



HAL
open science

La gestion des effluents d'élevage et la production d'hydrogène sulfuré, cas particulier de la méthanisation

Pascal Peu

► To cite this version:

Pascal Peu. La gestion des effluents d'élevage et la production d'hydrogène sulfuré, cas particulier de la méthanisation. Sciences de l'environnement. Doctorat Chimie, Université de Rennes 1, 2011. Français. ⟨NNT : >. ⟨tel-02596212⟩

HAL Id: tel-02596212

<https://hal.inrae.fr/tel-02596212v1>

Submitted on 15 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization



THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne

pour le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Mention : Chimie

Ecole doctorale SDLM

présentée par

Pascal Peu

préparée à l'unité de recherche GERE
Gestion environnementale et traitement biologique des déchets
Cemagref

**La gestion des
effluents d'élevage
et la production
d'hydrogène sulfuré,
cas particulier de la
méthanisation**

**Thèse soutenue à Rennes
le 12 septembre 2011**

devant le jury composé de :

Serge Guiot,

Pr., Institut de recherche en biotechnologie, CNRC, Montréal /
rapporteur

Pierre Buffière,

Pr., Laboratoire de Génie Civil et d'Ingénierie
Environnementale, INSA, Lyon / *rapporteur / président du jury*

Jean-Yves Dourmad,

Dr., UMR Systèmes d'Elevage, Nutrition Animale et Humaine,
INRA, St Gilles / *examineur*

Jean-François Sassi,

Dr., Equipe Algues Produits, CEVA, Pleubian / *examineur*

Guillaume Bastide,

Ing., Gestion biologique des déchets, Collecte, traitement,
épandage, ADEME, Angers / *examineur*

Patrick DABERT

Dr., Unité de recherche gestion environnementale et
traitement biologique des déchets, Cemagref / *directeur de
thèse*

La gestion des effluents d'élevage et la production d'hydrogène sulfuré, cas particulier de la méthanisation

Résumé

Le travail réalisé au cours de cette thèse avait pour objectif principal d'étudier une filière de gestion des effluents d'élevage (lisier de porcs) depuis leur production, jusqu'à leur traitement par digestion anaérobie vis-à-vis de la production d'hydrogène sulfuré. L'hydrogène sulfuré est un gaz malodorant qui est produit au cours de la gestion anaérobie des effluents. Ce gaz présent à forte concentration dans les espaces confinés peut être dangereux voire mortel.

La première partie de ce travail de thèse s'est principalement intéressée à l'impact des régimes alimentaires des porcs sur la quantité de soufre présente dans les déjections. La charge en soufre apportée par chacun des ingrédients qui composent la formulation a été analysée. Les ingrédients issus des transformations agro-industrielles ont une charge en soufre minérale importante, cependant les céréales, ingrédients principaux, présentent des teneurs limitées. La rétention et l'excrétion du soufre ingéré par les animaux (porcs) ont été évaluées par une étude *in-vivo*. Le soufre absorbé par les animaux est faiblement retenu, au-delà des besoins nutritionnels, il est excrété principalement sous la forme de sulfates, par la voie urinaire. En complément à cette première étude, la dynamique des sulfates dans le lisier a été évaluée par une simulation de stockage anaérobie reproduisant les conditions normales de stockage des déjections animales. Dans ces conditions, nous montrons que les sulfates sont consommés et que du sulfure d'hydrogène est produit, lequel est, soit transféré vers la phase gazeuse, soit stocké dans la phase liquide. Cette consommation est directement dépendante de la présence ou non d'acides gras volatils contenus dans le lisier. La réduction dissimilatrice des sulfates par des micro-organismes sulfato-réducteurs semble être la principale voie de transformation des sulfates dans les conditions de stockage anaérobie des effluents.

La deuxième partie de ce travail de thèse est consacrée au devenir du soufre dans les unités de méthanisation agricoles où la production d'hydrogène sulfuré est sous la dépendance des mélanges de co-substrats digérés. Dans ce contexte, la gestion des substrats entrant dans les unités de méthanisation est importante car elle doit respecter le dimensionnement du système de traitement du biogaz (désulfuration biocatalytique) avant son utilisation.

