduces the levels of dry matter and phosphorus (Møller *et al.*, 2002). Beline *et al.* (2004) studied the recovery of metals by such separations. Following aerobic treatment, they found that the different separation processes concentrated not only phosphorus but also Cu and Zn while only 10% of the metals were recovered in raw, untreated slurries. Our purpose was therefore to establish the removal percentages of metals and macronutrients in different granulometric fractions of digested slurry, and to find an explanation for this distribution.

3.2. METHOD

3.2.1. Anaerobic digestion unit and sample collection

The present work was conducted on an anaerobic digestion unit treating slurries from a farrow-to-finish herd at the ADÆSO experimental site (Pouech and Castaing, 1999). The anaerobic reactor was run at 37°C, with a retention time of about 15 days. The slurry was mechanically stirred by three sets of paddles functioning alternately (stirred tank reactor). The biogas generated was collected in a metal gasometer which maintained it under pressure (25 mbar) and was then directly burned in a boiler (Chappée) to maintain digester temperature. Introduction of approximately 11 m³ occurred once a day, 7 days a week (over a week, daily volumes can vary between 8 and 13 m³ depending on the pig unit outputs). The volume introduced was calculated by measuring the liquid level of the tank with a laser distance sensor. Simultaneously the same volume was evacuated into an intermediate storage tank. From there, the digested slurry was then pumped through a 250 µm rotary screen (Midi-Limpia, Demoisy Co.). The liquid fraction was stored in tanks of 600 and 1000 m³ for up to several months before being spread on maize fields. The separated solids were composted on a concrete slab.

Four types of waste were sampled: raw slurry (RS), digested slurry (DS), liquid fraction (LF) and solid fraction (SF) (Fig. 1). The sampling method was designed making the following assumptions. (i) Owing to the management plan of the pig farm, the site always housed the same number of animals at more or less the same physiological stage, whatever the period of the year. The flow of raw slurry from the site towards the digester is continuous. Similarly, the foodstuff was always identical for a given type of animal (piglets, pigs and sows), and their level of assimilation by the animals is perfectly controlled. Noblet and Perez (1993) showed that, for a given foodstuff composition, there is a given digestibility of nutrients thus determining the composition of the slurries. (ii) for a continuous stirred-tank reactor (CSTR), it is generally accepted that a period of 3 to 5 hydraulic retention times is necessary to reach a steady state (Houghton *et al.*, 2002). In our experiment, the digester had already been working for several months with regular slurry input. (iii) Hence, as the digester is a CSTR in the steady state, it must be operating at the outlet concentration, this concentration is identical at all points in the reactor and is independent of time at any point.

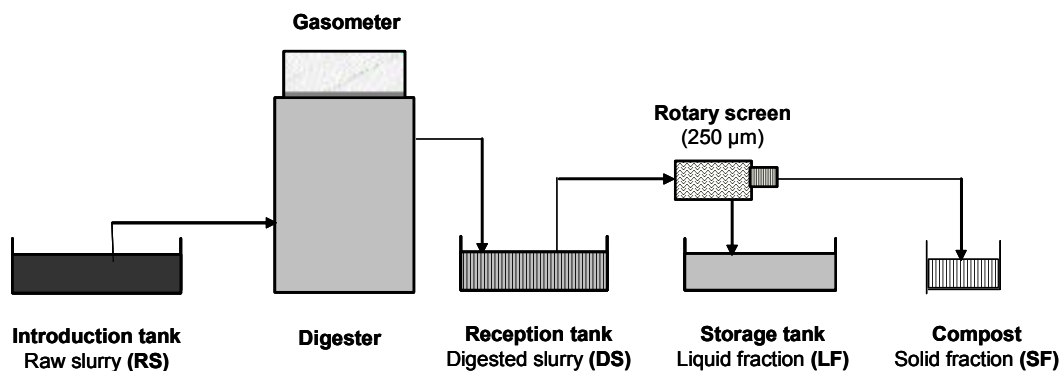


Fig. 1 : Flow-sheet of the anaerobic digestion plant and identification of samples

As a consequence, for each type of waste (Fig. 1), three samples were taken once a day, 7 days a week to constitute three weekly samples at each point of the treatment plant. Liquid effluent (RS, DS and LS) was sampled using the following sampling system. During transfers between two points of the process, the effluent was sent past a sampler. The sampler was a 3-way tap opened for 8 seconds per minute during the whole transfer period, and hence it sampled a daily volume strictly proportional to the total volume transferred. For FS, which is a solid, sampling was carried out following the standard AFNOR (2000a) procedure.

Analyses were performed right after sampling. Raw slurry and digested slurry (RS and DS) samples were stored at 4°C until distribution size analyses were performed; they were not frozen to avoid the formation of larger particles as described by Knocke and Trahern (1989).

Complementary mechanical separations were operated on digested slurry to determine the metal mass balance and identify any link between particle size and metal distribution. Separations were operated at 43 and 25 µm with a SWECO vibrating sieve (pilot unit). Laboratory separation was done by filtration through a Durieux cellulose filter.

3.2.2. Analysis

3.2.2.1. Chemical composition

Dry matter (DM) is the weight of each sample after drying at 105°C for 24 hours. Volatile solids (VS) were determined by heating to 200°C for 2 hours and then at 550°C for 10 hours. Total nitrogen (TN) was analysed by means of the Kjeldahl method. The ammonium (NH_4^+) was directly quantified by distillation without any previous mineralization stage.

Extraction of metals in slurry samples was undertaken using a modified strong acid digestion process described by AFNOR (1995), with a Gerhardt Kjeldatherm. An accurately weighed sample of 5 ml was digested with 20 ml 65% HNO_3 and 20 ml 37% HCl . Modifications to the original technique included the use of a 50/50 hydrochloric/nitric acid solution instead of a 75/25 hydrochloric/nitric acid solution, because of the high organic matter content in the samples. Nitric acid was used here for its strong oxidant properties. The samples were kept overnight at 20° then heated to 160°C for 2 hours.

After cooling to room temperature they were filtered at 3 μ m and then adjusted to 100 ml with deionized (UHQ) water. Three extraction replicates were operated for each sample. Al, As, Ba, Ca, Cd, Co, Cu, Fe, K, Mg, Mn, P, Pb, S, Se and Zn were determined by plasma optical emission spectrophotometry (ICP-OES Thermo IRIS Intrepid II XDL Duo).

3.2.2.2. Particle size distribution and separation system

Particle size distribution was studied for two slurries: raw slurry, and digested slurry before any separation treatment by laser diffraction using the Cilas 1180 L n°516 (AFNOR, 2000b). These measurements were performed by the Institute of Filtration and Techniques of Separation (Foulayronnes, 47510 France). The results provided the volume distribution of the particles, as a percentage of the total volume of the solids. Assuming that the particles are spherical and non-porous (Houghton *et al.*, 2002), we can calculate the number of particles and the specific area in each particle size class as a percentage of the cumulative total specific surface area (SSA). The SSA is plotted versus particle size. The distribution of the most abundant metals was studied in a few particle size classes of the digested slurry after separation by 250 μ m rotary screen, 43 μ m shaking sieve, 25 μ m shaking sieve, 3 and 0,45 μ m cellulose filter.

3.2.3. Calculations

Mean values were compared using Student's t test. Difference was considered significant for a probability below 0.05 ($P < 0.05$).

Mass balances of chemical elements were obtained by multiplying the concentrations by the volumes of effluent treated. Separation efficiency is commonly defined as the total mass of solids or nutrients recovered from the solid fraction as a proportion of the total input of solids or nutrients. This removal percentage (Re) was calculated using the procedure described by Møller *et al.* (2002).

3.3. RESULTS AND DISCUSSION

3.3.1. Nutrients and metals in the different slurries

Dry matter content (Table 1) in the raw slurry (RS) was low in comparison with values from the literature (Nicholson *et al.*, 1999; Levasseur P., 2002) due to the conditions at the ADÆSO experimental farm, which require frequent cleaning, causing the RS to be quite dilute. Due to the low dry matter contents, N and P levels were also moderate (about 0.28% N total in fresh matter and about 5-fold less for P). The quantities of slurry to be spread on the land are generally fixed from the levels of N but also, to a lesser extent, of P. Based on EC regulation (EEC, 1991), organic farming supplies are limited to the maximum load of manure-N, i.e. to 170 kg N ha⁻¹ yr⁻¹. The level of nitrogen was nearly constant before and after anaerobic digestion: all the liquid slurries contained between 0.26 and 0.28

% total nitrogen (TN). The composition of the slurries (RS, DS and LS), will mean spreading $60 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$ leading to annual macronutrient inputs (P, K, Ca, S, Mg and Al) lower than the requirements of most crops (Marchner, 1995). The slurry can thus contribute to the general nutrition of the plants without over-fertilizing with respect to N, P, K, Ca, S and Mg without any accumulation in arable land. The microelements presented a different picture. Cd, Co, As, Ba, Pb and Se were present in such low quantities (about 1 ppm fresh weight, i.e. very close to the detection threshold) that it was not possible to compare their levels in the different slurries. In Table 1, we have only reported the elements that showed a significant abundance.

Table 1 : Composition of slurries and mass balances on the anaerobic digestion plant (mean (standard deviation))

| | Raw slurry (RS) | Digested slurry (DS) | Liquid fraction (LF) | Solid fraction (SF) |
|---------------------------------|-----------------|----------------------|----------------------|---------------------|
| <i>% fresh matter</i> | | | | |
| DM ¹ | 2.7 (0.1) | 1.6 (0.0) | 1.5 (0.1) | 32.6 (0.8) |
| TN ² | 0.28 | 0.28 | 0.26 | 1.77 |
| NH ₄ ⁺ -N | 0.21 | 0.23 | 0.22 | 0.28 |
| <i>g.kg⁻¹ DM</i> | | | | |
| VS ³ | 673 (3) | 591 (17) | 617 (17) | 699 (7) |
| P | 29.5 (1.3) | 31.5 (4.0) | 24.9 (1.7) | 43.8 (4.2) |
| K | 37.4 (3.1) | 65.6 (2.0) | 72.3 (7.1) | 4.1 (0.4) |
| Ca | 51.2 (4.2) | 47.2 (4.4) | 39.0 (2.0) | 96.1 (8.3) |
| Fe | 2.5 (0.1) | 4.0 (0.1) | 4.3 (0.0) | 4.1 (1.5) |
| Mg | 14.2 (0.3) | 15.9 (0.9) | 12.1 (0.3) | 6.8 (1.3) |
| S | 8.1 (0.8) | 11.1 (2.2) | 10.8 (1.3) | 6.8 (0.7) |
| <i>mg.kg⁻¹ DM</i> | | | | |
| Al | 868 (308) | 1641 (367) | 998 (328) | 760 (154) |
| Cu | 590 (12) | 1016 (25) | 1001 (13) | 170 (16) |
| Mn | 629 (26) | 708 (20) | 610 (6) | 1042 (70) |
| Zn | 1507 (18) | 2628 (158) | 2563 (83) | 519 (82) |
| <i>kg day⁻¹</i> | | | | |
| Flow | 11297 (2362) | 11121 (2325) | 10223 (2123) | 39 (5) |
| DM | 301 (9.2) | 182 (1.7) | 148 (5.9) | 13 (0.2) |
| Nt | 31.6 | 31.1 | 26.6 | 0.7 |
| NH ₄ ⁺ -N | 23.7 | 25.6 | 22.5 | 0.1 |
| VS | 202 (6.6) | 107 (3.2) | 92 (3.8) | 9 (0.2) |
| P | 8.9 (0.6) | 5.7 (0.5) | 3.7 (0.3) | 0.6 (0.0) |
| K | 11.2 (0.9) | 11.9 (0.1) | 10.7 (0.8) | 0.1 (0.0) |
| Ca | 15.4 (1.0) | 8.6 (0.5) | 5.8 (0.3) | 1.2 (0.1) |
| Fe | 0.5 (0.4) | 0.5 (0.4) | 0.4 (0.3) | 0.1 (0.0) |
| Mg | 4.3 (0.1) | 2.9 (0.1) | 1.8 (0.1) | 0.1 (0.0) |
| S | 2.4 (0.3) | 2.0 (0.3) | 1.6 (0.2) | 0.1 (0.0) |
| <i>g day⁻¹</i> | | | | |
| Al | 261 (96) | 298 (44) | 149 (54) | 10 (0.6) |
| Cu | 177 (7) | 185 (1) | 149 (8) | 2 (0.1) |
| Mn | 189 (2) | 129 (1) | 90 (5) | 13 (0.7) |
| Zn | 453 (17) | 478 (16) | 380 (13) | 7 (1.2) |

¹: dry matter; ²: total nitrogen ; ³: volatile solids

The levels of P, Ca, Mg, S, Al, Cu, Mn and Zn are very close to those obtained by Levasseur (2002), the only notable differences being that Levasseur only found half the iron but twice the potassium before anaerobic digestion. The levels of Fe and Mn were low, giving rise to soil inputs of the same order as the levels of export in crops. In contrast, Cu and Zn were very abundant and the input from slurry (about 0.9 kg Cu ha⁻¹ and 2.5 kg Zn ha⁻¹) was ten-fold typical export values (Marschner, 1995), exceeding the limits laid down by the regulations governing the spreading of sewage sludge (Gavalda *et al.*, 2005). It is for this reason that the present work focused mainly on these two metals.

To consider the effects of anaerobic digestion on the composition of the slurries, the same slurry was compared before and after treatment (RS vs. DS). The greatest difference between the two types of slurry is their levels of DM since the hydrolysis reactions coupled to the methanogenesis degraded half the original organic matter. Similar levels of organic matter decomposition during treatment of swine manure had already been found by Hsu and Lo (2001) in aerobic conditions. Moreover, in other works Lake *et al.* (1985) reported a decrease of between 46 and 55 % in the volatile solids during anaerobic digestion of wastewater sludge. The temperature and pH conditions inside the digester were very close to ours, as were the organic degradation results even though the waste was very different from that of the current work: mixed and primary biological sludge from waste water.

Expressed per unit dry weight, digestion therefore enriches the proportion of mineral in the dry matter. Indeed, Cu and Zn concentrations were increased 1.8-fold by the digestion (Table 1). However, this did not affect the Cu and Zn inputs to the soil since the spreading is calculated with respect to the nitrogen, which remained constant during anaerobic digestion.

3.3.2. Mass balances of micro and macro nutrients in the anaerobic digestion plant

The anaerobic digestion process consumed 53% of the volatile compounds, which were most likely transformed into biogas in the digester (Table 1). During digestion, most of the mineral elements were conserved without any significant losses for N, K, Fe, S, Al, Cu and Zn. However, significant losses were observed for P, Ca, Mg and Mn, with respectively 36, 44, 32.5 and 32% of the respective elements lacking in the output (DS) in comparison to the input (RS). One feasible explanation is the accumulation of these elements in the reactor. Crystals lining the digester were observed when the reactor was opened. Scanning electronic microscopy (SEM-EDS) observations clearly showed them to be composed of P, Ca, Mg and Mn. X-ray diffraction analysis produced a spectrum of phosphate different from that of struvite described by numerous authors such as Suzuki *et al.* (2007). In addition, the overall budget *al.*so showed a loss of sulphur which can be attributed to the presence of H₂S in the biogas which was otherwise mainly composed of CH₄ and CO₂.

The solid-liquid separation system used here, i.e. the 250 µm rotary screen, removed very low amounts of dry matter (only 7%). Even if the solid fraction (SF) had high concentrations of macroelements (TN was 6-fold above that in the liquid fraction (LF), P and Ca were also more

concentrated in SF dry matter than in LF dry matter), the amounts of nutrients thus removed (Table 1) were very low: 3% TN, 14% Ca, 20% Fe and 10% P. In addition, the system did not allow the extraction of Cu or Zn because SF concentrations were 5- to 6-fold lower than in the whole digester output. This means that the metals did not occur on particles larger than 250 μm in diameter. These results are coherent with those of Westerman and Bicudo (2000) who recommended that solid-liquid separation processes be designed to remove both coarse material and particles smaller than 250 μm in order to significantly reduce the nutrient content of the effluent. In contrast, these performances are low compared to those of Daumer *et al.* (2005) working on undigested slurry for which the level of separation reached 20% for P and about 10% for Cu and Zn. Unfortunately, these authors did not report the cut-off size for the sieve, but in all likelihood, it was smaller than 250 μm .

3.3.3. Particle size and elemental distribution

The particle size distribution of the raw and digested slurries is presented in the form of a histogram of the relative frequency per volume class versus the volume class of the particles (Fig. 2). In both types of slurry, 92% of the volume of the solids is made up of particles greater than 3 μm in diameter. In the raw slurry, the median diameter was 67 μm while it was 305 μm in the digested slurry. Both slurries presented a bimodal particle size distribution: a first peak at 28 μm for the raw slurry and 53 μm for the digested slurry then a second peak at 950 μm for the raw and 700 μm for the digested. In the terminology proposed by Levine cited by Shon and Vigneswaran (2006) and adopted by Rodriguez and Lomas (2002), the first peak corresponds to "supracolloids" (1-100 μm , including bacterial floc, single cells and organic residues), and the second to settleables (>100 μm , corresponding mainly to organic residues). Fig. 2 therefore shows that it is mainly the smaller particles that are degraded during the anaerobic digestion leading to a relative increase in the proportion of larger particles (>1.4mm). The same shift in particle size distribution towards larger diameters was noted by Elmitwalli *et al.* (2001) in anaerobically digested domestic sewage. Production of bacterial floc and filaments during anaerobic digestion leads to a slight increase in the relative volume occupied by the largest particles. Moreover, the degradation of the organic compounds concerns the smallest particles most (i.e. < 1 μm) containing carbohydrates, amino acids and fatty acids as well as polysaccharides, proteins and lipids according to Shon and Vigneswaran (2006). Larger particles (i.e. > 10 μm) were more resistant to degradation, leading to a general shift in distribution towards larger sizes.

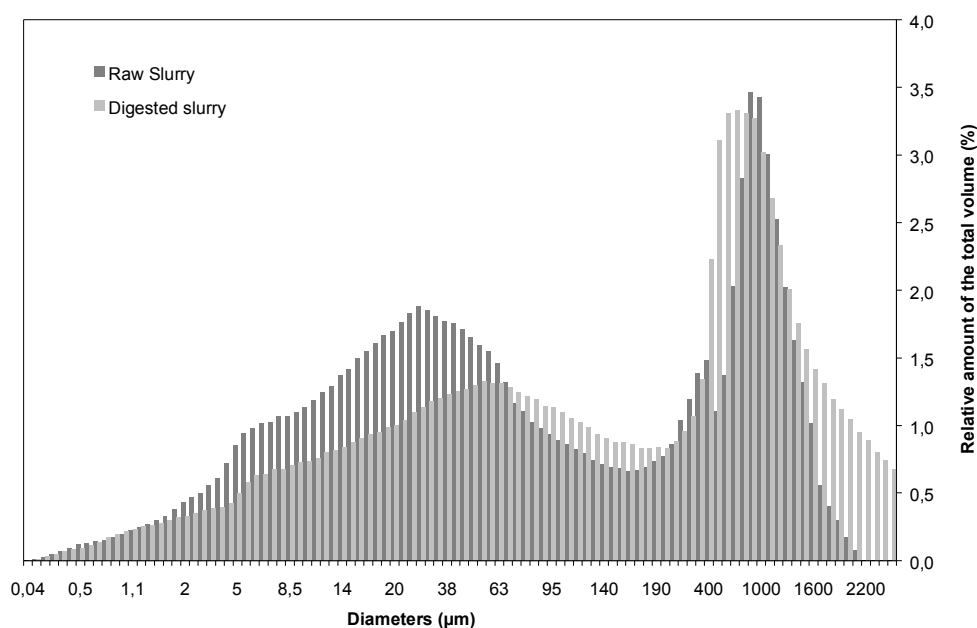


Fig. 2 : Distribution of the relative volumes of the various size classes of particles in raw and digested slurry

Rather than the size of the particles or the space that they occupy, areas of contact can play a predominant role in the processes of metal adsorption. By enhancing the contact between metals in solution and microbial cells, the specific surface area can increase the adsorption of the metals to the microbial biomass (Ginter and Grobicki, 1995; Leighton and Forster, 1997).

As generally accepted in the literature (Houghton *et al.*, 2002), the smaller particles contributed more in terms of specific surface area than the larger fractions (Fig. 3). Moreover, as anaerobic digestion preferentially attacked the small particles, the total specific surface area was, as expected, slightly lower in the digested slurry ($0.395 \text{ m}^2/\text{g}$) than in the raw slurry ($0.471 \text{ m}^2/\text{g}$).

In both RS and DS, particles of over $25 \mu\text{m}$ in diameter only accounted for 8% of the total specific surface area (SSA). The largest particle size class to make a strong contribution to the SSA was the 3 to $25 \mu\text{m}$ class which reached a contribution of 30 and 40% for raw and digested effluent respectively.

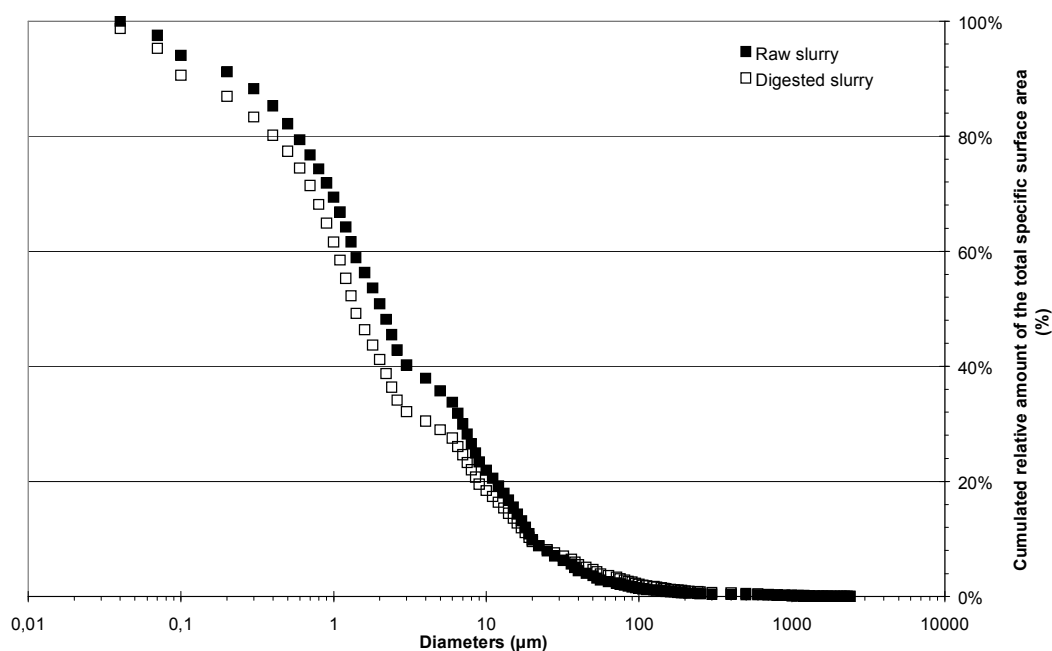


Fig. 3 : Cumulative relative distribution of specific surface area in raw and digested slurry

Concentrations and percentage nutrient and metal recovery in the dry matter of digested slurry after the different granulometric separations are reported in Table 2. For the concentrations, it can be noted that not all the elements had the same distribution in the various particle size classes. Among the macroelements, Ca and P followed the same pattern: very concentrated in the largest fraction (>250µm), less concentrated in the intermediate fraction, then a steady increase in concentration once more as the particle size diminished. In contrast, S was present at low levels as long as the particles were larger than 25 µm in diameter. The concentration of S doubled when the separation threshold was lowered to 3 µm. The distribution of K was again different: its level increased going from the 250-µm to the 25-µm fraction and then decreased in the fraction with the finest particles. Owing to the high affinity of potassium for water, its distribution is quite well correlated ($r^2 = 0.8619$) to the moisture remaining in the solid fraction. For the other metals, the distribution was the same: low levels in large particles, but the levels increased as the particle size decreased to reach maximal values for the >3 µm fraction. Lowering the cut-off threshold again to 0.45 µm, the metal concentrations decreased.

Table 2 : Composition and elemental removal percentage in different particle size fractions of digested slurry (mean (standard deviation))

| | | Whole digested slurry | Particle size fractions | | | | |
|--------------------------------|-----|-----------------------|-------------------------|------------|------------|------------|-----------|
| | | | > 250µm | > 43µm | > 25µm | > 3µm | > 0.45µm |
| Dry matter composition | | | | | | | |
| g kg ⁻¹ | P | 31.5 (4.1) | 43.8 (4.2) | 26.1 (1.3) | 37.7 (0.6) | 42.5 (4.5) | ND |
| | K | 65.6 (2.0) | 4.1 (0.4) | 9.6 (0.3) | 10.4 (0.4) | 7.4 (0.1) | ND |
| | Ca | 47.2 (4.4) | 96.1 (8.3) | 28.9 (1.9) | 36.8 (2.2) | 65.3 (1.1) | ND |
| | Mg | 15.9 (0.9) | 6.8 (1.3) | 15.1 (0.8) | 22.7 (0.6) | 23.3 (1.6) | ND |
| | S | 11.1 (2.2) | 6.8 (0.7) | 6.5 (0.5) | 6.7 (0.2) | 11.4 (0.9) | ND |
| m kg ⁻¹ | Cu | 1016 (25) | 170 (16) | 329 (23) | 364 (30) | 1402 (8) | 1001 (14) |
| | Mn | 708 (20) | 1042 (70) | 444 (25) | 586 (10) | 1024 (25) | 873 (21) |
| | Zn | 2628 (158) | 519 (82) | 900 (132) | 877 (37) | 3563 (172) | 2091 (75) |
| Specific area (%) | | 100 | 0.77 | 5.33 | 8.15 | 32.12 | 80.18 |
| Removal percentage (Re) | | | | | | | |
| % | DM* | 100 | 7.2 | 16.9 | 18.8 | 62.8 | ND |
| | P | 100 | 10.5 | 17.4 | 27.8 | 104.7 | ND |
| | K | 100 | 0.1 | 2.1 | 2.5 | 6.1 | ND |
| | Ca | 100 | 14.0 | 12.0 | 16.9 | 100.6 | ND |
| | Mg | 100 | 3.4 | 19.0 | 31.6 | 108.4 | ND |
| | S | 100 | 5.0 | 9.7 | 11.2 | 63.3 | ND |
| | Cu | 100 | 1.1 | 5.8 | 7.1 | 91.6 | 99.3 |
| | Mn | 100 | 10.1 | 12.7 | 18.5 | 108.4 | ND |
| | Zn | 100 | 1.5 | 6.3 | 6.8 | 92.8 | 99.6 |

* dry matter

If we consider the amount of dry matter recovered after each separation, we have the recovery efficiency (Re) for each element which increased with DM recovery efficiency from 250 µm to 0.45 µm sieve mesh (Table 2). As mentioned above, P and Ca were the elements that were the best extracted with the large (250 µm) mesh size. However, with this cut-off, the total quantities of metals extracted were negligible whereas they were close to 100% when particles >3 µm were separated. Japenga and Harmsen (1990) showed that while K, Na and NH₄⁺ remained in the liquid fraction of the slurry, all the other metals were bound to the solid fraction. These authors used the standard cut-off threshold of 0.45µm to differentiate between the two fractions. Our results show that 85% of the Cu and the Zn were in particles whose diameters were from 3 to 25 µm while only 8% were recovered with particle sizes of between 0.45 and 3 µm. Separation efficiency of Cu and Zn was similar for all the particle size ranges tested, removal percentages being strictly proportional ($r^2 = 0.9998$) even though Zn was always two- or three-fold more concentrated than Cu: in the RS, the DS and again in the various slurry fractions (Table 2).

A relationship was found between the specific surface area, the Cu and Zn concentrations and the different particle size classes. Fig. 4 shows that the larger the surface area, the greater the concentrations of Cu and Zn. If a second-order polynomial model is applied to fit the points of Fig. 4, it reaches a maximum level coinciding with 47% cumulated surface area for Zn and 51% for Cu: values which correspond to particle sizes of between 1.3 and 1.6 µm. Interestingly, this range is the mean

size of bacteria, revealing the possible biosorption of Cu and Zn by microorganisms as suggested by Artola *et al.* (2000). These results are also supported by those of Han and Thompson (1999) referring to the properties of organic matter from anaerobically digested sewage biosolids where the Cu-binding ability decreased as the molecular weight increased.

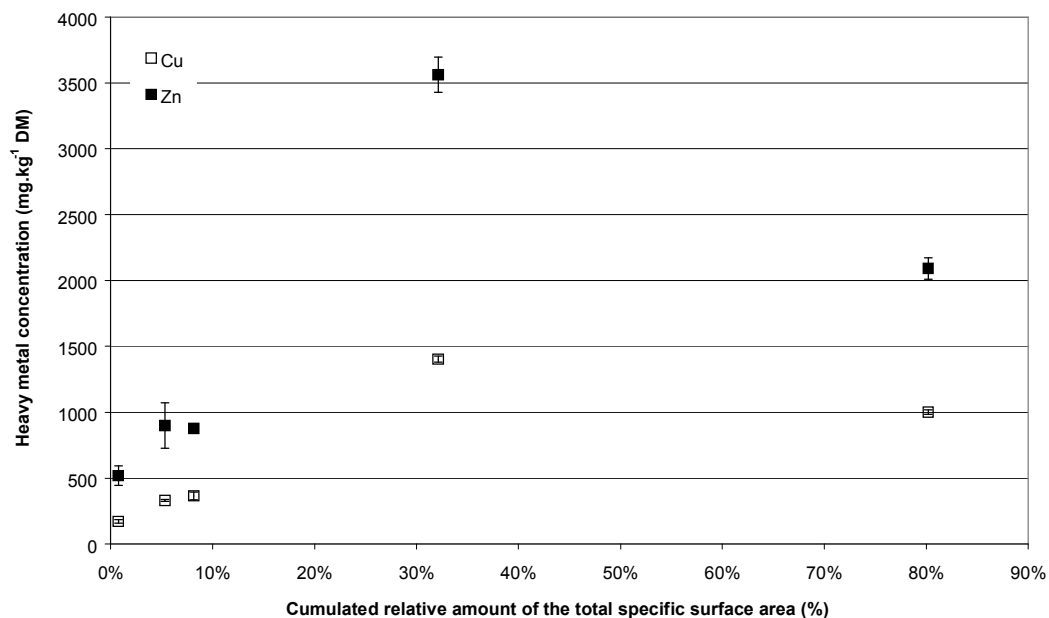


Fig. 4 : Cu and Zn dry matter concentration in particles of decreasing size in relation to cumulative specific surface area

3.4. CONCLUSION

Pig slurry contains nutrient elements (N, P, K, Ca, Fe, Mg and S) at levels corresponding to crop requirements. In contrast, copper and zinc are pig food additives, making their way into the excreta of these animals at high levels and can thus accumulate in slurry-fertilized soils.

By transforming almost half the organic matter in livestock slurry into methane, the process of anaerobic digestion has the effect of doubling the mineral content expressed per unit dry matter without any consequences on soil supplies as long as the amount of effluent spread is calculated on a nitrogen basis because the concentration in fresh effluent is the same. For most elements, there is no loss between the input and the output of the digester even for N, and recovery is not far from 100% except for P, Ca, Mg and Mn, which partially crystallise out in the form of a substituted phosphate which could be put to good use as P fertiliser in its own right.

During the anaerobic digestion of the slurry, it is the small particles that are degraded the most: i.e. those with diameters of between 1 and 60 μm . The major consequence is an increase in the relative abundance in the slurry of larger particles and finally a decrease in the specific surface area of the suspended matter in the slurry.

This modification in the particle size distribution caused by anaerobic treatment is an important factor in that the size of the particles is one of the criteria that determines the distribution of the metals in the digested slurry: most of the Cu and Zn (86%) is trapped within particles between 3 and 25 μm . Above this threshold, the larger the particles, the lower their specific surface area (SSA) and the less they concentrate metals, indicating that suspended organic matter with a high SSA presents more metal binding sites than matter with a low SSA. Finally, less than 2% of the total Cu and Zn are trapped within largest particles, indicating that the 250 μm mesh separation is not sufficient to remove the metals from the digested slurries, Cu and Zn remaining in the part of the slurry to be spread and not retained in the solid fraction. However, further investigations must now be carried out to determine the effect that anaerobic digestion can have on the bioavailability of metals after incorporation of the slurry into the soil

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the French National Agency for Research and Technology (ANRT), by the Association for the Environment and Security in Aquitaine (APESA) and by the French National Agency of Wastes and Energy (ADEME). A special thanks to all members of ADÆSO for performing the sampling in the anaerobic digestion plant. The authors also thank A. Alric for his precious help with ICP-OES analyses and T. Aigouy for the SEM-EDS observations.

REFERENCES

- AFNOR, 1995. Norme NF ISO 11466. Extraction des éléments en traces solubles dans l'eau régale. In : Qualité du sol, Volume 1. Paris : éditions AFNOR, 1999, 458-464.
- AFNOR, 2000a. Norme NF EN 12579. Amendement organique et sol – Echantillonnage.
- AFNOR, 2000b. Norme NF ISO 13320-1. Analyse granulométrique – Méthode par diffraction laser – Partie 1 : principes généraux.
- Artola, A., Martin, M., Balaguer, M.D., Rigola, M., 2000. Isotherm model analysis for the adsorption of Cd (II), Cu (II), Ni (II), and Zn (II) on anaerobically digested sludge. *J. Colloid. Interf. Sci.* 232, 64-70.
- Béline, F., Daumer, M.L., Guiziou, F., 2004. Biological aerobic treatment of pig slurry in France: nutrients removal efficiency and separation performances. *Transactions of the ASAE.* 47, 857-864.
- Bolan, N.S., Khan, M.A., Donaldson, J., Adriano, D.C., Matthew, C., 2003. Distribution and bioavailability of copper in farm effluent. *Sci. Total Environ.* 309, 225-236.
- Daumer, M.L., Béline F., Guiziou, F., 2005. Traitement biologique des lisiers de porcs en boues activées. Guide technique à l'usage des concepteurs, exploitants et organismes de contrôle des stations. Cemagref, 35044 Rennes, France, 69 p.
- De la Farge, B., Héduit, M., Brondeau, P., Mongin, J.P., Saugere, D., Cambus, L., 1983. La méthanisation des lisiers de porcs. *Journées Recherche Porcine en France*, 15, 11-22.

- EEC, 1991. Implementation of nitrates Directive, 12/12/1991, O.J. No. L375. Council Directive concerning the protection of waters against pollution caused by nitrates from agricultural sources.
- Elmitwalli, T.A., Soellner, J., De Keizer, A., Bruning, H., Zeeman, G., Lettinga, G., 2001. Biodegradability and change of physical characteristics of particles during anaerobic digestion of domestic sewage. *Wat. Res.* 35, 1311-1317.
- French agricultural and environment ministries, 2003. Estimation des rejets d'azote – phosphore – potassium – cuivre et zinc des porcs. Influence de la conduite alimentaire et du mode de logement des animaux sur la nature et la gestion des déjections produites. Rapport du groupe porc. 41 p.
- Gavalda, D., Scheiner, J.D., Revel, J.C., Merlina, G., Kaemmerer, M., Pinelli, E., Guiesse, M., 2005. Agronomic and environmental impacts of a single application of heat-dried sludge on an Alfisol. *Sci. Total Environ.* 343, 97-109.
- Ginter, M.O., Grobicki, A.M., 1995. Analysis of anaerobic sludge containing heavy metals: a novel technique. *Wat. Res.* 29, 2780-2784.
- Han, N., Thompson, M.L., 1999. Copper binding ability of dissolved organic matter derived from anaerobically digested biosolids. *J. Environ. Qual.* 28, 939-944
- Houghton, J.I., Burgess, J.E., Stephenson, T., 2002. Off-line particle size analysis of digested sludge. *Wat. Res.* 36, 4643-4647.
- Hsu, J.H., Lo, S.L., 2001. Effect of composting on characterization and leaching of copper, manganese, and zinc from swine manure. *Environ. Pollut.* 114, 119-127.
- Japenga, J., Harmsen, K., 1990. Determination of mass balances and ionic balances in animal manure. *Neth. J. Agric. Sc.* 38, 354-367.
- Jondreville, C., Revy, P.S., Dourmad, J.Y., 2003. Dietary means to better control the environmental impact of copper and zinc by pigs from weaning to slaughter. *Livestock Production Science* 84, 147-156.
- Knocke, W.R., Trahern, P., 1989. Freeze-thaw conditioning of chemical and biological sludges. *Wat. Res.* 23, 35-42.
- Lake, D.L., Kirk, P.W.W., Lester, J.N., 1985. The effects of anaerobic digestion on heavy metal distribution in sewage sludge. *Wat. Pollut. Control.* 84, 549-558.
- Lavado, R.S., Rodriguez, M.B., Taboada, M.A., 2005. Treatment with biosolids affects soil availability and plant uptake of potentially toxic elements. *Agric. Ecosys. Environ.* 109, 360-364.
- Leighton, I.R., Forster, C.F., 1997. The adsorption of heavy metals in an acidogenic thermophilic anaerobic reactor. *Wat. Res.* 31, 2969-2972.
- Levasseur, P. 2002. Composition chimique détaillée des aliments et des lisiers de porc. *Techni. Porc.* 25, 19-25.

- L'Herroux, L., Le Roux, S., Appriou, P., Martinez, J., 1997. Behaviour of metals following intensive pig slurry applications to a natural field treatment process in Brittany (France). *Environ. Pollut.* 97, 119-130.
- Marschner, H., 1995. Mineral nutrition of higher plants. Academic Presse, London.
- Møller, H.B., Sommer, S.G., Ahring, B.K., 2002. Separation efficiency and particle size distribution in relation to manure type and storage conditions. *Bioresour. Technol.* 85, 189-196.
- Nicholson F.A., Chambers B.J., Williams J.R., Unwin R.J., 1999. Heavy metal contents of livestock feeds and animal manures in England and Wales. *Bioresour. Technol.*, 70, 23-31.
- Noblet, J., Perez, J.M., 1993. Prediction of digestibility of nutrients and energy values of pig diets from chemical analysis. *J. Anim. Sci.* 73, 3389-3398.
- Pouech, P., Castaing, J., 1999. An experimental codigestion platform in south of France. II International Symposium on Anaerobic of Solid Waste, Barcelona, 15-18 june.
- Pouech, P., Coudure, R., Marcato, C.E., 2005. Intérêt de la co-digestion pour la valorisation des lisiers et le traitement de déchets fermentescibles à l'échelle d'un territoire. *Journées Recherche Porcine* 37, 39-44.
- Rodriguez, A., Lomas, J.M., 2002. Transition of particle size fractions in anaerobic digestion of the solid fraction of piggery manure. *Biomass Bioenergy* 23, 229-235.
- Shon, H.K, Vigneswaran, S., 2006. Effluent Organic Matter (EfOM) in Wastewater: Constituents, Effects, and Treatment. *Journal Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 36, 327-374.
- Suzuki, K., Tanaka, Y., Kuroda, K., Hanajima. D., Fukumoto, Y., Yasuda, T., Waki, M., 2007. Removal and recovery of phosphorous from swine wastewater by demonstration crystallization reactor and struvite accumulation device. *Bioresour. Technol.* 98, 1573-1578.
- Theis, T.L., Hayes, T.D., 1978. Chemistry of heavy metals in anaerobic digestion. In: *Chemistry of wastewater technology*. Rubin, A.J. Ann Arbor Science Publishers, Inc. Michigan, pp. 403-419.
- Westerman, P.W., Bicudo, J.R., 2000. Tangential flow separation and chemical enhancement to recover swine manure solids, nutrients and metals. *Bioresour. Technol.* 73, 1-11.

4. METHODOLOGIE MISE EN ŒUVRE DANS LA SUITE DE L'ÉTUDE A PARTIR DE CES PREMIERS RESULTATS

4.1. FLUX D'ÉLÉMENTS APPORTÉS AU SOL PAR LES EPANDAGES

Les apports d'éléments à la parcelle suite aux épandages de lisier brut ou de lisier méthanisé peuvent être calculés à partir du bilan de la station (Tableau 9). Pour cela, les quantités épandues sont déterminées à partir de la teneur en azote des lisiers, et en respectant des apports de 170 kg N.ha⁻¹.an⁻¹ recommandée par les différentes réglementations européennes et françaises. D'après la composition des lisiers, ces apports correspondent à des flux de lisiers d'environ 60 m³.ha⁻¹.an⁻¹.

Tableau 9 : Bilan des apports au champ par campagne d'épandage (kg.ha⁻¹.an⁻¹)

| | MS | MSV | Nt | N-NH ₄ ⁺ | P | K | Ca | Fe | Mg | S | Al | Cu | Mn | Zn |
|------------------|------|------|-----|--------------------------------|------|------|------|-----|------|------|------|------|------|------|
| Lisier brut | 1620 | 1090 | 168 | 126 | 47,8 | 60,6 | 82,9 | 4,1 | 23,0 | 13,1 | 1,41 | 0,96 | 1,02 | 2,44 |
| Lisier méthanisé | 960 | 567 | 168 | 138 | 30,2 | 63 | 45,3 | 3,8 | 15,3 | 10,7 | 1,58 | 0,98 | 0,68 | 2,52 |

Les flux au champ soulignent la valeur fertilisante des lisiers. Les apports de phosphore correspondent aux besoins des cultures. De même, les lisiers sont une source non négligeable de potassium, calcium, magnésium et soufre, bien que les apports soient inférieurs aux besoins des cultures (Marschner, 1995). Les apports de P, Ca et Mg sont inférieurs dans le cas du lisier méthanisé du fait des pertes sous forme de cristal dans le digesteur (p.84 et Annexe 1). Cependant, ce cristal pourrait être collecté et valorisé en tant qu'engrais phosphaté. En ce qui concerne les macro-éléments non indispensables pour les végétaux, seul l'aluminium a été dosé en quantités non négligeables dans les lisiers. Les flux au champ restent cependant en deçà des besoins des cultures. Les épandages de lisier brut ou méthanisé, effectués dans le respect de la réglementation, contribuent donc au recyclage d'éléments fertilisants et participent à la nutrition générale des cultures sans risque de surfertilisation en macro-éléments (N, P, K, Ca, Mg et S).

En ce qui concerne les micro-éléments, deux situations apparaissent. Le fer et le manganèse sont apportés en quantités équivalentes aux besoins des cultures (Marschner, 1995). En revanche, les apports de cuivre et de zinc sont environ 10 fois supérieurs à ces besoins, bien que les flux ne dépassent pas les limites fixées par la réglementation pour l'épandage de boues de station d'épuration (15 kg Cu.ha⁻¹ et 45 kg Zn.ha⁻¹ cumulés sur une période de 10 ans). Enfin, la digestion anaérobie n'a pas d'effet sur les flux de cuivre et de zinc, ces deux éléments étant conservés au cours du traitement.

Ainsi, que les lisiers soient traités ou non par digestion anaérobie, les apports de cuivre et de zinc par épandage seront supérieurs aux besoins des cultures et pourront entraîner une accumulation de ces éléments dans les sols.

4.2. OBTENTION DES CONCENTRES DE LISIERS

L'objectif prioritaire poursuivi dans ce travail est d'évaluer le rôle de la digestion anaérobie sur les impacts agro-environnementaux de l'épandage de lisiers porcins. Or ces effets sont des effets à long terme, dus à l'accumulation dans le sol des éléments traces métalliques.

Sur le site d'étude, seuls des lisiers traités par digestion anaérobie ont été épandus depuis la mise en service de l'unité de méthanisation il y a plus de 20 ans. Ainsi, il était impossible de comparer, à partir d'échantillons de sols réels, les effets de la méthanisation sur le devenir des lisiers épandus. Le choix a donc été fait de simuler des décennies d'épandage.

Pour évaluer des effets d'éléments traces métalliques dans des matrices peu chargées mais pouvant générer des effets à moyen ou long terme, différents auteurs ont fait le choix de doper les matrices étudiées. Ainsi, Bolan *et al.* (2003) ont enrichi une fraction solide de lisier contenant 526 mg Cu.kg⁻¹ MS avec une solution de CuSO₄ ou de CuO pour atteindre des niveaux de cuivre susceptibles d'engendrer une inhibition de l'activité microbienne du sol et pour pouvoir évaluer la phytodisponibilité de cet élément pour une culture de ray-grass. Cependant, d'autres auteurs ont montré une différence de phytodisponibilité d'éléments traces métalliques présents à l'origine dans les boues et ceux apportés lors d'un dopage (McGrath, 1994 ; Ross et Kaye, 1994 ; Stevens *et al.*, 2003). Le dopage d'un substrat organique par des solutions salines de métaux peut donc introduire un biais en modifiant la spéciation et la biodisponibilité des métaux étudiés. Or ce paramètre est de première importance dans le cas présent : les essais doivent permettre de répondre à la différence de comportement du cuivre et du zinc du fait du traitement des lisiers par digestion anaérobie.

Le choix a donc été fait de ne pas ajouter de métaux aux lisiers. Une technique devait donc être développée de façon à apporter le cuivre et le zinc en respectant leur fractionnement chimique tel que dans les lisiers bruts ou méthanisés, tout en s'affranchissant d'une toxicité liée à l'azote. Des essais ont donc été conduits de façon à trouver une méthode permettant de concentrer la matière organique et les éléments traces métalliques dans une fraction solide.

D'après les résultats de répartition du cuivre et du zinc (p.85), il apparaît que les deux éléments sont principalement liés à une fraction granulométrique comprise entre 3 et 25 µm. Dans un premier temps, des essais de filtration ont été réalisés. Cette technique s'est avérée inadaptée pour l'obtention de centaines de grammes de concentrés de lisier nécessaires aux essais agronomiques et de génotoxicité. Des centrifugations ont donc été réalisées sur des lisiers bruts et méthanisés (Beckam J2-21M/E centrifuge, 14 000g, 30 min). Ces essais révèlent qu'il est possible de concentrer efficacement la matière sèche, le cuivre et particulièrement le zinc contenus dans les lisiers brut et méthanisé (Figure 24). Pour les 2 métaux, les taux de séparation sont supérieurs à 80%. Les efficacités de séparation du zinc sont supérieures à celles obtenues pour le cuivre, quel que soit le lisier considéré. Pour la matière sèche, le taux de récupération semble plus important pour le lisier méthanisé que pour le lisier brut, bien que la différence ne soit pas significative.

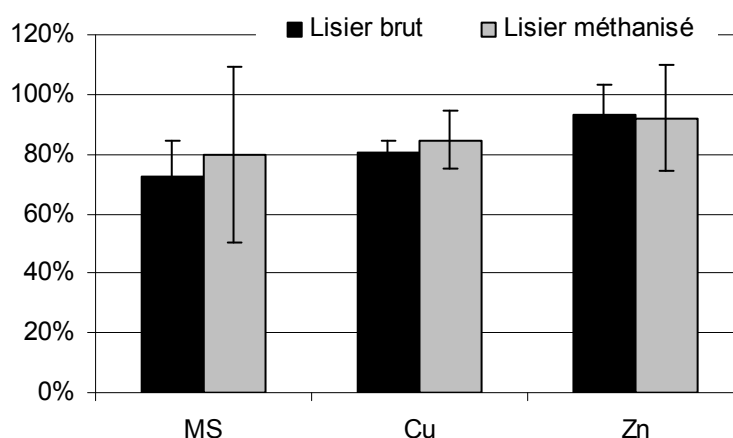


Figure 24 : Efficacité de séparation par centrifugation de la matière sèche, Cu et Zn des lisiers

Après une centrifugation de 30 minutes à 14 000 g, les culots obtenus sont liquides et contiennent 10 à 15 % de matière sèche. Ils sont donc placés à 40°C pendant 5 jours afin d'être complètement déshydratés. Ils sont ensuite broyés de façon à obtenir un produit homogène et facilement manipulable.

Cette méthode de concentration du cuivre et du zinc par centrifugation permettait la préparation de quantités importantes de concentrés, ce pourquoi tous les essais réalisés avec des végétaux ont été mis en œuvre avec apport d'une fraction solide, et non avec le lisier d'origine. Dans un souci de simplicité, ces concentrés de lisier pourront également être appelés simplement « lisiers » dans l'exploitation des résultats.

Il est important de noter que cette méthode peut induire différents biais pour l'évaluation de la phytodisponibilité :

- Les efficacités de séparation ne permettent pas de concentrer la totalité du cuivre et du zinc dans une fraction solide (Figure 24) ; la fraction demeurant dans le surnageant est vraisemblablement la plus mobile chimiquement, ce qui pourra entraîner une sous-estimation de la phytodisponibilité ;
- La centrifugation conduit à la formation d'un culot qui peut entraîner des remaniements granulométriques, pouvant avoir des conséquences sur la répartition physico-chimique des métaux au sein de la matière organique ;
- L'utilisation de concentrés en quantités importantes pour simuler l'accumulation du cuivre et du zinc dans le temps s'accompagnera d'apports importants de matière organique, alors que, *in situ*, ces apports sont réalisés sur de très longues périodes au cours desquelles la matière organique se dégrade progressivement.

Cependant, cette technique nous semble être celle qui conserve le mieux la compartimentation et la spéciation des éléments traces métalliques. Pour ces raisons, l'utilisation d'un concentré obtenu par centrifugation nous a paru préférable à un dopage des lisiers par des solutions de sels métalliques dont la spéciation est très différente de celle des métaux contenus dans les lisiers.

4.3. AUTRES ELEMENTS DE MATERIEL ET METHODE COMMUNS A L'ENSEMBLE DE L'ETUDE

4.3.1. Analyse des éléments métalliques par ICP-OES

L'extraction des métaux dans les différents échantillons (lisiers, concentrés de lisier, extraits, sols) a été réalisée par digestion à l'eau régale selon la méthode normalisée NF ISO 11466 (AFNOR, 1995). Pour les produits riches en matière organique, la méthode a été légèrement modifiée comme indiqué dans le Tableau 10. Chaque échantillon a été minéralisé pendant une nuit à température ambiante, puis le mélange a été porté à ébullition pendant 2 heures. Après digestion, les échantillons sont filtrés à 3 µm et dilués avec de l'eau déionisée de façon à obtenir un contenu en acide inférieur à 10% dans la solution finale, et une concentration en sels inférieur à 10 g.L⁻¹.

Trois répétitions sont réalisées pour chaque produit, et la qualité de l'extraction est assurée par utilisation de matériaux de référence (Tableau 10).

Tableau 10 : Protocoles d'extraction des métaux en fonction du produit à analyser

| | Protocole A Produits organiques Lisiers, concentrés, extraits | Protocole B Sols * |
|-----------------------------------|--|-------------------------------------|
| Masse de produit à doser (g) | 1 | 3 |
| Proportion HCl : HNO ₃ | 1 : 1 | 3 : 1 |
| Volume total d'acide (mL) | 40 | 28 |
| Matériaux de référence | Boue d'usine d'épuration BE-1 ¹ Boues BCR 145-R « s » ² | Sol sous forêt ISE 912 ³ |

* analyses réalisées selon la norme NF ISO 11466 (AFNOR, 1995)

L'analyse est effectuée par ICP-OES (Inducted Coupled Plasma, Optical Emission Spectrophotometry) au moyen d'un appareil Thermo IRIS Intrepid II XDL Duo.

4.3.2. Le sol

Dans les essais de minéralisation du carbone en sol et d'évaluation de la phytodisponibilité des éléments traces métalliques, un même sol a été utilisé. Il s'agit d'un sol d'alluvions récentes en rive gauche du Touch à Poucharramet (31). C'est un sol jeune peu évolué (Fluviosol), homogène sur deux mètres de profondeur et non calcaire. Pour les essais présentés ici, le sol a été prélevé sur les 30 premiers centimètres, séché à l'air, tamisé à 4 mm et a été stocké à température ambiante jusqu'à son utilisation. Sa texture est argilo-limoneuse (A = 35%, L = 41%, S = 24%). La capacité d'échange

¹ SCP Science, France

² Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM), Belgique

³ Wageningen Evaluating Programs for Analytical Laboratories, Pays Bas

cationique est faible (13,3 cMolc.kg⁻¹) et le pH est de 6,4. Le taux de carbone organique est égal à 1,33%. Les teneurs en cuivre et en zinc y sont de 20 et 80 mg.kg⁻¹ respectivement.

Tableau 11 : Caractéristiques du sol utilisé pour les essais de phytodisponibilité et de minéralisation du carbone organique

| Usage | Agricole | Caractéristiques | |
|--------------------------------|----------|--|-------|
| Granulométrie (%) | | pH _{eau} | 6,4 |
| Argiles < 2 µm | 35 | pH _{KCl} | 5,8 |
| Limons fins (2-20 µm) | 31 | C % | 1,33 |
| Limons grossiers (20-50 µm) | 10 | MO % | 2,4 |
| Sables fins (50-200 µm) | 9 | CEC (Ca ²⁺ , cMolc kg ⁻¹) | 10,2 |
| Sables grossiers (200-2000 µm) | 15 | CEC (Mg ²⁺ , cMolc kg ⁻¹) | 2,1 |
| | | CEC (K ⁺ , cMolc kg ⁻¹) | 1,0 |
| | | P Truog (ppm P ₂ O ₅) | 171,6 |

4.3.3. La fève

La fève (*Vicia faba*) a été utilisée dans les essais d'évaluation de la phytodisponibilité et de la génotoxicité. C'est une plante supérieure dicotylédone, de la famille des fabaceae (légumineuses). Nous avons utilisé une fève de type Aguadulce à longue cosse, comme recommandé par la norme AFNOR NF T 90-327 pour l'évaluation de la génotoxicité, du fait de sa grande sensibilité vis-à-vis des micropolluants et de sa facilité d'obtention. Par ailleurs, les cellules et les chromosomes de *Vicia faba* sont de grande taille, ce qui permet de repérer les dommages sur le matériel génétique.



Photo 4 : Gousse, tiges, feuilles et fleurs de *Vicia faba*

CHAPITRE II : CARACTERISATION DE LA MATIERE ORGANIQUE ET DISTRIBUTION DE CU ET ZN DANS LES « CONCENTRES DE LISIERS »

1. INTRODUCTION

La revue bibliographique de ce mémoire montre qu'assez peu de travaux ont été réalisés sur la définition de la matière organique des lisiers porcins après méthanisation, en relation avec la dynamique des métaux qu'ils contiennent. Pourtant, nos premiers résultats, présentés dans le chapitre précédent (Marcato *et al.*, 2007), mettent en évidence que si les épandages répétés de lisiers porcins constituent une source en éléments fertilisants, les apports en Cu et Zn sont excessifs par rapports aux besoins des cultures. Il est donc nécessaire de d'acquérir des références sur le devenir de ces métaux après leur enfouissement.

D'après Marcato *et al.* (2007), Cu et Zn se trouvent dans la fraction solide des lisiers, riche en matière organique. Leur devenir est donc intimement lié à celui de la matière organique. Or la littérature est très pauvre sur la composition des composés organiques des lisiers porcins et sur le rôle que la digestion anaérobie pourrait jouer sur la structure de ces composés organiques. En revanche, les boues résiduelles et leur transformation par compostage ont été davantage décrites par différentes approches pouvant être appliquées aux lisiers porcins méthanisés.

Dérivant des approches édaphologiques, de nombreux travaux ont été menés sur les acides humiques et fulviques extraits de boues d'eaux résiduelles (Guiesse *et al.*, 2004). Parallèlement, l'analyse des spectres infrarouge a fait beaucoup progresser la connaissance des substances humiques (Stevenson, 1994). D'autres méthodes d'analyses parfois très sophistiquées comme la thermochimiolysse couplée à la chromatographie gazeuse et la spectrométrie de masse ont permis d'étudier le devenir des acides gras lors des différentes phases du compostage (Amir *et al.*, 2005), mais concernant le traitement anaérobie, les travaux sont anciens (Buswell et Mueller, 1952). Plus récemment, Tardy *et al.* (2000, 2005) ont proposé une méthode d'interprétation de la composition élémentaire des substances humiques dans le but final de mieux comprendre leur genèse, leur structure et finalement leur liaisons avec les éléments minéraux du sol dont la mobilité vers les eaux et les plantes peut se retrouver fortement modifiée.

De plus, pour évaluer la stabilité de la matière organique après enfouissement, c'est à dire son aptitude à produire des composés humifiés, Linères et Djakovitch (1993) ont proposé une approche très originale analogue à l'étude de la digestibilité des fourrages animaux qui conduit à un modèle simple de prévision de la « valeur humique » d'un amendement agricole : l'indice de stabilité biologique (ISB).

Nous avons appliqué ces différentes méthodes en abordant la matière organique dans sa globalité sans la segmenter en fractions « humique », « fulvique » et « humine » qui décrivent bien la

solubilité de l'humus des sols mais qui, de notre point de vue, ne sont pas adaptées aux déjections animales.

Dans un premier temps consacré à l'étude de la matière organique, le spectre infrarouge des concentrés de lisier a été obtenu de façon à mettre en évidence les modifications majeures du traitement anaérobie sur la matière organique des lisiers. La caractérisation biochimique de la matière (CBM) a également été réalisée, et l'ISB a été calculé. Puis l'analyse élémentaire des concentrés de lisiers a été réalisée. Nous avons enfin déterminé la cinétique de minéralisation du carbone des concentrés de lisiers après et avant méthanisation puisque cette minéralisation conditionne la libération des métaux des lisiers après leur enfouissement.

Dans un second temps, nous avons caractérisé la répartition du cuivre et du zinc dans les concentrés de lisier : la répartition de ces deux éléments lors des différentes étapes de la CBM et un fractionnement chimique par extraction séquentielle ont été réalisés. Enfin, la mise en solution du cuivre et du zinc en fonction du pH a été étudiée pour chacun des lisiers, avant centrifugation.

2. MATERIEL ET METHODE

L'ensemble des analyses et essais décrits ci-après a été réalisé avec les concentrés de lisier obtenus par centrifugation et séchage (voir p.94), à l'exception de l'essai de mise en solution en fonction du pH qui a été réalisé sur les lisiers liquides. Pour chaque opération, trois répétitions ont été mises en œuvre pour chacun des lisiers.

2.1. CARACTERISATION DE LA MATIERE ORGANIQUE DES LISIERS

L'objectif de cette partie est de caractériser la matière organique de chacun des lisiers puis d'en évaluer la stabilité et la dégradabilité afin de mieux comprendre leur comportement après leur retour au sol par épandage.

2.1.1. Caractérisation fonctionnelle par spectroscopie infrarouge (FT-IR)

Les concentrés de lisier ont été analysés par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR). Les spectres ont été obtenus à partir de pastilles de bromure de potassium (KBr) obtenues par pression de 300 mg de KBr avec 2 mg de concentré de lisier finement broyé. Pour limiter les interférences dues à l'eau, le KBr et les concentrés de lisier ont été préalablement séchés à 105°C.

L'analyse a été réalisée au moyen d'un spectrophotomètre FT-IR Thermo Nicolet 5700, couplé à un logiciel Omnic, sur une gamme de fréquence allant de 4 000 à 400 cm⁻¹.

Ces analyses sont semi-quantitatives : elles permettent d'évaluer la présence relative de composés, et les spectres observés ne pourront pas conduire à l'établissement d'un bilan quantitatif pour la comparaison de deux types de lisier.

2.1.2. Caractérisation Biochimique de la Matière (CBM) et détermination de l'Indice de Stabilité Biologique (ISB)

Les concentrés de lisier ont également été fractionnés selon la méthode proposée par Linères & Djakovitch (1993). Cette méthode, basée sur celles développées par Van Soest (1963) et Van Soest et Wine (1967), permet de caractériser le produit par rapport à son contenu en fibres. La méthode d'origine avait été développée pour l'analyse de la digestibilité des rations alimentaires pour le bétail.

Un gramme de concentré de lisier a été mélangé à 2 g de sable, lavé à l'acide et calciné, dans un creuset de porosité comprise entre 40 et 90 μm , comme décrit par Gabrielle *et al.* (2004). Le mélange a été successivement mis en présence de différents réactifs pour en extraire les fractions définies selon le protocole suivant :

- a) NDF (Neutral Detergent Fiber incluant les carbohydrates solubles, les protéines, les lipides et les substances minérales solubles) : détergent neutre pendant 60 minutes ;
- b) ADF (Acid Detergent Fiber incluant les mêmes composés que NDF + les hémicelluloses) : détergent acide pendant 60 minutes ;
- c) ADL (Acid Detergent Lignin incluant la lignine et la cutine) : H_2SO_4 72% à froid pendant 3 heures.

Cette extraction séquentielle a été réalisée au moyen d'un appareil Velp Scientifica FIWE extractor. Les extraits de chaque étape ont été collectés pour analyse des éléments traces métalliques par ICP-OES. Le poids sec du résidu a été mesuré entre chaque étape afin de calculer les proportions relatives des fractions soluble (SOL), hémicellulose (HEM) et lignine (LIC) dans les concentrés de lisier selon les relations suivantes : $\text{SOL} = 1 - \text{NDF}$; $\text{HEMI} = \text{ADF} - \text{NDF}$; $\text{LIC} = \text{ADL}$

Une extraction de la cellulose dite « de Weende » (CEW) a également été réalisée selon la norme AFNOR NF V03-040 (1993) en portant successivement à ébullition pendant 30 minutes le mélange de sable et de concentré de lisier dans de l'acide sulfurique (0,26 M) puis dans l'hydroxyde de potassium (0,23 M).

L'indice de stabilité biologique (ISB) a enfin été calculé comme indiqué par Linères & Djakovitch (1993) et repris par Gabrielle *et al.* (2004) :

$$\text{ISB} = 2,112 - 2,009 \times \text{SOL} - 2,378 \times \text{HEMI} - 2,216 \times \text{CEW} + 0,840 \times \text{LIC}$$

Compris entre 0 et 1, cet indice est élevé pour les amendements stables, peu biodégradables. Ainsi, Linères & Djakovitch (1993) ont trouvé des ISB proches de 1 pour des tourbes ou des écorces, compris entre 0,2 et 0,6 pour des composts ou des fumiers, et enfin inférieurs à 0,2 pour des pailles fraîches. Parnaudeau *et al.* (2004) ont montré que la minéralisation du carbone peut difficilement être prédite à partir de la CBM ou de la répartition de l'azote et du carbone, contrairement à la

minéralisation de l'azote qui étroitement liée au rapport C/N. Toutefois, des tendances ont pu être mises en évidence pour une vingtaine de boues issues de stations d'épuration industrielles ou collectives : un groupe constitué de boues digérées présentait un C/N bas et une fraction LIC importante présentait un faible taux de minéralisation du carbone, tandis qu'un autre avec un C/N élevé et une fraction LIC réduite montrait une minéralisation importante du carbone et une immobilisation de l'azote.

2.1.3. Analyse élémentaire

L'analyse élémentaire a été réalisée par le GRMP (Service inter-universitaire de micro-analyse) de l'ENSIACET¹ de Toulouse. La composition en C, H, N, S a été obtenue après combustion à 1300°C au moyen d'un analyseur Thermo EA1110. L'oxygène a été déterminé par pyrolyse à 1000°C au moyen d'un microanalyseur Thermo Flash EA1112.

A partir de ces compositions élémentaires, le C/N a été calculé, et une approche thermodynamique a été réalisée selon la méthode des groupements atomiques fictifs proposée par Tardy *et al.* (2000). Selon cette approche la fraction CHO des substances humiques exclut l'azote. Pour cela, l'analyse élémentaire doit être recalculée pour un N, de telle sorte que le C/N est directement donné par la valeur du carbone. Cette méthode permet ainsi d'évaluer simplement le degré d'hydratation et d'oxydation du carbone à partir de la seule analyse élémentaire excluant l'azote ($C_tH_uO_v$). Pour cela, nous avons fait l'hypothèse que l'azote est exclusivement présent dans les concentrés de lisiers au sein de protéines (biomasse bactérienne et protéines résiduelles dans les fèces animaux), et donc principalement sous forme $-NH_2$.

Dans un premier temps, l'oxygène est utilisé pour créer de CH_2O . Si de l'oxygène reste disponible, il est utilisé pour former du CO, dans le cas contraire, c'est du CH_2 qui est généré. Le carbone restant est noté C ; si le carbone est épuisé avant la dernière étape, de l'eau libre peut être formée (H_2O). Dans un second temps, ces groupes atomiques permettent le calcul de différents paramètres :

- le degré d'hydratation du carbone : il peut être appréhendé de trois manières : $C_{sec} = C / C_t$ ou $C_{humide} = CH_2O / C_t$ ou $C_{sec} / C_{humide} = C / CH_2O$.
- le degré de polymérisation (CH_2O / C) ou de dépolymérisation ($(CH_2O + CO) / C_t$) du carbone.
- le degré d'oxydation (CO) ou de réduction (CH_2) du carbone.

Enfin, une approche thermodynamique, c'est-à-dire une recherche de conditions rationnelles de stabilité dans le sol des matières organiques, a été conduite pour évaluer la répartition des groupements fonctionnels des concentrés de lisier. Cette approche développée par Tardy *et al.* (2005) permet d'évaluer des propriétés physicochimiques de la matière organique en se basant sur 4 éléments : une connaissance précise des la stoechiométrie des réactions à partir de l'analyse

¹ Ecole Nationale Supérieure des Ingénieurs en Arts Chimiques et Technologiques

élémentaire ; des données thermodynamiques relatives à des composés simples permettant d'estimer les paramètres thermodynamiques pour des composés plus complexes ; un inventaire des paramètres modifiant les équilibres ; des mesures au champs pour valider les modèles établis. Parmi les propriétés physico-chimiques qu'il est possible de déterminer, nous avons retenu l'acidité totale (AT, meq.g⁻¹ C), l'acidité carboxylique (COOH, meq.g⁻¹ C), l'acidité alcoolique (OH, meq.g⁻¹ C) et le poids moléculaire (PM, g.mol⁻¹ C).

Tableau 12 : Relations linéaires pour le calcul des groupements fonctionnels, avec X le degré de dépolymérisation (Tardy *et al.*, 2005)

| Groupement fonctionnel | Formule |
|--|----------------------------|
| Acidité totale (meq.g ⁻¹ C) | Log AT = 0,689 X + 0,422 |
| Acidité carboxylique (meq.g ⁻¹ C) | Log COOH = 1,319 X – 0,217 |
| Acidité alcoolique (meq.g ⁻¹ C) | Log OH = 1,366 X – 0,385 |
| Poids moléculaire (g.mol ⁻¹ C) | Log PM = - 4,902 X + 7,897 |

2.1.4. Minéralisation du carbone en sol

La cinétique de minéralisation du carbone organique des concentrés de lisier a été déterminée par incubation à 28 ± 1 °C pendant 49 jours, selon le protocole présenté par Parnaudeau *et al.* (2004).

Le sol utilisé dans les essais est celui décrit en p.96. Les concentrés de lisier ont été mélangés au sol en proportion équivalente à des apports de lisier par épandage d'une cinquantaine d'années : 856 mg de lisier brut et 542 mg de lisier méthanisé ont été apportés dans 25 g de sol sec. En parallèle, un témoin ne contenant que le sol a été mis en place. Les mélanges ont été humidifiés de façon à obtenir une teneur en eau égale à 60% de la capacité de rétention en eau, puis ont été placés dans des flacons de verre étanches, en présence de 10 mL de NaOH à 0,5 M. Le CO₂ produit a été piégé par la soude qui a été renouvelée après 1, 3, 7, 14 et 28 jours d'essai. L'alcalinité résiduelle a été mesurée par un dosage en retour avec de l'acide chlorhydrique 0,1 M dans du chlorure de baryum en excès.

La minéralisation nette du carbone de chaque lisier a été calculée comme la différence entre la minéralisation du Témoin (sol seul) et celle du mélange sol + concentré de lisier, en considérant que la minéralisation du sol était identique avec ou sans ajout de lisier. La cinétique de minéralisation du carbone a été représentée sous forme cumulée, en g C-CO₂. 100 g⁻¹ carbone organique apporté par les lisiers.

2.2. FRACTIONNEMENT CHIMIQUE DU CUIVRE ET DU ZINC

Les principales stratégies de fractionnement chimique par extraction séquentielle permettant de caractériser la compartimentation des éléments métalliques dans les matrices solides ont été présentées en première partie de ce mémoire (p.55). Parmi elles, deux ont été développées pour des substrats organiques (Stover *et al.*, 1976 ; McGrath et Cegarra, 1992). L'extraction séquentielle du cuivre et du zinc a été réalisée ici selon le protocole développé par McGrath et Cegarra (1992), et

utilisé plus récemment par Canet *et al.* (1998) et Clemente *et al.* (2006). Cette méthodologie a été retenue pour deux raisons principales. D'une part, elle a été conçue pour des boues, essentiellement constituées de matière organique, tandis que la plupart des autres protocoles recensés dans la partie bibliographique du mémoire ont été développées pour des sols qui sont des matériaux composés à plus de 90% de minéraux, et riches en phases oxydées. D'autre part, elle n'utilise qu'un seul réactif neutre pour extraire la fraction échangeable, ce qui permet de limiter l'altération de la matière organique et des carbonates, et, ainsi, d'évaluer au mieux les quantités d'éléments traces métalliques liées à ces phases porteuses. En effet, Stover *et al.* (1976) ont montré que près de 20% du cuivre et du zinc liés aux carbonates pouvaient être extraits par le réactif de l'étape précédente de leur protocole d'extraction séquentielle, lorsque celui-ci est trop agressif.

A chaque étape, les réactifs ont été utilisés dans un rapport 10 :1 (volume : masse) par rapport à la masse initiale d'échantillon, et les extraits ont été obtenus par centrifugation des mélanges (20 minutes à 30 000g). Le protocole d'extraction utilisé reprend celui proposé par McGrath et Cegarra (1992) :

Etape 1 (formes en solution et échangeables) :

0,1 M CaCl₂ pendant 16 heures à température ambiante ;

Etape 2 (formes associées à la matière organique) :

0,5 M NaOH pendant 16 heures à température ambiante, puis minéralisation à l'eau régale de l'extrait ;

Etape 3 (formes associées aux carbonates) :

0,05 M Na₂EDTA pendant 6 heures à température ambiante, puis minéralisation à l'eau régale de l'extrait ;

Etape 4 (formes résiduelles) :

minéralisation à l'eau régale, 2 heures à ébullition.

Le protocole d'origine ne comprenait de minéralisation acide que pour les extraits des étapes 2 et 4. La minéralisation de l'extrait de la troisième étape constitue donc une légère modification par rapport à la méthodologie proposée par McGrath et Cegarra (1992). Cette digestion acide s'est avérée nécessaire du fait de la haute teneur en matière organique des produits analysés et de l'extrait obtenu ; seul l'extrait au CaCl₂ était limpide et a pu être analysé sans minéralisation acide préalable. Des pertes importantes de masse ont donc eu lieu au cours du protocole. Pour tenir compte de ces variations, les culots ont été pesés puis séchés entre chaque étape de façon à déterminer les masses exactes de solide et de réactif restant après chaque extraction. Les quantités de métal extraites à chaque étape ont ensuite été calculées comme l'ont décrit McGrath et Cegarra (1992) :

Etape 1 : $C_1 \times V_1$;

Etape 2 : $C_2 \times (V_2 + R_1) - C_1 \times R_1$;

Etape 3 : $C_3 \times (V_3 + R_2) - C_2 \times R_2$;

Etape 4 : $C_4 \times V_4 - C_3 \times R_3$

où C_n est la concentration de l'extrait de l'étape n , V_n le volume de centrat de l'étape n et R_n le volume d'extrait de l'étape n restant dans le culot humide. Les analyses des extraits ont été réalisées par ICP-OES.

2.3. PH ET MISE EN SOLUTION DU CUIVRE ET DU ZINC

L'effet du pH sur le passage en solution du cuivre et du zinc contenu dans les lisiers bruts et méthanisés a été évalué sur des échantillons de lisiers « entiers » n'ayant subi aucun traitement préalable, si ce n'est un stockage à -18°C . L'évaluation de la répartition du cuivre et du zinc entre les fractions dissoute et particulaire (séparées à $0,45\ \mu\text{m}$) a été effectuée sur une gamme de pH représentative de celle couramment rencontrée dans les sols :

- pH naturel des effluents, proche de la neutralité ;
- pH = 4.0 ajusté avec HNO_3 10 M, reflétant les conditions d'un sol acide sableux ;
- pH = 9.0 ajusté avec NaOH 10 M, correspondant à un sol basique calcaire.

Chacun des pH est étudié pour chaque effluent, soit 6 modalités expérimentales. Après l'ajout d'acide ou de base, les échantillons sont placés sous agitation à température ambiante pendant 24 heures. Puis, les pH sont mesurés et les échantillons filtrés sous vide à $0,45\ \mu\text{m}$. Pour la conservation et l'analyse, les filtrats sont acidifiés (HNO_3 70 %), tandis que les culots sont séchés en étuve à 40°C pendant 4 jours puis minéralisés avec un mélange 2,5 : 1 d'acide nitrique (HNO_3 70 %) et de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 30 %) chauffé à 90°C pendant 1h30. L'analyse est réalisée par ICP-MS. Un bilan de masse des éléments analysés est établi de façon à évaluer leur répartition entre les fractions dissoute et particulaire.

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. CARACTERISATION DE LA MATIERE ORGANIQUE DES LISIERS

3.1.1. Caractérisation fonctionnelle par spectroscopie infrarouge (FT-IR)

Les deux lisiers étudiés présentent des spectres FT-IR proches (Figure 25). Les principales caractéristiques de ces spectres sont les suivantes :

- Une bande large à environ $3400\ \text{cm}^{-1}$, attribuée à l'élongation des liaisons O-H (phénols, alcools et acides carboxyliques) et N-H (amines et amides I) ;
- Deux bandes fines comprises à environ $2930 - 2920\ \text{cm}^{-1}$ et $2860 - 2850\ \text{cm}^{-1}$ qui correspondent à l'élongation des liaisons C – H aliphatiques (acides gras et autres longues chaînes carbonées) ;
- Une bande large entre 1665 et $1635\ \text{cm}^{-1}$ due à l'élongation des liaisons C=O des amides (amide I), acides ou cétones, ainsi qu'à l'élongation des C=C aromatiques ;

- Une bande intense à environ 1570 cm^{-1} due à la déformation des liaisons N-H et à l'élongation des liaisons C=N (amide II) ;
- Un épaulement à environ 1460 cm^{-1} attribué à l'élongation des liaisons C-H (structures aliphatiques) ;
- Une bande d'intensité moyenne à environ 1420 cm^{-1} , caractéristiques de l'élongation des liaisons C-O (carbonates) ;
- Une bande de faible intensité à environ 1250 cm^{-1} attribuée à l'élongation des liaisons C-O, ou au déformations des liaisons C-N et O-H (groupes carboxyles, phénols et cycles aromatiques) ;
- Une bande constituée de 2 pics principaux entre 1120 cm^{-1} et 1040 cm^{-1} qui peut être due à la vibration des cycles (polysaccharides), ou à l'élongation symétrique et asymétrique des phosphodiesteres (contribution de la biomasse bactérienne) ;
- Une petite bande aiguë à 875 cm^{-1} due à la déformation angulaire hors du plan des liaisons C-O (carbonates).

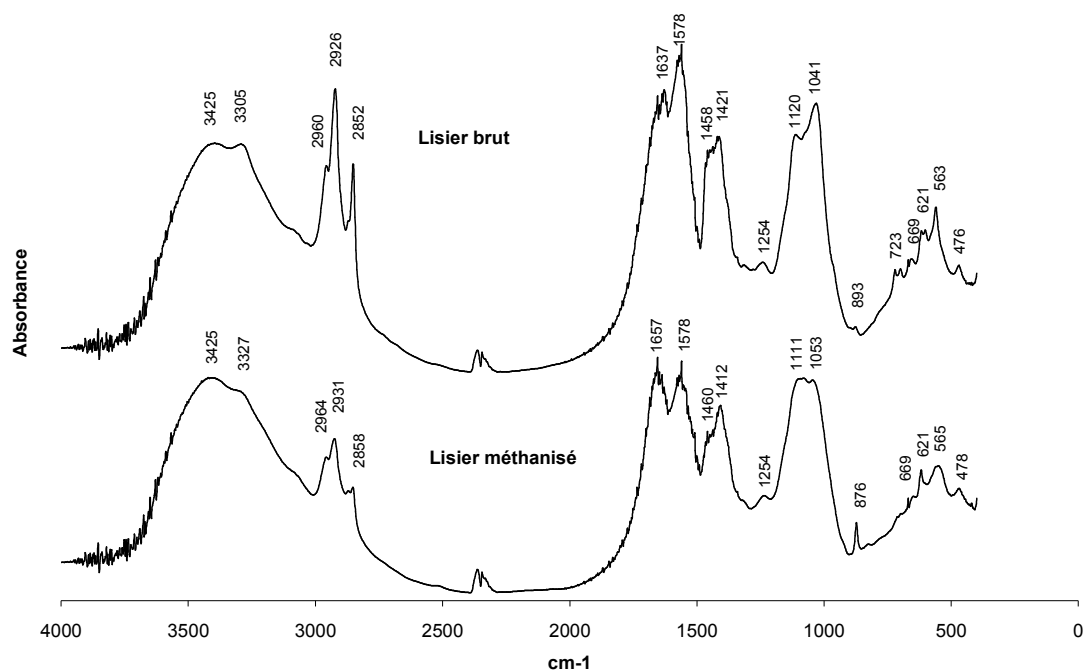


Figure 25 : Spectres FT-IR des lisiers brut et méthanisé

Les spectres du lisier brut et du lisier méthanisé révèlent donc d'importantes similitudes, mais il existe cependant des différences d'amplitude pour certains pics. Dans le lisier méthanisé, le spectre indique une diminution marquée des structures aliphatiques et des lipides (bandes entre 2930 et 2920 cm^{-1} , 2860 et 2850 cm^{-1} et bande à environ 1460 cm^{-1}), mais également des polysaccharides (1040 cm^{-1}). Ces diminutions traduisent la conversion du carbone organique de molécules biodégradables en biogaz (CH_4 et CO_2) lors du traitement par digestion anaérobie. Le devenir des amides est moins

évident : certaines bandes indiquent plutôt une diminution suite au traitement par méthanisation (bandes à environ 3330 cm^{-1} et 1570 cm^{-1}) alors que d'autres indiquent plutôt une augmentation (bande entre 1665 et 1635 cm^{-1}). Par ailleurs, le spectre du lisier méthanisé révèle une augmentation d'intensité du pic associé aux carbonates (875 cm^{-1}), ce qui est en accord avec la dissolution partielle du CO_2 dans le milieu de fermentation sous forme de CO_3^{2-} (Callender et Barford, 1983).

3.1.2. CBM et détermination de l'ISB

Le fractionnement des fibres selon la méthode proposée par Linères et Djakovitch (1993) révèle à nouveau des profils assez proches pour le lisier méthanisé et le lisier brut, les différences étant cependant significatives pour chacune des fractions. Pour ces deux lisiers, la fraction soluble (SOL) est majoritaire tandis que la cellulose (CEW) et la lignine (LIC) sont quasi inexistantes (Figure 26). La fraction SOL représente plus de 90% de la matière sèche du lisier brut, et cette proportion diminue significativement après méthanisation pour représenter environ 83% dans le lisier méthanisé. Cette réduction traduit la transformation des molécules les plus facilement dégradables en biogaz lors du traitement des lisiers. Cette observation est ainsi en accord avec les résultats de spectroscopie infrarouge présentés précédemment. La dégradation de composés tels que les protéines ou les lipides conduit à un enrichissement relatif de la matière sèche en composés réfractaires à la dégradation anaérobie comme la lignine par exemple. En couplant ce fractionnement au bilan de masse de l'unité de méthanisation (p.84), il apparaît que seule la fraction SOL est modifiée significativement par le traitement. Ces résultats confirment que les fractions les plus résistantes (LIC, HEMI, CEW) ne sont pas ou peu dégradées en conditions anaérobies.