Un inventaire des différents substrats utilisables par les unités de méthanisation à la ferme a donc été réalisé. Les teneurs en soufre total ainsi que les potentiels méthanogènes pour chacun de ces substrats ont été déterminés et un potentiel sulfurogène (concentration maximale d'hydrogène sulfuré du biogaz pour un substrat donné) a été défini. Grâce à ces données, un ratio C/S a pu être défini, lequel a permis de classer les différents substrats quant à leur potentialité à produire de l'hydrogène sulfuré. Sur la base de cet inventaire, certains co-substrats se distinguent par une potentialité à produire de l'hydrogène sulfuré plus élevée, notamment les algues d'échouage et certains déchets agro-industriels.

Les algues vertes d'échouage, substrat à faible ratio C/S, ont été testées sur des pilotes de digestion anaérobie en co-digestion avec des lisiers de porcs. Pour ces algues, le faible potentiel de production de biogaz couplé aux fortes teneurs en hydrogène sulfuré du biogaz mesuré avec nos essais limite fortement l'intérêt de leur utilisation dans les filières de méthanisation à la ferme.

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|---|-----------|
| INTRODUCTION | 3 |
| Chapitre 1: Etat des connaissances | 4 |
| 1. Les productions animales en Europe | 5 |
| 2. La production porcine en Europe et en France | 5 |
| 2.1. Les systèmes d'élevage et de gestion des effluents porcins en France | 6 |
| 2.2. Composition du lisier de porcs | 9 |
| 2.3. Les pollutions agricoles liées à la gestion des lisiers de porcs | 10 |
| 3. L'hydrogène sulfuré | 11 |
| 3.1. Histoire de sa découverte | 11 |
| 3.2. Caractéristiques physico-chimiques | 12 |
| 3.2.1. Propriétés en phase gazeuse | 12 |
| 3.2.2. Equilibre du sulfure d'hydrogène entre une phase gazeuse et une phase aqueuse | 13 |
| 3.3. Sources d'émissions connues | 15 |
| 3.4. Impact sur l'environnement | 15 |
| 3.5. Effets sur la santé | 16 |
| 3.5.1. Exposition aiguë | 16 |
| 3.5.1.1. Mécanisme d'action | 16 |
| 3.5.1.2. Cas d'expositions rapportés dans la littérature | 17 |
| 3.5.1.3. Etude du risque lié à l'exposition à l'hydrogène sulfuré, cas particulier de l'élevage porcine | 23 |
| 3.5.2. Exposition chronique | 25 |
| 3.5.2.1. Impacts sur la santé | 25 |
| 3.5.2.1. Exposition chronique des agriculteurs dans les élevages porcins | 25 |
| 3.5.3. Obligations réglementaires | 27 |
| 3.6. La nuisance olfactive | 28 |
| 3.6.1. Les odeurs en élevage porcine | 28 |
| 3.6.2. Concentrations retrouvées dans l'air des bâtiments d'élevage porcine | 29 |
| 3.6.3. L'hydrogène sulfuré, la nuisance olfactive et l'élevage porcine | 30 |
| 3.7. Un gaz corrosif | 31 |
| 3.7.1. Mécanisme d'action | 31 |
| 3.7.2. Impact pour le secteur agricole, cas particulier de la méthanisation agricole. | 32 |
| 3.8. Résumé des impacts et des nuisances pour la production porcine | 33 |
| 4. Les processus biologiques responsables de la production de l'hydrogène sulfuré | 34 |
| 4.1. Le cycle du soufre et ses biotransformations | 34 |
| 4.2. La digestion anaérobie | 35 |
| 4.2.1. La biochimie et la microbiologie de la digestion anaérobie | 35 |
| 4.2.2. La dépolymérisation des macromolécules | 36 |
| 4.2.3. L'acidogénèse | 36 |
| 4.2.4. L'acétogénèse | 38 |
| 4.2.5. La méthanogénèse | 40 |
| 4.2.6. La sulfato-réduction | 41 |
| 4.2.6.1. Activation du sulfate et production de sulfure | 41 |