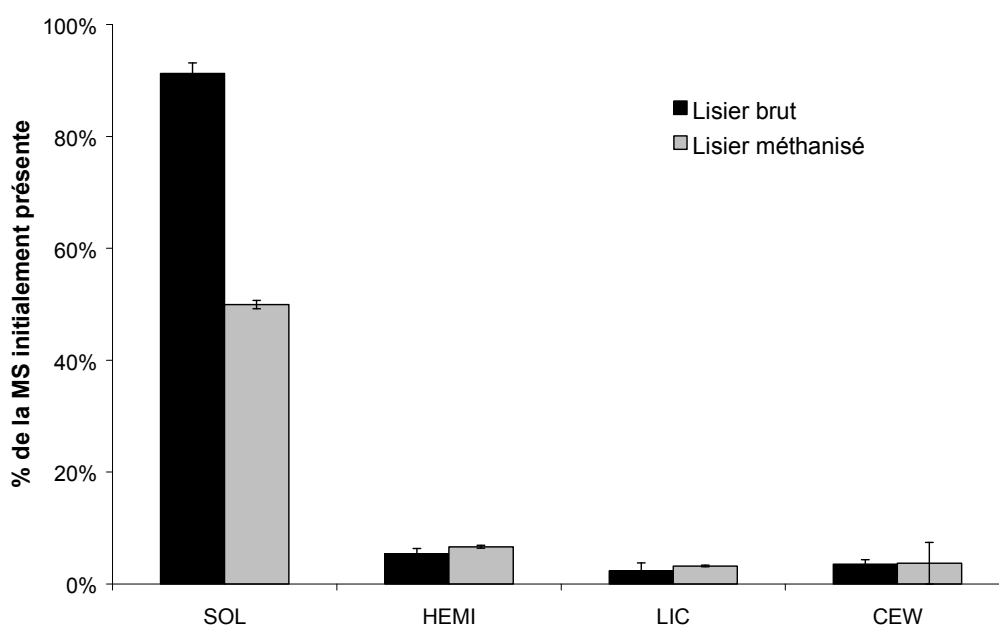


Figure 26 : CBM des lisiers brut et méthanisé

En utilisant la formule proposée par Linères et Djakovitch (1993 - voir p.101), les valeurs d'ISB calculées à partir de ces fractionnements sont 0,09 pour le lisier brut et 0,10 pour le lisier méthanisé. Cet indice ne permet pas de discriminer correctement le lisier brut et le lisier méthanisé. L'ISB, qui a été développé pour caractériser et classer des amendements organiques selon leur niveau de dégradabilité se révèle donc peu adapté pour des produits tels que les lisiers. En revanche, la CBM a permis de mettre en évidence une stabilisation du lisier suite à son traitement par digestion anaérobie, venant confirmer les résultats de spectroscopie infrarouge. Ces observations confirment également les travaux de Morvan *et al.* (2006) qui ont utilisé le seul fractionnement biochimique pour prédire les taux de minéralisation du carbone et de l'azote de différents sous-produits d'élevages (lisiers, litières et fumiers). Elles confirment enfin les résultats de Marcato *et al.* (2007) montrant que ce sont les particules de diamètre compris entre 1 et 60 µm qui sont le plus dégradées pendant la méthanisation (p.85).

L'analyse du cuivre et du zinc dans les différents extraits obtenus séquentiellement est en accord avec la répartition de la masse sèche présentée précédemment : l'essentiel des éléments est retrouvé dans la fraction SOL (Tableau 13). Toutefois, la méthanisation conduit à enrichir en Cu et en Zn cette phase dite « soluble » au détriment de la fraction peu dégradable. Ceci est difficilement justifiable, et nous pouvons seulement émettre des hypothèses. La méthanisation conduit à une production de biomasse microbienne ; or, les parois cellulaires des bactéries ont une forte affinité avec Cu et Zn du fait de la présence de fonctions acides, mais également des groupements phosphates ou sulfates (Artola *et al.*, 2000). Il est donc envisageable que les équilibres physico-chimiques dans le digesteur favorisent les liaisons « métaux-biomasse » ; la biosorption d'éléments métalliques par des boues digérées est d'ailleurs étudiée comme technique de dépollution. Artola *et al.* (2000) ont montré qu'une boue digérée peut fixer jusqu'à 1,4 mmol de Cu et 0,6 mmol de Zn par gramme de solide, soit des quantités 100 fois supérieures à celles présentes dans nos lisiers. Or, la biomasse est mise en solution par le 1^{er} réactif du fractionnement biochimique, et elle est ainsi comptabilisée dans la fraction SOL, ce qui expliquerait l'augmentation du cuivre et du zinc dans cette fraction après méthanisation. Une autre hypothèse est que les équilibres chimiques dans le méthaniseur favorisent la formation de précipités (sulfures, phosphates ou carbonates), qui seront également entraînés lors de l'exposition au réactif NDF et seront également pris en compte dans la fraction « soluble ».

Tableau 13 : Répartition du cuivre et du zinc dans les différentes fractions biochimiques

| | SOL | HEMI | LIC |
|----------------------|---------------|---------------|---------------|
| Matière sèche | | | |
| Lisier brut | 91,2 ± 1,9 | 5,4 ± 1,0 | 2,3 ± 1,4 |
| Lisier méthanisé | 82,6 ± 1,2 | 11,0 ± 0,5 | 5,3 ± 0,3 |
| Cu | | | |
| Lisier brut | 77,9% ± 8,5% | 0,0% ± 0,0% | 22,1% ± 10,1% |
| Lisier méthanisé | 97,6% ± 15,3% | 0,0% ± 0,0% | 2,4% ± 3,4% |
| Zn | | | |
| Lisier brut | 78,6% ± 5,6% | 13,1% ± 14,0% | 8,3% ± 0,8% |
| Lisier méthanisé | 100,0% ± 4,1% | 0,0% ± 0,0% | 0,0% ± 0,0% |

3.1.3. Analyse élémentaire

La CBM des concentrés de lisier ne permettant pas de discriminer correctement les deux lisiers, nous avons appliqué la méthode dite « des groupements atomiques fictifs » développée par Tardy *et al.* (2000) Cette méthode permet en effet d'évaluer aisément le degré d'hydratation et d'oxydation du carbone dans un produit de formule $C_tH_uO_v$.

Dans un premier temps, une analyse élémentaire des concentrés de lisier a été réalisée (Tableau 14). Cette analyse montre une diminution des éléments constituant la matière organique dont la proportion dans la matière sèche totale diminue d'environ 12%, en accord avec le bilan de masse réalisé sur les lisiers en entrée et sortie du digesteur (p.83). La diminution des quantités de C et de H est en accord avec la production d'un biogaz contenant majoritairement du CH_4 (63% environ). Les quantités de N sont également réduites après méthanisation : cet élément est conservé au cours du traitement, mais il est minéralisé pour partie sous forme ammoniacale, en solution. Or la fraction soluble a été séparée par centrifugation pour obtenir les concentrés de lisiers.

Tableau 14 : Analyse élémentaire des concentrés de lisier (% MS)

| | Lisier brut | Lisier méthanisé |
|-------|--------------|------------------|
| N | 4,45 ± 0,35 | 3,46 ± 0,07 |
| C | 41,93 ± 0,64 | 30,75 ± 0,16 |
| H | 6,02 ± 0,09 | 4,23 ± 0,06 |
| S | 0,07 ± 0,11 | 0,00 ± 0,00 |
| O | 19,88 ± 0,23 | 25,45 ± 0,20 |
| Total | 72,35 ± 1,07 | 63,90 ± 0,18 |
| C/N | 9,46 ± 0,61 | 8,89 ± 0,22 |

Le C/N obtenu pour chacun des concentrés est faible (< 10) ; d'après Mustin (1987), ces valeurs sont du même ordre de grandeur que le C/N d'un compost fini (entre 8 et 15).

A partir des analyses élémentaires, les groupements atomiques fictifs ont été calculés (Tableau 15).

Tableau 15 : Groupements atomiques fictifs (moles) calculés à partir de l'analyse élémentaire

| | Lisier brut | Lisier méthanisé |
|------------------------------------|-------------|------------------|
| CH ₂ O | 3,910 | 6,433 |
| CO | 0,000 | 0,000 |
| CH ₂ | 4,557 | 1,119 |
| C | 2,528 | 2,812 |
| CH ₂ O / C _t | 0,356 | 0,621 |
| CO / C _t | 0,000 | 0,000 |
| CH ₂ / C _t | 0,414 | 0,108 |
| C / C _t | 0,230 | 0,271 |
| Degré oxydation | -0,829 | -0,216 |
| Degré de polymérisation | 0,647 | 0,437 |

L'absence du groupement CO dans chacun des concentrés traduit un état réduit de la matière organique. Les deux produits sont en effets issus de milieux anaérobies : le tractus digestif de l'animal dans le cas du lisier brut, et le digesteur dans le cas du lisier méthanisé. Le calcul du degré d'oxydation confirme l'état réduit des concentrés. Cependant, il apparaît que le concentré de lisier brut est plus réduit que celui de lisier méthanisé, ce qui peut sembler étonnant par rapport aux milieux desquels proviennent les concentrés. L'anaérobiose est en effet plus importante dans le digesteur où le potentiel d'oxydoréduction est inférieur à -300 mV. Cependant, du fait de la conversion des molécules les plus dégradables en biogaz (contenant 63% de CH_4), le degré d'oxydation du carbone se trouve augmenté (Tableau 15) puisque les fractions de carbone les plus réduites sont extraites du lisier par production de méthane. Ces résultats corroborent ceux obtenus lors de la CBM (p.107) qui ont montré une augmentation relative des fractions « lignine » et « hémicellulose » après méthanisation. Il semblerait donc logique que le degré de polymérisation augmente également, et ce d'autant que l'analyse granulométrique a montré un déplacement du profil vers les particules de plus grand diamètre (p.85). Ce n'est pas le cas. En effet, si l'on regarde la distribution granulométrique en fonction du nombre de particules par classe granulométrique plutôt qu'en fonction du volume qu'elles occupent, ou la surface spécifique qu'elles représentent, il apparaît que les particules de diamètre inférieur ou égal à $3 \mu\text{m}$ représentent 99,7% des particules présentes dans le lisier brut, et 99,9% de celles présentes dans le lisier méthanisé. De plus, les particules strictement inférieures à $0,1 \mu\text{m}$ représentent 50% et 69,6% des particules totales pour le lisier brut et le lisier méthanisé respectivement. Ainsi, l'hydrolyse des macromolécules et composés plus simples et la conversion des molécules les plus biodégradables en biogaz se traduisent par une diminution du degré de polymérisation. Enfin, la diminution marquée du groupement CH_2 semble en accord avec les profils obtenus par spectroscopie infrarouge indiquant une diminution des liaisons C-H des groupements aliphatiques.

Ces groupements atomiques fictifs ont permis de calculer la répartition des groupes fonctionnels dans les concentrés de lisier (Tableau 16). Cette analyse indique que le poids moléculaire moyen des composés carbonés diminue lors de la méthanisation, ce qui va toujours dans le sens de la dépolymérisation des molécules du fait de l'activité biologique dans le digesteur. De plus, cette approche montre une augmentation de l'acidité totale du concentré de lisier qui pourra se traduire par une augmentation de la capacité d'échange cationique de cette matière organique.

Tableau 16 : Groupes fonctionnels et poids moléculaires des concentrés de lisiers estimés par approche thermodynamique

| | Lisier brut | Lisier méthanisé |
|---|-------------|------------------|
| Degré de dépolymérisation | 0,356 | 0,621 |
| Acidité totale ($\text{meq.g}^{-1} \text{C}$) | 4,7 | 7,1 |
| Acidité carboxylique ($\text{meq.g}^{-1} \text{C}$) | 1,8 | 4,0 |
| Acidité alcoolique ($\text{meq.g}^{-1} \text{C}$) | 1,3 | 2,9 |
| Poids moléculaire ($\text{g.mol}^{-1} \text{C}$) | 6,2 | 4,9 |

3.1.4. Minéralisation du carbone en sol

L'essai de minéralisation du carbone en sol est en accord avec la stabilisation de la matière organique du fait du traitement par digestion anaérobie décrite dans les paragraphes précédents.

La quantité de CO₂ produite en 49 jours a été significativement augmentée après apport de lisier brut ou de lisier méthanisé par rapport au témoin (sol seul) : l'application de lisier brut a conduit à la production de 18,7 g C-CO₂.100 g⁻¹ C_{org} pour 13,2 g C-CO₂. 100 g⁻¹ C_{org} dans le cas du lisier méthanisé. La valeur de référence du sol seul s'élevait quant à elle seulement à 3,6 g C-CO₂. 100 g⁻¹ C_{org} (Figure 27). De plus, la minéralisation du carbone apporté par le lisier brut est significativement plus élevée que celle du carbone apporté par le lisier méthanisé (p < 0,05 dans le test de Student).

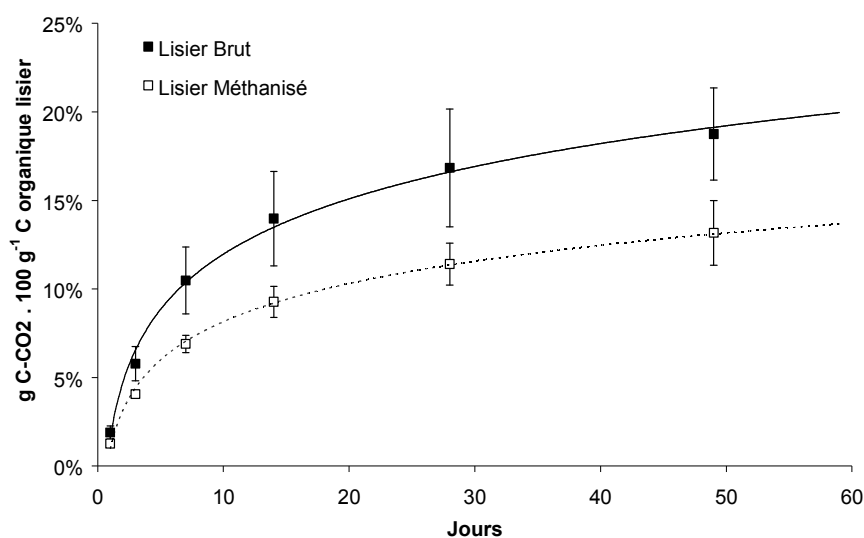


Figure 27 : Cinétique de minéralisation du carbone des lisier brut et méthanisé

Après apport de lisiers, les vitesses de minéralisation ont été significativement différentes de celle du témoin, et ce du début à la fin de l'essai ; cependant, après 49 jours, les cinétiques tendent vers une même pente, indiquant un rapprochement des comportements des 3 modalités. Les vitesses maximales de dégradation ont été obtenues lors du 1^{er} jour d'essai, et les cinétiques de dégradation sont décrites par une fonction de premier ordre. Ces résultats sont en accord avec ceux présentés par Clemente *et al.* (2006), Morvan *et al.* (2006) et Parnaudeau *et al.* (2004) ; tous ont établi une relation entre la cinétique de minéralisation du carbone et la stabilité des différents déchets organiques.

On peut souligner que les résultats obtenus sur le lisier brut ont une plus forte variabilité que sur le lisier méthanisé puisque les écart-types sont 4 fois plus élevés pour le concentré de lisier brut que pour celui de lisier méthanisé. Finalement, les doses de lisiers épandus étant calculées selon les teneurs en azote (Tableau 9), la quantité de carbone organique enfoui avec le lisier brut est 1,5 fois supérieure à celle apportée par le lisier méthanisé. Malgré cela, la proportion de carbone des lisiers qui se minéralise dans le sol est supérieure de près de 50% pour le lisier brut. Ainsi, pour une même quantité de lisier épandu, la masse nette de CO₂ dégagé dans le sol est trois fois plus forte lorsque le lisier n'a pas subi de méthanisation préalable. Ce fort dégagement de CO₂ pourra avoir différents

effets sur la physiologie des végétaux qui seront cultivés dans ces conditions : l'apparition de conditions anoxiques qui vont être défavorables au bon développement des plantes (Guirese *et al.*, 1995), ou l'apparition d'une acidification de la rhizosphère, en particulier pour les sols calcaires (Hinsinger *et al.*, 2003).

Cet essai de minéralisation en sol du carbone apporté par des lisiers montre donc que le traitement par méthanisation homogénéise et stabilise la matière organique des lisiers.

3.2. FRACTIONNEMENT CHIMIQUE DU CUIVRE ET DU ZINC

Le protocole retenu a permis une bonne extraction du cuivre et du zinc dans la mesure où la somme des quantités extraites dans chaque fraction correspond aux quantités totales obtenues par minéralisation acide à l'eau régale : entre 82 et 87% pour le cuivre et entre 96 et 114% pour le Zn.

Le cuivre et le zinc présentent des profils différents, avec des modifications significatives entre les lisiers brut et méthanisé (Figure 28). Les formes échangeables extraites au CaCl_2 représentent la fraction la moins importante, si bien que le zinc n'a pas pu y être détecté (concentrations inférieures au seuil de détection). Le cuivre se trouve essentiellement associé à la matière organique tandis que le zinc est principalement associé aux carbonates, et ce quel que soit le lisier considéré.

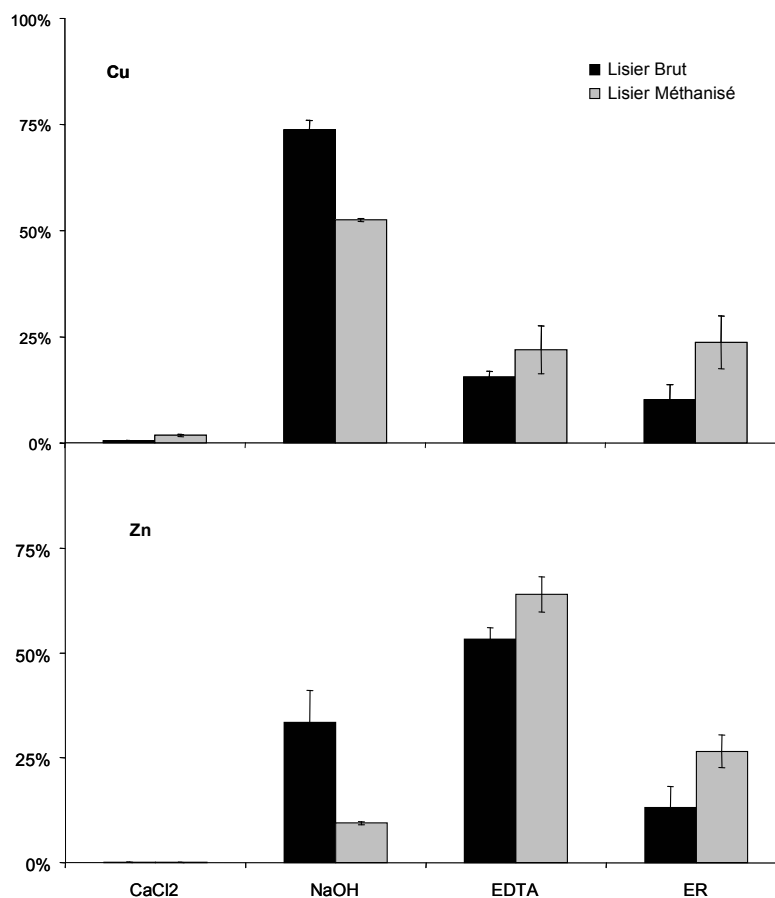


Figure 28 : Répartition du cuivre et du zinc dans les différentes fractions

Les formes échangeables de cuivre représentaient moins de 2% des quantités totales, mais cette fraction est légèrement plus importante dans le lisier méthanisé que dans le lisier brut. Cette légère augmentation du fait de la méthanisation peut être mise en relation avec l'augmentation de l'acidité totale qui a été décrite en p.110 et une augmentation associée de la capacité d'échange cationique de la matière organique. En revanche, 75% du cuivre a été extrait par la soude pour le lisier brut. Ces formes, associées à la matière organique ont été significativement diminuées après méthanisation, et ne représentaient plus que 50% du cuivre présent dans le lisier méthanisé. En parallèle, le cuivre a été extrait en plus grande quantité par l'EDTA, tandis que les formes résiduelles doubleraient, atteignant près de 25% de l'élément total. La diminution des formes associées à la matière organique suite au traitement par méthanisation a également été observée pour le zinc dans la mesure où la proportion de Zn extrait par la soude a été divisée par 3. Le lisier méthanisé a présenté en revanche des augmentations significatives des fractions de zinc associé aux carbonates et de zinc résiduel qui passent respectivement de 53 et 14% à 64 et 27%.

L'importance de la fraction extraite à la soude permet d'apporter un élément de compréhension par rapport aux efficacités de séparation du cuivre et du zinc par centrifugation, lors de la préparation des concentrés de lisiers (p.95). En effet, cette efficacité de séparation est inversement proportionnelle au taux d'extraction des métaux à la soude (Figure 29) : cela signifie que plus le cuivre et le zinc seront associés à la matière organique, plus ils seront difficiles à bien séparer par centrifugation.

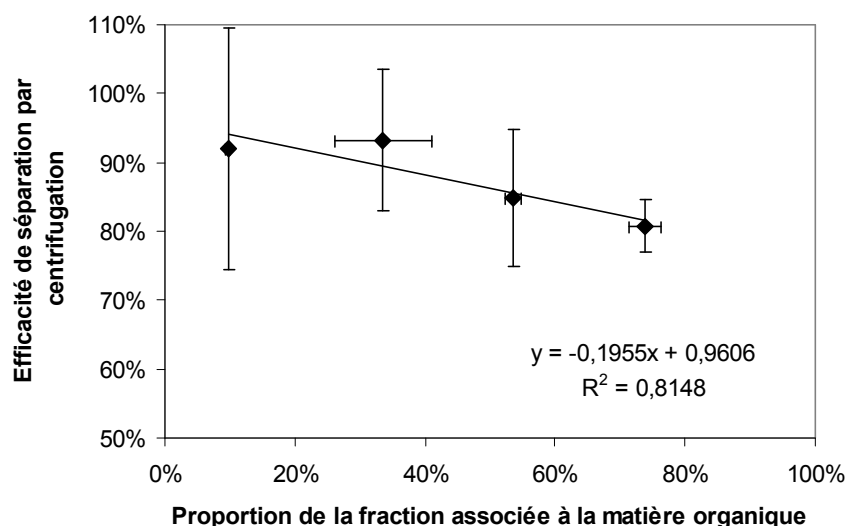


Figure 29 : Efficacité de séparation du cuivre et du zinc par centrifugation des lisiers en fonction de la proportion d'élément extrait à la soude dans l'extraction séquentielle

Les modifications de la répartition du cuivre et du zinc induites par la méthanisation sont toujours significatives, à l'exception de la fraction de cuivre associée aux carbonates. Au cours de la méthanisation, le cuivre et le zinc initialement associés à la matière organique sont déplacés vers des

formes plus stables. La fraction résiduelle augmentant, la mobilité des métaux devrait donc être réduite après méthanisation ; cependant, cette fraction ne représente que le quart des éléments totaux. De plus, la fraction des carbonates augmentant, les métaux passent vers des formes acido-solubles et deviennent ainsi plus sensibles à des variations de pH. Enfin, l'extrait au CaCl_2 , utilisé pour quantifier la fraction d'élément biodisponible pour les végétaux (p.55), était négligeable et ne représentait qu'environ 2% du cuivre et 1% du zinc.

Ces résultats sont en accord avec ceux présentés par Lake *et al.* (1985) qui ont appliqué le protocole proposé par Stover *et al.* (1976), présenté en p.55. Dans des boues non traitées, le cuivre était essentiellement présent sous des formes associées aux carbonates ou résiduelles. Après digestion anaérobie, cette dernière fraction était deux fois plus importante. Le zinc était quant à lui principalement associé à la matière organique (80% du métal extrait au pyrophosphate) avant et après traitement. Cependant, Stover *et al.* (1976) ont montré que le pyrophosphate pouvait extraire 18% du zinc et 19% du cuivre associés aux carbonates, ce qui a pu masquer partiellement le transfert de ces éléments vers la fraction acido-soluble.

En revanche, nos résultats sont en contradiction avec ceux obtenus sur des boues digérées et des boues de lagune par les auteurs de la méthode (McGrath et Cegarra, 1992). Dans leur étude, le cuivre a été principalement extrait dans la fraction résiduelle, et environ 30% était associé à la matière organique, tandis que le zinc était également réparti dans les fractions extraites à la soude, à l'EDTA ou à l'eau régale. Walter *et al.* (2006) ont appliqué la méthode BCR (Quevauvillier *et al.*, 1997) sur le même type de produits, et on trouve le zinc principalement associé à la matière organique et aux oxydes. Ce même protocole appliqué à des boues stabilisées ou non a montré une répartition semblable du zinc dans les produits frais, avec une augmentation de la part associée à la matière organique après traitement par digestion anaérobie ou compostage (Alonso Alvarez *et al.*, 2002). Dans cette étude, le cuivre demeurait associé principalement à la matière organique. A noter que dans ce schéma, l'extraction des oxydes est réalisée à pH acide et peut donc entraîner un passage en solution des carbonates. Des extractions réalisées par Wong *et al.* (2001) selon le protocole de Tessier ont montré que le cuivre était essentiellement associé à la matière organique, ou présent dans la fraction résiduelle, tandis que le zinc était réparti entre 4 fractions : carbonates, oxydes, matière organique et formes résiduelles. Enfin, l'application du protocole de Sposito *et al.* (1982) sur des composts a montré une affinité particulière du cuivre et du zinc pour la matière organique et les carbonates (Amir *et al.*, 2005).

Ainsi, plusieurs études utilisant différents schémas d'extraction séquentielle pour la caractérisation de boues de station d'épuration ont montré que le cuivre y est essentiellement associé à la matière organique ou aux formes résiduelles, tandis que le zinc est moins spécifiquement extrait et peut être associé en même proportion à la matière organique et aux carbonates.

3.3. PH ET MISE EN SOLUTION DU CUIVRE ET DU ZINC

Le lisier méthanisé présente un pouvoir tampon important du fait de la formation de NH_4HCO_3 qui va permettre un maintien du pH à des valeurs voisines de 8 (p.37). Ainsi, afin de tenir compte de ce pouvoir tampon, nous avons préféré réaliser l'essai de mise en solution du cuivre et du zinc sur les lisiers plutôt que sur les concentrés, pour lesquels la fraction liquide a été écartée, éliminant de fait l'essentiel des ions NH_4^+ et HCO_3^- .

L'essai de mise en solution a montré des analogies de comportement entre le lisier brut et le lisier méthanisé. En effet, pour les 2 effluents, à pH naturel (c'est-à-dire sans ajustement, soit 6,5 pour le lisier brut et 7,9 pour le lisier méthanisé) et après filtration à $0,45 \mu\text{m}$, les espèces métalliques analysées se concentrent majoritairement dans la fraction particulaire (Figure 30). Par ailleurs, le lisier méthanisé contient des quantités importantes de bicarbonates (environ 15 g.L^{-1} d'après un dosage réalisé selon la méthode proposée par Anderson et Yang, 1992) qui lui confèrent un pouvoir tampon élevé (p.37). Ainsi lors de l'ajustement du pH au moyen d'HCl, le pH cible de 4,0 n'a pas pu être atteint, et l'acidification du lisier a été poussée jusqu'à une valeur de 2,7 du fait d'un saut de pH après que la capacité tampon du lisier ait été épuisée.

Sur la gamme de pH étudiée, le cuivre demeure toujours dans la fraction particulaire qui concentre au moins 98% de l'élément, et ce quel que soit le lisier considéré. Ces résultats sont en accord avec ceux présentés par Wang *et al.* (1999) qui ont étudié l'effet du pH sur l'adsorption du cuivre par des boues de station d'épuration sur une gamme de pH allant de 2 à 11. Le cuivre se trouvait dans la fraction particulaire pour les pH compris entre 2 et 10, et un passage en solution était observé pour des pH très alcalins. A noter cependant que si le pH ne permet pas un passage en solution du cuivre, il peut toutefois jouer sur sa biodisponibilité. Chaignon *et al.* (2003) ont en effet montré que pour des sols de vignobles acides, les quantités de cuivre extraites à l'EDTA étaient corrélées au pH du sol ($r^2 = -0,74$).

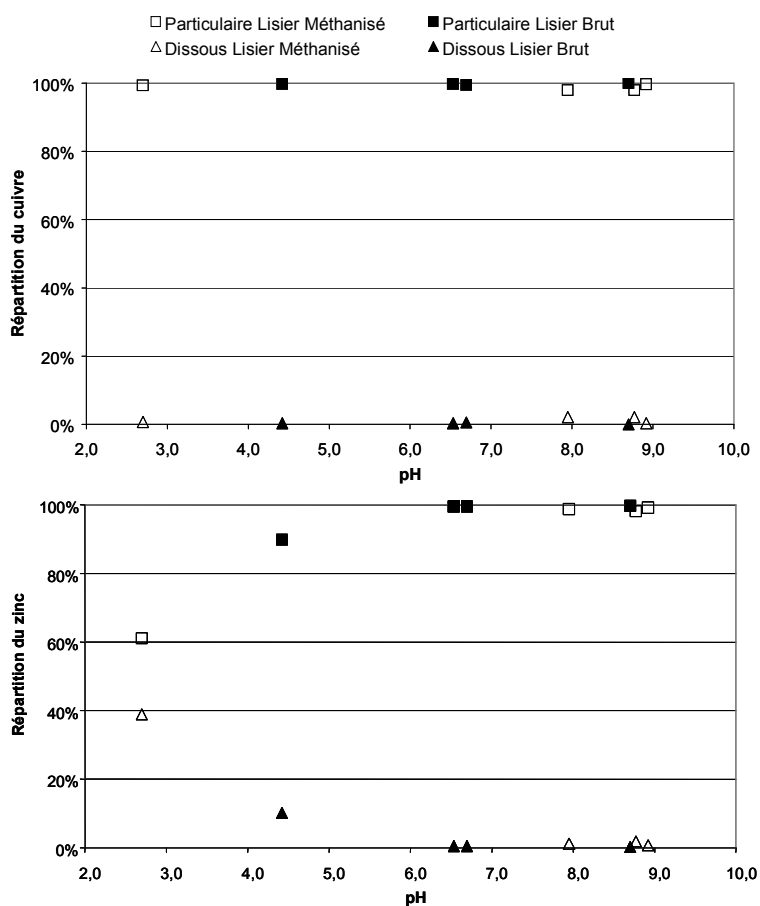


Figure 30 : Mise en solution du cuivre et du zinc des lisiers en fonction du pH

En revanche, pour le zinc, il existe une évolution de cette répartition en fonction du pH. La Figure 30 montre que pour les pH supérieurs à 6,5, le zinc est quasi exclusivement présent dans la fraction particulaire (plus de 98% du métal) tandis que pour les pH plus acides, il existe un passage en solution du zinc jusqu'à atteindre une valeur de 38,9% dans la fraction dissoute pour un pH de 2,7. Ces résultats sont en accord avec la littérature où le zinc est présenté comme l'un des éléments étant les plus sensibles à l'acidité (Alloway, 1995 ; Artola *et al.*, 2000). Ici encore, il n'existe pas de différence de comportement entre lisier brut et lisier méthanisé comme l'ont trouvé par ailleurs Artola et Rigola (1992) qui ont montré une relation unique entre la biosorption du zinc et le pH pour différentes boues d'épuration (aérobies, anaérobies, épaissies, déshydratées...).

Finalement la plus forte sensibilité du zinc vis-à-vis du pH confirme les résultats du fractionnement chimique (p.112) qui ont montré la prédominance des formes carbonatées du zinc contrairement au cuivre qui est majoritairement associé à la matière organique et qui se trouve donc moins sensible aux variations de pH du milieu. De même, Artola *et al.* (2000) ont montré que le zinc adsorbé à la biomasse est rapidement et totalement désorbé à pH acide.

4. DISCUSSION

Dans un premier temps, différentes techniques ont montré la stabilisation de la matière organique des lisiers de porcs après que ceux-ci aient été traités par digestion anaérobie. La dégradation de composés facilement biodégradables (protéines, lipides,...) par la flore bactérienne du digesteur anaérobie a été observée lors de l'analyse par spectroscopie infrarouge, avec une réduction relative de fonctions associées aux structures aliphatiques (C-H), aux protéines (N-H, C=N) ou encore aux polysaccharides (C dans un cycle). La conversion de ces composés en biogaz s'est traduite par une diminution du poids moléculaire estimé d'après la méthode des groupements fictifs, et s'est accompagnée d'un enrichissement relatif en composés plus stables, tels que la lignine ou les hémicelluloses, qui a été observé grâce au fractionnement biochimique des lisiers (CBM).

Différents auteurs ont pu montrer une relation entre la minéralisation du carbone et les teneurs en lignine des produits étudiés (Bernal *et al.*, 1998 ; Parnaudeau *et al.*, 2004 ; Morvan *et al.*, 2006). Ici une approche statistique globale ne peut pas être mise en place du fait du faible nombre de produits analysés, mais le pourcentage de carbone organique minéralisé en 49 jours est effectivement moindre (-29%) pour le lisier méthanisé par rapport au lisier brut alors que la proportion en lignine est doublée lors du traitement.

Une seconde approche, chimique, a permis de montrer une diminution de la part du cuivre et du zinc associée à la matière organique, et une augmentation de formes associées aux carbonates et des formes résiduelles. Ces résultats sont en accord avec l'analyse infrarouge des lisiers qui a montré une augmentation des carbonates (pic à 875 cm^{-1}), ainsi qu'avec la dissolution partielle du CO_2 du biogaz dans milieu de fermentation liquide sous la forme CO_3^{2-} comme l'ont montré Callender et Barford (1983). D'après ces auteurs, la concentration en CO_3^{2-} peut être estimée à partir de la teneur en CO_2 du biogaz et du pH. Dans les conditions de notre étude, les carbonates représenteraient ainsi 2.10^{-3} M , soit environ $7500\text{ mg.kg}^{-1}\text{ MS}$; cette valeur est cohérente avec les augmentations des quantités de cuivre et de zinc extraites dans la fraction EDTA. Les formes associées aux carbonates supplémentaires ne représenteraient en effet que 0,8% (Cu) et 3,5% (Zn) des carbonates totaux générés lors du traitement.

De plus, l'étude de l'effet du pH sur le passage en solution n'a pas montré de modification de la répartition du cuivre qui est toujours lié à la fraction particulaire, tandis que le zinc a été plus sensible au pH, avec un passage en solution observé pour des valeurs inférieures à 6 : la fraction soluble représente près de 40% des quantités totales de l'élément à pH 2,7. Une extraction séquentielle réalisée sur une gamme de pH permettrait de compléter cette approche et de mieux évaluer la phytodisponibilité du cuivre et du zinc pour chacun des lisiers.

CHAPITRE III : EVALUATION DE LA PHYTODISPONIBILITE DU CU ET DU ZN APPORTES AU SOL PAR EPANDAGE DE LISIERS BRUT OU METHANISE

1. INTRODUCTION

Si le retour aux sols de sous-produits organiques constitue un débouché intéressant pour le recyclage des éléments nutritifs, il doit se faire dans de bonnes conditions d'innocuité. La maîtrise des flux de micro-polluants qu'ils contiennent constitue un souci majeur ce pourquoi la réglementation est de plus en plus sévère sur ce point. Concernant les épandages de boues résiduelles, les flux des éléments traces métalliques et de micro-polluants organiques sont réglementés par l'arrêté du 8 janvier 1998 (p.22). L'établissement de réglementations et de normes devant être soutenu par des résultats expérimentaux, des recherches ont été menées pour évaluer les changements de phytodisponibilité des ETM apportés au sol par épandage de boues (Planquart *et al.*, 1999 ; Gavalda *et al.*, 2005), de fumiers ou de lisiers porcins (Jarausch-Wehrheim *et al.*, 1996 ; Bolan *et al.*, 2003) du fait de leurs concentrations importantes en cuivre et en zinc (p.18). La digestion anaérobie est largement utilisée pour la réduction du volume et des odeurs des boues de station d'épuration, ce pourquoi parmi les travaux précédemment cités, certains ont été réalisés avec des boues digérées (Jarausch-Wehrheim *et al.*, 1996 ; Su et Wong, 2003). Cependant, dans la littérature, il existe peu, voire pas, de travaux comparant la phytodisponibilité d'un même produit organique avant et après traitement par digestion anaérobie.

L'objectif de cette partie est donc d'apporter des éléments nouveaux concernant la phytodisponibilité à moyen et long terme du cuivre et du zinc apportés au sol par épandage de lisiers porcins brut ou méthanisé. Cette partie expérimentale devait permettre de répondre à plusieurs questions. Tout d'abord, il s'agissait de vérifier si Cu et Zn apportés par des épandages de lisier répétés sur 20 ou 100 ans sont significativement absorbés par les végétaux cultivés, dans quelle proportion, et comment les conditions pédologiques, et en particulier le pH des sols, influent sur ce transfert. Nous voulions ensuite vérifier si une plante monocotylédone et une dicotylédone ont la même aptitude vis-à-vis de ce transfert et comment les métaux sont mobilisés au sein des végétaux depuis les racines vers les parties aériennes. Enfin, ces essais devaient apporter des précisions quant à l'impact de la méthanisation sur la mobilité de Cu et Zn dans le sol et sur leur phytodisponibilité.

Pour répondre à ces différents points, deux essais indépendants ont été mis en place en conditions contrôlées (pots en phytotron), en simulant les apports par épandage à partir des concentrés de lisier (voir p.94) :

- Les effets à moyen terme ont été évalués sur une culture de dicotylédone, la fève (*Vicia faba*) recevant des apports équivalents à une vingtaine d'années d'épandage ;

- Les effets à long terme ont été évalués sur une culture de monocotylédone, le maïs (*Zea mays*) recevant des apports équivalents à une centaine d'années d'épandage.

2. MATERIELS ET METHODES

2.1. PREPARATION DES SUPPORTS DE CULTURE

Le sol utilisé dans les essais est le sol d'alluvions récentes présenté en p.96. Utilisé lors de travaux précédents, il avait présenté d'excellentes propriétés physiques pour des suivis de minéralisation de boues (Piboul, 1992). Malheureusement, les alluvions récentes sont très hétérogènes et les sols prélevés dans la même parcelle pour nos travaux se sont révélés 2 fois plus argileux que ceux utilisés par Piboul (1992).

Les concentrés de lisier (voir la description de leur préparation en p. 94) ont été mélangés à 500g de sol (Tableau 17) sur la base d'un épandage de $60 \text{ m}^3 \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{an}^{-1}$, d'après la composition des effluents présentés au chapitre I de cette partie (Tableau 9, p.93). Pour l'essai d'évaluation à long terme, les apports de matière organique étaient très importants et conduisaient à doubler (dans le cas du lisier méthanisé) et tripler (dans le cas du lisier brut) la teneur en matière organique du sol (Tableau 17). Les pots ont donc été placés en incubation préalable dans les conditions décrites en p.103 (28°C, obscurité) pendant 50 jours de façon à minéraliser cette matière instable. Dans le cas de l'essai d'évaluation des effets à moyen terme, le flux de matière organique rajouté ne représentait qu'au maximum 40% de la MO initiale du sol ; la phase de minéralisation préliminaire ne nous a pas parue indispensable et n'a donc pas été effectuée.

Pour chaque essai, 3 modalités ont été mises en place, avec 5 répétitions par modalité : Témoin (T = sol seul), Lisier brut (LB = sol + concentré de lisier brut), Lisier méthanisé (LM = sol + concentré de lisier méthanisé).

Tableau 17 : Composition des supports de culture dans les essais d'évaluation de la phytodisponibilité

| | Long terme / Maïs | | | Moyen terme / Fève | | |
|------------------------------------|-------------------|-------------|------------------|--------------------|-------------|------------------|
| | Témoin | Lisier brut | Lisier méthanisé | Témoin | Lisier brut | Lisier méthanisé |
| pH à la récolte | 6,21 | 5,07 | 4,85 | 5,73 | 6,65 | 6,57 |
| Lisier (g/pot) | | 32,8 ± 0,4 | 21,1 ± 0,1 | | 7,4 ± 0,3 | 3,9 ± 0,1 |
| MO totale (g/pot) | 12,0 | 35,1 ± 0,3 | 25,8 ± 0,1 | 12,0 | 16,9 ± 0,1 | 14,2 ± 0,0 |
| Cu lisier (mg) | | 16,1 ± 0,2 | 12,3 ± 0,1 | | 4,0 ± 0,2 | 3,2 ± 0,1 |
| Cu tot (mg.kg ⁻¹ sol) | 20,0 | 48,9 ± 0,3 | 42,8 ± 0,1 | 20,0 | 27,8 ± 0,1 | 26,1 ± 0,1 |
| Zn lisier (mg) | | 51,5 ± 0,6 | 34,6 ± 0,2 | | 11,0 ± 0,4 | 7,6 ± 0,1 |
| Zn total (mg.kg ⁻¹ sol) | 80,0 | 171,7 ± 1,0 | 132,4 ± 0,3 | 80,0 | 100,9 ± 0,2 | 94,4 ± 0,2 |

Les supports de culture ont ensuite été placés dans des pots de 800 mL et recouverts d'un centimètre de sable préalablement lavé à l'acide pour éviter les contaminations en éléments traces métalliques. Les supports de culture ont été arrosés avec de l'eau de façon à obtenir une humidité égale aux 2/3 de la capacité de rétention en eau. Dans l'essai à long terme, le sable n'a pas, accidentellement, été suffisamment bien rincé, ce qui a entraîné une acidification du support de culture pour les modalités Lisier brut et Lisier méthanisé, il en sera bien sûr tenu compte dans l'interprétation des résultats (Tableau 17). Finalement, ce qui relevait initialement d'une erreur expérimentale permettra d'obtenir des informations sur l'impact de variations du pH sur la phytodisponibilité des 2 métaux étudiés.

2.2. CULTURE ET RECOLTE

Les graines de maïs (*Zea mays*, type bonus) et de fève (*Vicia faba*, type aguadulce), ont été hydratées pendant une nuit et désinfectées avec de l'hypochlorite de calcium à 0,9%. Puis, quatre graines ont été semées dans chaque pot, dans la couche de sable de surface de façon à faciliter leur germination et leur émergence. Après 8 jours, une sélection a été faite pour ne garder qu'une plante par pot.

Les cultures ont ensuite été menées pendant 7 semaines en conditions contrôlées et optimales, en phytotron avec des cycles de 16 heures de jour (température : 24°C ; humidité : 70%) et 8 heures de nuit (température : 20°C ; humidité : 75%). Pendant toute la durée de la culture, l'humidité des supports de culture a été maintenue aux 2/3 de la capacité de rétention en eau du pot.

A la récolte, les parties aériennes et les racines ont été séparées. Pour la culture de fève, la tige a été associée aux feuilles pour constituer ce qui sera appelé les parties aériennes, tandis que pour le maïs, la tige étant très courte, elle a été associée aux racines.

2.3. ANALYSES ET EXPLOITATION

La masse fraîche et la masse sèche après déshydratation à 80°C pendant 48 heures ont été déterminées pour chaque plante et chaque organe. Pour l'analyse du cuivre et du zinc, les parties aériennes et les racines ont été traitées séparément. Les échantillons secs ont été broyés finement puis minéralisés par voie humide à l'aide du DigiPREP Jr (SCP Sciences) ; cet appareil de digestion est équipé d'une sonde de température, placée dans un tube de référence, permettant de travailler à une température adaptée au point d'ébullition du mélange de digestion. Pour chaque échantillon, 125 mg de poudre sèche ont été minéralisés dans 5 mL d'HNO₃ 65%, à froid pendant une nuit, puis à 80°C pendant une heure. Après refroidissement 5 mL d'H₂O₂ 30% ont été ajoutés précautionneusement, et le tout a été porté à 80°C pendant 3 heures. Les minéralisats ont été dilués de façon à ce que la teneur en acide soit inférieure à 10%, pour pouvoir être analysés par ICP-OES. La qualité des résultats a été validée grâce à l'utilisation d'un matériau de référence (feuilles de tabac Virginia, CTA-VTL-2, ICHTJ).

Pour chaque variable, les résultats obtenus dans les modalités Lisier brut ou Lisier méthanisé ont été comparés à ceux des témoins correspondants. L'analyse statistique a été réalisée par ANOVA. Lorsque l'hypothèse d'égalité des moyennes est donnée avec une probabilité inférieure à 0,05 dans le test de Student, l'hypothèse d'égalité est rejetée, et les différences sont alors considérées comme significatives. Dans les tableaux de résultats, un astérisque indique une différence significative.

A partir des teneurs dans les différents organes des végétaux (parties aériennes et racines), trois types de coefficients ont été calculés :

- les coefficients d'absorption :

$$CA = \frac{\text{Teneur de l'élément dans l'organe étudié}}{\text{Concentration de l'élément dans le support de culture}}$$

- les coefficients de translocation :

$$CT = \frac{\text{Quantité d'élément contenu dans les parties aériennes}}{\text{Quantité d'élément contenu dans les racines}}$$

- les coefficients apparents d'utilisation :

$$CAU (\%) = \frac{\text{Quantité nette d'élément prélevé par le végétal}}{\text{Quantité nette d'élément apporté au support de culture}} \times 100$$

où les quantités nettes sont obtenues par soustraction entre les valeurs des modalités avec apport de lisier et la valeur moyenne de la modalité Témoin. Les CAU représentent les pourcentages de métaux apportés par les lisiers qui sont absorbés par la plante.

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. BIOMASSE ET ETAT NUTRITIONNEL EN CUIVRE ET ZINC

Les plantes de maïs ont connu un développement très lent qui peut s'expliquer par le pH des supports de culture qui était voisin de 5,0 à la récolte. Les pH en début de culture ont sans doute été encore plus acides que ceux mesurés à la récolte, l'acide résiduel du sable ayant probablement été lixivié pendant la culture. Ces acidités des supports de culture ont donc entraîné des croissances 10 fois plus faibles que celles habituellement obtenues pour le maïs. En effet, Su et Wong (2003) ont obtenu des biomasses comprises entre 2,6 g et 30 g, selon le niveau d'apport de boues résiduaires au sol, pour des plantes récoltées à 42 jours. On peut toutefois souligner que la matière sèche est plus élevée après ajout de lisier brut que celle obtenue avec les 2 autres modalités (Tableau 18).

Tableau 18 : Biomasse et teneurs en Cu et Zn dans le maïs

| | Témoin | Lisier brut | Lisier méthanisé |
|------------------------|-------------|---------------|------------------|
| <i>Biomasse (g MS)</i> | | | |
| Racines | 0,42 ± 0,12 | 1,09 ± 0,59 * | 0,42 ± 0,39 |

| | Témoin | Lisier brut | Lisier méthanisé |
|--------------------------------------|-------------|----------------|------------------|
| Parties aériennes | 0,87 ± 0,12 | 2,27 ± 1,24 | 1,01 ± 0,91 |
| Total | 1,29 ± 0,2 | 3,36 ± 1,8 | 1,43 ± 1,3 |
| <i>Cuivre (µg.g⁻¹ MS)</i> | | | |
| Racines | 11,5 ± 0,9 | 49,5 ± 2,8 * | 42,0 ± 4,2 * |
| Parties aériennes | 5,2 ± 1 | 8,5 ± 1,2 * | 8,3 ± 1,5 * |
| Total | 7,2 ± 0,6 | 22,2 ± 0,8 * | 18,5 ± 2,4 * |
| <i>Zinc (µg.g⁻¹ MS)</i> | | | |
| Racines | 43,6 ± 8,3 | 214,2 ± 30,3 * | 277,1 ± 22,6 * |
| Parties aériennes | 16,6 ± 2,9 | 90,9 ± 18,7 * | 90,8 ± 15,7 * |
| Total | 25,4 ± 4,0 | 132,5 ± 24,4 * | 147,1 ± 17,7 * |

* P < 0,05 dans le test de Student

Pour les fèves, l'analyse de la biomasse montre qu'il existe un effet d'inhibition sur la croissance de certaines plantes de la modalité Lisier brut qui s'est traduit par une moyenne faible et des écarts-types importants (Tableau 19 et Photo 5). De plus, parmi les cinq répétitions, une plante est morte en cours d'essai et n'a pas été intégrée dans les résultats. L'origine de cette inhibition de croissance est à rechercher soit dans la nature de la matière organique apportée, soit dans la disponibilité des nutriments.

Tableau 19 : Biomasse et teneurs en Cu et Zn dans la fève

| | Témoin | Lisier brut | Lisier méthanisé |
|--------------------------------------|-------------|----------------|------------------|
| <i>Biomasse (g MS)</i> | | | |
| Racines | 1,11 ± 0,54 | 0,61 ± 0,49 | 1,24 ± 0,45 |
| Parties aériennes | 3,31 ± 0,90 | 2,39 ± 0,91 | 2,68 ± 0,59 |
| Total | 4,42 ± 1,22 | 3,00 ± 1,32 | 3,92 ± 0,96 |
| <i>Cuivre (µg.g⁻¹ MS)</i> | | | |
| Racines | 19,1 ± 1,7 | 40,0 ± 11,9 * | 46,0 ± 6,3 * |
| Parties aériennes | 6,4 ± 0,7 | 8,5 ± 2,1 | 10,6 ± 1,4 * |
| Total | 8,8 ± 2,2 | 13,5 ± 8,1 | 21,8 ± 4,6 * |
| <i>Zinc (µg.g⁻¹ MS)</i> | | | |
| Racines | 78,1 ± 23,3 | 143,8 ± 15,8 * | 145,6 ± 16,3 * |
| Parties aériennes | 38,7 ± 3,4 | 43,9 ± 10,7 | 58,7 ± 12,3 * |
| Total | 45,6 ± 10,2 | 55,9 ± 26,8 | 85,6 ± 11,3 * |

* P < 0,05 dans le test de Student

En effet, le choix avait été fait de ne pas réaliser d'incubation du support de culture avant le semis. La minéralisation de la matière organique apportée par les lisiers a donc eu lieu simultanément à la croissance des plantes. Or les essais de minéralisation (p.109) ont montré que l'activité microbienne est particulièrement intense au cours des deux premières semaines et qu'il faut attendre plus de 7 semaines pour que la cinétique de dégradation du carbone après ajout de lisier brut soit

équivalente à celle du sol sans apport de matière organique. Cette activité microbienne pourrait avoir induit une « faim en azote », c'est-à-dire une utilisation de l'azote minéral contenu dans le support de culture pour le métabolisme bactérien et une limitation de la nitrification entraînant une carence en azote pour le végétal Garcia-Gomez *et al.* (2003). L'analyse foliaire effectuée sur les deux seules plantes ayant produit suffisamment de matière sèche, n'a montré aucune déficience en N, P, K, Ca, Mg, S, Cu, Fe, Mn et Zn. Cependant, une carence en azote ne peut pas être catégoriquement écartée pour les deux fèves dont le développement a été particulièrement retardé.

Parallèlement, cette forte activité microbienne a pu également produire des quantités importantes de CO₂ induisant ainsi des conditions asphyxiantes défavorables à la croissance de la fève (Guirette *et al.*, 1995). Cette hypothèse semble plus probable pour expliquer la baisse de rendement.

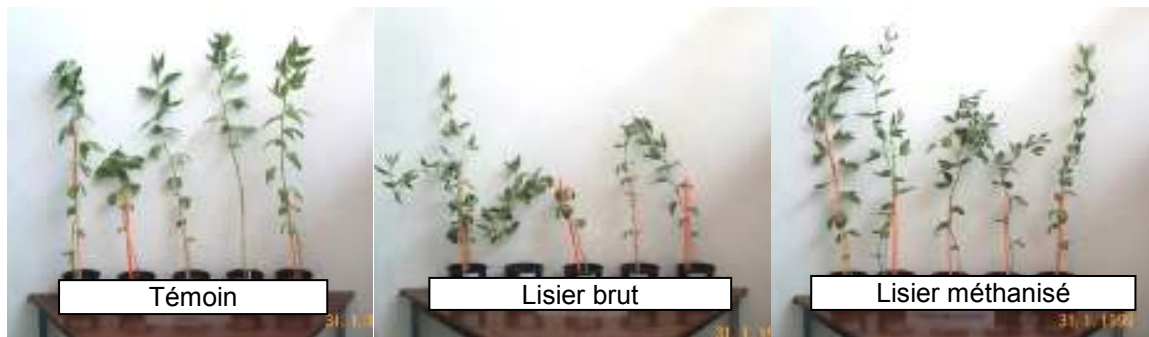


Photo 5 : Fèves à la récolte

Dans les modalités Témoin, les teneurs en cuivre et en zinc sont plus fortes dans la fève que dans le maïs (Tableau 18 et Tableau 19). Cette différence est significative pour le zinc quel que soit l'organe considéré, tandis que pour le cuivre, seules les teneurs dans les racines sont significativement différentes. Ces résultats sont en accord avec la capacité des monocotylédones et des dicotylédones à fixer les cations d'une part, et avec la mobilité du cuivre et du zinc au sein de la plante d'autre part. En effet, les racines des dicotylédones présentent une capacité d'échange cationique élevée et absorbent plus de métaux que les monocotylédones (Morel, 1998). De plus, le cuivre est peu mobile au sein de la plante (p.50), ce qui justifie que l'augmentation de sa teneur dans les parties aériennes de la fève n'est pas significative par rapport à celles obtenues dans l'essai maïs.

Une augmentation des teneurs en cuivre et en zinc dans les parties aériennes et les racines est observée après ajout de lisier brut ou de lisier méthanisé, et ce quelles que soient la culture et la dose apportée. L'analyse statistique des résultats montre que ces augmentations sont significatives pour tous les organes et toutes les modalités, à l'exception des parties aériennes des fèves de la modalité Lisier brut. Pour ces plantes, la faible production de biomasse a été accompagnée par des teneurs en cuivre et en zinc relativement faibles, mais augmentées par rapport au témoin (Tableau 18 et Tableau 19).

Les teneurs en cuivre sont, pour les modalités Témoin, proches du seuil de carence estimé entre 1 et 5 mg.kg⁻¹ MS dans les feuilles (Marschner, 1995). Flores-Vélez *et al.* (1996) ont identifié que le cuivre présent dans le sol d'un vignoble était majoritairement lié aux résidus végétaux et à l'argile. De plus, d'après Brun *et al.* (2001), la teneur en cuivre dans les racines de maïs est corrélée négativement avec la teneur en argile du sol (pour des sols la teneur en argile était comprise entre 10 et 30%). Le sol de notre essai contenait 35% d'argile, la phytodisponibilité du cuivre a donc pu être réduite par cette forte teneur en argile. En revanche, après apport de lisier brut ou méthanisé, les teneurs dans les parties aériennes se situent dans la gamme optimale pour le bon développement des plantes, soit entre 5 et 20 mg Cu.kg⁻¹ MS dans les feuilles d'après Marschner (1995). Le cuivre apporté par les effluents est donc prélevé par le maïs et la fève.

Par ailleurs, les teneurs en zinc dans les parties aériennes des plantes de maïs de la modalité Témoin sont au niveau du seuil de carence estimé entre 16 et 22 mg.kg⁻¹ MS pour des jeunes plantes de maïs (Alloway, 2004), ce qui n'est pas le cas pour les plantes de fève de la modalité Témoin. Alloway (1995) rapporte différents travaux montrant que les sols ayant des teneurs élevées en argile et en matière organique adsorbent fortement le zinc, en particulier pour des pH élevés. Ainsi, un sol de pH 7,0 et à près de 40% d'argile pour une teneur en carbone organique de 1,74% peut adsorber jusqu'à 5 000 mg Zn.kg⁻¹sol. De plus, le maïs est une des cultures les plus sensibles à la fourniture en zinc (Loué, 1993), et les teneurs en argile et en matière organique de notre essai pourraient donc avoir entraîné un manque de disponibilité du zinc vis-à-vis du maïs (modalité Témoin). En revanche, dans les deux essais, les teneurs en zinc dans les parties aériennes des plantes des modalités Lisier brut et Lisier méthanisé se trouvent dans la gamme optimale pour le bon développement des plantes (25 à 150 mg Zn.kg⁻¹ MS dans les feuilles d'après Marschner, 1995). De plus, les teneurs dans les parties aériennes des maïs sont inférieures au seuil de toxicité établi par Su et Wong (2003) pour des plantes de 42 jours. Ces auteurs ont en effet montré que la biomasse des parties aériennes était significativement réduite pour des teneurs supérieures à 300 mg.kg⁻¹. Cela confirme que l'inhibition de croissance observée dans notre étude n'est pas liée à une toxicité en zinc mais à des problèmes d'acidité dans le cas de l'essai maïs (Tableau 18) ou d'apport massif de MO dégradable dans le cas de la fève (Tableau 19). Enfin, l'augmentation de teneur en zinc par rapport à la modalité Témoin est significative dans les plantes de maïs des modalités Lisier brut et Lisier méthanisé (Tableau 18), mais également pour fèves de la modalité Lisier méthanisé (Tableau 19). Le zinc apporté par les effluents est donc prélevé par les végétaux.

Ces augmentations de la phytodisponibilité du cuivre et du zinc sont en accord avec les résultats issus d'autres travaux, que la phytodisponibilité soit évaluée selon une approche chimique ou biologique. En effet, la réalisation d'extractions séquentielles a souvent indiqué une augmentation des fractions les plus labiles après apport de matière organique au sol (Canet *et al.*, 1998 ; Planquart *et al.*, 1999). Pichtel et Anderson (1997) ont couplé une approche par fractionnement chimique avec une culture d'avoine (en pot pendant 30 jours) amendée avec des composts. Ces auteurs ont observé une augmentation de la teneur en cuivre uniquement aux plus fortes doses d'application, tandis que la

teneur de zinc augmentait graduellement avec les apports. Lors d'essais au champ sur une culture de maïs, Jarausch-Wehrheim *et al.* (1996, 1999) ont mesuré des augmentations des teneurs en cuivre et en zinc pour des sols amendés avec un fumier ou des boues de station d'épuration.

Afin de mieux évaluer la phytodisponibilité du cuivre et du zinc après épandage de lisiers bruts ou méthanisés, les résultats obtenus pour chacun des métaux vont être détaillés séparément.

3.2. ABSORPTION ET TRANSLOCATION DU CUIVRE DANS LA PLANTE

Les apports de lisier brut et de lisier méthanisé ont conduit à une augmentation significative des teneurs en cuivre dans les végétaux, pour lesquels les différents organes peuvent être examinés séparément.

Dans les racines, les teneurs en cuivre sont similaires pour les plantes de maïs et de fève alors que les doses apportées étaient plus importantes dans l'essai « à long terme » (maïs) ; la différence de capacité d'échange cationique est à nouveau une hypothèse permettant d'expliquer les teneurs dans les racines des deux cultures. Par ailleurs, l'absence de proportionnalité entre la concentration en cuivre dans le support de culture et dans les racines (pour une même culture) est en contradiction avec les résultats de Brun *et al.* (2001). Pour des plantes de maïs cultivées pendant 35 jours, ces auteurs ont montré que la teneur dans les racines était proportionnelle à la concentration de cuivre dans le sol, mais que les teneurs dans les parties aériennes demeuraient constantes. Chaignon *et al.* (2003) ont observé les mêmes tendances pour des tomates cultivées sur des sols contaminés en cuivre. Cette différence peut s'expliquer par la mobilité et la phytodisponibilité du métal, dans la mesure où ces auteurs ont travaillé sur des sols de vignobles contaminés par de la bouillie bordelaise (CuSO_4).

Les teneurs dans les parties aériennes semblent évoluer de la même façon que celles des racines : l'apport de lisier entraîne une augmentation du même ordre de grandeur dans les parties aériennes de fèves et de maïs. Cette augmentation n'est pas corrélée à la dose et au lisier appliqués, indiquant que les plantes sont en situation de consommation de luxe. Ces résultats confirment la faible mobilité du cuivre au sein du végétal déjà rapportée par Kabata-Pendias et Pendias (1992) et Mengel et Kirkby (2001). De plus, ils sont en accord avec ceux obtenus par Tao *et al.* (2003) montrant que l'accumulation du cuivre dans la plante de maïs est « biomasse-dépendante » ($r^2 = 0,999$), et donc que la concentration est constante.

L'augmentation de la phytodisponibilité de cuivre après apport de lisiers pour les plantes de maïs et de fève se traduit par une augmentation du coefficient d'absorption au niveau des racines, du fait de stockage de cet élément dans cet organe (Tableau 20). Inversement, le cuivre étant peu mobilisé vers les parties aériennes des maïs, le coefficient d'absorption de cet organe diminue significativement après apport de lisier. Ce n'est pas le cas pour les fèves pour lesquelles l'augmentation de phytodisponibilité compense l'augmentation de la concentration du sol, ce qui, finalement, aboutit à un coefficient d'absorption qui reste constant. Enfin, la faible translocation du

cuivre vers les parties aériennes et l'augmentation de la teneur dans les racines se traduit par une diminution du coefficient de translocation entre les Témoins et les modalités « lisiers ».

Tableau 20 : Coefficients d'absorption et de translocation du cuivre

| | Témoin | Lisier brut | Lisier méthanisé |
|-----------------------------------|-------------|---------------|------------------|
| Essai à long terme : Maïs | | | |
| Coefficient d'absorption | | | |
| Racines | 0,57 ± 0,04 | 1,01 ± 0,06 * | 0,98 ± 0,1 * |
| Parties aériennes | 0,26 ± 0,05 | 0,17 ± 0,02 * | 0,19 ± 0,04 * |
| Total | 0,36 ± 0,03 | 0,45 ± 0,02 * | 0,43 ± 0,06 * |
| Coefficient de Translocation | 1,0 ± 0,3 | 0,34 ± 0,06 * | 0,46 ± 0,06 * |
| Essai à moyen terme : Fève | | | |
| Coefficient d'absorption | | | |
| Racines | 0,96 ± 0,08 | 1,44 ± 0,43 | 1,76 ± 0,24 * |
| Parties aériennes | 0,32 ± 0,04 | 0,31 ± 0,08 | 0,4 ± 0,05 * |
| Total | 0,44 ± 0,11 | 0,49 ± 0,29 | 0,84 ± 0,18 * |
| Coefficient de Translocation | 1,15 ± 0,44 | 1,1 ± 0,55 | 0,53 ± 0,16 |

* P < 0,05 dans le test de Student

Deux groupes de plantes se distinguent par le niveau d'accumulation du cuivre dans la plante entière : les témoins et les plantes des « modalités lisiers ». Au sein de chaque groupe, les prélèvements de cuivre par le végétal dépendent de la biomasse, comme le montre la Figure 31. Dans cette figure, chaque plante a été représentée de façon à mieux prendre en compte la variabilité d'un individu à l'autre. La Figure 31 montre qu'au sein d'une même population de plantes placées dans des conditions de sols identiques (les 5 répétitions d'une même modalité), les individus ne produisent pas la même biomasse et donc n'absorbent pas la même quantité de cuivre, mais que leur teneur en cuivre reste quasiment constante dans la mesure où les points s'alignent sur des modèles linéaires ou quasi linéaires.

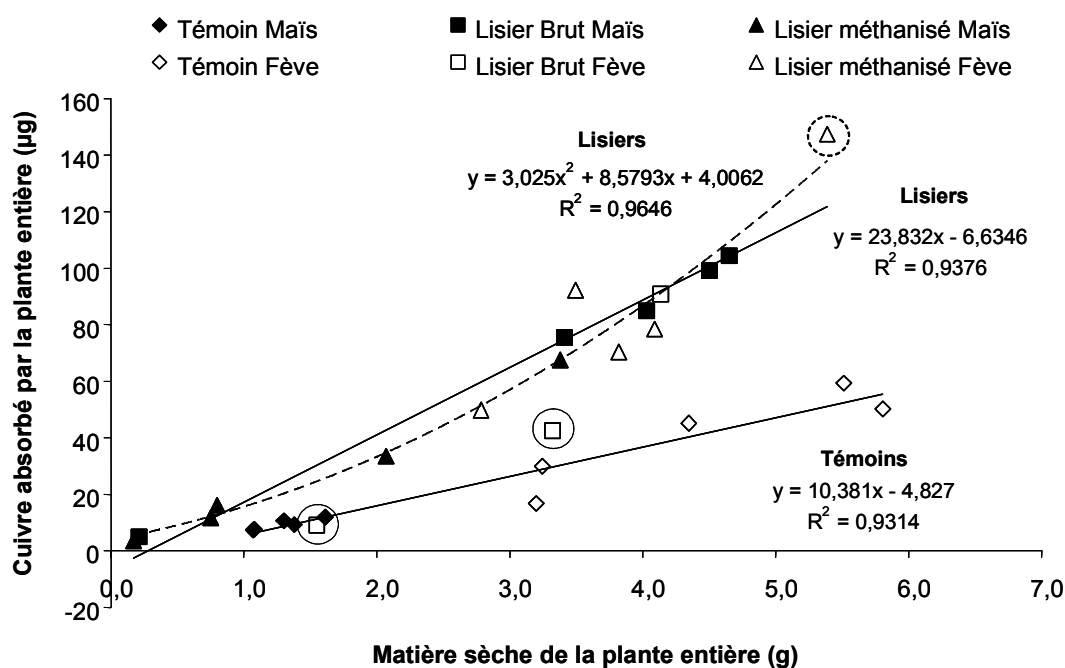


Figure 31 : Quantité totale de Cu absorbé par la fève et le maïs en fonction de la biomasse totale

Les témoins (maïs et fève) sont sur une même droite d'absorption reliant la biomasse produite et les quantités de cuivre absorbé, traduisant une concentration constante (Figure 31).

Les modalités Lisier brut et Lisier méthanisé donnent des résultats très significativement différents des témoins, et elles peuvent être décrites par un modèle linéaire ou polynomial du 2^{ème} ordre avec un coefficient en x^2 très faible (Figure 31). Ces modèles ont été calculés en excluant de la régression les deux fèves entourées en trait plein sur la Figure 31. Ils indiquent qu'il y a donc bien augmentation de la phytodisponibilité du cuivre après ajout de lisier brut ou de lisier méthanisé : pour une même biomasse, les prélèvements sont plus importants que dans les plantes témoins. De plus, ces modèles indiquent qu'il n'existe pas de différence significative de phytodisponibilité du cuivre entre lisier brut et lisier méthanisé. La valeur de la pente du modèle linéaire donne une teneur moyenne de $23,8 \mu\text{g Cu.g}^{-1}$ MS dans la plante entière, en accord avec les moyennes arithmétiques (Tableau 18 et Tableau 19). Cependant, sur les trois points qui s'éloignent du modèle, les deux correspondant à la modalité Lisier brut révèlent une réduction des quantités absorbées tandis que celui obtenu après utilisation de lisier méthanisé indique une augmentation de l'absorption. Cependant, ces effets sont certainement à mettre d'avantage en relation avec des conditions plus ou moins adaptées au développement des plantes plutôt qu'à des modifications de la phytodisponibilité des métaux suite au traitement par méthanisation des lisiers.

Finalement, les coefficients apparents d'utilisation sont toujours positifs, quel que soit la culture, le lisier ou l'organe considéré. Cependant, dans la mesure où les plantes sont en situation de consommation de luxe, on mesure la même teneur en cuivre les parties aériennes de la fève et du

maïs (Tableau 18 et Tableau 19). Dans le cas d'un développement normal du végétal (production de biomasse homogène), la valeur des CAU est donc contrôlée par les apports de cuivre dans le support de culture : plus le milieu est enrichi en cuivre plus ce rapport diminue. Ainsi, les coefficients obtenus pour les fèves de la modalité Lisier méthanisé sont au moins 3 fois supérieurs à ceux des autres modalités. Ces valeurs de CAU (Figure 32) sont données à titre indicatif, les écarts-types étant importants.

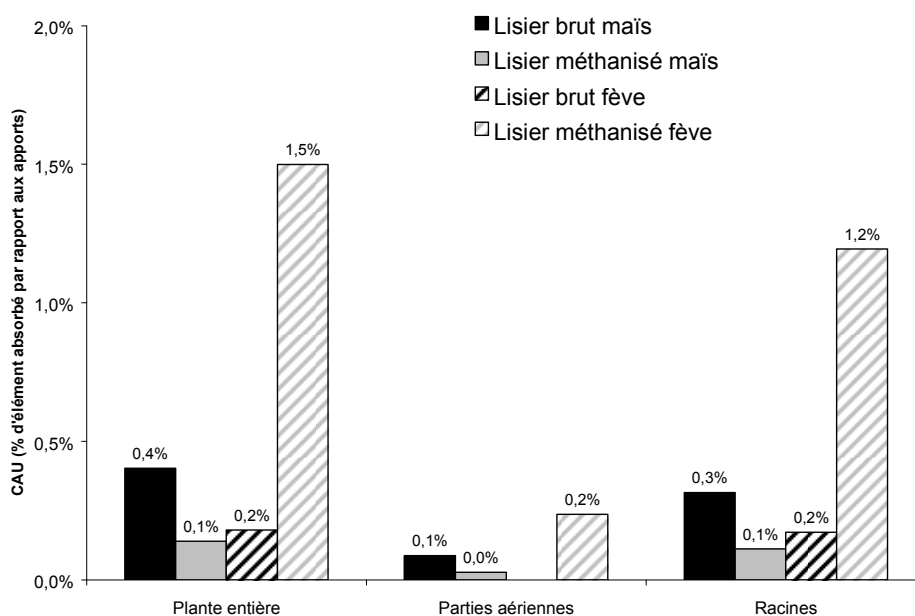


Figure 32 : Coefficient Apparent d'Utilisation du cuivre pour les deux cultures en fonction des organes

3.3. ABSORPTION ET TRANSLOCATION DU ZINC DANS LA PLANTE

Comme pour le cuivre, la phytodisponibilité du zinc a été augmentée par les apports de lisier (Tableau 18 et Tableau 19). Bien que cela ne soit pas significatif pour les fèves ayant reçu du lisier brut, les teneurs en zinc dans les parties aériennes et les racines sont toujours augmentées suite aux apports des 2 lisiers. Malgré les perturbations de développement rencontrées par les plantes de maïs du fait du pH acide, ou par les plantes de fève du fait de l'apport de lisier brut, l'augmentation des teneurs dans les racines est proportionnelle aux apports en zinc dans le support de culture. La translocation au sein de la plante n'est pas affectée, la teneur en zinc y augmentant également en fonction de la concentration du support de culture. Ainsi, c'est toujours dans le maïs que les teneurs en zinc sont les plus élevées, quel que soit l'organe considéré. Les mécanismes d'absorption et de translocation (voir la partie I, p.46) n'ont donc été affectés que dans le cas d'apport de lisier brut sur les plantes de fève, et les résultats sont en accord avec ce qui est généralement décrit en physiologie végétale (Kabata-Pendias et Pendias, 1992).

L'augmentation de l'absorption en fonction de l'augmentation de la teneur en zinc du sol suite à l'apport d'un amendement est en accord avec les travaux rapportés par Jarausch-Wehrheim *et al.* (1999) et Pichtel et Anderson (1997). Les premiers ont évalué la phytodisponibilité du zinc lors d'un essai au champ dans des conditions relativement proches des nôtres (sol acide avec apport de boues digérées, culture de maïs) tandis que les seconds ont étudié l'effet de l'apport d'un compost à 5 doses différentes. Les teneurs en zinc dans les plantes augmentaient graduellement avec la concentration du sol. L'ensemble de ces résultats confirme une plus grande phytodisponibilité du zinc que du cuivre pour les végétaux supérieurs, et ce même dans le cas où les apports sont effectués sous forme organique. Cette augmentation de la phytodisponibilité du zinc se traduit directement par une augmentation des coefficients d'absorption (Tableau 21).

Le coefficient de translocation est toujours plus fort pour les fèves que pour les maïs. Cependant, dans les maïs, il est relativement constant et n'est pas affecté significativement par les apports de lisier. En revanche, dans les fèves, l'apport de lisiers réduit la mobilité relative du zinc vers les parties aériennes, et le coefficient de translocation diminue, de façon significative dans le cas du lisier méthanisé.

Tableau 21 : Coefficients d'absorption et de translocation du zinc

| | Témoin | Lisier brut | Lisier méthanisé |
|-----------------------------------|-------------|---------------|------------------|
| Essai à long terme : Maïs | | | |
| Coefficient d'absorption | | | |
| Racines | 0,54 ± 0,1 | 1,25 ± 0,17 * | 2,09 ± 0,17 * |
| Parties aériennes | 0,21 ± 0,04 | 0,53 ± 0,11 * | 0,69 ± 0,12 * |
| Total | 0,32 ± 0,05 | 0,77 ± 0,14 * | 1,11 ± 0,13 * |
| Coefficient de Translocation | 0,86 ± 0,26 | 0,84 ± 0,11 | 0,75 ± 0,1 |
| Essai à moyen terme : Fève | | | |
| Coefficient d'absorption | | | |
| Racines | 0,98 ± 0,29 | 1,43 ± 0,16 * | 1,54 ± 0,17 * |
| Parties aériennes | 0,48 ± 0,04 | 0,44 ± 0,11 | 0,62 ± 0,13 * |
| Total | 0,57 ± 0,13 | 0,55 ± 0,27 | 0,91 ± 0,12 * |
| Coefficient de Translocation | 1,74 ± 0,65 | 1,47 ± 0,49 | 0,91 ± 0,25 * |

* P < 0,05 dans le test de Student

La différence de translocation obtenue entre les deux cultures peut être corrélée au pH du support de culture ainsi qu'au mode d'absorption et de translocation du zinc dans le végétal (p.47). En effet, le zinc est un des éléments les plus sensibles au pH et passe facilement sous la forme Zn²⁺ lorsque celui-ci diminue ; or c'est sous cette forme que le métal est absorbé et transporté vers les parties aériennes. Jung et Thornton (1996) ont mis en relation les teneurs en zinc dans les parties aériennes avec les concentrations dans le sol ; les régressions étaient améliorées lorsque des paramètres physico-chimiques du sol (pH, CEC) étaient également considérés. Par ailleurs, la caractérisation chimique des concentrés de lisier utilisés dans l'essai a montré que la diminution du pH entraîne un passage en solution du zinc pour des pH inférieurs à 6,0 (voir p.115). De même, Qiao

et al. (2003) ont montré qu'après apport de boues digérées, en abaissant le pH de 7,8 à 4,7, le zinc de la fraction soluble devenait majoritaire par rapport aux autres fractions. Enfin, Sims et Kline (1991) ont montré que la fraction échangeable du zinc était corrélée aux teneurs dans les parties aériennes de soja et de blé. Dans notre essai, les teneurs en zinc dans les parties aériennes sont inversement proportionnelles au pH comme le montre clairement la Figure 33.

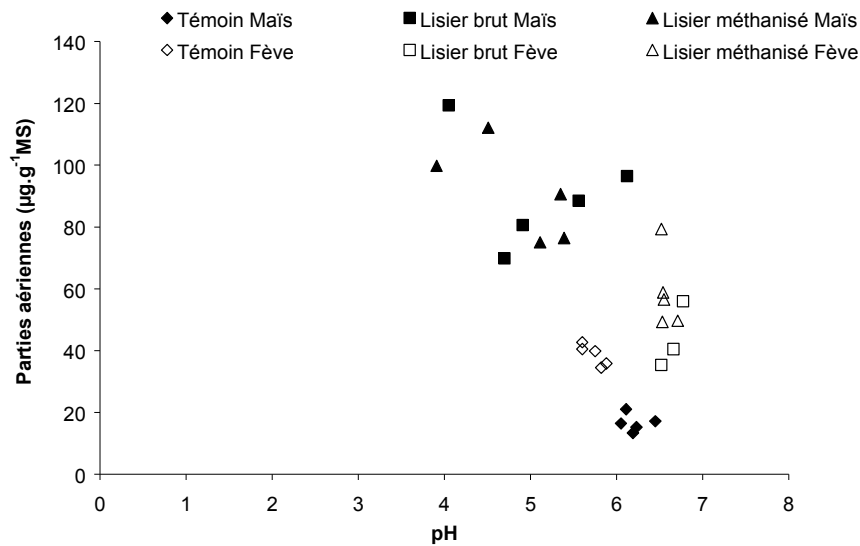


Figure 33 : Teneurs en zinc dans les parties aériennes en fonction du pH du milieu de culture

Si l'on considère maintenant la biomasse ainsi que les quantités de zinc absorbé par la plante entière, les plantes Témoins apparaissent sur une même droite d'absorption (Figure 34) bien distincte de celles sur lesquelles s'alignent les plantes ayant reçu des lisiers. Ceci découle du fait que les teneurs en zinc sont augmentées dans les plantes après apport de lisier, comme cela a été décrit précédemment. De plus, alors que pour le cuivre il n'existait qu'une droite d'absorption après apport de lisier, il existe cette fois une différence de comportement entre la fève et le maïs, en relation avec les pH des supports de culture.

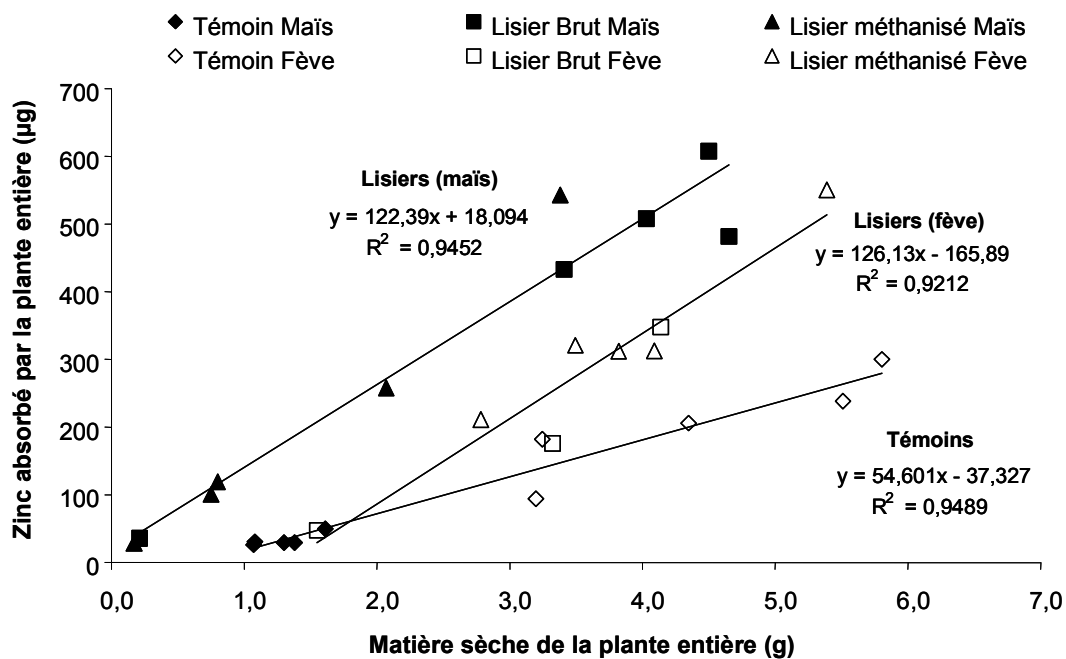


Figure 34 : Quantité totale de Zn absorbé en fonction de la biomasse totale produite par la fève et le maïs

Les coefficients apparents d'utilisation sont négatifs pour les fèves de la modalité Lisier brut lorsque l'on considère la plante entière ou les parties aériennes, du fait de la diminution des rendements dans cette modalité. Comme pour le cuivre, les coefficients obtenus pour les fèves de la modalité Lisier méthanisé sont supérieurs à ceux des autres modalités.

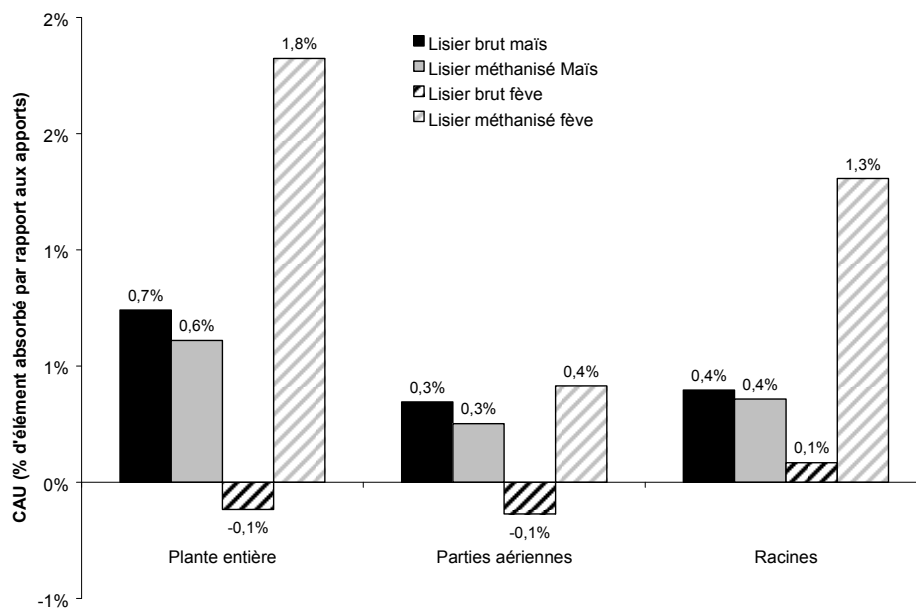


Figure 35 : Coefficient Apparent d'Utilisation du zinc pour les deux cultures en fonction des organes

4. CONCLUSION

Ces travaux ont montré que lorsque le maïs et la fève sont placés dans des conditions de sol identiques (modalités Témoin), la fève absorbe presque deux fois plus de cuivre et de zinc que le maïs, du fait d'une plus grande accumulation des éléments dans les racines. En revanche, une telle comparaison n'est pas possible entre les modalités Lisier brut et Lisier méthanisé, les apports de lisier étant différents entre les deux cultures.

Ces essais ont toutefois montré que l'apport de lisier brut ou de lisier méthanisé a entraîné une augmentation de la phytodisponibilité du cuivre et du zinc. Les teneurs dans les plantes ont été significativement augmentées, et ainsi, pour une même biomasse produite, les quantités d'éléments traces métalliques absorbés par les plantes ont également été augmentées. Cependant, les teneurs obtenues étaient dans la gamme de concentration d'élément indispensable et non de phytotoxique, et l'absorption de cuivre et de zinc n'a donc induit aucune diminution de rendement.