| | |
|---|------------|
| 4.2.6.2. Métabolisme des sulfato-réducteurs | 42 |
| 4.2.7. <i>Compétition entre les archaea méthanogènes et les bactéries sulfato-réductrices</i> | 45 |
| 4.2.8. <i>Toxicité de l'hydrogène sulfuré dans les écosystèmes microbiens anaérobies</i> | 46 |
| 4.3. Les autres voies de production de l'hydrogène sulfuré | 47 |
| 4.4. Résumé sur les voies de production de l'hydrogène sulfuré | 49 |
| 5. Conclusion et présentation des chapitres | 49 |
| REFERENCES | 52 |
| Chapitre 2 : Contrôler les formes soufrées présentes dans les lisiers de porcs en utilisant l'approche nutritionnelle | 60 |
| Avant-propos : | 61 |
| MATERIALS AND METHODS | 65 |
| RESULTS AND DISCUSSION | 68 |
| CONCLUSIONS AND TECHNICAL IMPLICATIONS | 81 |
| ACKNOWLEDGEMENTS | 81 |
| REFERENCES | 82 |
| Chapitre 3 : Réponse des communautés sulfato-réductrices du lisier de porcs à des ajouts de sulfate et d'acides gras volatils | 84 |
| Avant-propos : | 85 |
| RÉSUMÉ | 87 |
| INTRODUCTION | 88 |
| MATÉRIELS ET MÉTHODES | 90 |
| RÉSULTATS | 94 |
| DISCUSSION | 100 |
| CONCLUSION | 103 |
| RÉFÉRENCES | 104 |
| Chapitre 4 : Détermination d'un « potentiel sulfurogène » pour différentes matières premières utilisables en co-digestion anaérobie dans la filière agricole | 107 |
| Avant-propos : | 108 |
| ABSTRACT | 110 |
| INTRODUCTION | 111 |
| METHODS | 113 |
| RESULTS AND DISCUSSION | 116 |
| CONCLUSION | 123 |
| REFERENCES: | 124 |

| | |
|---|------------|
| Chapitre 5 : Essai de valorisation de la biomasse algues (Ulva sp.) par co-digestion anaérobie avec du lisier de porcs | 126 |
| Avant-propos : | 127 |
| ABSTRACT | 129 |
| INTRODUCTION | 130 |
| MATERIALS AND METHODS | 131 |
| RESULTS AND DISCUSSION | 136 |
| CONCLUSION | 149 |
| REFERENCES | 151 |
| Chapitre 6 : Conclusions et perspectives | 153 |
| Liste des tableaux et figures | 162 |

*à ma mère, mon père et mon frère
à Karine, Titouan et Mathurin*

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'Unité de Recherche « Gestion environnementale et traitement biologique des déchets » du Cemagref de Rennes.

Je remercie tout d'abord les membres du jury, qui ont accepté de juger ce travail de thèse, en particulier les rapporteurs Serge Guiot et Pierre Buffière. Mes remerciements s'adressent également aux examinateurs, Jean-Yves Dourmad, Jean-François Sassi et Guillaume Bastide pour leur participation à ce jury de thèse.

Je tiens à exprimer ma gratitude au Cemagref et particulièrement à François Lacroix et Philippe Duchène directeurs de l'ancien département scientifique 3E et du nouveau département Ecotechnologies, ainsi qu'à Nicolas Petit et José Martinez, directeurs successifs du Centre de Rennes pour m'avoir soutenu tout au long de ce parcours qualifiant réalisé au sein de notre Établissement.

Je remercie aussi les équipes de l'INRA, UMR Système d'Élevage, Nutrition Animale et Humaine, du CEVA Algues produit, du CAREN Géosciences ainsi que le Département de Recherche et de Développement de la SAUR pour leurs contributions techniques à ces travaux de thèse.

Ces travaux de thèse n'auraient pas été possibles sans :

Mon indéfectible encadrant, Patrick (Directeur de thèse). Merci pour la liberté que tu m'as accordé pour ce travail, pour ta confiance, ta disponibilité et pour le temps passé. Merci aussi d'avoir partagé tes connaissances en microbiologie moléculaire.

Ma conseillère particulière, Anne-Marie. Merci pour toutes ces relectures, pour tes questions et ta réflexion et merci pour ta générosité. Merci aussi de m'avoir fait découvrir une des plus belles courses à pied au monde.

Mon professeur à la Recherche, José. Merci à toi, ancien camarade de jeu, mon formateur qui aime inlassablement me répéter : « *Shut up, listen and learn* ». Merci aussi, José d'être heureux de voir réussir les autres...

Ma chère binôme de laboratoire, Sylvie. Merci à toi pour ton implication et ta disponibilité dans ce travail de thèse. Sans ton aide précieuse, il m'aurait fallu 10 ans de plus !

Les rois du modèle, Fabrice et Romain. Merci à eux d'avoir éveillé ma curiosité pour un langage encore inconnu, la modélisation. Langage, que je commence à pratiquer mais heureusement, un langage encore peu répandu, tout comme la biologie moléculaire.

« Ma » secrétaire bien aimée, Marie-Noëlle. Merci à toi pour tout le temps que tu as passé et que tu passes encore à relire et à mettre en forme ces rapports avec autant de « fotes ».

Mon co-loc, Thierry. Merci à toi, partenaire de chambrée pour ta bonne humeur quotidienne et ton humour potache.

Un grand merci aussi à tous ceux qui ont participé à ces travaux : Michel l'homme aux doigts d'argent, pour la co-construction de ces si beaux pilotes, Patricia pour ton aide précieuse au laboratoire, Arnaud pour ton aide encore juvénile, Marie-Line la reine des ions. Merci aussi à SOS info (Fabrice et Amina) et SOS logistique (Philippe) pour leur professionnalisme. Enfin merci à tous les stagiaires qui participent, dans l'ombre, à nos travaux.

Mes remerciements vont aussi à tous ceux qui participent à la bonne ambiance de travail au Cemagref de Rennes : le sourire de Brigitte dans son « bocal », Aurélie, ma partenaire des pauses « thé », aux fumeurs du hall pilote (Céline, Christine, Amaury, Jean-Claude, JP et Eric), au duo Chic et Choc (Cécile et Mathilde), aux provocatrices Linda et Mylène, aux rappels à l'ordre des services administratifs (Sylviane, Brigitte et Monique), à mes partenaires de courses à pied (Marie-Emilie, Yoann...), à celles dont le ventre s'arrondit (Sophie et Anne-Cécile) et à Pascal le roi de l'esquimautage.

Merci aussi à Fabrice et Annie, mes premiers « employeurs » de m'avoir fait confiance pour mon premier « job » au Cemagref.

Merci à mes partenaires de travail, l'équipe Sowaste de Rennes, les équipes Epure de Lyon, d'Antony et de Bordeaux et l'équipe Sowaste d'Antony.

Enfin merci à ceux que je n'ai pas cités ici, qu'ils n'en soient pas offensés.

Pour finir, un très grand merci à Karine, qui me supporte tous les jours, et qui doit aussi supporter cette maîtresse parfois trop pesante qu'est le Cemagref...

Liste des publications et des communications

Articles à comité de lecture

Pascal PEU, Sylvie PICARD, Jean-Yves DOURMAD, Patrick DABERT (2011) **Managing sulfur content of pig diets to control sulfide production during anaerobic storage of pig slurry.** (*soumis à Journal of Environmental Quality*)

Pascal PEU, Anne-Marie POURCHER, Patrick DABERT (2011) **Sulphate-reducing microorganism's responses to sulphate and volatils fatty acids supplementation of stored pig slurry** (*en préparation pour une soumission à FEMS Microbiology Ecology*)