Le cuivre s'accumule essentiellement dans les racines puisque les rapports entre les teneurs dans la matière sèche des végétaux et celles des milieux de culture (coefficients d'absorption) ont été augmentés pour les racines après apport de lisier, mais sans apparition d'un effet dose, et ont été diminués pour les parties aériennes. De la même façon, le rapport entre les quantités absorbées par les parties aériennes et souterraines (coefficient de translocation) a été diminué après apport de lisier dans la plupart des cas, ce qui souligne clairement que la plante régule la mobilité du cuivre des racines vers les parties aériennes. Concernant le zinc, les coefficients d'absorption ont été augmentés dans les deux organes, en relation avec une plus grande mobilité de l'élément au sein du végétal, et en lien avec la concentration du sol. Ces résultats sont en accord avec ceux présentés par Jarausch-Wehrheim *et al.* (1996, 1999). Lors d'essais au champ sur culture de maïs, ces auteurs ont montré que le cuivre était dans un premier temps accumulé dans les racines puis transloqué vers les parties aériennes entre 95 et 118 jours de culture, tandis que le zinc était rapidement redistribué vers les parties aériennes.

En ce qui concerne la phytodisponibilité du cuivre et du zinc apportés par un lisier ayant subi ou non un traitement par méthanisation, les essais n'ont pas permis de mettre en évidence de différence significative entre les deux effluents. Dans le premier chapitre, la réalisation d'une extraction séquentielle a montré des profils assez ressemblants pour les deux types de lisier. Cependant, une légère augmentation de la fraction échangeable du cuivre a été observée suite à la méthanisation, cette fraction ne représentant toutefois que 2% de l'élément total dans le lisier méthanisé. De plus, dans le même temps, les formes résiduelles, peu phytodisponibles, ont été augmentées. Le zinc a été quant à lui extrait majoritairement dans la fraction liée aux carbonates, la fraction échangeable étant nulle dans les 2 lisiers. Cette répartition du zinc pourrait partiellement expliquer la sensibilité de cet élément au pH dans les lisiers brut et méthanisé. Enfin, le déplacement des métaux vers des formes dites plus stables (associées aux carbonates ou résiduelles) va dans le sens d'une diminution de la phytodisponibilité. Cependant, ces essais ne permettent pas de conclure

à une différence significative de phytodisponibilité du cuivre et du zinc apportés par un lisier brut ou un lisier méthanisé.

En revanche, les essais ont permis de souligner l'effet de la méthanisation sur le devenir de la matière organique des lisiers porcins. En effet, dans le cas où les lisiers n'ont pas été soumis à une minéralisation préalable, l'apport de lisier brut a entraîné des perturbations de croissance qui n'ont pas été observées avec le lisier méthanisé. Cependant, le rôle de la matière organique après épandage de lisiers brut ou méthanisé reste à approfondir.

Finalement, les teneurs en cuivre et en zinc étant peu différentes entre la fève et le maïs après apport des lisiers, les quantités de métaux absorbés vont dépendre des conditions dans lesquelles les végétaux vont pouvoir se développer, et notamment les conditions de pH et d'aération du milieu. Plus le végétal est placé dans de bonnes conditions, plus il peut produire de biomasse, et plus il va absorber de métaux. En terme de proportion de métal absorbé, par rapport à ce qui a été apporté au végétal (CAU), ce rapport diminue lorsque les apports augmentent dans la mesure où les quantités de métaux absorbés augmentent beaucoup moins vite que les apports. C'est pour toutes ces raisons que la culture de fève a donné les plus forts CAU : 1,5% pour le cuivre et 1,8 % pour le zinc, en stockant les $\frac{3}{4}$ de ces métaux dans les racines. Dès que le végétal est placé dans des conditions non optimales ou que la quantité de métaux apportée est 5 fois plus importante (cas du maïs), les CAU chutent à des valeurs 5 fois plus faibles : 0,24% en moyenne pour le cuivre dans la plante entière et 0,45 % pour les zinc. Dans ces conditions, le zinc est nettement plus mobile que le cuivre au sein des plantes, puisque l'on en retrouve presque autant dans les parties aériennes que dans les racines, contrairement au cuivre qui reste pour les $\frac{3}{4}$ dans les racines.

CHAPITRE IV : EVALUATION DES EFFETS GENOTOXIQUES

1. INTRODUCTION

Le caractère génotoxique des micropolluants constitue une des composantes majeures de leur toxicité à long terme. Pour cette raison, et devant l'importance des conséquences des effets génotoxiques sur les organismes vivants, de nombreux tests ont été développés pour l'évaluation des mutations génétiques chez les procaryotes comme les eucaryotes. Parmi ces tests, le test des micronoyaux permet une évaluation prospective des effets, c'est-à-dire qu'il permet de connaître le risque que représente un contaminant avant de décider de son utilisation. Mis en œuvre dès le milieu du XX^{ème} siècle, il est aujourd'hui un biomarqueur très utilisé (p.67). Chez les végétaux supérieurs, trois espèces sont principalement utilisées pour l'évaluation de la fréquence d'apparition des micronoyaux : *Vicia faba*, *Allium cepa* et *Tradescantia*.

Le test sur *Vicia faba* a largement été utilisé depuis quelques décennies, en particulier pour l'évaluation de la qualité des eaux (p.67). Ce test a également été appliqué aux sols via leur lixiviat, généralement obtenu par extraction d'une masse de sol dans 10 fois sa masse d'eau. En France, ce test a été normalisé en 2004 par l'AFNOR (NF T90-327). Cependant, cette méthode a présenté des performances variables. Ainsi, si certains auteurs ont pu trouver de bonnes corrélations entre le niveau de contamination des sols et l'induction de micronoyaux (Wang, 1999 ; Cotelle *et al.*, 1999), d'autres n'ont pas pu corréliser les concentrations en micropolluants et les effets observés (Song *et al.*, 2006). Afin d'être plus représentatif, différents auteurs ont réalisé un test des micronoyaux en exposant les racines des plantes par contact direct avec le sol ou les sédiments. Les résultats sont contradictoires. En effet, certains travaux ont mis en évidence une apparition significative de micronoyaux (Minissi *et al.*, 1998 ; Jain *et al.*, 2004), tandis que d'autres auteurs n'ont pas observé d'effet génotoxique (Minissi et Lombi, 1997 ; Knasmüller *et al.*, 1998). De plus, seuls les travaux conduits par De Simone *et al.* (2005) ont comparé différentes méthodes d'exposition pour une même matrice solide. Ainsi l'effet génotoxique de composts a été évalué par contact direct des amendements apportés à différentes doses dans un sol, ou par exposition à des lixiviats obtenus par extraction au DMSO ou à l'eau. Les résultats obtenus ont montré une corrélation entre les expositions en sol à la plus forte dose d'apport des composts (avant observation de phytotoxicité) et les expositions au lixiviat DMSO.

Les objectifs de cette partie sont d'évaluer l'impact écotoxicologique des épandages de lisiers dans le temps et de prédire les effets à long terme de ces apports, ainsi que d'évaluer l'effet de la digestion anaérobie sur cet impact.

Par ailleurs, les conditions de réalisation d'un test en sol rapide, sensible, permettant d'obtenir des résultats reproductibles, et aboutissant à un diagnostic de la matrice testée équivalent à celui obtenu par application de la méthode normalisée ont été déterminées. La méthodologie développée a ensuite été validée par application du test à des sols voisins de l'unité de digestion anaérobie de

Montardon. Trois sols ont été considérés : un sol forestier, et deux sols agricoles, dont un a reçu des lisiers méthanisés pendant une vingtaine d'années.

2. MATERIEL ET METHODE

2.1. DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE D'EVALUATION DE LA GENOTOXICITE D'UN SOL PAR EXPOSITION DIRECTE

2.1.1. Mise en place d'un référentiel

Pour la mise au point d'un test par contact direct, deux sols ont été utilisés (Tableau 22) :

- un sol de référence (LUFA) dont les effets génotoxiques ont été étudiés et reconnus comme nuls (Song *et al.*, 2006). Ce sol sera utilisé comme témoin négatif d'une part, et sera également contaminé artificiellement par un composé organique (ajout d'une solution d'hydrazide maléique à 10^{-5} M), ou par un composé métallique (ajout d'une solution de chlorure de cadmium à 10^{-8} M).
- un sol industriel prélevé dans l'horizon de surface (0 – 10 cm) aux alentours immédiat d'un site de recyclage du plomb.

Le sol LUFA est exempt de polluants, tandis que la teneur en plomb atteint quasiment 2 000 mg Pb.kg⁻¹ MS dans le sol industriel (Tableau 22).

Tableau 22 : Caractéristiques des sols de l'essai

| | Sol référence LUFA | Sol industriel | |
|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|--------------------------|
| | | Sol | Lixiviat |
| Corg (%) | 2,33 ± 0,18 | 3,4 | - |
| pH (eau) | 5,7 ± 0,3 | 6,98 | - |
| CEC (mval / 100g) | 11 ± 1 | 15,1 | - |
| <i>Granulométrie (%)</i> | | | |
| <0,002 | 7,9 ± 1,0 | 20,3 | - |
| 0,002 - 0,05 | 14,2 ± 2,6 | 52,7 | - |
| 0,05 - 2,0 | 77,9 ± 3,0 | 21,0 | - |
| Type de sol | Fluviosol | Brunisol | - |
| <i>Eléments métalliques</i> | <i>mg.kg⁻¹ MS</i> | <i>mg.kg⁻¹ MS</i> | <i>µg.L⁻¹</i> |
| As | nd | 28 | < l.d. |
| Cd | nd | 6 | < l.d. |
| Cr | nd | 62 | < l.d. |
| Cu | nd | 34 | 157 ± 30 |
| Ni | nd | 33 | < l.d. |
| Pb | nd | 1933 | 391 ± 40 |
| Zn | nd | 87 | < l.d. |

Pour chaque sol, une expérimentation par contact direct a été réalisée et comparée à une expérimentation menée selon la méthode normalisée après lixiviation du sol (Figure 36). Les lixiviats à l'eau du sol de référence et du sol industriel ont été préparés selon la norme NF EN 12457-2 (AFNOR, 2002). Une masse de 100 g est placée dans un récipient en présence de 1000 mL d'eau déminéralisée et mise sous agitation à température ambiante pendant 24 heures. La préparation est laissée à décanter pendant 24 heures à 4°C. Le surnageant est prélevé (sans être filtré) au moment de l'exposition.

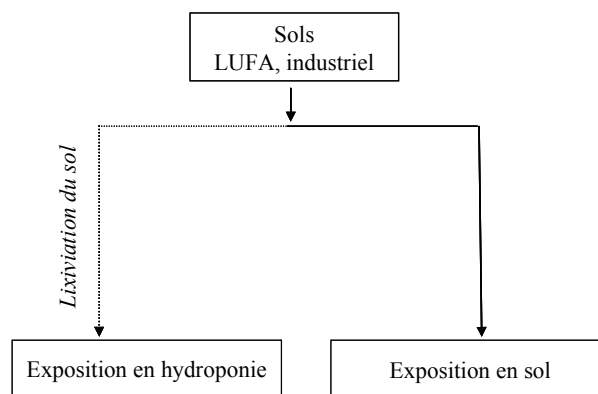


Figure 36 : Méthodologie pour la mise en place d'un référentiel pour l'évaluation de la génotoxicité d'un sol par contact direct

2.1.1.1. Test des micronoyaux normalisé

Le test a été réalisé selon la norme AFNOR NF T90-327. Les graines, conservées à l'obscurité en chambre froide (4°C), ont été hydratées pendant 24 heures à température ambiante dans de l'eau déminéralisée, puis ont été écosées. Les graines ont été désinfectées au moyen d'hypochlorite de calcium (CaClO 0,9%, 15 minutes) puis rincées à l'eau déminéralisée avant d'être mises à germer verticalement, à 24°C dans du coton constamment humidifié. Après 3 jours, les graines dont la longueur de la racine primaire était comprise entre 3 et 5 cm ont été sélectionnées, et l'extrémité de ces racines a été coupée (5 mm environ) de façon à favoriser le développement des racines secondaires. Les graines ont alors été placées au dessus d'un récipient contenant le milieu nutritif préalablement oxygéné (solution de Hoagland dont la composition est donnée en Annexe 2), à 22°C. Après 5 jours, les racines secondaires avaient une longueur de 1 à 2 cm et pouvaient être utilisées pour le test.

Pour l'exposition, cinq plantes ont été placées dans un récipient contenant la solution d'exposition, les racines étant immergées. Les récipients ont ensuite été placés à l'obscurité, de façon à préserver les racines de tout stress liés aux rayons ultraviolets, et à 24 °C pendant 30 heures. Afin d'éviter tout risque d'anoxie dans les solutions d'exposition, un bulleur a été placé dans chaque récipient permettant une oxygénation de la solution par apport d'air. Trois témoins ont été mis en

place en plus des deux lixiviats de sol testés. La solution de Hoagland a été utilisée comme témoin négatif. La solution de Hoagland a également servi à la préparation des témoins positifs par des dilutions d'hydrazide maléique (HM à 10^{-5} M) et de chlorure de cadmium (CdCl_2 à 10^{-8} M).

En fin d'exposition, les racines ont été nettoyées à l'eau déionisée. Pour chaque plante, les extrémités (environ 2 cm) d'une douzaine de racines secondaires ont été coupées et placées pour une nuit à 4°C dans une solution de Carnoy (mélange d'acide acétique glacial et d'éthanol en proportion 1 :3). Pour l'observation, les racines ont été plongées pendant 10 minutes dans l'eau déminéralisée, puis ont été hydrolysées dans l'acide chlorhydrique (HCl 1 N) pendant 6 minutes à 60°C. L'ADN des racines hydrolysées a ensuite été coloré en les plongeant dans l'orcéine pendant 3 minutes à 60°C. Les lames de microscope ont été préparées en ne conservant que les apex (extrémités radiculaires). Six racines différentes ont été observées pour chaque plante. Les observations ont été réalisées au moyen d'un microscope Olympus BX41 avec un grossissement x 40 équipé d'une caméra Q imaging FA1394-RETIGA Exi permettant un comptage différé.

2.1.1.2. Test des micronoyaux par exposition directe en sol

Les graines ont été préparées (hydratation, germination) selon le protocole de la méthode normalisée. En revanche, lorsque la racine primaire a été coupée, la fève a été placée directement dans le sol d'exposition. Le sol LUFA a été utilisé comme témoin négatif, mais également comme matrice support pour les témoins positifs. Dans le cas du témoin négatif, le sol a été humidifié aux deux tiers de la capacité de rétention en eau avec de l'eau déminéralisée. Dans le cas des témoins positifs, ce sont les solutions de CdCl_2 (10^{-8} M) et d'hydrazide maléique (10^{-5} M) qui ont été apportées au sol pour l'humidifier. Puis les plantes ont été placées en phytotron (cycles de 16 heures de jour à 24°C et 8 heures de nuit à 20°C, à une humidité de 75%).

Différents temps d'exposition ont été testés de façon à déterminer la durée optimale de contact pour l'observation des micronoyaux : 2, 5 et 7 jours. Au cours des périodes d'exposition, l'humidité du sol a été contrôlée par pesée et maintenue aux 2/3 de la capacité par ajout d'eau pour le témoin négatif et le sol industriel, et par ajout de solution d'hydrazide maléique ou de chlorure de cadmium pour les témoins positifs. Après exposition, les racines sont récoltées et traitées comme dans le cas de la méthode normalisée.

2.1.1.3. Statistiques

Pour chacune des méthodologies utilisées (normalisée ou par contact direct), le dénombrement des cellules en division cellulaire (mitose) et des cellules micronucléées a été réalisé grâce au logiciel Explora nova morpho. L'indice mitotique (IM, exprimée en %) et la fréquence de micronoyaux (MN, exprimé en ‰) ont été calculés pour chaque plante, après observation d'un minimum de 2000 cellules. Les résultats pour une modalité sont présentés sous forme de moyenne \pm écart-type (avec 5 plantes).

Le test est soumis à deux critères de validité :

- un indice mitotique supérieur à 2%, c'est-à-dire que la zone de la racine observée devait présenter au moins 2% de cellules en division cellulaire (mitose). Pour cela, toutes les phases de la mitose ont été considérées, de la prophase à la télophase.
- Une réponse significative des témoins positifs.

Le test était positif pour une modalité lorsque le nombre de micronoyaux générés était significativement supérieur à celui du témoin négatif. La significativité des résultats a été déterminée par analyse de variance selon une méthode non paramétrique (test de Kruskal-Wallis couplé au test de comparaison de Dunn), les probabilités P inférieures à 0,05 étant considérées comme significatives.

2.1.2. Validation de la méthode d'évaluation de la génotoxicité d'un sol par contact direct – Application aux sols de Montardon (64)

Un triplet de sols voisins du site d'élevage de Montardon (Figure 37) a été retenu pour appliquer la méthodologie développée. Le triplet comprenait deux sols agricoles, et un sol forestier. La monoculture de maïs est pratiquée sur les 2 sols agricoles choisis : le sol sans lisier dit « SL » a toujours été fertilisé par des apports minéraux, tandis que le sol dit « L » a reçu pendant une vingtaine d'années des lisiers méthanisés de la station zootechnique. Le sol forestier a été prélevé à proximité immédiate des deux sols agricoles, dans une parcelle en forêt qui n'a jamais été cultivée.

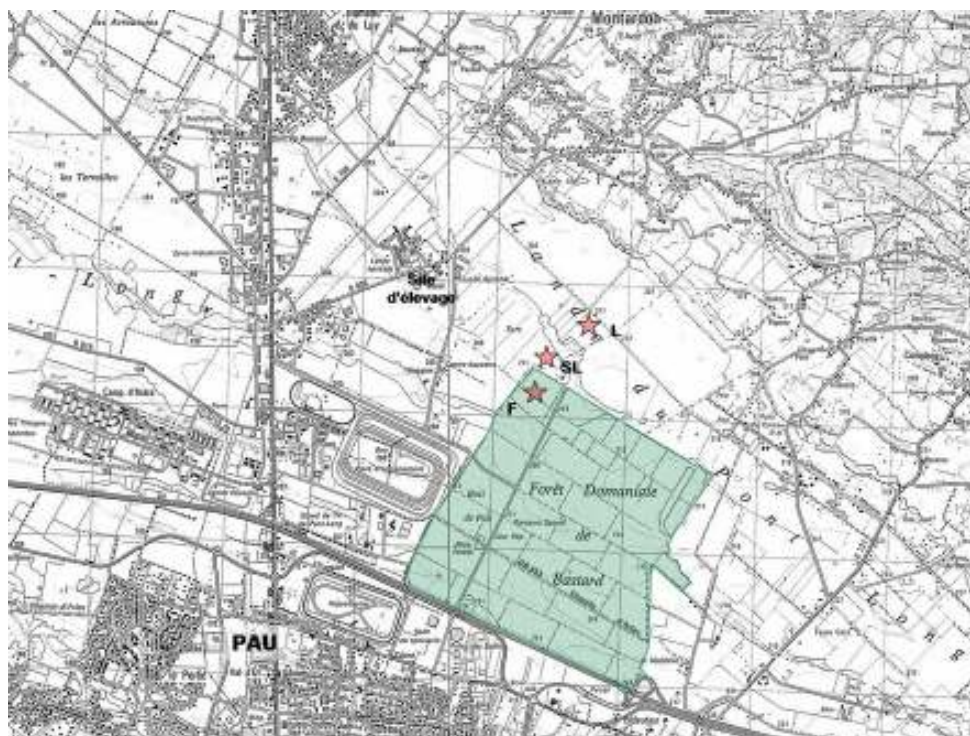


Figure 37 : Points de prélèvement des sols du « Triplet Montardon » (F : sol forestier ; SL : sol agricole fertilisation minérale ; L : sol agricole ayant reçu des lisiers méthanisés)

Selon le référentiel pédologique français (INRA, 1995) les sols de la zone d'étude sont des Veracrisols, appelés localement « sols de Touyas » (Tableau 23). En effet, à l'origine, la végétation était une chênaie acide ; celle-ci a été dégradée de manière anthropique, puis remplacée naturellement par des landes dont les essences principales étaient des ajoncs (appelés « touyes » en Béarnais, d'où l'appellation des sols), des fougères et des graminées. Ces landes ont été assainies dans les années 1960 et transformées en terres agricoles pour la monoculture du maïs. Les sols de Touyas, extrêmement riches en matière organique et caractérisés par une très forte activité biologique, reposent sur de très anciennes alluvions du Gave de Pau (Arrouays, 1995).

Tableau 23 : Caractéristiques des sols de l'étude

| Usage | F | SL | L |
|--|---------------|--|--|
| | Sol forestier | Sol agricole n'ayant jamais reçu de lisier | Sol agricole ayant reçu des lisiers méthanisés |
| Granulométrie (%) | | | |
| Argiles < 2 µm | 26 | 24 | 25 |
| Limons fins (2-20 µm) | 44 | 44 | 43 |
| Limons grossiers (20-50 µm) | 21 | 22 | 20 |
| Sables fins (50-200 µm) | 7 | 8 | 8 |
| Sables grossiers (200-2000 µm) | 2 | 2 | 4 |
| Caractéristiques | | | |
| pH _{eau} | 3,6 | 5,7 | 6,5 |
| pH _{KCl} | 3,2 | 4,6 | 5,8 |
| C % | 3,7 | 3,0 | 2,4 |
| MO % | 6,7 | 5,5 | 4,4 |
| CEC (Ca ²⁺ , cMolc.kg ⁻¹) | 0,86 | 8,07 | 4,33 |
| CEC (Mg ²⁺ , cMolc.kg ⁻¹) | 0,64 | 1,16 | 0,84 |
| CEC (K ⁺ , cMolc.kg ⁻¹) | 0,18 | 0,76 | 0,67 |
| Sommes des bases échangeables | 1,68 | 9,99 | 5,84 |
| P Truog (ppm P ₂ O ₅) | 13,4 | 74,4 | 917,6 |

Les trois sols prélevés sont homogènes au niveau de leur texture : à plus de 60% de limons, leur texture est limoneuse légère. Leur teneur en argiles est équilibrée (25%), donnant des propriétés physiques satisfaisantes.

Ces sols se caractérisent par une teneur en matière organique élevée qui dépend beaucoup de l'occupation du sol comme l'avait déjà souligné Arrouays (1995) et qui varie entre 4,5 et 7,0%. Le sol forestier est celui qui présente la plus forte teneur (6,7%). Paradoxalement, parmi les deux sols agricoles, c'est celui qui n'a jamais reçu de lisier qui est le plus riche en matière organique (5,5% contre 4,4%). Deux hypothèses peuvent être émises pour expliquer cela. La parcelle SL se trouve en bordure du bois (Figure 37) et il peut y avoir un apport de matière organique par la chute des feuilles. Mais ce qui paraît plus probable c'est que la mise en culture de cette parcelle soit postérieure à celle de parcelle L qui est plus éloignée de la forêt. Arrouays (1995) a en effet montré que ces sols voient

leur taux de carbone organique chuter très rapidement après le défrichement : les pertes sont de 50% au bout de 30 ans de monoculture de maïs.

Ses sols sont acides et leur mise en culture nécessite un chaulage. Le pH des sols agricoles est donc plus proche de la neutralité. Finalement le pH varie à l'inverse de la teneur en matière organique : très acide dans le sol sous forêt (3,6) jusqu'à proche de la neutralité dans le sol épandu avec les lisiers méthanisés.

Les cations échangeables présentent une très forte variabilité entre les trois parcelles. Dans le sol forestier, très acide, la capacité d'échange cationique est très désaturée : le taux de calcium, magnésium et potassium échangeable est donc très faible, alors qu'il est plus équilibré dans les sols agricoles.

Les apports de lisier se traduisent par une augmentation majeure du phosphore assimilable qui se retrouve en excès par rapport aux besoins des cultures. Cette augmentation est en partie liée au fait que des sédiments collectés en fond de digesteur ont également été épandus sur cette parcelle. Or, ces sédiments contiennent des phosphates de calcium et de magnésium du fait de la chute des cristaux formés sur les parois de l'échangeur thermique (p.178).

Les teneurs en éléments traces métalliques de chaque sol et de leur lixiviat ont été analysées par ICP-OES après minéralisation acide à l'eau régale (voir p. 96).

Le test des micronoyaux a été mis en place suivant la méthode normalisée, mais également par contact direct, pour chacun des trois sols. Dans le cas du sol forestier dont le lixiviat présentait un pH acide, une seconde lixiviation a été réalisée. Le pH de ce lixiviat a été ajusté à 6,5 au moyen de soude concentrée.

2.2. GENOTOXICITE DU CUIVRE ET DU ZINC DES LISIERS

L'objectif était de comparer l'effet génotoxique d'un lisier brut et d'un lisier méthanisé au moyen d'un outil de diagnostic rapide. Pour cela, seule la méthode normalisée a été appliquée.

Deux témoins ont été mis en place. La solution de Hoagland a été utilisée comme témoin négatif, tandis que le témoin positif était constitué d'hydrazide maléique (dilution à 10^{-5} M dans la solution de Hoagland). Des gammes de concentrations de lisier brut et de lisier méthanisé, ainsi que de solutions minérales de sulfate de cuivre et de sulfate de zinc ont été testées. La concentration 100%, correspondait à une quarantaine d'années d'apport de lisier par épandage. Pour effectuer cette simulation, les apports annuels décrits en p.93 ont été considérés. Ainsi, les flux liés aux épandages étant de $320 \mu\text{g Cu.kg}^{-1} \text{ sol.an}^{-1}$ et $835 \mu\text{g Zn.kg}^{-1} \text{ sol.an}^{-1}$, alors les apports d'ETM dans le sol après 40 ans d'épandage seraient de $12,8 \text{ mg Cu.kg}^{-1} \text{ sol}$ et $33,4 \text{ mg Zn.kg}^{-1} \text{ sol}$. La concentration cible pour la dose 100% était donc de 13 mg Cu.L^{-1} et 33 mg Zn.L^{-1} , soit $200 \mu\text{M Cu}$ et $500 \mu\text{M Zn}$.

Pour les solutions de lisiers, ces concentrations ont été reproduites en mélangeant les concentrés de lisier dans la solution de Hoagland de façon à obtenir une gamme comprenant les doses 100%, 50%, 10% et 1%. Les différentes solutions ont été préparées 24 heures avant utilisation par mélange d'une quantité adéquate de concentré dans 750 mL de solution de Hoagland. Elles ont

été mises sous agitation à température ambiante de façon à obtenir un produit oxygéné et le plus homogène possible. Après utilisation pour le test des micronoyaux, le pH a été mesuré et les solutions ont été filtrées à 0,45 µm. Le filtrat a été digéré à l'eau régale pour le dosage des éléments dissous (voir en p.96 pour la méthode de digestion acide).

Les solutions minérales ont été préparées de façon à obtenir une gamme de concentrations allant de 200% à 20% (Tableau 24). Dans la mesure où le cuivre et le zinc sont toujours présents simultanément dans les lisiers, une seule gamme comprenant les deux éléments a été utilisée. Pour respecter les concentrations analysées dans les concentrés de lisier, le cuivre et le zinc ont été utilisés dans une proportion unique de 1 :3, par mélange de CuSO₄ et ZnSO₄. Des solutions mères concentrées ont été préparées dans de l'eau déionisée, puis les dilutions ont été réalisées dans la solution de Hoagland pour obtenir les concentrations 200, 100, 50 et 20%.

Tableau 24 : Concentration des solutions minérales de cuivre et de zinc

| Dilution | 20% | 50% | 100% | 200% |
|-------------|-------|-------|-------|--------|
| Cuivre (µM) | 38,1 | 95,3 | 190,6 | 381,1 |
| Zinc (µM) | 112,1 | 280,3 | 560,6 | 1121,1 |

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE D'EVALUATION DE LA GENOTOXICITE D'UN SOL PAR EXPOSITION DIRECTE

3.1.1. Mise en place d'un référentiel

L'exposition, selon les conditions normalisées, des fèves aux lixiviats du sol de référence (LUFA) ou des sols contaminés n'a révélé aucune toxicité, les indices mitotiques étant toujours supérieurs au seuil de 2% (Tableau 25). Cependant, dans le cas des témoins positifs à l'hydrazide maléique et au chlorure de cadmium, les indices mitotiques ont été réduits significativement (-36% environ), mais restent supérieurs à 2%.

L'innocuité du sol LUFA a été confirmée, le nombre de micronoyaux étant du même ordre de grandeur que pour le témoin négatif. De plus, le test a montré une augmentation significative du nombre de micronoyaux dans le cas des témoins positifs (condition de validité du test), mais également dans le cas du sol industriel. Pour ce dernier, le nombre de cellules micronucléées est en effet quasiment multiplié par 6 par rapport au témoin négatif, tandis que l'indice mitotique est également significativement augmenté.

Tableau 25 : Résultats du test des micronoyaux selon la méthode normalisée

| | Indice mitotique (%) \pm ds (n=5) | Micronoyaux (‰) \pm ds (n=5) |
|---|--|-----------------------------------|
| Lixiviats | | |
| Témoin négatif (solution de Hoagland) | 9,6 \pm 3,2 | 3,2 \pm 0,5 |
| Témoin positif HM (HM 10 ⁻⁵ M) | 6,1 \pm 2,0 * | 22,1 \pm 7,9 * |
| Témoin positif Cd (Cd 10 ⁻⁸ M) | 5,9 \pm 1,5 * | 30 \pm 16,3 * |
| LUFA | 9,3 \pm 1,7 | 3,5 \pm 3,2 |
| Industriel | 15,0 \pm 3,5 * | 18,5 \pm 4,4 * |

Le test par contact direct en sol a permis un développement des plantes correct, avec des indices mitotiques toujours supérieurs au critère de validité du test (Tableau 26). Cependant, après 2 jours d'exposition, l'hydrazide maléique induit une réduction de la division cellulaire, qui s'estompe lors d'expositions de plus longue durée.

De plus, l'essai a montré un effet notable de la durée d'exposition sur l'apparition de micronoyaux (Tableau 26). Après 2 jours d'exposition, le nombre de micronoyaux induits par le sol LUFA est très faible (0,08 \pm 0,18), et l'augmentation de la fréquence d'apparition des micronoyaux est significative par rapport au témoin négatif pour toutes les modalités. L'effet est particulièrement marqué pour l'hydrazide maléique dont la réponse est du même ordre de grandeur que lors de l'exposition selon la méthode normalisée (Tableau 25), avec près de 25 micronoyaux pour 1000 cellules. En revanche, pour les autres modalités, les réponses obtenues sont de moindre amplitude qu'en hydroponie, bien que significativement différentes du témoin négatif. Après 5 jours d'exposition, les réponses des différentes modalités sont encore significatives, cependant, la réponse pour l'hydrazide maléique est diminuée par 2,5 et l'écart type est augmenté. Enfin, après 7 jours d'exposition, les réponses sont de faible amplitude, y compris pour l'hydrazide maléique ; l'augmentation du nombre de micronoyaux n'est plus significative que dans ce dernier cas.

Tableau 26 : Résultats du test des micronoyaux par contact direct

| | Indice mitotique (%) \pm ds (n=5) | Micronoyaux (‰) \pm ds (n=5) |
|---|--|-----------------------------------|
| Contact direct – 2 jours | | |
| Témoin négatif (LUFA + eau) | 13,5 \pm 3,1 | 0,08 \pm 0,18 |
| Témoin positif HM (HM 10 ⁻⁵ M) | 7,3 \pm 4,3 | 24,65 \pm 7,50 * |
| Témoin positif Cd (Cd 10 ⁻⁸ M) | 11,7 \pm 5,1 | 0,95 \pm 0,55 * |
| Industriel | 12,5 \pm 2,2 | 0,84 \pm 0,43 * |
| Contact direct – 5 jours | | |
| Témoin négatif (LUFA + eau) | 20,3 \pm 3,7 | 0,12 \pm 0,29 |
| Témoin positif HM (HM 10 ⁻⁵ M) | 21,3 \pm 4,3 | 9,78 \pm 6,21 * |
| Témoin positif Cd (Cd 10 ⁻⁸ M) | 18,8 \pm 3,1 | 1,23 \pm 0,96 * |
| Industriel | 17,6 \pm 3,2 | 0,81 \pm 0,47 * |
| Contact direct – 7 jours | | |
| Témoin négatif (LUFA + eau) | 11,6 \pm 3,1 | 0,13 \pm 0,28 |
| Témoin positif HM (HM 10 ⁻⁵ M) | 10,2 \pm 1,5 | 1,4 \pm 0,7 * |
| Témoin positif Cd (Cd 10 ⁻⁸ M) | 16,1 \pm 2,5 | 0,27 \pm 0,37 |
| Industriel | 11,5 \pm 2,8 | 0,42 \pm 0,61 |

Ainsi, une induction significative de micronoyaux a été observée quel que soit le mode d'exposition pour des sols contaminés en cadmium (par dopage d'un sol de référence) ou en plomb (sol industriel). La génotoxicité de ces deux métaux a déjà été reportée par Steinkellner *et al.* (1998). Dans leurs essais, ces auteurs ont exposé les racines de *Vicia faba* dans des solutions de nitrate de plomb et de chlorure de cadmium. Des effets significatifs ont été observés pour le plomb à des concentrations de 4 mM, les effets toxiques apparaissant pour les concentrations supérieures à 8 mM. Pour le cadmium, les effets génotoxiques ont été observés à partir de 50 mM, et les effets cytotoxiques à 200 mM. Ces concentrations sont bien supérieures à celles de l'essai présenté dans ce chapitre, où la solution de chlorure de cadmium est à 0,01 μ M, et le lixiviat du sol industriel à 391 μ M de plomb. Les différences de réponse peuvent s'expliquer par le temps d'exposition, qui n'était que de 2 heures chez Steinkellner *et al.* (1998), contre 30 heures dans nos conditions expérimentales. Le mécanisme d'action de ces métaux est relativement bien documenté. Le cadmium et le plomb appartiennent au groupe des métaux dont la toxicité est liée à l'inactivation des enzymes par liaison aux résidus -SH de la cystéine, entraînant un blocage du groupe fonctionnel de certaines enzymes (Schützendübel et Polle, 2002). Ces deux métaux interagissent en effet fortement avec le groupe sulfhydryl des protéines riches en cystéines. Parmi ces protéines, les microtubules qui régissent la migration des chromosomes représentent d'importantes cibles. L'interaction des métaux avec ces protéines va, durant la mitose, provoquer l'apparition de micronoyaux (effet aneugène). Eun *et al.* (2000) ont montré que le plomb perturbait l'alignement des microtubules de façon dose dépendante dans les racines de maïs pour des doses supérieures ou égale à 10 μ M. En revanche, l'aluminium et le cuivre n'induisaient pas d'effet sur les microtubules même lorsque leur concentration générait une diminution de la croissance des racines. Outre ces effets directs sur les microtubules, les métaux peuvent agir via le stress oxydatif sur l'ADN, et ainsi provoquer la formation de micronoyaux (p.65).

Les réponses des tests conduits en hydroponie et par contact direct sur 2 jours sont bien corrélées. Les résultats obtenus en sol ou en hydroponie présentent toutefois des ordres de grandeurs différents : en solution, 18 et 30 micronoyaux ont été dénombrés pour les contaminations en Cd et Pb respectivement, tandis qu'en sol, les valeurs ne dépassent pas 1 micronoyau. Cette différence est également observée avec le témoin négatif qui passe de 3,2 micronoyaux en hydroponie à 0,08 micronoyau en sol. En revanche, le témoin positif à l'hydrazide maléique induit un nombre de micronoyaux équivalent quel que soit le mode d'exposition. Trois hypothèses peuvent être émises pour expliquer cette différence de réponse : la physiologie de la racine, la diffusion des éléments en sol et la surface de contact entre la racine et la solution du sol.

Le milieu physique dans lequel se développent les racines peut être un élément pour expliquer la différence de réponse entre les deux modes d'exposition. En effet, pour les expositions en milieu liquide, les graines sont d'abord mises à germer en aéroponie pendant 3 jours, puis cultivées en hydroponie pendant 5 jours et enfin exposées pendant 30 heures. Dans le cas de l'exposition en sol, la phase de germination est identique, mais les graines sont ensuite placées en sol pendant 2 jours. Or Enstone et Peterson (2005) ont montré que la racine développe beaucoup plus rapidement

de la subérine au niveau de l'endoderme et de l'exoderme lorsqu'elle se développe en sol par rapport à l'hydroponie. Cette subérine est une cire imperméable qui réduit le transport actif de l'eau et des solutés au niveau des bandes de Caspary qui constituent les cellules pariétales de l'endoderme et de l'exoderme (Hose *et al.*, 2001). Ainsi, la formation de lamelles de subérine au niveau des parois cellulaires de la racine pourrait participer à sa protection en obligeant le passage par la voie symplastique, ce qui limiterait les flux de contaminants et expliquerait en partie la différence d'amplitude obtenue entre les deux méthodologies. La bibliographie ne fait pas état d'une telle différence de développement au niveau de la coiffe des racines ; cependant, nous pouvons émettre l'hypothèse que la subérisation des cellules y est également plus rapide lorsque la racine croît en sol, protégeant ainsi plus efficacement l'apex, et limitant, de fait, la formation de micronoyaux. Cette protection naturelle que la racine met en place pour croître en sol, et qui est complètement développée après 6 jours de culture d'après Enstone et Peterson (2005), pourrait également être une cause de la perte d'effet observée après 7 jours d'exposition. En effet, les plantes ne changent pas de milieu. Elles sont donc exposées aux mêmes doses de contaminant quelle que soit la durée d'exposition. La fréquence d'apparition de micronoyaux devrait être constante ou éventuellement augmenter. Ici, cette fréquence diminue, indiquant que la plante est moins affectée par le milieu extérieur.

Par ailleurs, du fait du pouvoir tampon et de la porosité du sol, l'introduction d'une solution va générer des échanges entre la phase aqueuse et la phase solide. Les éléments apportés initialement par voie dissoute peuvent ainsi se retrouver adsorbés par les colloïdes du sol, ce qui limite leur coefficient de diffusion et finalement leur phytodisponibilité. Hinsinger *et al.* (2005) rapportent que les coefficients de diffusion d'ions tels que NO_3^- , K^+ ou H_2PO_4^- sont du même ordre de grandeur dans l'eau ($1 \text{ à } 2 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$), tandis que dans le sol, ils sont très différents et beaucoup plus faibles (de 10^{-10} à $10^{-15} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$).

Enfin, la surface d'échange entre la racine et la phase aqueuse environnante est plus élevée en hydroponie qu'en sol : elle est maximale et atteint 100 % lorsque la plante est cultivée en hydroponie. Dans le sol, on peut supposer que la matrice solide, qui occupe 50% du volume total, empêche que la racine soit totalement en contact avec la solution du sol.

Cet essai a permis de déterminer un mode opératoire pour l'évaluation de l'augmentation de la fréquence d'apparition des micronoyaux dans les racines de *Vicia faba* par une exposition des racines au contact direct de la matrice solide à tester. Ainsi une exposition de deux jours en sol a permis d'obtenir des effets similaires à ceux établis par l'application de la méthode normalisée. Cependant, les réponses obtenues en sol sont de moindre amplitude que celle obtenues en hydroponie.

3.2. VALIDATION DE LA METHODE AVEC LES SOLS DE MONTARDON

Il s'agit dans cette partie de valider la méthode par contact direct en l'appliquant à des sols moyennement contaminés. Pour cela, deux sols agricoles et un sol forestier ont été retenus.

3.2.1. Analyses chimiques des sols de Montardon

Le dosage des éléments majeurs et traces métalliques dans les sols et leur lixiviat montre des différences notables entre les 3 types de sol (Tableau 27).

Tableau 27 : Teneurs en éléments traces métalliques de sols et des lixiviats

| | Sol forestier F | | Sol agricole sans lisier SL | | Sol agricole avec lisier L | |
|----------------|--------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| | Sol (mg.g ⁻¹ MS) | Lixiviat (µg.L ⁻¹) | Sol (mg.g ⁻¹ MS) | Lixiviat (µg.L ⁻¹) | Sol (mg.g ⁻¹ MS) | Lixiviat (µg.L ⁻¹) |
| pH | | 3,9 | | 5,9 | | 7,0 |
| Majeurs | | | | | | |
| Al | 5646 | 11700 | 6036 | 8342 | 5619 | 6338 |
| Ca | 828 | 2556 | 1237 | 4156 | 10529 | 17749 |
| Fe | 11498 | 4062 | 11135 | 2793 | 9996 | 2407 |
| K | 1412 | 3415 | 1606 | 5103 | 1805 | 9109 |
| Mg | 1578 | 2367 | 1699 | 1077 | 1819 | 2547 |
| Na | ND | 3902 | ND | 2391 | ND | 2778 |
| P | 268 | 326 | 419 | 28 | 3741 | 1328 |
| S | 308 | 2834 | 281 | 1379 | 401 | 1056 |
| Mineurs | | | | | | |
| Cu | 1,1 | 11 | 2,2 | 7 | 9,8 | 10 |
| Mn | 56,5 | 57 | 65,8 | 27 | 127,6 | 22 |
| Pb | 11,4 | 22 | 12,0 | 1 | 13,1 | 4 |
| Zn | 17,5 | 48 | 20,8 | < l.d. | 68,0 | < l.d. |

Le pH des lixiviats obtenus évolue linéairement par rapport au taux de matière organique dans les sols, le pH du sol forestier étant très acide (< 4,0). Ainsi, les éléments sensibles au pH tels que l'aluminium, le plomb ou le zinc ont été mis en solution, ce pourquoi ils sont dosés à de plus fortes teneurs dans le lixiviat F que pour ceux des sols agricoles. Ainsi, alors que le zinc est près de 4 fois plus concentré dans le sol ayant reçu des lisiers que dans le sol forestier, la teneur dans le lixiviat est inférieure au seuil de détection, ce qui n'est pas le cas pour le lixiviat de sol forestier. De plus, le pH de lixiviat du sol forestier (F) pouvant induire une toxicité importante pour les plantes durant le test, une deuxième expérimentation a été réalisée après ajustement du pH à 6,5 au moyen de NaOH (10 N).

3.2.2. Test des micronoyaux

Après contact direct, l'indice mitotique est significativement réduit par rapport au témoin négatif, et ce quel que soit le sol considéré (Tableau 28). Cependant, cet indice demeure supérieur au seuil de validité du test. En hydroponie, cet indice est significativement réduit pour les lixiviats dont le pH n'a pas été modifié. Pour le lixiviat du sol forestier, acide, il est inférieur à 2%, et des signes de

toxicité ont été observés (noircissement des parties aériennes) ce pourquoi le dénombrement des micronoyaux n'a pas été effectué.

Par ailleurs, en sol, l'augmentation du nombre de micronoyaux n'est pas significative pour le sol F. En revanche, l'effet est significatif pour les sols agricoles SL et L (Tableau 28). En hydroponie, l'augmentation du nombre de micronoyaux est également significative pour ces deux sols. Pour le sol F dont le pH a été ajusté à 6,5, ni l'indice mitotique ni le nombre de micronoyaux ne se distinguent du témoin négatif, ce qui démontre l'innocuité du sol F.

Tableau 28 : Indice mitotique et micronoyaux induits par les sols de Montardon et leur lixiviat

| | Indice mitotique (%) | Micronoyaux (‰) |
|--|----------------------|----------------------|
| | Moyenne ± ds (n = 5) | Moyenne ± ds (n = 5) |
| Sols | | |
| Témoin négatif | 10 ± 0,5 | 0,1 ± 0,3 |
| Témoin positif (HM 10 ⁻⁵ M) | 7,4 ± 0,6 * | 15,8 ± 1,1 * |
| F | 8,5 ± 0,9 * | 0,2 ± 0,3 |
| SL | 8,4 ± 0,9 * | 0,8 ± 0,5 * |
| L | 8 ± 0,4 | 0,9 ± 0,4 * |
| Lixiviats | | |
| Témoin négatif | 9,4 ± 0,3 | 2 ± 0,9 |
| Témoin positif (HM 10 ⁻⁵ M) | 6 ± 0,3 * | 21,6 ± 2,1 * |
| F (pH naturel) | 0,8 ± 0,3 * | - |
| F (pH ajusté à 6,5) | 10,5 ± 1,9 | 1,4 ± 1,6 |
| SL | 7 ± 0,1 * | 10,7 ± 1,8 * |
| L | 7,3 ± 0,1 * | 7,8 ± 1,9 * |

* P < 0,05 dans le test de Dunn

Il existe bien une relation entre les résultats obtenus par exposition selon la méthode normalisée ou par contact direct : les résultats sont en effet identiques pour chaque modalité, bien que les réponses soient de moindre amplitude après exposition en sol.

Ces résultats confirment que la méthode normalisée (lixiviation) et un contact direct de 2 jours entre les racines de *Vicia faba* et le sol conduisent au même diagnostic en terme d'induction de génotoxicité. La mise en application des deux méthodes sur les sols de Montardon permet donc de valider notre protocole pour un test d'évaluation rapide de la fréquence d'apparition des micronoyaux.

Par ailleurs, cet essai a permis de souligner l'impact de la lixiviation sur les propriétés de la matrice, et en particulier du pH. En effet, l'acidité du lixiviat du sol F a entraîné des effets toxiques tandis qu'aucun effet n'a été observé par contact direct pour le même sol. De même, pour le lixiviat SL, le pH légèrement acide (5,9) peut avoir eu des effets non observés en sol, tels que le passage en solution de certains éléments (fer, aluminium ou soufre, Tableau 27). Le pH a également pu avoir un effet sur des composés non analysés. Courty *et al.* (2004) ont décrit les effets du protocole de lixiviation sur l'induction de l'activité mutagène de sols urbains sur *Salmonella typhimurium* (adaptation du test de Ames). Cette activité augmentait avec la température et la durée de l'extraction (37°C / température ambiante et 24 h / 4 h), ainsi qu'avec le ratio sol / extractant (1 : 2 / 1 :10). Par ailleurs, Békaert *et al.* (2002) ont observé des effets plus marqués en utilisant un lixiviat obtenu par simple

décantation du mélange initial qu'avec un lixiviat filtré à 0,45 µM comme recommandé par la norme NF EN 12457-2 (AFNOR, 2002). Ces résultats montrent clairement que la lixiviation introduit un biais dans l'évaluation des matrices solides, pouvant conduire à une mésestimation des effets génotoxiques de cette matrice.

3.3. GENOTOXICITE DU CUIVRE ET DU ZINC DES LISIERS

L'objectif de cette partie était de comparer l'effet génotoxique d'un lisier brut ou d'un lisier méthanisé apportés au sol après une quarantaine d'années d'épandage. Cette étude devait évaluer, au moyen d'un outil de diagnostic rapide, les effets à long terme des épandages de lisier du fait de l'accumulation du cuivre et du zinc dans la couche superficielle du sol. Devant l'impossibilité de disposer de sols ayant reçu des apports équivalents de lisier brut et de lisier méthanisé une méthode de simulation des épandages a été retenue. Deux méthodes étaient alors disponibles pour l'évaluation de la génotoxicité : le contact direct dans un mélange de sol et de concentré de lisier, ou la méthode normalisée par exposition dans une solution de concentré de lisier.

L'évaluation de la minéralisation du carbone (p.109) a montré une augmentation de l'activité microbienne du sol pendant plus de 50 jours après apport des concentrés de lisier. Dans l'essai d'évaluation de la phytodisponibilité du cuivre et du zinc pour la fève (p.119), cette activité intense a entraîné un retard de croissance des plantes après apport de lisier brut à des doses équivalentes à une vingtaine d'années d'épandage, soit la moitié de la dose maximale utilisée dans cette partie. En tenant compte de l'objectif de disposer d'un essai rapide, le test par contact direct avec le sol, qui aurait nécessité plusieurs semaines de minéralisation du carbone apporté par les lisiers, ne semblait pas adapté. Par ailleurs, étant donnée la nature des concentrés de lisier à tester, il était plus aisé d'obtenir un milieu d'exposition homogène en solution qu'en sol. L'ensemble de ces raisons a motivé le choix de ne pas mettre en œuvre le test par contact direct ; seule la méthode normalisée a donc été appliquée.

3.3.1. Composition des solutions de lisier

Les résultats des analyses des éléments métalliques (Tableau 29) indiquent que le concentré de lisier méthanisé est plus riche en cuivre et zinc que celui obtenu par centrifugation de lisier brut, conformément à la composition des lisiers d'origine (voir p.83).

Tableau 29 : Compositions des fractions solides de lisier et des solutions résultantes

| Fractions solides | MO * | Cu total | Zn total |
|-------------------|-------|------------------------|------------------------|
| | % MS | mg.kg ⁻¹ MS | mg.kg ⁻¹ MS |
| Lisier Brut | 68,16 | 385 | 1162 |
| Lisier Méthanisé | 70,59 | 521 | 1758 |

* MO : matière organique assimilée à la matière sèche volatile (déterminée par calcination à 550°C)

| Solutions de lisier | | MO mg.L ⁻¹ | Cu total µM | Cu dissous µM | Zn total µM | Zn dissous µM | pH |
|---------------------|------|--------------------------|----------------|------------------|----------------|------------------|------|
| Lisier Brut | 1% | 0,2 | 2,0 | 2,1 | 5,5 | 5,9 | 6,48 |
| | 10% | 1,8 | 18,3 | 1,3 | 52,7 | 42,5 | 7,6 |
| | 50% | 11,0 | 110,0 | - | 318,4 | - | - |
| | 100% | 18,0 | 180,9 | - | 523,7 | - | - |
| Lisier Méthanisé | 1% | 0,1 | 2,1 | 1,3 | 6,5 | 3,3 | 6,31 |
| | 10% | 1,2 | 18,8 | 10,3 | 60,6 | 35,1 | 7,25 |
| | 50% | 6,1 | 92,9 | 0,9 | 302,2 | 126,9 | 7,86 |
| | 100% | 12,2 | 185,5 | - | 603,7 | - | 7,7 |

De façon à travailler à des doses de Cu et Zn équivalentes dans les solutions de lisier brut et de lisier méthanisé, les concentrés ont dû être utilisés en quantités différentes. Les concentrations totales de Cu et de Zn dans les solutions d'exposition sont ainsi du même ordre de grandeur pour les deux lisiers (Tableau 29). De même, les concentrations en éléments dissous, obtenues après filtration des solutions à 0,45 µm, sont du même ordre de grandeur entre les 2 lisiers (à dose équivalente) et pour chaque métal. Cependant, les comportements du Cu et du Zn sont très différents : Cu demeure essentiellement dans la fraction particulaire supérieure à 0,45 µm, tandis que Zn passe en solution de façon proportionnelle à la teneur totale ($r^2 = 0,95$). Le pH des solutions est dans la gamme de neutralité, avec des valeurs comprises entre 6,5 et 7,9.

3.3.2. Test des micronoyaux

Pour les solutions de lisier brut, les indices mitotiques sont supérieurs au seuil de validité du test (2%) pour la moitié des modalités (Tableau 30). Cependant pour les fortes doses (50% et 100%), les racines sont apparues noires en fin d'exposition, révélant une toxicité aiguë. De plus, leur rigidité n'a pas permis de les étaler sur lame ; elles n'ont donc pas été analysées, et les micronoyaux n'ont pas pu être dénombrés. Pour les faibles doses (1% et 10%), qui n'ont révélé aucun effet toxique, une augmentation significative du nombre de micronoyaux a été observée.

Pour les solutions de lisier méthanisé, l'indice mitotique est généralement augmenté par rapport au témoin négatif, et supérieur au seuil de validité (Tableau 30). Cependant, deux plantes exposées à la dose maximale (100%) présentaient exactement les mêmes symptômes de toxicité que celles exposées aux doses 50% et 100% de lisier brut. La génotoxicité n'a donc pas été évaluée pour cette modalité. Pour les plus faibles doses (50%, 10% et 1%), une augmentation du nombre de micronoyaux a été observée pour l'ensemble des modalités. Cette augmentation n'était significative que pour la modalité 10%.

En ce qui concerne les expositions en solutions minérales, des résultats similaires ont été obtenus. Aux fortes doses (100% et 200%), pour des concentrations supérieures à 150 µM Cu et 500 µM Zn, l'indice mitotique était inférieur au seuil de validité, bien que les racines soient en meilleur état que lors des expositions avec les concentrés de lisiers. Ces concentrations induisent donc une inhibition du développement des racines qui ne permet pas l'évaluation de l'effet génotoxique. Pour les plus faibles concentrations en cuivre et zinc, l'indice mitotique n'a pas été affecté, et une augmentation significative des micronoyaux, dépendante de la dose, a été observée (Tableau 30).

L'effet maximum a été obtenu à des concentrations de 95 μM Cu et 280 μM Zn (dose 50%), concentrations au-delà desquelles est apparue la toxicité.

Tableau 30 : Indices mitotiques et micronoyaux induits par les solutions de lisier et les solutions minérales

| | Indice mitotique (%) \pm ds (n=5) | Micronoyaux (‰) \pm ds (n=5) |
|--|--|-----------------------------------|
| Solutions de lisier | | |
| Témoin négatif (Solution de Hoagland) | 9,8 \pm 1,5 | 3,9 \pm 1,7 |
| Témoin positif (HM 10 ⁻⁵ M) | 6,3 \pm 3,0 | 19,0 \pm 5,7 * |
| Lisier Brut 1% | 11,14 \pm 3,6 | 8,8 \pm 3,6 * |
| 10% | 9,74 \pm 0,8 | 10,2 \pm 3,8 * |
| 50% | - | - |
| 100% | - | - |
| Lisier Méthanisé 1% | 10,4 \pm 2,2 | 9,4 \pm 3,6 |
| 10% | 11,1 \pm 0,9 | 14,3 \pm 4,0 * |
| 50% | 14,0 \pm 3,8 * | 9,0 \pm 4,3 |
| 100% | - | - |
| Solutions minérales | | |
| Témoin négatif (Solution de Hoagland) | 5,1 \pm 0,5 | 2,8 \pm 1,7 |
| Témoin positif (HM 10 ⁻⁵ M) | 6,7 \pm 3,1 | 30,6 \pm 8,7 * |
| 20% | 8,4 \pm 1,2 * | 21,7 \pm 4,8 * |
| 50% | 6,3 \pm 1,3 | 26,4 \pm 5,2 * |
| 100% | 1,1 \pm 0,5 | - |
| 200% | 0,3 \pm 0,1 * | - |

* test de Dunn significatif (P < 0,05)

L'étude de l'effet du cuivre et du zinc a été conduite en recherchant à maintenir des concentrations en cuivre et en zinc constantes quel que soit le traitement (lisier brut, lisier méthanisé, ou sels). Cette condition n'a pu être remplie qu'en faisant varier d'autres paramètres, dont la concentration en matière organique (Tableau 29). En effet, la digestion anaérobie permet la conversion du carbone organique en biogaz comme cela a été développé dans les chapitres précédents. Cette biodégradation se traduit par une stabilisation de la matière organique du lisier et par une concentration des éléments traces métalliques dans le produit méthanisé.

Pour une même dose de cuivre et de zinc, la solution à 50% révèle de la toxicité dans le cas du lisier brut, mais pas dans le cas de lisier méthanisé. L'apparition d'effets cytotoxiques ne semble donc pas être liée au cuivre et au zinc à ces concentrations. Ces résultats peuvent être comparés à ceux obtenus par Walter *et al.* (2006) sur des boues de stations d'épuration digérées, séchées ou compostées. Ces auteurs ont montré que les boues digérées généraient une inhibition de germination (cresson, orge et avoine) plus importante que les 2 autres types de boues, alors qu'elles contenaient moins d'éléments traces métalliques, suggérant que les composés organiques (acides gras volatils) étaient responsables de l'effet inhibiteur. Les résultats de toxicité obtenus aux plus fortes doses de lisier semblent indiquer un effet de la matière organique pour des concentrations supérieures à 10 g.L⁻¹, l'effet étant plus marqué pour le lisier brut.

Deux hypothèses peuvent être avancées quant à l'apparition d'une toxicité associée à la matière organique. La toxicité peut être induite par un problème d'anoxie de la racine, ou bien par la nature même des composés organiques présents. L'hypothèse d'anoxie peut être écartée dans la mesure où un apport régulier d'air a été assuré de façon à garantir un excès en oxygène par rapport aux besoins des plantes d'une part, et par rapport à la demande biochimique en oxygène des concentrés de lisier d'autre part. L'hypothèse liée à la présence de composés phytotoxiques dans le lisier brut, partiellement ou totalement dégradables en digestion anaérobie (acides gras volatils, phénol, p-crésol), reste donc la seule hypothèse possible pour expliquer la toxicité des deux lisiers. Cependant, nos données expérimentales ne permettent pas de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse ; des analyses supplémentaires seraient nécessaires pour la vérifier.

Par ailleurs les plus fortes concentrations de solution minérale ont également induit des effets cytotoxiques se traduisant par un indice mitotique inférieur à 2%. Dans ce cas, la toxicité ne peut être induite que par les éléments traces métalliques. Il semble alors que la toxicité de la matière organique ait masqué celle du cuivre et du zinc, en particulier dans le cas du lisier brut.

Quelles que soient les solutions d'exposition (de lisier ou minérales), pour les doses subtoxiques, une induction de la génotoxicité a été observée. L'augmentation du nombre de micronoyaux est significative pour les deux doses de lisier brut (1 et 10%) ainsi que celles de solution minérale (20 et 50%) tandis qu'elle n'est significative que pour la dose intermédiaire de lisier méthanisé (10%). L'augmentation du nombre de micronoyaux dans les solutions minérales démontre un effet génotoxique du cuivre et du zinc. Cependant, cet effet est délicat à identifier dans le cas des lisiers du fait du rôle de la matière organique (Figure 38). L'augmentation de la fréquence d'apparition des micronoyaux du fait du cuivre et du zinc est en contradiction avec les résultats obtenus par Steinkellner *et al.* (1998). Ces auteurs n'ont en effet pas observé d'augmentation significative du nombre de micronoyaux dans les racines de *Vicia faba* après leur exposition dans des solutions de sulfate de cuivre et de chlorure de zinc à des concentrations élevées (entre 0 et 125 mM pour le cuivre, et 0 à 2 000 mM pour le zinc). Cependant, les expositions étaient de courte durée (2 heures, suivies de 36 heures de récupération) pouvant expliquer l'absence d'effet génotoxique significatif.

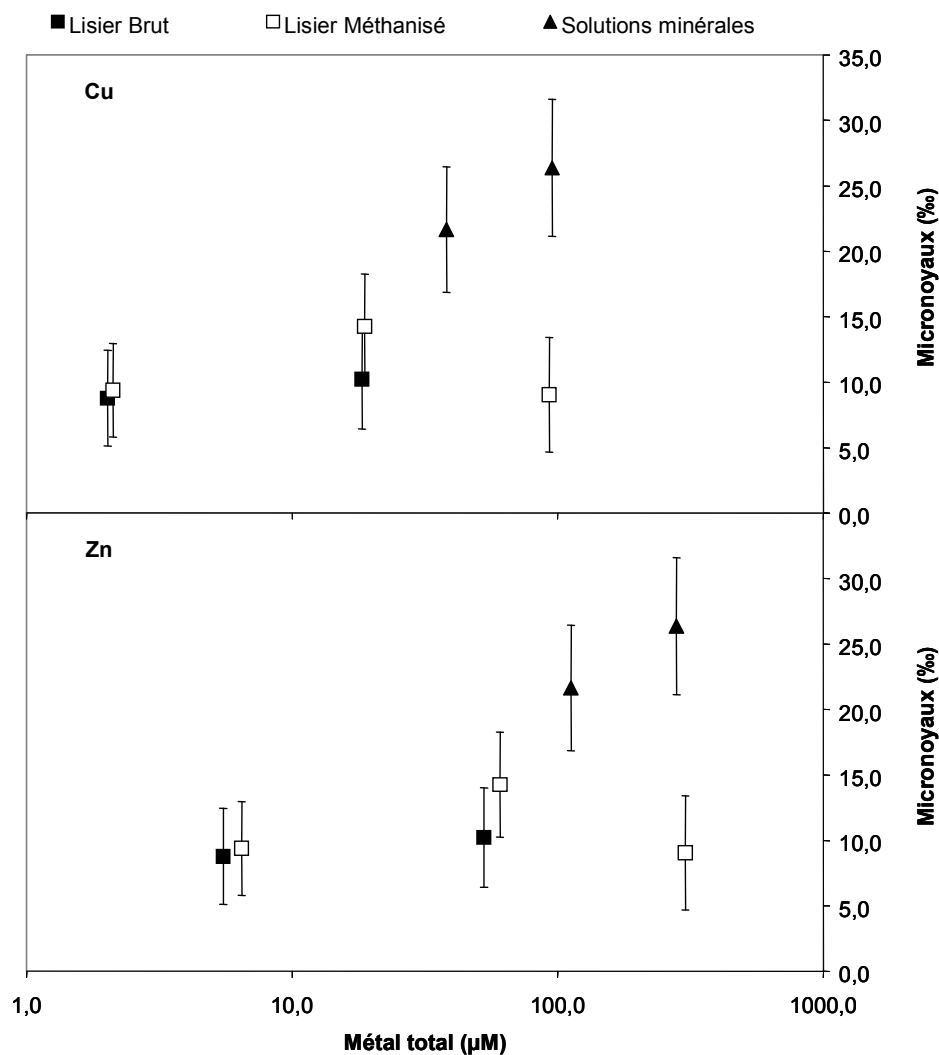


Figure 38 : Induction de micronoyaux en fonction du cuivre et du zinc total

Malgré l'effet génotoxique du cuivre et du zinc démontré par la gamme minérale, il semble qu'il n'y ait pas de relation directe entre les concentrations en cuivre et zinc dans les solutions d'exposition et la génotoxicité observée. Il existe peu de résultats dans la littérature traitant de la génotoxicité du cuivre et du zinc auxquels se référer pour mieux interpréter ces données.

Des travaux menés par le passé au sein du laboratoire (Loudes, 2002) ont montré que le zinc seul a un effet significatif sur l'apparition de micronoyaux pour des concentrations comprises entre 490 et 3 800 µM. Aux doses supérieures, l'indice mitotique devenait inférieur à 2%, traduisant un effet cytotoxique du métal. Dans l'essai présent, et dans le cas des solutions minérales, l'inhibition de la mitose apparaît dès 500 µM de zinc. Ce métal ne doit donc pas être impliqué dans la toxicité observée.

Par ailleurs, la toxicité du cuivre a été étudiée du fait notamment de la contamination des sols viticoles par les applications de bouillie bordelaise pour lutter contre le mildiou (Chaignon et Hinsinger, 2003). Ainsi, ces auteurs ont montré une inhibition de la croissance racinaire de plantes de colza pour des doses de cuivre d'environ 80 µM dans la solution nutritive. O'Dell *et al.* (2007) ont également

constaté une inhibition du développement racinaire de *Bromus carinatus* pour de concentrations en Cu^{2+} dans la solution du sol d'environ $15 \mu\text{M}$. Le cuivre a donc des effets toxiques connus sur le développement des plantes.

Le rôle du cuivre dans l'induction de stress oxydant chez les végétaux supérieurs a également été décrit par plusieurs auteurs. Ainsi, dès 1972, Mukherji et Gupta ont montré une augmentation des activités catalase et peroxydase directement proportionnelle à la concentration de cuivre. Une inhibition de la croissance était observée à 50 mM , et une inhibition de la germination à partir de 100 mM . Plus récemment, Cuypers *et al.* (2002) ont montré qu'une exposition d'une semaine à une concentration de $50 \mu\text{M}$ de cuivre est toxique pour les racines de *Phaseolus vulgaris*. En revanche, une exposition à $15 \mu\text{M}$ a permis de mettre en évidence une augmentation de l'activité des peroxydases. De même, Radetski *et al.* (2004) ont observé une augmentation des activités superoxyde dismutase, peroxydase, catalase et glutathion réductase dans les racines de *Vicia faba* après exposition à une gamme de dilution d'un lixiviat dont les concentrations en cuivre allaient de $0,14$ à $14 \mu\text{M}$). Un test de micronoyaux sur *Vicia faba* suivant la même gamme de dilution de lixiviat a montré une augmentation significative du nombre de micronoyaux à partir de $0,48 \mu\text{M}$. L'ensemble des essais relatifs à l'induction de stress oxydant ou de phytotoxicité par le cuivre répertoriés ici fait référence à des essais en solution, et donc à des concentrations en éléments dissous, voire sous forme ionique. Sur la base de ce raisonnement, la Figure 39 présente la fréquence d'apparition des micronoyaux en fonction du cuivre présent en solution (dans le filtrat obtenu à $0,45 \mu\text{m}$ pour les solutions de lisier mais également dans les lixiviats des sols agricoles de Montardon).

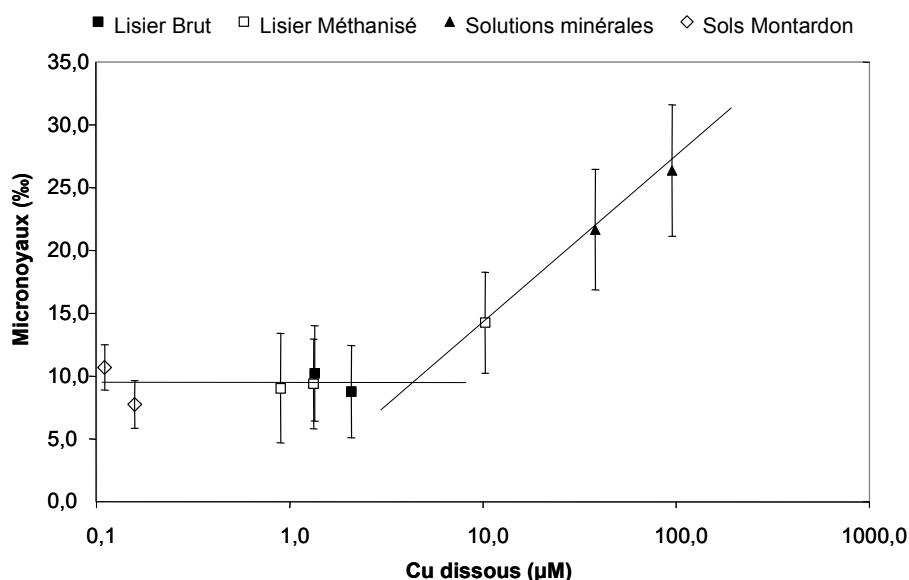


Figure 39 : Induction de micronoyaux en fonction du cuivre dissous (< $0,45 \mu\text{m}$)

Il apparaît nettement que l'induction de la génotoxicité est directement corrélée à la concentration de cuivre dissous. Pour des concentrations en cuivre inférieures à $10 \mu\text{M}$, une légère augmentation de la fréquence d'apparition des micronoyaux est observée. Cette augmentation peut être significative par rapport au témoin négatif ou non (Tableau 28 et Tableau 30). En revanche, à

partir de 10 μM , les effets deviennent systématiquement significatifs jusqu'à l'apparition de symptômes de toxicité pour des concentrations supérieures à 150 μM .

La relation entre le cuivre présent en solution et l'apparition de génotoxicité est soutenue par les mécanismes de stress oxydant, et le rôle de catalyseur que joue le cuivre dans la formation de radicaux libre HO^\bullet à partir de l'anion superoxyde $\text{O}_2^{\bullet-}$ (voir p,62). Lagadic *et al.* (1997) rapportent des travaux qui ont mis en relation l'activité peroxydase avec la concentration du cuivre dans les racines de *Zea mays*. La tendance obtenue est similaire à celle présentée ici : pour les faibles concentrations (comprises entre 3 et 20 mg Cu.kg^{-1} MS, soit entre 47 et 315 $\mu\text{M.kg}^{-1}$ MS), l'activité peroxydase était constante, puis, au-delà de 20 mg Cu.kg^{-1} MS, elle augmentait proportionnellement à la concentration en cuivre dans les racines. Plus récemment, Babar Ali *et al.* (2006) ont décrit l'évolution des activités enzymatiques antioxydantes dans des racines de *Panax ginseng*. Face un stress généré par des concentrations de cuivre comprises entre 5 et 25 μM , ces plantes étaient capables de se développer en régulant leur mécanisme de défense au stress oxydant. Pour des concentrations de 5 à 10 μM dans la solution de culture, les activités enzymatiques antioxydantes (péroxydases, réductases et catalases) étaient légèrement augmentées, puis fortement inhibées à 50 μM . En parallèle, à cette dose, la concentration en H_2O_2 et la production instantanée d' $\text{O}_2^{\bullet-}$ augmentaient dans les racines.

Enfin, la relation étroite établie entre la concentration de cuivre dissous et les effets génotoxiques confirme que, dans le cas des solutions de lisier, la toxicité était bien induite par la matière organique et non par les éléments traces métalliques. Sans apport de matière organique, le cuivre, sous sa forme dissoute, conduit à l'arrêt de la division cellulaire pour des concentrations voisines de 400 μM .

Ces observations permettent de regarder sous un nouvel angle les résultats obtenus par contact direct aux sols de Montardon, bien que la teneur en cuivre dans les solutions des différents sols n'ait pas pu être déterminée. En effet, pour ces sols, le nombre de micronoyaux augmentait avec la teneur totale en cuivre. De plus, la réalisation de l'essai normalisé sur ces sols a mis en évidence le rôle du pH. Or, ces deux paramètres vont effectivement jouer sur la teneur en cuivre disponible pour la plante. Pour des sols acides, Brun *et al.* (2001) ont effectivement observé une relation linéaire entre le cuivre échangeable (extrait au CaCl_2) et le cuivre présent dans les racines. Ainsi, si le pH n'influe pas directement sur le passage en solution du cuivre (Tyler et Olsson, 2001), il peut participer à sa phytodisponibilité. Une régression multiple prenant en compte le pH ainsi que la teneur totale en cuivre permet d'expliquer les résultats obtenus par contact direct avec les sols de Montardon et le sol LUFA : $\text{Micronoyaux} = 0,079 \times \text{pH} + 0,089 \times [\text{Cu}] - 0,148$ ($r^2 = 0,86$)

Toutefois, cette relation, qui est en accord avec un effet du cuivre sur l'apparition de micronoyaux, est à considérer avec précautions du fait du faible nombre de valeurs ayant permis de l'établir.

4. CONCLUSION

La comparaison de tests de micronoyaux sur les racines de *Vicia faba* selon deux méthodes d'exposition pour un sol dopé en cadmium et un sol industriel contaminé en plomb a conduit à un même diagnostic. Cependant, l'application de la même méthode à des sols agricoles a permis de soulever quelques limites de la méthode normalisée pour l'évaluation de la génotoxicité d'un sol ou d'une matrice solide. La lixiviation peut entraîner en effet des variations au niveau des conditions physico-chimiques du milieu, et en particulier de pH, et ainsi jouer sur le passage en solution de différents composés. Ces modifications peuvent conduire à surestimer l'effet de ces composés. Inversement, la lixiviation peut amener à sous-estimer l'effet d'autres molécules, peu hydrosolubles, ou encore mésestimer le rôle de la matière organique. Enfin, la physiologie des racines étant différentes en sol et en hydroponie, des effets peuvent apparaître en solution du fait d'une plus grande perméabilité des racines. La méthode par contact direct présente quant à elle l'avantage d'être rapide dans la mesure où la phase d'exposition suit la phase de germination sans nécessiter de phase intermédiaire de culture. De plus, elle permet de tester le sol dans son ensemble et ainsi éviter l'introduction de biais dans l'évaluation des effets génotoxiques.

Par ailleurs, le dispositif utilisé pour la comparaison des effets génotoxiques d'un lisier brut et d'un lisier méthanisé n'a pas permis de mettre en évidence de différence significative entre les deux effluents. En effet, afin d'éviter des modifications chimiques des lisiers, le choix a été fait d'apporter le produit sans l'enrichir en éléments traces métalliques. Cette méthode permettait d'éviter une augmentation artificielle de la fraction échangeable du cuivre et du zinc, et donc une augmentation de leur mobilité et de leur phytodisponibilité pour *Vicia faba*. Cependant, pour simuler une quarantaine d'années d'épandage, une quantité importante de matière organique a été apportée en une fois. Cette méthode a alors introduit un biais aux fortes concentrations. En effet, en sol, la matière organique apportée par les épandages de lisier se minéralise au fur et à mesure de son introduction, et seuls les éléments traces métalliques s'accumulent. En revanche, ce dispositif a permis de confirmer la plus grande stabilité de la matière organique après méthanisation, limitant les effets phytotoxiques.

De plus, les tests de génotoxicité réalisés selon la norme ont permis de montrer que l'apparition de micronoyaux au niveau des racines de *Vicia faba* est liée au cuivre dissous. Que le cuivre soit apporté par des produits organiques (lisiers), des sols ou des sels minéraux, et quelle que soit la dose totale, c'est la fraction présente en solution ($< 0,45 \mu\text{M}$) qui pourra conduire à l'apparition de micronoyaux. Pour des concentrations inférieures à $10 \mu\text{M}$, il semble que les plantes puissent réguler le stress lié au cuivre. Cette régulation se traduit par une légère augmentation du nombre de micronoyaux qui reste stable sur la gamme étudiée. En revanche, pour des concentrations supérieures à $10 \mu\text{M}$, les effets s'accroissent, et le nombre de micronoyaux est multiplié par 2,5 lorsque la concentration atteint $100 \mu\text{M}$. Au-delà de $150 \mu\text{M}$ de cuivre, une diminution de l'indice mitotique est observée, précédant l'apparition de symptômes de phytotoxicité. Ces observations sont en accord avec les mécanismes de stress oxydant induit par le cuivre.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

La digestion anaérobie est aujourd'hui l'objet d'un intérêt grandissant dans un contexte économique et environnemental tourné vers le développement durable. Ce procédé permet en effet la valorisation des résidus organiques qui, du fait de la loi n° 92-646 du 13 juillet 1992 relative à l'élimination des déchets ainsi qu'aux installations classées pour la protection de l'environnement, doivent être valorisés et n'entrent plus dans le cadre des déchets ultimes pouvant être stockés en centre d'enfouissement technique. Par ailleurs, la digestion anaérobie permet également la production d'une énergie renouvelable sous la forme d'un biogaz constitué principalement de méthane.

Déjà au début des années 1980, de nombreuses installations agricoles de méthanisation ont vu le jour en France pour le traitement des lisiers porcins. Nombre de ces exploitations ont rapidement cessé de fonctionner, à l'exception de la station de Montardon (64). Cependant, les digesteurs agricoles reviennent d'actualité du fait de la nouvelle tarification de l'électricité produite par valorisation du biogaz. Les conditions d'achat de l'électricité produite par les installations qui valorisent le biogaz sont fixées par l'arrêté du 10 juillet 2006. Grâce à une politique incitative, l'Allemagne a ainsi réussi depuis le début des années 1990 à développer rapidement le secteur du biogaz avec l'apparition de centaines d'unités de codigestion à la ferme. Un tel développement, guidé par une approche énergétique, ne doit cependant pas occulter le fait que la digestion anaérobie n'est pas un procédé de dégradation ultime et que des sous-produits doivent donc être pris en compte.

Ce travail de thèse s'inscrit dans cette problématique, avec pour objectif de caractériser l'effet de la méthanisation sur le devenir des éléments traces métalliques, et les risques associés aux digestats et à leur valorisation agronomique. Pour cela, le digesteur de Montardon, qui traite des lisiers porcins depuis 25 ans, a été retenu comme unité d'étude. Les lisiers porcins contiennent des quantités importantes de cuivre et de zinc du fait de la supplémentation de l'alimentation des animaux de façon à garantir leurs besoins physiologiques. Or, l'épandage des déjections animales sur les terres agricoles est quasiment systématiquement utilisé pour la valorisation de ces lisiers ; cette pratique contribue en effet au recyclage d'éléments nutritifs comme l'azote et le phosphore, ainsi qu'à l'apport de matière organique au sol. Cependant, à long terme, lorsque les épandages se répètent sur un nombre d'années important, les oligo-éléments tels que le cuivre et le zinc s'accumulent dans les sols et peuvent constituer un risque environnemental. L'étude s'est donc concentrée sur le devenir de ces deux éléments.

La description de l'unité de méthanisation a été couplée avec un bilan de masse et une analyse granulométrique des lisiers avant et après traitement par digestion anaérobie. A partir de ces résultats, une méthode de concentration du cuivre et du zinc a été développée de façon à concentrer la matière organique et les éléments métalliques dans une fraction solide. Puis, dans un deuxième temps, la stabilité de la matière organique et la répartition du cuivre et du zinc dans le lisier brut et le lisier méthanisé ont été caractérisées. La phytodisponibilité du cuivre et du zinc apportés au sol par épandage de lisier brut ou de lisier méthanisé a ensuite été évaluée par la mise en place de cultures

de fève et de maïs. Enfin, les impacts écotoxicologiques des lisiers ont été analysés par l'évaluation de l'induction de génotoxicité dans les racines de *Vicia faba*.

1. CARACTERISATION DES LISIERS AVANT ET APRES TRAITEMENT PAR METHANISATION

Un bilan de fonctionnement du procédé a tout d'abord été réalisé, comprenant une caractérisation des lisiers entrant et sortant du digesteur, ainsi que sur les sous-produits issus de la séparation de phase du digestat. Le bilan de masse du digesteur a montré la disparition de la moitié de la matière sèche volatile. Cette conversion de la matière organique en biogaz s'est traduite par un changement de répartition granulométrique des particules présentes dans le lisier. Pour le lisier brut et le lisier méthanisé, il existe une répartition bidisperse des particules, c'est-à-dire avec deux pics sur le profil de distribution des particules. Cependant, après traitement, les particules de plus petite taille (< 60 µm) sont moins présentes ; ce sont en effet ces particules qui sont majoritairement converties en biogaz. De ce fait, le lisier méthanisé présente une répartition granulométrique centrée sur des tailles de particules plus importantes (305 µm contre 67 µm pour le lisier brut).

Le bilan de masse a également montré des pertes importantes en phosphore, calcium et magnésium. Ces éléments ont été en effet quasiment diminués de moitié entre l'entrée et la sortie du digesteur. La collecte de cristaux sur les parois en inox de l'échangeur thermique du digesteur nous a permis de montrer qu'il s'agissait de phosphates de calcium et de magnésium, en accord avec les pertes observées en sortie de digesteur. Cependant, du fait du mélange de plusieurs cristaux, il a été impossible de déterminer la nature exacte de ces composés. Il est important de considérer la production de ces phosphates dans les flux de phosphore au champ. En effet, en grandissant, les cristaux finissent par se casser et s'accumuler en fond de digesteur. Ainsi, lors de vidanges techniques pour l'extraction des sédiments, le produit obtenu sera extrêmement riche en phosphore et devra être épandu en conséquence, de façon à éviter une accumulation importante de cet élément dans le sol, comme cela a été observé dans le sol agricole de Montardon ayant reçu des lisiers méthanisés, ainsi que des sédiments (p.140).

Enfin, la majorité des éléments analysés a été conservée, et en particulier l'azote, le cuivre et le zinc. La digestion anaérobie permet la minéralisation de l'azote, dont la fraction NH_4^+ devient prépondérante par rapport aux formes organiques. Cette minéralisation représente un avantage agronomique du fait d'une plus grande phytodisponibilité de l'élément. Cependant, le potentiel de volatilisation de l'azote sous forme d'ammoniac est également augmenté, et l'effluent doit être bien géré pour limiter ces pertes : l'agitation du lisier et son transfert doivent être limités, et le système d'épandage doit être également choisi pour limiter la volatilisation. Des techniques par dépôt au sol avec des pendillards ou par enfouissement direct seront donc à privilégier. L'utilisation de ces méthodes sera par ailleurs facilitée pour l'épandage d'un digestat par rapport à celui d'un lisier du fait de la faible teneur en matière sèche du digestat qui présente donc moins de risques de colmatage, à plus forte raison si une séparation de phase est mise en place en sortie du digesteur. La conservation

de l'azote se traduit en pratique par des quantités de lisier épandues équivalentes, et donc des apports de cuivre et de zinc identiques entre un lisier brut et un lisier méthanisé, dans la mesure où ces éléments sont également conservés au cours du traitement. Cette conservation de l'azote est un avantage de la méthanisation sur les autres procédés de traitements qui conduisent en général à abattre l'azote des lisiers : les doses épandues étant toujours calculées en fonction de l'azote, les autres traitements conduisent indirectement à augmenter, jusqu'à 10 fois, les flux de métaux au sol (Nicholson, 2007).

L'analyse de leur répartition granulométrique dans le lisier méthanisé a par ailleurs montré que le cuivre et le zinc sont essentiellement associés aux particules dont le diamètre est compris entre 3 et 25 μm . Cette répartition peut être expliquée par la forte affinité de deux métaux pour la biomasse, et par les mécanismes de biosorption des cations métalliques aux parois cellulaires des bactéries. Ce résultat est important à prendre en considération dans le cadre de la mise en place de filières de gestion des lisiers. En effet, une séparation à 250 μm s'est avérée inefficace pour concentrer ces éléments dans une fraction solide. Peu d'études ont été conduites pour évaluer l'efficacité de séparation des oligo-éléments des lisiers, mais différents travaux (Møller *et al.* 2000, 2002) ont été conduits sur l'azote ou le phosphore, montrant que les techniques simples (vis presseuse, tamis centrifuge) utilisant des tamis de maille relativement large (quelques centaines de micromètres à quelques millimètres) ne sont pas efficaces. En revanche, les techniques utilisant la centrifugation permettent d'améliorer de façon significative l'efficacité de séparation de la matière sèche et du phosphore. Des études similaires seront donc à réaliser pour les éléments traces métalliques. Dans le cas d'une agriculture raisonnée et d'une gestion des flux d'ETM au champ, il conviendra donc d'adapter la technique de séparation liquide / solide des lisiers méthanisés, ainsi que de raisonner le devenir des ETM en association avec celui des éléments majeurs (N, P, K) à partir desquels seront déterminées les quantités d'effluents à apporter au sol.