Pascal PEU, Sylvie PICARD., Romain GIRAULT, Fabrice BELINE, Gilbert BRIDOUX, Patrick DABERT (2011) **Prediction of hydrogen sulphide production during anaerobic digestion of organic substrates** (*soumis à Bioresource Technology*)

Pascal PEU, Jean-François SASSI, Romain GIRAULT, Sylvie PICARD, Fabrice BELINE, Patrick DABERT (2011) **Sulphur fate and anaerobic biodegradation potential during co-digestion of seaweed biomass (*Ulva sp.*) with pig slurry** (*soumis à Bioresource Technology, accepté avec revisions*)

Fabrice BELINE, Patrick DABERT, Pascal PEU, Romain GIRAULT (2010) **Methane production from farm effluents in France and Europe : principle, inventory and prospects.** *Fourrages*:155-161.

Guillaume JARRET, Alba CERISUELO, Pascal PEU, José MARTINEZ, Jean-Yves DOURMAD (2011) **Impact of pig diets with different fibre contents on the composition of excreta and their gaseous emissions and anaerobic digestion.** *Agriculture, Ecosystems and Environment* (*sous-presses*)

Brochure ou chapitre de livre :

Alain BESNARD, Laurence SAGOT, Jean LEGARTO, Pascal PEU, Sylvain MARSAC, (2011) **Valorisation fourragère de la biomasse.** Arvalis – *Institut du végétal – juin 2011*

Romain GIRAULT, Fabrice BELINE, Pascal PEU, Thomas LENDORMI (2011). **Guide la méthanisation multi-partenariale et territoriale – onglet 7 : substrats.** Coop de France. 8p. *en cours d'édition*

Communication à des congrès :

Fabrice BELINE, Marie-Line DAUMER, Anne-Marie POURCHER, Fabrice GUIZIOU, Pascal PEU, José MARTINEZ, Colin BURTON (2010) **Le traitement des effluents d'élevage : état actuel et perspectives / Treatment of livestock wastes: state of the art and perspectives** dans : *Élevages intensifs et environnement. Les effluents : menace ou richesse ?*, Paris, *Académie d'Agriculture de France*, p. 63-73.

Pascal PEU, Jean-Francois SASSI, Romain GIRAULT, Patrick DABERT, Fabrice BÉLINE (2011) **Essai de valorisation de la biomasse algues (*Ulva sp.*) par co-digestion anaérobie avec du lisier de porcs.** *Journées de la Recherche Porcine 15-16 février 2011 (poster)*

P. PEU, Sylvie PICARD, Jean-Yves DOURMAD, Patrick DABERT Managing sulphur content of pig diet to control sulphides production during pig slurry anaerobic storage.
In: Treatment and use of organic residues in agriculture. RAMIRAN network, Lisboa, 12-15 september 2010. (*présentation orale*)

Pascal PEU, Sylvie PICARD, Jean-Yves DOURMAD, Patrick DABERT Contrôler les formes soufrées présentes dans les lisiers de porcs en utilisant l'approche alimentaire.
Journées de la Recherche Porcine 7-8 février 2012 (présentation orale)

INTRODUCTION

Les systèmes d'élevage intensif sont souvent au cœur de diverses polémiques, notamment parce qu'ils sont à l'origine de pollutions ponctuelles et diffuses de l'environnement. Outre le fait que la gestion de leurs effluents participe aux problèmes d'eutrophisation des eaux de surface et à la contamination par les nitrates des eaux souterraines, ces exploitations émettent un grand nombre de molécules gazeuses. En effet, le stockage anaérobie des excréments des animaux d'élevage est à l'origine d'émissions de molécules telles que l'ammoniac, le méthane, l'hydrogène sulfuré et les composés odorants.