Cette première partie liant la granulométrie des particules et les teneurs en cuivre et en zinc dans le lisier brut et le lisier méthanisé a permis de mettre au point une technique pour concentrer les éléments traces métalliques et la matière organique dans une fraction solide, tout en s'affranchissant de quantités importantes d'azote ammoniacal. Ces produits, appelés concentrés, ont été utilisés pour la suite des expérimentations.

Les différentes méthodes mises en œuvre pour caractériser la matière organique et la répartition du cuivre et du zinc ont montré des différences significatives entre un lisier brut et un lisier méthanisé.

La stabilité de la matière organique présente dans un lisier brut ou dans un lisier méthanisé a été appréhendée selon quatre approches : une caractérisation par spectroscopie infrarouge, une caractérisation biochimique de la matière (CBM), une analyse élémentaire couplée à une modélisation des « groupements atomiques fictifs » et une minéralisation du carbone en sol. Les différents profils obtenus présentent d'importantes analogies qui peuvent s'expliquer par le fait que les lisiers sont produits dans un contexte anaérobie (appareil digestif de l'animal). Cependant, la quasi-totalité des éléments étudiés révèlent des différences significatives entre les deux produits qui vont dans le sens d'une stabilisation générale de la matière organique des lisiers. La spectroscopie infrarouge a montré

une réduction des fonctions caractéristiques des chaînes aliphatiques dans le lisier méthanisé qui n'a cependant pas pu être quantifiée par cette approche. En revanche, une diminution significative de la fraction soluble dans la caractérisation biochimique de la matière a permis d'estimer cette perte à environ 45% de la masse initiale. L'indice de stabilité biologique n'ayant pas été discriminant entre les deux lisiers, nous avons appliqué une approche selon les « groupements atomiques fictifs ». Cette méthode a permis de mieux différencier les deux produits ; le degré de polymérisation et le poids moléculaire calculés pour le lisier méthanisé ont été diminués par rapport au lisier brut. De plus, la matière organique résiduelle présente un degré d'oxydation supérieur du fait de la production d'un biogaz riche en méthane, conduisant à perdre plus d'hydrogène que d'oxygène. La méthanisation permet donc le retour au sol d'un résidu organique dans lequel le carbone est moins réduit et la matière organique plus stable. L'évolution dans le sol de ce résidu consommera moins d'oxygène que celle d'un lisier brut. Cela a été confirmé par la mesure directe de la cinétique de minéralisation du carbone en sol : la quantité de carbone apportée par un lisier méthanisé et minéralisée en 50 jours était inférieure de 30% à celle apportée par un lisier brut.

L'étude de la répartition du cuivre et du zinc dans les concentrés de lisier a révélé des différences de comportement entre les deux éléments et entre les deux lisiers lors d'une extraction séquentielle permettant la distinction de fractions échangeable, associées à la matière organique ou aux carbonates, et résiduelle. Dans le lisier brut, le cuivre est essentiellement associé à la matière organique, tandis que le zinc est principalement associé aux carbonates. Après méthanisation, les modifications dans la répartition sont significatives entre le lisier brut et le lisier méthanisé pour chaque élément : la fraction organique est réduite, et la fraction résiduelle, la plus stable, est augmentée, représentant environ un quart des quantités totales pour le cuivre et le zinc. Cependant, le cuivre demeure majoritairement dans la fraction associée à la matière organique qui représente encore plus de 50% de l'élément total, et le zinc associé aux carbonates augmente pour constituer près des 2/3 des quantités totales. Ces méthodes de fractionnement chimique sont utilisées pour évaluer la phytodisponibilité des éléments. Or, ici la méthanisation a conduit à une augmentation de la fraction la plus stable (fraction résiduelle), considérée comme peu ou pas phytodisponible. Cette approche semble donc indiquer une réduction de la phytodisponibilité des éléments traces métalliques suite à la méthanisation, en accord avec ce qui est généralement décrit dans la littérature. Cependant, la fraction résiduelle ne représente que 25% des quantités totales de cuivre et de zinc, et il est plus probable que le devenir du cuivre et du zinc soit principalement lié à celui des fractions majoritaires : la phytodisponibilité du cuivre serait alors dépendante de la minéralisation de la matière organique en sol, tandis que le celui du zinc serait étroitement lié aux évolutions du pH dans le sol du fait de la sensibilité des carbonates à ce paramètre. Selon ces hypothèses, les devenirs du cuivre et du zinc apportés par un lisier brut ou un lisier méthanisé présenteraient des analogies, la fraction liée à la matière organique étant toujours majoritaire pour le cuivre, et celle liée aux carbonates étant toujours majoritaire pour le zinc.

Enfin, les différences observées entre lisier brut et lisier méthanisé lors du dosage des éléments obtenus dans les fractions de la CBM étaient moins marquées, l'essentiel du cuivre et du zinc étant extrait dans la fraction soluble pour chacun des lisiers. Ce résultat peut s'expliquer par la

granulométrie du dispositif de filtration d'une part (plusieurs dizaines de μm), mais également par la forte affinité du cuivre et du zinc pour les parois bactériennes auxquelles ils se lient par biosorption et qui sont solubilisées par le premier réactif de la CBM.

L'extraction séquentielle et la minéralisation du carbone en sol pourraient être couplées dans une nouvelle série d'essais de façon à évaluer plus précisément la phytodisponibilité du cuivre et du zinc des lisiers brut et méthanisé. Dans ces deux approches, les quantités d'azote apportées au sol peuvent être importantes, et les produits pourraient être apportés sans centrifugation préliminaire sur différents sols couvrant une large gamme de pH. Le fractionnement chimique pourrait être réalisé en début d'essai, puis selon le même pas de temps que le dosage du carbone produit par l'activité microbienne. En parallèle, le pH du sol pourrait également être mesuré.

L'effet principal de la méthanisation des lisiers de porcs est donc essentiellement observable sur la matière organique. Cet élément sera particulièrement important à considérer dans le cadre de la mise en place de filières de traitement des lisiers, en particulier dans le cas d'une séparation de phase en vue de l'obtention d'un amendement organique. A l'heure actuelle, la norme AFNOR NF U 44-051 impose que les digestats soient mélangés à des matières végétales et subissent un « compostage caractérisé », c'est-à-dire un « processus de décomposition et de transformation contrôlées [...] sous l'action de populations microbiennes évoluant en milieu aérobie ». Ce traitement est caractérisé par une augmentation initiale de la température, une perte de masse et de volume, une homogénéisation du produit, une humification des produits et un degré de maturité en relation avec l'usage. Des travaux pourraient donc être réalisés pour mieux caractériser le post-traitement aérobie des digestats de lisier porcin seuls ou en mélange. Ils permettraient ainsi de valider ou d'infirmer le fait que les amendements produits répondraient aux spécifications de la norme AFNOR NF U 44-051 sans qu'il soit nécessaire de co-composter les digestats avec des matières végétales.

2. EVALUATION DE LA PHYTODISPONIBILITE DE CU ET ZN DES LISIERS BRUT ET METHANISE

Dans cette partie, nous avons évalué la phytodisponibilité du cuivre et du zinc apportés par épandage de lisier brut ou lisier méthanisé à moyen et long terme. Les apports de lisier d'une vingtaine et d'une centaine d'années d'épandage ont été simulés par mélange des concentrés de lisier avec un sol de façon à constituer des supports de cultures pour des plantes de fève et de maïs. Après apport de lisier et 7 semaines de culture, les concentrations dans les plantes ont été significativement augmentées, mais elles sont restées dans la gamme de concentration d'élément indispensable et non de phytotoxique : l'absorption de cuivre et de zinc n'a induit aucune diminution de rendement. Le cuivre et le zinc apportés par le lisier brut et le lisier méthanisé ont donc été absorbés par les végétaux.

Ces deux cultures n'ont pas permis de mettre en évidence de différence de phytodisponibilité du cuivre et du zinc apportés par un lisier brut ou un lisier méthanisé. Ces résultats sont en accord avec les hypothèses qui ont été émises à partir des résultats de l'extraction séquentielle. En revanche, les essais ont souligné l'effet de la méthanisation sur la stabilité de la matière organique. En effet, dans le cas où les semis ont été réalisés sans une minéralisation préalable du carbone apporté par les concentrés de lisiers (culture de fève), l'apport de lisier brut a entraîné des perturbations de croissance qui n'ont pas été observées avec le lisier méthanisé. Ces perturbations peuvent être expliquées soit par une compétition pour l'azote entre la biomasse bactérienne et la culture, soit par des dégagements importants de CO₂ dans le support de culture, du fait de la minéralisation du carbone, qui génèrent des conditions défavorables pour les végétaux.

Après apport des concentrés de lisier au sol, les coefficients d'absorption du cuivre ont été augmentés pour les racines dans le cas d'apport de lisier et ont été diminués pour les parties aériennes, traduisant une accumulation de l'élément dans les racines et une régulation de la translocation vers les parties aériennes. Ces variations semblent indépendantes des apports par le support de culture, et aucun effet dose n'a été observé. Les concentrations dans le végétal sont donc constantes : aucune différence significative d'absorption n'a été observée après apport de lisier brut ou de lisier méthanisé. Dans un contexte de consommation de luxe, les coefficients apparents d'utilisation étaient donc principalement contrôlés par la concentration en cuivre total dans le support de culture.

Pour le zinc, les coefficients d'absorption ont été augmentés dans les racines et les parties aériennes, en relation avec une plus grande mobilité de l'élément au sein du végétal. De plus, l'augmentation de la concentration dans le végétal était corrélée à la concentration totale en zinc du support de culture. Cette relation a pu être améliorée en intégrant le facteur pH, pour lequel le zinc a montré une grande sensibilité, en accord avec les résultats obtenus par une approche chimique de la phytodisponibilité (p.112).

Finalement, la proportion du cuivre et du zinc apportés par les lisiers sur de très longues périodes qui se retrouve dans les parties aériennes est très faible : de l'ordre de quelques pour cent. Cela signifie qu'il y aura bien une accumulation de cuivre et de zinc dans les sols recevant des lisiers porcins sur de longues périodes. En revanche, une proportion presque dix fois plus importante, notamment pour le cuivre, est absorbé par les racines et y reste. L'extrapolation de ces résultats à une culture en plein champ se traduirait par des exportations hors de la parcelle faibles, et une accumulation du cuivre et du zinc absorbés par le végétal au niveau des racines. Or, ces racines vont rester dans le sol et évoluer dans le temps, ce qui pourrait rendre les ETM plus mobiles et/ou phytodisponibles. Ainsi, il apparaît important que les parcelles recevant des lisiers disposent le plus possible d'une couverture végétale quasi-permanente, de façon à éviter le lessivage des fractions piégées dans les racines pouvant être solubilisées à la mort du végétal et pouvant migrer dans le profil du sol.

L'ensemble de ces résultats confirme une plus grande phytodisponibilité du zinc que du cuivre pour les végétaux supérieurs, et ce même dans le cas où les apports sont effectués sous forme organique. Cependant, dans cet essai, la totalité du cuivre contenu dans le lisier n'a pas été

considéré, dans la mesure où les supports de culture ont été préparés avec des concentrés de lisier obtenus par centrifugation. L'efficacité de séparation du cuivre au niveau de cette opération a été d'environ 80%, et la fraction la plus disponible de cuivre a vraisemblablement été ignorée du fait de son élimination dans le centrat. Cela n'a pas été le cas pour le zinc dans la mesure où l'efficacité de séparation de cet élément était proche de 100%. La phytodisponibilité du cuivre a donc vraisemblablement été sous-estimée, la fraction de cuivre perdue dans le centrat couvrant largement, à elle seule, les besoins des cultures.

Par ailleurs, aucune différence significative de phytodisponibilité n'a pu être mise en évidence pour des éléments apportés par des lisiers bruts ou des lisiers méthanisés. De nouveaux essais pourraient être conduits en mettant en œuvre une gamme de concentration pour chacun des lisiers, et pour différents sols. De plus, la différence entre fève et maïs n'est pas flagrante : plusieurs doses testées sur la même plante permettraient de conclure sur les différences entre céréales et légumineuses. La réalisation d'essais de plus longue durée, permettant l'obtention de fruits, permettrait de plus d'évaluer les différences en terme d'impact pour la chaîne alimentaire. Ils permettraient enfin de modéliser la part des ETM réellement accumulée dans le sol à moyen ou long terme, du fait des épandages de lisier porcin.

3. EVALUATION DE LA GENOTOXICITE DE CU ET ZN DES LISIERS BRUT ET METHANISE

La comparaison de la génotoxicité d'un lisier brut et d'un lisier méthanisé a été réalisée par évaluation de la fréquence d'apparition des micronoyaux dans les racines de *Vicia faba* exposées à des solutions de différentes concentrations des concentrés de lisier. Ce dispositif a confirmé la stabilité de la matière organique déjà observée lors de la caractérisation des concentrés de lisiers et de l'essai de phytodisponibilité. En effet, pour simuler une quarantaine d'années d'épandage et atteindre des concentrations totales en cuivre et en zinc de l'ordre de 13 et 33 mg.L⁻¹, des quantités importantes de concentrés de lisier brut ou méthanisé ont été mises en solution. Ainsi, aux fortes concentrations, la quantité de matière organique dans la solution d'exposition était importante, et introduisait un biais qui s'est traduit par une phytotoxicité pour la fève. En effet, en sol, la matière organique apportée par les épandages de lisier se minéralise au fur et à mesure de son introduction, et seuls les éléments traces métalliques s'accumulent. Cependant, nous avons jugé préférable d'introduire un biais du fait de la matière organique plutôt que de doper les concentrés de lisiers au moyen de sels métalliques, ce qui aurait modifié considérablement le fractionnement chimique du cuivre et du zinc, en augmentant leur mobilité et leur phytodisponibilité. La stabilisation de la matière organique après méthanisation a été confirmée par le fait que, pour des concentrations équivalentes de matière organique dans les solutions d'expositions, le lisier brut s'est avéré plus phytotoxique. Pour les doses subtoxiques, le test n'a finalement pas permis de discriminer les deux lisiers en terme de génotoxicité.

En revanche, ces résultats couplés à ceux obtenus par exposition de la fève à des solutions de CuSO_4 et de ZnSO_4 , ainsi qu'à des lixiviats de sols agricoles semblaient montrer que l'apparition de micronoyaux au niveau des racines de *Vicia faba* est liée au cuivre dissous ($< 0,45 \mu\text{m}$). Alors qu'aucune relation n'avait pu être établie entre les concentrations en cuivre et en zinc total et le nombre de micronoyaux, la prise en compte du cuivre dissous a permis d'identifier un seuil au-delà duquel la fève n'est plus capable de réguler le stress oxydant généré par le cuivre, conduisant à l'apparition d'un effet génotoxique marqué. Pour les fortes concentrations, soit environ $150 \mu\text{M}$ de cuivre, les premiers symptômes de phytotoxicité apparaissaient.

La réalisation à venir d'essais sur des solutions minérales de sulfate de cuivre et de sulfate de zinc seuls ou en mélange permettra de valider ou d'infirmer cette hypothèse. De même, des tests réalisés sur des solutions de sols présentant des caractéristiques variées, et différents niveaux de contamination en cuivre, ou encore sur des lixiviats de déchets ou de boues pourraient être conduits pour l'étayer. Enfin, afin de répondre à la différence de génotoxicité du cuivre apporté au sol par épandage de lisier brut et de lisier méthanisé, des prélèvements de la solution du sol pourraient être réalisés au cours de l'essai de minéralisation en sol de ces produits.

Par ailleurs, une méthode d'évaluation de la génotoxicité par exposition des racines de *Vicia faba* au contact direct du sol a été développée. Pour des sols contaminés en plomb (site industriel) ou en cadmium (sol dopé), le protocole retenu, basé sur le développement des racines secondaires dans le sol à tester pendant 48 heures, a permis d'obtenir un diagnostic équivalent à celui obtenu par application de la méthode normalisée (NF T 90-327). L'intensité des réponses en sol était beaucoup plus faible que celle des réponses en hydroponie, vraisemblablement en relation avec la physiologie de la racine dans chacun de ses milieux, mais sans altérer la significativité des résultats.

Cette méthode présente l'intérêt de travailler dans des conditions les plus proches de celles du terrain, et d'éviter une étape de lixiviation. Cet intérêt a été particulièrement mis en valeur par l'évaluation de sols agricoles et forestier selon notre méthode en sol et la méthode normalisée. Le lixiviat obtenu pour le sol forestier a présenté des signes de toxicité tandis que l'exposition en sol montrait une absence d'effet. Ainsi, la lixiviation peut entraîner des variations au niveau des conditions physico-chimiques du milieu, et en particulier de pH, et ainsi jouer sur le passage en solution de différents composés ; ces modifications peuvent conduire à surestimer l'effet de ces composés. Inversement, la lixiviation peut amener à sous-estimer l'effet d'autres molécules, peu hydrosolubles, ou encore à mésestimer le rôle de la matière organique.

Un autre intérêt de la méthode en sol proposée est sa courte durée. En effet, la phase d'exposition suit la phase de germination sans nécessiter de phase intermédiaire de culture, recommandée dans la méthode normalisée pour permettre le développement de racines secondaires.

En conclusion, ce test en sol pourra être aisément couplé aux tests agronomiques classiquement utilisés pour l'évaluation de la qualité d'un sol ou d'un amendement organique tels que l'inhibition de la germination, de l'émergence ou de la croissance d'un végétal développées dans les normes éditées par l'AFNOR (NF ISO 11269-1, 1993 et NF ISO 11269-2, 2005 ; X31-201, Octobre 1982).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Directive du Conseil n° 91/676/CEE du 12 décembre 1991 concernant la protection des eaux contre la pollution par les nitrates à partir de sources agricoles. *Journal Officiel de la Communauté Européenne*, L 375, 1991.

AFNOR, 1982. X31-201. Qualité des sols - Essai d'inhibition de germination de semences par une substance. 6 p.

AFNOR, 1993. ISO 11269-1. Qualité du sol. Détermination des effets des polluants sur la flore du sol. Partie 1 : méthode de mesurage de l'inhibition de la croissance des racines. 16 p.

AFNOR, 1993. NF V03-040. Produits agricoles et alimentaires - Détermination de la cellulose brute - Méthode générale. 12 p.

AFNOR, 1993. NF X31-121. Qualité des sols - Méthodes chimiques - Détermination du cuivre, du manganèse, du zinc et du fer - Extraction en présence de DTPA. 8 p.

AFNOR, 1995. Norme NF ISO 11466. Extraction des éléments en traces solubles dans l'eau régale. In : *Qualité du sol, Volume 1. Paris : éditions AFNOR, 1999, 458-464.*

AFNOR, 2000. Norme NF ISO 13320-1. Analyse granulométrique – Méthode par diffraction laser – Partie 1 : principes généraux. 44 p.

AFNOR, 2000. Norme NF EN 12579. Amendement organique et sol – Echantillonnage. 16 p.

AFNOR, 2002. NF EN 12457-2. Caractérisation des déchets - Lixiviation - Essai de conformité pour lixiviation des déchets fragmentés et des boues - Partie 2 : essai en bûchée unique avec un rapport liquide-solide de 10 l/kg et une granularité inférieure à 4 mm (sans ou avec réduction de la granularité). 29 p.

AFNOR, 2003. NF X31-120. Qualité des sols - Détermination du cuivre, du fer, du manganèse et du zinc - Extraction par l'acétate d'ammonium en présence d'EDTA. 7 p.

AFNOR, 2004. NF T 90-327. Qualité du sol - Évaluation des effets génotoxiques sur végétaux supérieurs - Évaluation de la fréquence d'apparition de micronoyaux dans les racines secondaires de *Vicia faba*. 13 p.

AFNOR, 2005. ISO 11269-2. Qualité du sol - Détermination des effets des polluants sur la flore du sol - Partie 2 : effets des substances chimiques sur l'émergence et la croissance des végétaux supérieurs. 18 p.

Agreste, 2002. Des élevages porcins toujours plus gros. *Agreste Primeur*, **108**, 4 p.

Alloway B.J., 1995. Heavy metals in soils. *Blackie Academic & Professional, London*, 2nd Edition, 368 p.

Alloway B.J., 2004. Zinc in soils and crop nutrition. *International Zinc Association (IZA), Brussels, Belgium*, 116 p.

Alonso Alvarez E., Callejon Mochon M., Jimenez Sanchez J.C., Ternero Rodriguez M., 2002. Heavy metal extractable forms in sludge from wastewater treatment plants. *Chemosphere*, **47**, 765-775.

Ames B., Dusrton E., Yamasaki E., Lee F., 1973. Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenate for activation and bacteria for detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **70**, 2281-2285.

Amir S., Hafidi M., Merlina G., Revel J.C., 2005. Sequential extraction of heavy metals during composting of sewage sludge. *Chemosphere*, **59**, 801-810.

Anderson G.K., Yang G., 1992. Determination of bicarbonate and total volatile acid concentration in anaerobic digesters using a simple titration. *Water Environment Research*, **64 (1)**, 53-59.

- Arrouays D.**, 1995. Analyse et modélisation spatiales de l'évolution des stocks de carbone organique des sols à l'échelle d'un paysage pédologique : application de l'étude des sols de « touyas » du piémont pyrénéen. *Thèse de doctorat*, 152 p.
- Artola A., Rigola M.**, 1992. Selection of optimum biological sludge for zinc removal from wastewater by a biosorption process. *Biotechnology Letters*, **14 (12)**, 1199-1204.
- Artola A., Martin M., Balaguer M., Rigola M.**, 2000. Isotherm model analysis for the adsorption of Cd(II), Cu(II), Ni(II) and Zn(II) on anaerobically digested sludge. *Journal of Colloid and Interface Science*, **232**, 64-70.
- Arzul G., Maguer J.F.**, 1990. Influence of pig farming on the copper content of estuarine sediments in Brittany, France. *Marine Pollution Bulletin*, **21**, 431-434.
- Babar Ali M., Hahn E.J., Paek K.Y.**, 2006. Copper-induced changes in the growth, oxidative metabolism, and saponin production in suspension culture roots of *Panax ginseng* in bioreactors. *Plant Cell Reports*, **25**, 1122-1132.
- Baize D.**, 1997. Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols (France). Références et stratégies d'interprétation. *INRA Edition, Paris (France)*, 410 p.
- Barona A., Romero F.**, 1997. Relationships among metals in the solid phase of soils and in wild plants. *Water, Air and Soil Pollution*, **95**, 59-74.
- Batey T., Berryman C., Line C.**, 1972. The disposal of copper-enriched pig-manure slurry on grassland. *Journal of the British Grassland Society*, **27**, 139-143.
- Békaert C., Ferrier V., Marty J., Pfohl-Leszkowicz A., Bispo A., Jourdain M.J., Jauzein M., Lambolez-Michel L., Billard H.**, 2002. Evaluation of toxic and genotoxic potential of stabilized industrial waste and contaminated soils. *Waste Management*, **22**, 241-247.
- Béline F.**, 2001. Le traitement biologique aérobie du lisier de porc. *Cemagref Editions, Rennes (France)*, 134 p.
- Bernard C.R., Héduit M.**, 1979. Evolution du lisier de porcs au cours du stockage. *Journées de la Recherche porcine*, **11**, 177-184.
- Bernal M.P., Paredes C., Sanchez-Monedero M.A., Cegarra J.**, 1998. Maturity and stability parameters of composts prepared with a wide range of organic wastes. *Bioresource Technology*, **63**, 91-99.
- Bitton G.**, 1994. Wastewater microbiology. *Wiley-Liss, Inc., New-York*, 478 p.
- Bolan N.S., Khan M.A., Donaldson J., Adriano D.C., Matthew**, 2003. Distribution and bioavailability of copper in farm effluent. *Science of the Total Environment*, **309 (1)**, 225-236.
- Bourbonnais G.**, (2007).
http://ici.cegep-ste-foy.qc.ca/profs/gbourbonnais/pascal/nya/botanique/powerpoint/botanique_4.ppt#15
- Bourelle P.H., Berthelin J.**, 1998. Contamination des sols par les éléments en traces. *Tec & Doc-Lavoisier*, 440 p.
- Brummer G.W., Gerth J., Herms U.**, 1986. Heavy metal species, mobility and availability in soils. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde*, **149**, 382-398.
- Brun L.A., Maillet J., Hinsinger P., Pépin M.**, 2001. Evaluation of copper availability to plants in copper-contaminated vineyard soil. *Environmental Pollution*, **111**, 293-302.
- Brusick D., Mayer W.**, 1973. New developments in mutagenicity screening techniques with yeast. *Environmental Health Perspectives*, **6**, 83-96.
- Burton C.H., Turner C.**, 2003. Manure management. Treatment strategies for sustainable agriculture. *Silsoe Research Institute*, 2nd Edition, 451 p.
- Buswell A.M., Mueller H.F.**, 1952. Mechanism of methane fermentation. *Industrial and engineering chemistry*, **44 (3)**, 550-552.
- Callaghan F.J., Wase D.A.J., Thayanithy K., Forster C.F.**, 1998. An examination of the continuous anaerobic codigestion of cattle slurry and fish offal. *Process Safety and Environmental Protection*, **76 (B3)**, 224-228.

- Callender I.J., Barford J.P.**, 1983. Precipitation, chelation, and the availability of metals as nutrients in anaerobic digestion. I. Methodology. *Biotechnology and Bioengineering*, **25**, 1947-1957.
- Canet R., Pomares F., Tarazona F., Estela M.**, 1998. Sequential fractionation and plant availability of heavy metals as affected by sewage sludge applications to soil. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, **29 (5-6)**, 697-716.
- Cathala N., Salsac L.**, 1975. Absorption du cuivre par les racines de maïs (*Zea mays L.*) et de tournesol (*Helianthus annuus L.*). *Plant and soil*, **42 (1)**, 65-83.
- Cecchi M., Dumat C., Pradere P., Bidegain R., Pinelli E., Guisresse M.**, 2006. Lead behaviour in a contaminated calcic cambisol profile. *18th World Congress of Soil Science*, July 9-15th, Philadelphia, Pennsylvania, USA.
- Chaignon V.**, 2001. Biodisponibilité du cuivre dans la rhizosphère de différentes plantes cultivées. Cas de sols viticoles contaminés par des fongicides. *Thèse de doctorat*, 167 p.
- Chaignon V., Sanchez-Neira I., Herrmann P., Jaillard B., Hinsinger P.**, 2003. Copper bioavailability and extractability as related to chemical properties of contaminated soils from a vine-growing area. *Environmental Pollution*, **123 (2)**, 229-238.
- Chaignon V., Hinsinger P.**, 2003. A biotest for evaluating copper bioavailability to plants in a contaminated soil. *Journal of Environmental Quality*, **32**, 824-833.
- Chenon P.**, 2001. Evaluation du pouvoir toxique, génotoxique et tératogène de boues de stations d'épuration valorisées en agriculture. *Thèse de doctorat*, 204 p.
- Christie P., Beattie J.A.M.**, 1989. Grassland soil microbial biomass and accumulation of potential toxic metals from long-term slurry application. *Journal of Applied Ecology*, **26**, 597-612.
- Cimino G., Toscano G.**, 1993. Effects of digested sewage sludge on yield and heavy metal accumulation in horticultural species. *Bioresource Technology*, **46**, 217-220.
- Clemente R., Escolar A., Bernal M.P.**, 2006. Heavy metals fractionation and organic matter mineralization in contaminated calcareous soil amended with organic materials. *Bioresource Technology*, **97**, 1894-1901.
- Clive D., Johnson K., Spector J., Baston A., Brown M.**, 1979. Validation and characterization of the L5178Y/TK⁺/ mouse lymphoma mutagen assays system. *Mutation Research*, **59**, 61-108.
- Coppenet M.**, 1981. Copper accumulation in Brittany soils through enriched pig slurry ; phytotoxic risks. In: *Copper in animal wastes and sewage sludge*, D. Reidel Publishing Company, London, 154-161.
- Coppenet M., Golven J., Simon, J.C., Le Core L., Le Roy M.**, 1993. Evolution chimique des sols en exploitation d'élevage intensif. *Agronomie*, **13**, 77-83.
- Cornu S., Deschatrettesa V., Salvador-Blanesa S., Clozel B., Hardya M., Branchut S., Le Forestier L.**, 2005. Trace element accumulation in Mn-Fe-oxide nodules of a planosolic horizon. *Geoderma*, **125**, 11-24.
- Cotelle S., Masfaraud J.F., Féraud J.F.**, 1999. Assessment of the genotoxicity of contaminated soil with the *Allium/Vicia*-micronucleus and the *Tradescantia*-micronucleus assays. *Mutation Research*, **426**, 167-171.
- Courty B., Le Curieux F., Milon V., Marzin D.**, 2004. Influence of extraction parameters on mutagenicity of soil samples. *Mutation Research*, **565**, 23-34.
- Cuypers A. Vangronsveld J., Clijsters H.**, 2002. Peroxidases in roots and primary leaves of *Phaseolus vulgaris* copper and zinc phytotoxicity: a comparison. *Journal of Plant Physiology*, **159**, 869-876.
- David F.**, 2004. Valorisation des matières organiques en agriculture conventionnelle et raisonnée : pratiques et situation en France des essais agronomiques. *Journées techniques, Retour au sol des matières organiques*, 27-28 avril 2004, Paris, 7-9.
- De La Farge B.**, 1995. Le biogaz - Procédés de fermentation méthanique. *Ingénierie de l'environnement*. Editions Masson, 237 p.

De Simone C., Tomati U., Galli E., Owczarek M., De Marco A., D'Ambrosio C., Alianello F., Cortellini L., 2000. Evaluation of toxic and genotoxic activity of some composts from different origin. *Fresenius Environmental Bulletin*, **9**, 683-690.

De Simone C., Angelucci R., Errichetti M.F., Marconi S., Rossi M., Selvi S., 2005. A statistical approach to evaluate compost genotoxicity. *Biology and Fertility of Soils*, **41**, 9-14.

Degryse F., Smolders E. and Parker D.R., 2006. Metal complexes increase uptake of Zn and Cu by plants: implications for uptake and deficiency studies in chelator-buffered solutions. *Plant and Soil*, **289 (1-2)**, 171-185.

Elmitwalli T., Soellner J., De Keizer A., Bruning H., Zeeman G., Lettinga G., 2001. Biodegradability and change of physical characteristics of particles during anaerobic digestion of domestic sewage. *Water Research*, **35 (5)**, 1311-1317.

Enstone D.E., Peterson C.A., 2005. Suberin lamella development in maize seedling roots grown in aerated and stagnant conditions. *Plant, Cell and Environment*, **28**, 444-455.

Eun S.O., Youn H.S., Lee Y., 2000. Lead disturbs microtubule organization in the root meristem of *Zea mays*. *Physiologia Plantarum*, **110 (3)**, 357-365.

Favier A., 2003. Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, 108-115.

Feng M.H., Shan X.Q., Zhang S., Wen B., 2005. A comparison of the rhizosphere-based method with DTPA, EDTA, CaCl₂ and NaNO₃ extraction methods for prediction of bioavailability of metals in soil to barley. *Environmental Pollution*, **137**, 231-240.

Flores-Velez L.M., Ducaroir J., Jaunet A.M., Robert M., 1996. Study of the distribution of copper in an acid sandy vineyard soil by three different methods. *European Journal of Soil Science*, **46**, 523-532.

Gabrielle B., Da-Silveira J., Houot S., Francou C., 2004. Simulating urban waste compost effects on carbon and nitrogen dynamics using a biochemical index. *Journal of Environmental Quality*, **33**, 2333-2342.

Garcia J.L., Patel B.K.C., Ollivier B., 2000. Taxonomic, phylogenetic, and ecological diversity of Methanogenic Archae. *Anaerobe*, **6**, 205-226.

Garcia-Gomez A., Bernal M.P., Roig A., 2003. Carbon mineralisation and plant growth in soil amended with compost samples at different degrees of maturity. *Waste Management and Research*, **21**, 161-171.

Gavalda D., 2001. Devenir des éléments traces métalliques dans les boubènes (luvirodoxysol) après épandage de boues granulées. *Thèse de doctorat INPT*, 258 p.

Gavalda D., Scheiner J.D., Revel J.C., Merlina G., Kaemmerer M., Pinelli E, Guiesse M., 2005. Agronomic and environmental impacts of a single application of heat-dried sludge on a Alfisol. *Science of the Total Environment*, **343**, 97-109.

Gould M.S., Genetelli E.J., 1975. Heavy metal distribution in anaerobically digested sludges. *Proc. 30th Ind. Waste Conf., Purdue Univ.*, 689-699.

Gould M., Genetelli E., 1978. Heavy metal complexation behavior in anaerobically digested sludges. *Water Research*, **12**, 505-512.

Guiesse M., Gers C., Dourel L., Kaemmerer M., Revel J.C., 1995. Crop soil air carbon dioxide concentration and sludge. *3th International Congress Energy, Environment and Technological Innovations. University Central Venezuela, University of Roma "La Sapienza". November 5-11th, CARACAS*, 321-326.

Guiesse M., Seibane L., Scheiner J.D., Guetierrez-Boem F.H., Kaemmerer M., Gavalda D., Hafidi M. and Revel J.C., 2004. Evolution of humic fraction in a redoxi-luvisol after application of granular sewage sludge. *Agrochimica XLVIII, n° 1-2*, 61-72.

Gunaseelan V.N., 1997. Anaerobic digestion of biomass for methane production: a review. *Biomass and Bioenergy*, **13**, 83-114.

- Halliwell B.**, 1987. Oxidants and human disease: some new concepts. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, **1**, 358-364.
- Hansen M.N., Nyord T.**, 2005. Effects of separation and anaerobic digestion of slurry on odour and ammonia emission during subsequent storage and land spreading. *NJF Seminar 372, Nordic Association of Agricultural Scientists*, **1 (2)**, 53-56.
- Hayes T.D., Theis T.L.**, 1978. The distribution of heavy metals in anaerobic digestion. *Journal of Water Pollution Control Federation*, **50**, 61-72.
- Hinsinger P., Plassard C., Tang C., Jaillard B.**, 2003. Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints – a review. *Plant and Soil*, **248**, 43-59.
- Hinsinger P., Schneider A., Dufey J.E.**, 2005. Le sol : ressource en nutriments et biodisponibilité. In « *Sols et Environnement* », Dunod (ed), Paris, 285-305.
- Hlavackova P.**, 2005. Evaluation du comportement du cuivre et du zinc dans une matrice de type sol à l'aide de différentes méthodologies. *Thèse de doctorat*, 179 p.
- Hose E., Clarkson D.T., Steudle E., Schreiber L., Hartung W.**, 2001. The exodermis: a variable apoplastic barrier. *Journal of Experimental Botany*, **52 (365)**, 2245-2264.
- Houghton J.I., Burgess J.E., Stephenson T.**, 2002. Off-line particle size analysis of digested sludge. *Water Research*, **36**, 4643-4647.
- Hsu J.H., Lo S.L.**, 2001. Effect of composting on characterization and leaching of copper, manganese and zinc from swine manure. *Environmental Pollution*, **114**, 119-127.
- INRA**, 1995. Référentiel pédologique. *AFES, INRA Editions*, 332 p.
- Institut Technique du Porc**, 2000. Mémento de l'éleveur de porc. *ITP Editions, Paris (France)*, 6^{ème} Edition, 384 p.
- Jain K., Singh J., Chauhan L.K.S., Murthy R.C., Gupta S.K.**, 2004. Modulation of flyash-induced genotoxicity in *Vicia faba* by vermicomposting. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **59**, 89-94.
- Japenga J., Harmsen K.**, 1990. Determination of mass and ionic balances in animal manure. *Netherlands Journal of Agricultural Science*, **38**, 353-367.
- Jarusch-Wehrheim B., Mocquot B., Mench M.**, 1996. Uptake and partitioning of sludge-borne copper in field-grown maize (*Zea mays L.*). *Environmental Pollution*, **5**, 259-271.
- Jarusch-Wehrheim B., Mocquot B., Mench M.**, 1999. Absorption and translocation of sludge-born zinc in field-grown maize (*Zea mays L.*). *European Journal of Agronomy*, **11**, 23-33.
- Jaylet A., Deparis P., Gaschignard D.**, 1986. Induction of micronuclei in peripheral erythrocytes of axolotl larvae following in vivo exposure to mutagenic agents. *Mutagenesis*, **1 (3)**, 211-215.
- Jondreville C., Revy P.S., Jaffrezic A., Dourmad J.Y.**, 2002. Le cuivre dans l'alimentation des porcs : oligo-élément essentiel, facteur de croissance et risque potentiel pour l'homme et l'environnement. *INRA Productions Animales*, **15 (4)**, 247-265.
- Jondreville C., Revy P.S., Dourmad J.Y.**, 2003. Dietary means to better control the environmental impact of copper and zinc by pigs from weaning to slaughter. *Livestock Production Science*, **84**, 147-156.
- Jung M.C., Thornton I.**, 1996. Heavy metal contamination of soils and plants in the vicinity of a lead-zinc mine, Korea. *Applied Geochemistry*, **11**, 53-59.
- Juste C.**, 1988. Appréciation de la mobilité et de la biodisponibilité des éléments en traces du sol. *Science du Sol*, **26**, 103-112.
- Juste C., Chassin P., Gomez A., Linères M., Mocquot B., Feix I., Wiart J.**, 1995. Les micro-polluants métalliques dans les boues résiduelles des stations d'épuration urbaines. *Ademe, Angers*, 209 p.

- Kabata-Pendias A., Pendias H.**, 1992. Trace elements in soils and plants. *CRC Press, Boca Raton, Florida*, 2nd Edition, 209 p.
- Kafer E., Scott B., Dorn G., Stafford R.**, 1982. *Aspergillus nidulans*, systems and results of tests for chemical induction of mitotic segregation and mutation. I. Diploids and duplication assay systems. *Mutation Research*, **98**, 1-48.
- Knasmüller S., Gottman E., Steinkellner H., Fomin A., Pickl C., Paschke A., Göd R., Kundi M.**, 1998. Detection of genotoxic effects of heavy metal contaminated soils with plant bioassays. *Mutation Research*, **420**, 37-48.
- Knocke W.R., Trahern P.**, 1989. Freeze-thaw conditioning of chemical and biological sludges. *Water Research*, **23**, 35-42.
- Lagadic L., Caquet Y., Amiard J.C., Ramade F.**, 1997. Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects fondamentaux. *Masson (ed), Paris, France*, 419 p.
- Lake D.L., Kirk P.W.W., Lester J.N.**, 1985. The effects of anaerobic digestion on heavy metal distribution in sewage sludge. *Water Pollution Control*, **84 (4)**, 549-558.
- Lamy I., Sterckeman T., Cambier P., Jaffrezic A., van Oort F., Baize D., Chaussod R., Denaix L., Cornu S.**, 2005. Présence et impact des éléments traces dans les sols. In « *Sols et Environnement* », *Dunod (ed), Paris*, 469 - 490.
- Latt S.A., Allen J.W., Rogers W.E., Juergens L.A.**, 1977. In vitro and in vivo analysis of sister chromatid exchange formation. In: *B.J. Kilbey et al. (Eds), Handbook of Mutagenicity Test Procedures, Elsevier (Amsterdam)*, 275-291.
- Lavado R.S., Rodriguez M.B., Taboada M.A.**, 2005. Treatment with biosolids affects soil availability and plant uptake of potentially toxic elements. *Agriculture, Ecosystems and environment*, **109**, 360-364.
- Lavado R.S., Rodriguez M., Alvarez R., Taboada M.A., Zubillaga M.S.**, 2007. Transfer of potentially toxic elements from biosolod-treated soils to maize and wheat crop. *Agriculture Ecosystems and Environment*, **118**, 312-318.
- Lebourg A., Sterckeman T., Ciesielski H., Proix N.**, 1996. Intérêt des différents réactifs d'extraction chimique pour l'évaluation de la biodisponibilité de métaux en trace du sol. *Agronomie*, **16**, 201-215.
- Leighton I.R., Forester C.F.**, 1997. The adsorption of heavy metals in an acidogenic thermophilic anaerobic reactor. *Water Research*, **31 (12)**, 2969-2972.
- Levasseur P.**, 1998. Composition et volume de lisier produit par le porc. Données bibliographiques. *Techni Porc*, **21 (4)**, 17-24.
- Levasseur P.**, 2002. Composition chimique détaillée des aliments et des lisiers de porcs. *Techni Porc*, **25 (1)**, 19-25.
- Levasseur P.**, 2005. Teneur en cuivre et zinc des lisiers et des fumiers porcins après réduction de leur concentration dans les aliments. *Techni Porc*, **28 (5)**, 21-24.
- Levine A.D., Tchobanoglous G., Asano T.**, 1985. Characterization of the size distribution of contaminants in wastewater: treatment and reuse implications. *Journal of Water and Pollution Control Federation*, **57 (7)**, 805-816.
- L'Herroux L., Le Roux S., Appriou P., Martinez J.**, 1997. Behaviour of metals following intensive pig slurry applications to a natural field treatment process in Brittany (France). *Environmental Pollution*, **97 (1-2)**, 119-130.
- Linères M., Djakovitch J.L.**, 1993. Caractérisation de la stabilité biologique des apports organiques par l'analyse biochimique. In *J. Decroux & J.C. Ignazi (ed.) Matières organiques et agricultures. Gemas-COMIFER, Paris*, 159-168.
- Loudes J.P.**, 2002. Mise au point de biotests sur plantes pour mettre en évidence un effet toxique ou agronomique de substances exogènes (zinc, plomb, substances humiques). *Mémoire de DEA*, 51 p.
- Loué A.**, 1993. Oligoéléments en agriculture. *Editions Nathan*, 577 p.