Or, en France un cadre législatif strict, le droit de l'environnement, impose certaines règles. Ainsi, la «loi sur l'air et l'utilisation rationnelle de l'énergie» publiée au journal officiel le 01 janvier 1997 énonce dans son second article : *« Constitue une pollution atmosphérique au sens de la présente loi l'introduction par l'homme, directement ou indirectement, dans l'atmosphère et les espaces clos, de substances ayant des conséquences préjudiciables de nature à mettre en danger la santé humaine, à nuire aux ressources biologiques et aux écosystèmes, à influencer sur les changements climatiques, à détériorer les biens matériels, à provoquer des nuisances olfactives excessives. »*

Dans ce cadre réglementaire, la gestion des effluents, est à l'origine de l'introduction par l'homme dans l'atmosphère et les espaces clos, de composés gazeux odorants, pouvant mettre en danger la santé humaine et pouvant détériorer les biens matériels et l'environnement. Parmi les composés émis par les effluents d'élevage, l'hydrogène sulfuré est un des gaz les plus préoccupants. Ce gaz malodorant est produit et émis sur toute la filière de gestion des effluents agricoles. Dans le cas de la filière porcine, ce gaz se retrouve dans les bâtiments d'élevage et autour des fosses de stockage des effluents où il peut être à l'origine d'accidents mortels. Sa nature corrosive est à l'origine de la détérioration des biens matériels, notamment les bâtiments et les équipements mécaniques. Enfin, son émission dans l'atmosphère participe au phénomène des pluies acides. Dans ce contexte, la maîtrise de sa production sur l'ensemble de la filière est un enjeu majeur. Ses sources de production doivent donc être identifiées afin de fournir les clés d'une éventuelle maîtrise.

Ce travail de thèse s'inscrivait dans ce cadre et avait pour objectifs de rechercher des situations à risque, vis-à-vis de la pollution à l'hydrogène sulfuré, pour la filière de gestion des lisiers de porcs ainsi que d'identifier les sources et les mécanismes de production. Ce travail de thèse a été réalisé dans le cadre d'une convention collaborative entre l'ADEME et le Cemagref de Rennes.

Chapitre 1:

État des connaissances

L'objectif de cet état des connaissances est de présenter les différents modes de gestion des effluents d'élevage en se focalisant plus particulièrement sur la production porcine. Cette synthèse portera une attention particulière sur l'hydrogène sulfuré et sur les risques et les nuisances occasionnés par ce gaz dans le secteur de l'élevage. Enfin, les processus biologiques de production de l'hydrogène sulfuré seront décrits, en lien avec la filière de gestion des effluents porcins et plus spécialement des lisiers.

1. Les productions animales en Europe

Les européens sont de grands consommateurs de produits animaux. La consommation moyenne sur une année pour chaque habitant de l'UE27¹ est estimée à 135kg de lait et de produits dérivés, 89kg de viande (équivalent carcasse) et 13kg d'œufs (Eurostat, 2010). Cette consommation couvre largement les besoins nutritionnels des européens, par contre, la demande en produits d'origine animale est en constante progression sur l'ensemble de l'Europe (EU27). Le tableau 1 synthétise les principales productions animales pour l'année 2009 (Eurostat, 2010). Ces productions en Europe sont par ordre décroissant, le lait, la viande de porcs et la viande de volailles. Elles sont essentiellement intensives et spécialisées sur le territoire européen, avec des quantités produites variant selon les pays et les systèmes de production. Certains pays sont très largement auto-suffisants à l'exemple de l'Irlande et du Danemark qui produisent 350% de leurs besoins en viande alors que la Grèce n'en produit que 54% (Eurostat, 2010).

Tableau 1 :
Principales productions de produits animaux en Europe pour l'année 2009 (exprimées en Mt)

| | Viande de porcs | Viande bovine | Lait | Viande de volailles | Œufs |
|--------|-----------------|---------------|-------|---------------------|------|
| EU27 | 22,0 | 7,9 | 134,4 | 11,6 | 6,4 |
| France | 2,0 | 1,5 | 22,9 | 1,7 | 0,9 |

Source : www.eurostat.com

2. La production porcine en Europe et en France

Le cheptel européen est d'environ 152 millions d'animaux, ce qui représente près de 10 % de la production mondiale. La viande de porcs représente à elle seule 22 millions de tonnes par an. L'élevage de porcs est très concentré sur le territoire européen (figure 1), avec des bassins de production très géolocalisés : la Belgique, la Hollande, le Danemark, le nord-ouest de

¹ Union européenne des vingt-sept, correspond à l'ensemble des pays qui appartiennent à l'Union européenne à partir du 1er janvier 2007.

l'Allemagne, la Lombardie en Italie, la Catalogne et la région de Murcia en Espagne, la Bretagne en France. Les densités d'élevage dans ces zones sont comprises entre 500 à plus de 1000 porcs.ha⁻¹ de surface agricole utile.