- Ma T.H., Cabrera G.L., Chen R., Gill B.S., Sandhu S.S., Vandenberg A.L., Salamone M.F.**, 1994. *Tradescantia* micronucleus test. *Mutation Research*, **310**, 221-230.
- Ma T.H., Xu Z., Xu C., McConnell H., Rabago E.V. Arreola G.A., Zhang H.**, 1995. An improved *Allium* / *Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. *Mutation Research*, **334**, 185-195.
- Mackie R.I., Stroot P.G., Varel V.H.**, 1998. Biochemical identification and biological origin of key odor components in livestock waste. *Journal of Animal Science*, **76**, 1331-1342.
- Mantovi P., Baldoni G., Toderi G.**, 2005. Reuse of liquid, dewatered, and composted sewage sludge on agricultural land: effects of long-term application on soil and crop. *Water Research*, **39**, 289-296.
- Marcato C.E., Pinelli P., Pouech P., Alric A., Guiresse M.**, 2007. Macro and micronutrients in anaerobic digested pig slurry: recovery of Ca and Mg-Phosphates and fate of Cu and Zn in fields. *OTEANE, 1st International Scientific Symposium on trace elements in animal production system*, 14-15 June 2007, Geneva.
- Marcato C.E., Pinelli E., Pouech P., Winterton P., Guiresse M.**, 2007. Particle size and metal distributions in anaerobically digested pig slurry. *Bioresource Technology*, (in press).
- Marchaim U.**, 1992. Biogas processes for sustainable development. *FAO Agricultural Services bulletin*, **N 95**, 232 p.
- Marsaux M.**, 2003. Dynamique du cuivre et du zinc dans les sols "touyas": approche géochimique et écotoxicologique. *Mémoire de DEA*, 93 p.
- Marschner H.**, 1995. Mineral nutrition of higher plants. *Academic Presse, London*, **2nd Edition**, 889 p.
- Martinez J., Le Bozec G.**, 2000. Déjections porcines et problèmes environnementaux en Europe. *Cahiers d'études et de recherches francophones / Agriculture*, **9 (3)**, 181-190.
- Mata-Alvarez J., Macé S., Llabrés P.**, 2000. Anaerobic digestion of organic solid wastes. An overview of research achievements and perspectives. *Bioresource Technology*, **74 (1)**, 3-16.
- McGrath D.**, 1981. Implications of applying copper-rich pig slurry to grassland, effects on plants and soils. In: *Copper in animal wastes and sewage sludge*, D. Reidel. Publishing Company, London, 145-153.
- McGrath S.P., Cegarra J.**, 1992. Chemical extractability of heavy metals during and after long-term applications of sewage sludge to soil. *Journal of Soil Science*, **43**, 313-321.
- McGrath S.P.**, 1994. Effects of heavy metals from sewage sludge on soil microbes in agricultural ecosystems. In: *Toxic metals in soil-plant system*, 247-274.
- McGrath S.P., Knight B., Killham K., Preston S., Paton G.I.**, 1999. Assessment of the toxicity of metals in soils amended with sewage sludge using a chemical speciation technique and a lux-based biosensor. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **18 (4)**, 659-663.
- Mench M.**, 1990. Transfert des oligo-éléments du sol à la racines et absorption. *Oligo-éléments et monde vivant, mécanismes d'action, carences et excès chez le végétal, l'animal et l'homme. Comptes rendus de l'Académie d'Agriculture de France*, **76 (2)**, 17-30.
- Mengel K., Kirkby E.A.**, 2001. Principles of Plant Nutrition. *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands*, **5th Edition**, 864 p.
- Miao M., Fu R., Yang D., Zheng L.**, 1999. *Vicia* root micronucleus assay on the clastogenicity of water samples from the Xiaoqing River in Shandong Province of the People's Republic of China. *Mutation Research*, **426**, 143-145.
- Minissi S., Lombi E.**, 1997. Heavy metal content and mutagenic activity, evaluated by *Vicia faba* micronucleus test, of Tiber river sediments. *Mutation Research*, **393**, 17-21.
- Minissi S., Caccese D., Passafiume F., Grella A., Ciccotti E., Rizzoni M.**, 1998. Mutagenicity (micronucleus test in *Vicia faba* root tips), polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals content of sediments collected in Tiber river and its tributaries within the urban area of Roma. *Mutation Research*, **420**, 77-84.

- Moletta R.**, 2005. Winery and distillery wastewater treatment by anaerobic digestion. *Water Science and Technology*, **51** (1), 137-144.
- Moller H.B., Lund I., Sommer S.G.**, 2000. Solid-liquid separation of livestock slurry: efficiency and cost. *Bioresource Technology*, **74**, 223-229.
- Moller H.B., Sommer S.G., Ahring B.K.**, 2002. Separation efficiency and particle size distribution in relation to manure type and storage conditions. *Bioresource Technology*, **85**, 189-196.
- Morard P.**, 1995. Les cultures végétales hors sol. *Publications agricoles, Agen, France*, 304 p.
- Morel J.L.**, 1998. Dynamique des éléments traces dans les sols : mobilité et transfert vers les eaux souterraines et les plantes. *Dans : Contamination des sols par les éléments en traces : les risques et leur gestion. Académie des sciences, Rapport n°42*, 67-126.
- Morvan T., Nicolardot B., Péan L.**, 2006. Biochemical composition and kinetics of C and N mineralization of animal wastes : a typological approach. *Biology and Fertility of Soils*, **42**, 513-522.
- Mukherji S., Gupta B.D.**, 1972. Characterization of copper toxicity in lettuce seedlings. *Physiologia Plantarum*, **27** (2), 126-129.
- Muller A.**, 1965. The chimeral structure of M1 plants and its bearing on the determination of mutation frequencies in *Arabidopsis*. In: *Induction of mutations and the mutation process* (Ed. J. Veleminsky, and T. Gichner), 46-52. Prague: Czech. Acad. Sci.
- Mustin M.**, 1987. Le compost, gestion de la matière organique. *Editions François Dubosc, Paris*, 954 p.
- Nahm K.H.**, 2002. Efficient feed nutrient utilisation to reduce pollutants in poultry and swine manure. *Critical reviews in environmental sciences and technology*, **32** (1), 1-16.
- Nicholson F.A., Chambers B.J., Williams J.R., Unwin R.J.**, 1999. Heavy metal contents of livestock feeds and animal manures in England and Wales. *Bioresource Technology*, **70**, 23-31.
- Nicholson F.A., Smith S.R., Alloway B.J., Carlton-Smith C., Chambers B.J.**, 2003. An inventory of heavy metal inputs to agricultural soils in England and Wales. *Science of the Total Environment*, **311**, 205-219.
- Nicholson F.A.**, 2007. Livestock manure management and treatment: implications for heavy metal inputs to agricultural soils. In: *Proc. OTEANE, 1st International Scientific Symposium on trace elements in animal production system*, 14-15 June 2007, Geneva.
- Noblet J., Perez J.M.**, 1993. Prediction of digestibility of nutrients and energy values of pig diets from chemical analysis. *Journal of Animal Science*, **73**, 3389-3398.
- O'Dell R., Silk W., Green P., Claassen V.**, 2007. Compost amendment of Cu-Zn minespoil reduces toxic bioavailable heavy metal concentrations and promotes establishment and biomass production of *Bromus carinatus* (Hook and Arn.). *Environmental Pollution*, **148** (1), 115-124.
- O'Neill J., Brimer P., Machanoff R., Hirsh G., Hsie A.**, 1977. A quantitative assay of mutation induction at the hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase locus in Chinese hamster ovary (CHO/HGPRT system): development and definition of the system. *Mutation Research*, **45**, 91-101.
- Ohe T., Watanabe T., Wakabayashi K.**, 2004. Mutagens in surface waters: a review. *Mutation Research*, **567**, 109-149.
- Ortenblad H.**, 2000. The use of digested slurry within agriculture. In *AD-Nett (ed), Anaerobic Digestion: Making Energy and Solving Modern Waste Problems*. Ortenblad H., Herning Kommune, Denmark, 195 p.
- Paboeuf F., Calvar C., Landrain B., Roy H.**, 2001. Impact de la réduction des niveaux alimentaires en matière azotée totale, en phosphore, en cuivre et en zinc sur les performances et les rejets des porcs charcutiers. *Journées de la Recherche porcine*, **33**, 49-56.
- Pampura T., Ustinin M.**, 1999. Effect of succinic acid produced by microorganisms and plant roots on copper sorption by soil. In *Berthelin et al.: Effect of mineral-organic-microorganism interactions on soil and fresh water environments*. Kluwer Academic (Ed), 55-67.

- Parnaudeau V., Nicolardot B., Pagès J.**, 2004. Relevance of organic matter fractions as predictors of wastewater sludge mineralization in soil. *Journal of Environmental Quality*, **33**, 1885-1894.
- Piboul E.**, 1992. Etude comparée de la minéralisation de l'azote d'engrais minéraux, organo-minéraux, organiques et d'amendements organiques. *Rapport de DESS*, 49 p.
- Pichtel J., Anderson M.**, 1997. Trace metal bioavailability in municipal solid waste and sewage sludge composts. *Bioresource Technology*, **60**, 223-229.
- Planquart P., Bonin G., Prone A., Massiani C.**, 1999. Distribution, movement and plant availability of trace metals in soils amended with sewage sludge composts: application to low metal loadings. *Science of the Total Environment*, **241**, 161-179.
- Pouech P., Castaing J.**, 1999. An experimental codigestion platform in South of France. In: *Proc. 2nd International Symposium on Anaerobic Digestion of Solid Waste, Barcelona, 15-18 June*, 4 p.
- Pouech P., Coudure, R., Marcato C.E.**, 2005. Intérêt de la codigestion pour la valorisation des lisiers et le traitement de déchets fermentescibles à l'échelle d'un territoire. *Journées de la Recherche Porcine*, **37**, 39-44.
- Powers W.J., Van Horn H. H., Wilkie A. C, Wilcox C. J., Nordstedt R.A.**, 1999. Effects of Anaerobic Digestion and Additives to Effluent or Cattle Feed on Odor and Odorant Concentrations. *Journal of Animal Science*, **77**, 1412-1421.
- Priem R., Maton A.**, 1980. The influence of the content of trace elements in the feed on the composition of liquid manure of pig. In: *Gasser J.K.R (ed), Effluents from livestock. Applied Science Publishers, Baking.*, 9-22.
- Qiao X.L., Luo Y.M., Christie P., Wong M.H.**, 2003. Chemical speciation and extractability of Zn, Cu and Cd in two contrasting biosolids-amended clay soils. *Chemosphere*, **50**, 823-829.
- Quevauviller P., Rauret G., Lopez-Sanchez J.F., Rubio R., Ure A., Muntau H.**, 1997. Certification of trace metal extractable contents in a sediment reference material (CRM 601) following a three-step sequential extraction procedure. *Science of the Total Environment*, **205**, 223-234.
- Radetski C.M., Ferrari B., Cotelle S., Masfarau J.F., Ferard J.F.**, 2004. Evaluation of the genotoxic, mutagenic and oxidant stress potentials of municipal solid waste incinerator bottom ash leachates. *Science of the Total Environment*, **333**, 209-216.
- Revy P.S, Jondreville C., Dourmad J.Y., Nys Y.**, 2003. Le zinc dans l'alimentation du porc : oligo-élément essentiel, et risque potentiel pour l'environnement. *INRA Productions Animales*, **16 (1)**, 3-18.
- Roberts, L. A., Pierson, A. J., Panaviene, Z., Walker, E.L.**, 2004. Yellow stripe1. Expanded roles for the maize iron-phytosiderophore transporter. *Plant Physiology*, **135 (1)**, 112-120.
- Rodriguez Andara A., Lomas Esteban J.M.**, 2002. Transition of particle size fractions in anaerobic digestion of the solid fraction of piggery manure. *Biomass and Bioenergy*, **23**, 229-235.
- Roger B.**, 1986. Comparaison de deux schémas d'extractions sélectives. Phénomènes de réadsorption en cours de minéralisation. *Environmental Technology Letters*, **7**, 539-546.
- Rooney C.P., Zhao F.J., McGrath S.P.**, 2006. Soil factors controlling the expression of copper toxicity to plants in a wide range of European soils. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **25 (3)**, 726-732.
- Ross S.M., Kaye K.J.**, 1994. The meaning of metal toxicity in soil-plant systems. In: *Toxic metals in soil-plant systems*, S. Ross. *John Wiley & Sons Ltd, Chichester*, 27-62.
- Rupa T.R., Srinivasa Rao Ch., Subba Rao A., Muneshwar Singh**, 2003. Effects of farmyard manure and phosphorus on zinc transformations and phyto-availability in two alfisols of India. *Bioresource Technology*, **87**, 279-288.
- Sahlström L.**, 2003. A review of survival of pathogenic bacteria in organic waste used in biogas plants. *Bioresource Technology*, **87**, 161-166.

- Sanchez M., González J.L.**, 2005. The fertilizer value of pig slurry. I. Values depending on the type of operation. *Bioresource Technology*, **96**, 1117-1123.
- Sang N., Li G.**, 2004. Genotoxicity of municipal landfill leachate on root tips of *Vicia faba*. *Mutation Research*, **560**, 159-165.
- Santa-Maria G.E., Cogliatti D.H.**, 1998. The regulation of zinc uptake in wheat plants. *Plant Science*, **137**, 1-12.
- Schützendübel A., Polle A.**, 2002. Plant responses to abiotic stresses : heavy metal-induced oxidative stress and protection by micorrhyzation. *Journal of Experimental Botany*, **53 (372)**, 1351-1365.
- Scott B., Sparrow A., Lamm S., Schairer L.**, 1978. Plant metabolic activation of EDB to a mutagen of greater potency. *Mutation Research*, **49**, 203-212.
- Shon H.K., Vigneswaran S.**, 2006. Effluent organic matter (EfOM) in wastewater : constituents, effects and treatment. *Critical Review in Environmental Science and Technology*, **36**, 327-374.
- Sies H.**, 1991. Oxidative stress: introduction. In: *Sies H. (ed), Oxidative stress, Oxidants and Antioxidants. Academic Press, San Diego, I-XV*, 650 p.
- Sims T., Kline J.S.**, 1991. Chemical fractionation and plant uptake of heavy metals in soils amended with co-composted sewage sludge. *Journal of Environmental Quality*, **20 (2)**, 387-395.
- Singh S.P., Tack F.M.G., Verloo M.G.**, 1996. Extractability and bioavailability of heavy metals in surface soils derived from dredged sediments. *Chemical Speciation and bioavailability*, **8 (3-4)**, 105-109.
- Snell-Castro R.**, 2004. Caractérisation de la communauté microbienne de lisier et du fumier de porcs par des méthodes moléculaires. *Thèse de doctorat*, 254 p.
- Solagro**, 2001. La digestion anaérobie des boues urbaines. Etat des lieux, état de l'art. Co-édition Agence de l'Eau Adour-Garonne, 36 p.
- Song J., Zhaom F.J., Luo Y.M., McGrath S.P., Zhang H.**, 2004. Copper uptake by *Elsholtzia splendens* and *Silene vulgaris* and assessment of copper phytoavailability in contaminated soils. *Environmental Pollution*, **128 (3)**, 307-315.
- Song Y.F., Wilke B.M., Song X.Y., Gong P., Zhou Q.X., Yang G.F.**, 2006. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated biphenyls (PCBs) and heavy metals (HMs) as well as their genotoxicity in soil after long-term wastewater irrigation. *Chemosphere*, **65**, 1859-1868.
- Sophonsiri C., Morgenroth E.**, 2004. Chemical composition associated with different particle size fractions in municipal, industrial, and agricultural wastewaters. *Chemosphere*, **55**, 691-703.
- Soubrand-Colin M., Neel C., Bril H., Grosbois C., Caner L.**, 2007. Geochemical behaviour of Ni, Cr, Cu, Zn and Pb in an Andosol-Cambisol climosequence on basaltic rocks in the French Massif Central. *Geoderma*, **137**, 340-351.
- Sparks D.L.**, 1995. Environmental soil chemistry. *Academic press, London*, 267 p.
- Sposito G., Lund L.J., Chang A.C.**, 1982. Trace metal chemistry in arid-zone field soils amended with sewage sludge: I. Fractionation of Ni, Cu, Zn, Cd and Pb in solid phases. *Soil Science Society of America Journal*, **46**, 260-264.
- Steinkellner H., Mun-Sik K., Helma C., Ecker S., Ma T., Horak O., Kundi M., Knasmüller S.**, 1998. Genotoxic effects of heavy metals: comparative investigation with plant bioassays. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **31**, 183-191.
- Sterckeman T., Douay F., Baize D., Fourrier H., Proix N. Schvartz C., Carignan J.**, 2006. Trace element distributions in soils developed in loess deposits from northern France. *European Journal of Soil Science*, **57**, 392-410.
- Stevens D.P., McLaughlin M.J., Heinrich T.**, 2003. Determining toxicity of lead and zinc runoff in soils: salinity effects on metal partitioning and on phytotoxicity. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **22 (12)**, 3017-3024.

- Stevenson F.J.**, 1994. Humus chemistry. Genesis, composition, reaction. *John Wiley, New York*, 496 p.
- Stover R.C., Sommers L.E., Silviera D.J.**, 1976. Evaluation of metals in wastewater sludge. *Water Pollution Control*, **48 (9)**, 2165-2175.
- Su D.C., Wong J.W.C.**, 2003. Chemical speciation and phytoavailability of Zn, Cu, Ni and Cd in soil amended with fly ash-stabilized sewage sludge. *Environment International*, **29**, 895-900.
- Tao S., Chen Y.J., Xu F.L., Cao J., Li B.G.**, 2003. Changes of copper speciation in maize rhizosphere soil. *Environmental Pollution*, **122**, 447-454.
- Tardy Y., Bailly J.R., Guiesse M., Kaemmerer M., Boutin M.P., Revel J.C.**, 2000. An approach for a thermodynamic treatment of the humic substances in soils and plant nutritional environment. In: *IHSS International Meeting, 10th, Toulouse, Introductive conference, Proceedings*, **1**: 23-28.
- Tardy Y., Motta de Toledo M.C., Bailly J.R., Guiesse M., Revel J.C.**, 2005. Towards the thermodynamic treatment of humic substances in soils. *Revista do Instituto Geológico, São Paulo*, **26 (1/2)**, 45-51.
- Tessier A., Campbell P.G.C., Bisson M.**, 1979. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. *Analytical Chemistry*, **51 (7)**, 844-851.
- Texier C.**, 2001. Les litières biomaitrisées en porcherie. *Techni porc*, **24 (4)**, 29-34.
- Theis T.L., Hayes T.D.**, 1978. Chemistry of heavy metals in anaerobic digestion. In: *Chemistry of wastewater technology, A.J. Rubin. Ann Arbor Science Publishers, Inc. Michigan*, 403-419.
- Thornton I.**, 1999. Bioavailability of trace elements in the food chain. In: *Proceedings of the 5th International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements, July 1999, Vienna, Austria*.
- Trably E.**, 2002. Etude et optimisation de la biodégradation d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) et de polychlorobiphényles (PCBs) au cours de la digestion anaérobie et aérobie de boues urbaines contaminées. *Thèse de doctorat*, 281 p.
- Tremel-Schaub A., Feix I.**, 2005. Contamination des sols. *EDP Sciences & ADEME Edition*, 413 p.
- Tyler G., Olsson T.**, 2001. Concentration of 60 elements in the soil solution as related to the soil acidity. *European Journal of Soil Science*, **52**, 151-165.
- Van Soest P.J.**, 1963. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II - A rapid method for the determination of fibre and lignin. *Journal - Association of Official Analytical Chemists*, **46**, 829-835.
- Van Soest P.J., Wine R.H.**, 1967. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV - Determination of plant cell-wall constituents. *Journal - Association of Official Analytical Chemists*, **50**, 50-55.
- Vertes F.**, 1995. Observatoire des parcelles : pollution en phosphore et métaux lourds d'origine agricole dans le bassin versant de l'Elorn. In: *Le programme rade, 3^{ème} rencontres internationales, Brest, 14-16 mars 1995, Actes du colloque, Vol.1*, 350-360.
- Vranová E., Inzé D., Van Breusegem F.**, 2002. Signal transduction during oxidative stress. *Journal of Experimental Botany*, **53 (372)**, 1227-1236.
- Walter I., Martinez F., Cala V.**, 2006. Heavy metal speciation and phytotoxic effects of three representative sewage sludge for agricultural uses. *Environmental Pollution*, **139**, 507-514.
- Wang H.**, 1999. Clastogenicity of chromium contaminated soil samples evaluated by *Vicia* root-micronucleus assay. *Mutation Research*, **426**, 147-149.
- Wang J., Huang C.P., Allen H.E., Poesponegoro I., Poesponegoro H., Takiyama L.R.**, 1999. Effects of dissolved organic matter and pH on heavy metal uptake by sludge particulates exemplified by copper(II) and nickel(II) : three-variable model. *Water Environment Research*, **71**, 139-147.

Westerman P.W., Bicudo J.R., 2000. Tangential flow separation and chemical enhancement to recover swine manure solids, nutrients and metals. *Bioresource Technology*, **73**, 1-11.

White P.A., Claxton L.D., 2004. Mutagens in contaminated soil: a review. *Mutation Research*, **567**, 227-345.

Wong J.W.C., Li K., Fang M., Su D.C., 2001. Toxicity evaluation of sewage sludges in Hong Kong. *Environment International*, **27**, 373-380.

Wu X., Aasen I., 1994. Models for predicting soil zinc availability for barley. *Plant and Soil*, **163**, 279-285.

Yousfi I., Bermond A., 1997. Réactivité chimique des métaux-traces de deux sols pollués en présence d'un réactif réducteur. *Environmental Technology*, **18**, 139-149.

Zehnder A. J. B., Stumm W., 1988. Geochemistry and Biogeochemistry of anaerobic habitats. In A.J.B. Zehnder (ed.) *Biology of Anaerobic Micro-organisms*. John Wiley & Sons, New York, 1-38.

Zeikus J.G., 1982. Microbial intermediary metabolism in anaerobic digestion. In: 1st *International symposium on anaerobic digestion*. Travemünde, 23-25.

Zhang H., Zhao F.J., Sun B., Davison W., McGrath S.P., 2001. A new method to measure effective soil solution concentration predicts copper availability to plants. *Environmental Science and Technology*, **35 (12)**, 2602 -2607.

ANNEXES

Annexe 1 : Macro and micronutrients in anaerobically digested pig slurry: recovery of Ca and Mg phosphates and nutrient fate in soil

Annexe 2 : Composition de la solution de Hoagland

Annexe 1

Macro and micronutrients in anaerobically digested pig slurry: recovery of Ca and Mg phosphates and nutrient fate in soil

C.E. Marcato^{1,2}, E. Pinelli¹, P. Pouech², A. Alric¹ and M. Guirese¹

¹ Ecolab UMR 5245 CNRS/UPS/INPT ENSAT BP 32607, 31326 Castanet-Tolosan, France

² Apesa Hélioparc, 64053 Pau Cedex, France

Keywords: Anaerobic process, copper, zinc, nutrients, phosphates, pig slurry

Introduction

Methane production from the biological conversion of organic waste is receiving increasing attention, both with a view to processing organic waste and as a source of energy (Pouech *et al.*, 2005). However, anaerobic digestion (AD) is a transformation process and not a destructive final treatment. The product obtained then has to be dealt with. In agricultural installations, the digestates are spread on the land. Applications are based on macro-nutrient loading, and trace metals may be overdosed with regards to crop requirements. In the current work, a livestock-manure AD plant was investigated to compare raw and anaerobically digested pig slurry. The fate of the macro and micro elements during the anaerobic treatment was followed. Mass balances were calculated for the AD plant and for the soil, after spreading of raw or digested slurry.

Material and methods

The present work was conducted on the ADÆSO experimental site which consists of five livestock buildings and a 150 m³ AD plant (Pouech *et al.*, 2005). The anaerobic stirred tank reactor was run at 37°C, with a hydraulic retention time of about 15 days. Macro and micro element composition of pig slurry was studied before and after AD. AD mass balance was calculated between the input and the output of the reactor.

Results

Mass balance showed that the AD process consumed 49% of the volatile solids (VS), which were most likely transformed into biogas. Hence the metal concentrations of the slurry nearly doubled after anaerobic digestion while nitrogen, the main nutrient, remained constant (Table 1). Most of the elements were conserved between the input and the output of the digester (N, K, Fe, S, Al, Cu and Zn). However, losses did occur for P, Ca, Mg and Mn due to crystallisation on the lining of the digester.

Table 1: Composition of pig slurry and mass balance over the whole anaerobic treatment (RS: raw slurry; DS: digested slurry)

| | Flow | DM | Ntot | NH ₄ ⁺ -N | VS | P | K | Ca | Fe | Mg | S | Al | Cu | Mn | Zn | |
|----|-------|----------------------|------|---------------------------------|-----------------------|------|------|------|-----|---------------------|------|------|------------------------|-----|------|--|
| | Flow | % fresh matter | | | g.kg ⁻¹ DM | | | | | | | | mg.kg ⁻¹ DM | | | |
| RS | | 2.7 | 0.28 | 0.21 | 67.3 | 29.5 | 37.4 | 51.2 | 2.5 | 14.2 | 8.1 | 868 | 590 | 629 | 1507 | |
| DS | | 1.6 | 0.28 | 0.23 | 59.1 | 31.5 | 65.6 | 47.2 | 4.0 | 15.9 | 11.1 | 1641 | 1016 | 708 | 2628 | |
| | | kg.day ⁻¹ | | | | | | | | g.day ⁻¹ | | | | | | |
| RS | 11297 | 301 | 31.6 | 23.7 | 202 | 8.9 | 11.2 | 15.4 | 0.5 | 4.3 | 2.4 | 261 | 177 | 189 | 453 | |
| DS | 11121 | 182 | 28.9 | 24.5 | 107 | 5.7 | 11.9 | 8.6 | 0.5 | 2.9 | 2.0 | 298 | 185 | 129 | 478 | |

Scanning electron microscopy coupled with energy dispersive X-ray analysis (SEM-EDS) observations (Fig. 1) clearly showed the crystals to be composed of Ca, Mg, Mn and P, and free of N. They were in fact amorphous magnesium phosphate (Fig. 1, point 1) and well-crystallised calcium phosphate (Fig. 1, point 2) and not the Struvite crystals often described (Suzuki *et al.*, 2002; Burns and Moody, 2002). They could be Whitlockite or Bobbierite nucleating at low temperatures on the stainless steel surface of the agitation system.

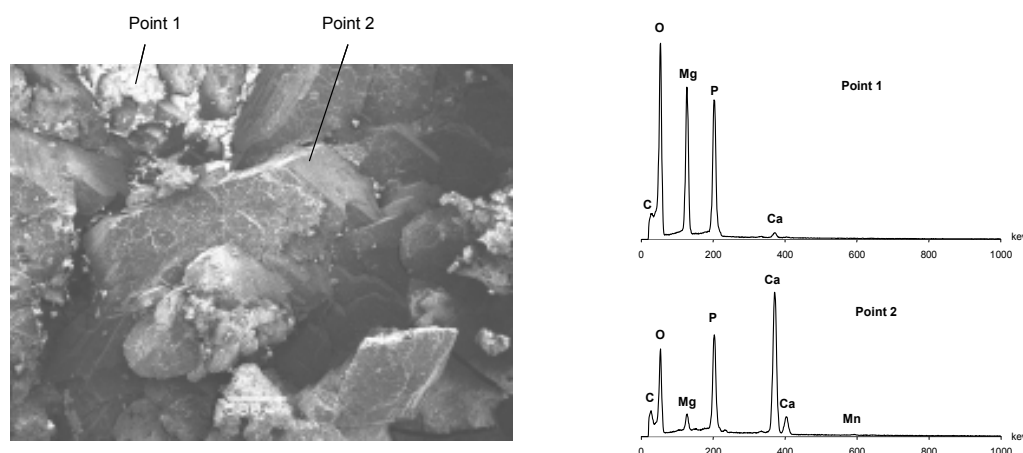


Figure 1. SEM picture and EDS spectra of Ca and Mg phosphates

The quantities of slurry to be spread on the land are generally determined by fixing the levels of N. In French and European regulations, the recommended dosage of N is 170 kg N.ha⁻¹.yr⁻¹. From the composition of raw and digested slurry (Table 1) this will mean spreading 60 m³.ha⁻¹.yr⁻¹. Such applications will lead respectively to annual inputs of 47 and 22 kg P.ha⁻¹, 64 and 60 kg K.ha⁻¹, 13 and 9 kg S.ha⁻¹, 82 and 34 kg Ca.ha⁻¹, and 23 and 11 kg Mg ha⁻¹. P inputs more or less correspond to export by crops, but the K, S, Ca and Mg levels of input remain lower than the requirements of most crops. The slurry therefore contributes to the general nutrition of the plants. However, part of this amending value was lost during AD due to the crystallisation of the calcium and magnesium phosphates in the digester. Concerning the non-indispensable macro-elements, Al was the most abundant with inputs of 1.6 and 0.9 kg Al.ha⁻¹, which is well below the quantities exported by the crops. To sum up, none of the macro-elements from the slurry will accumulate in arable land. The microelements presented a different picture and inputs were equivalent for both slurries. The levels of Fe and Mn were low, giving rise to soil inputs of 4 kg Fe.ha⁻¹ and about 1 and 0.5 kg Mn ha⁻¹, which is

of the same order as the levels of export in crops. In contrast, Cu and Zn were very abundant and the input from slurry (about 0.9 kg Cu.ha⁻¹ and 2.5 kg Zn.ha⁻¹) reached ten-fold typical export values.

References

Pouech, P., Coudure, R. and C.E. Marcato, 2005. Intérêt de la co-digestion pour la valorisation des lisiers et le traitement de déchets fermentescibles à l'échelle d'un territoire. Journées Recherche Porcine, 37, 39-44.

Suzuki, K., Tanaka, Y., Osada, T. and M. Waki, 2002. Removal of phosphate, magnesium and calcium from swine wastewater through crystallization enhanced by aeration. Wat. Res. 36, 2991-2998.

R.T. Burns, and L.B. Moody, 2002. Phosphorus recovery from animal manures using optimized struvite precipitation. In Proceedings of coagulants and flocculants: Global market and technical opportunities for water treatment chemicals, Chicago, Illinois.



Macro and micronutrients in anaerobically digested pig slurry: recovery of Ca and Mg phosphates and nutrient fate in soil



C.E. MARCATO ^(1,2), E. PINELLI ⁽¹⁾, P. POUÉCH ⁽²⁾, A. ALRIC ⁽¹⁾ and M. GUIRESSE ^{(1)*}

⁽¹⁾ Ecolab UMR 5245 CNRS / UPS / INPT ENSAT BP 32607, 31326 Castanet-Tolosan Cedex, France

⁽²⁾ APESA Hélioparc, 64053 Pau Cedex, France

* guiresse@ensat.fr



Context

Anaerobic digestion (AD) is receiving increasing attention. AD is a transformation process and the product obtained has to be dealt with. In agricultural plants, the digestates are spread on the land. Applications are based on macro-nutrient loading, and trace metals may be overdosed with regards to crop requirements. A livestock-manure AD plant (Fig 1) was investigated to compare raw slurry (RS) and anaerobically digested pig slurry (DS). Mass balances were calculated for the AD plant and for the soil, after spreading of RS or DS.



Material

| | |
|---------------|--|
| Substrate: | Pig slurry |
| Process: | One phase |
| Reactor: | CSTR |
| Volume: | 150 m ³ |
| HRT: | 11 days |
| Loading rate: | 2 kg VS.m ⁻³ .d ⁻¹ |
| Temperature: | 37°C |
| VS removal: | 47% |

Fig 1: Performances of the anaerobic digestion plant

Results

N was conserved through the AD plant, so that equivalent quantities of raw either digested slurry were to be spread. Cu and Zn were also conserved, representing an equivalent environmental hazard.

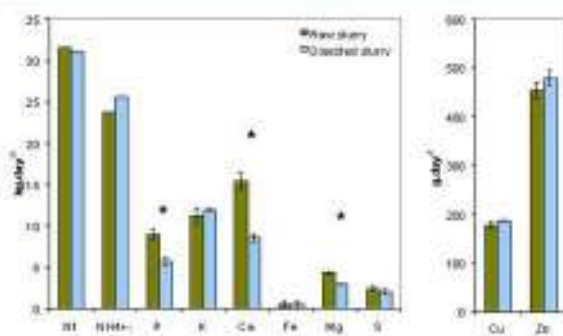


Fig 2: Mass balance over the whole AD plant (*: significant losses during the treatment)

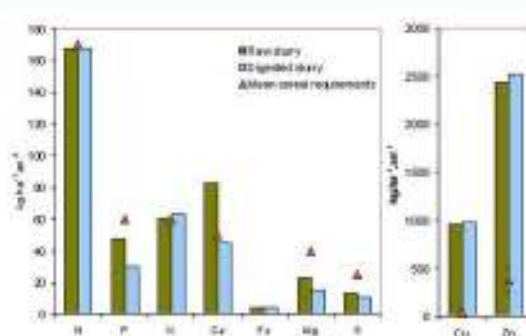


Fig 3: Annual mass balance for the soil when spreading 60 m³ ha⁻¹ compared to mean crop requirements (S. coli A., 1982. *Oligoéléments en agriculture*. Editions Nathan, 577 p.)

Ca and Mg phosphates were recovered as crystals lining the digester



Fig 4: SEM picture and EDS spectra of Ca and Mg phosphates

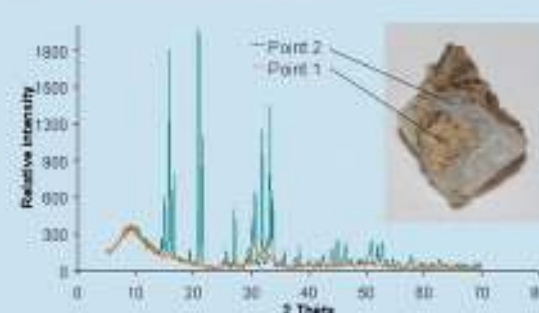
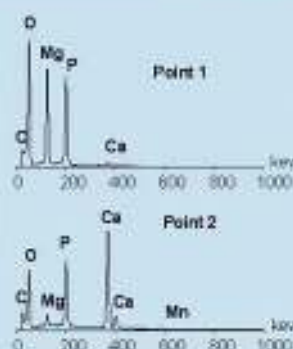


Fig 5: X-ray diffractometer

Conclusions & Perspectives

N, P, K, Ca and Mg, S from raw slurry and anaerobically digested slurry would contribute to the general nutrition of the plants but none of these elements would accumulate in crop soils. However, in this experiment, a part of this amending value was lost during AD due to the crystallisation of the calcium and magnesium phosphates in the digester. In contrast, Cu and Zn are very abundant and the input from both slurries would reach ten-fold typical export values and would accumulate. Additional researches on the fate and the impact of Cu and Zn in digested slurries must be conducted.

Annexe 2

Composition de la solution de Hoagland

| | |
|--|------|
| KNO ₃ | 5 mM |
| Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O | 5 mM |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 5 mM |
| KH ₂ PO ₄ | 1 mM |
| Tartrate de fer | 9 μM |

RESUME

L'épandage des déjections animales sur les terres agricoles est pratiqué depuis très longtemps. Il contribue au recyclage d'éléments nutritifs comme l'azote et le phosphore ainsi qu'à l'apport de matière organique au sol. Cependant, l'intensification de la production animale a entraîné une concentration des élevages et des changements de pratiques, notamment en production porcine avec l'ajout de cuivre et de zinc dans la ration alimentaire. Ces éléments se retrouvant en partie dans les déjections, l'épandage des lisiers peut conduire à une accumulation du cuivre et du zinc dans le sol. Par ailleurs, la digestion anaérobie, ou méthanisation, connaît un regain d'intérêt pour la production d'une énergie renouvelable couplée au traitement de déchets organiques. Ce procédé est notamment bien adapté au traitement des déjections animales.

Dans ce contexte, notre objectif a été d'évaluer le rôle de la méthanisation sur le devenir et les impacts du cuivre et du zinc des lisiers porcins. Pour cela, nous nous sommes appuyés sur le fonctionnement d'une unité de méthanisation située dans la région de Pau (64) traitant quotidiennement environ 11 m³ de lisier produit par un élevage porcin naisseur-engraisseur de 250 truies. Le bilan de masse montre que l'azote est conservé au cours du traitement, entraînant un raisonnement sur l'azote apporté par épandage équivalent entre le lisier brut et le lisier méthanisé. Le cuivre et le zinc sont également conservés par la digestion anaérobie, et, dans le lisier méthanisé, l'essentiel du cuivre et du zinc est associé à une fraction granulométrique comprise entre 3 et 25 µm. En revanche, au cours du traitement anaérobie des pertes de phosphore, calcium et magnésium sont constatées du fait de la formation de cristaux de phosphates sur les parois de l'échangeur thermique du digesteur. La méthanisation permet le retour au sol d'une matière organique stabilisée puisque la moitié de la matière organique est convertie en biogaz lors de la digestion. De ce fait, après enfouissement au sol, les lisiers méthanisés génèrent moins de dégagement de CO₂ que les lisiers bruts. L'analyse granulométrique des lisiers met en évidence que l'hydrolyse des particules conduit à une augmentation relative du nombre de particules de très petite taille (< 0,1 µm) mais également à une augmentation relative du volume occupé par les particules de grande taille (> 60 µm). L'utilisation d'un modèle permettant d'interpréter l'analyse élémentaire des fractions solides, amène à la conclusion que le traitement anaérobie se traduit par une dépolymérisation de la matière organique. L'extraction chimique séquentielle montre que le cuivre et le zinc ont une répartition très différentes dans les fractions solides : alors que le zinc est préférentiellement sous forme de carbonates, le cuivre est majoritairement associé à la matière organique. De fait, cette fraction diminue après méthanisation au cours de laquelle le cuivre et le zinc évoluent vers des formes plus stables. La phytodisponibilité et la génotoxicité du cuivre et du zinc contenus dans un lisier brut ou un lisier méthanisé ont été évaluées en simulant les apports par épandage. Pour cela des fractions solides obtenues par centrifugation ont été utilisées. Elles contenaient l'essentiel de la matière sèche, du cuivre et du zinc des lisiers.

Aucune différence significative de phytodisponibilité du cuivre et du zinc n'a été observée entre lisier brut et lisier méthanisé pour des cultures de maïs et de fève. La stabilisation de la matière organique dans le lisier méthanisé a permis une diminution d'effet phytotoxique pour des apports importants de matière organique au sol. Le cuivre et le zinc apportés par épandage sur des périodes de 20 ou 100 ans sont absorbés par la fève et le maïs ; cependant, les métaux restent dans des gammes de concentrations non toxiques pour les végétaux. L'absorption de zinc a été corrélée au pH du support de culture et à la dose d'apport, tandis que celle du cuivre a été indépendante de ces paramètres.

L'évaluation de la génotoxicité selon la méthode normalisée n'a pas montré de différence significative entre lisier brut et lisier méthanisé. Une corrélation a été établie entre la teneur en cuivre dissous (< 0,45 µm) dans la solution d'exposition et l'apparition de micronoyaux dans les racines de *Vicia faba*. Un test rapide a été développé pour l'évaluation de la génotoxicité par contact direct au sol.

Mots-clefs : méthanisation, digestat, éléments traces métalliques, phytodisponibilité, écotoxicologie, agronomie, génotoxicité, *Vicia faba*