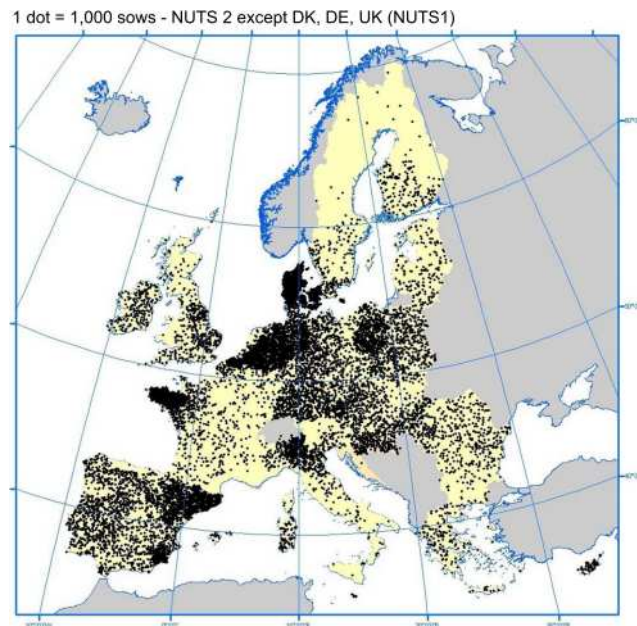


Figure 1
Répartition géographique de la production porcine en Europe
(un point représente 1000 truies, (Eurostat, 2010))

2.1. Les systèmes d'élevage et de gestion des effluents porcins en France

Cette production très géolocalisée résulte d'une intégration importante de la filière avec des regroupements des usines de fabrication des aliments, des exploitations agricoles, des abattoirs ainsi que des industries de transformation. Ce modèle de production a imposé une restructuration importante des élevages. Depuis les années 70, les exploitations porcines se sont modernisées en développant un nouveau type d'élevage n'exigeant pas d'autre sol que celui supportant l'outil de travail : « le hors sol ». Ce type d'élevage peut ainsi être décrit (figure 2) : le bâtiment d'élevage est entièrement couvert et isolé, le sol est couvert par des caillebotis, les animaux sont élevés dans des salles spécifiques pour chaque stade physiologique et l'aliment est distribué de façon automatique dans des mangeoires, sous forme de soupe ou de farine. Ces exploitations permettent de mieux contrôler l'alimentation, la croissance des animaux et les déchets produits, permettant ainsi d'augmenter les gains de productivité. Actuellement, plus de 80 % des porcs produits en France sont élevés dans ce type de bâtiment. Dans ces élevages hors sol, un déchet particulier est produit : le lisier. Celui-ci correspond à l'effluent généralement recueilli sous le bâtiment et qui se compose :

- d'un liquide constitué d'urines, d'eaux de lavage des locaux et de désinfectants. Ce liquide contient des matières minérales et organiques sous forme dissoutes.
- de matières en suspension provenant des matières fécales solides et de débris alimentaires (Béline, 2001).

En fonction de la configuration du bâtiment (figure 2), le lisier s'accumule d'abord dans les bâtiments, dans des pré-fosses de faible profondeur (1 à 1,5 m de hauteur totale) situées sous les caillebotis (figure 2-A). En fonction du stade physiologique des animaux (tableau 2), ces pré-fosses se remplissent jusqu'à atteindre 80 % du volume total. Lorsque les pré-fosses sont pleines, le lisier est évacué vers une fosse de stockage située à l'extérieur du bâtiment. L'évacuation est réalisée de façon gravitaire après remise en suspension des matières décantées.

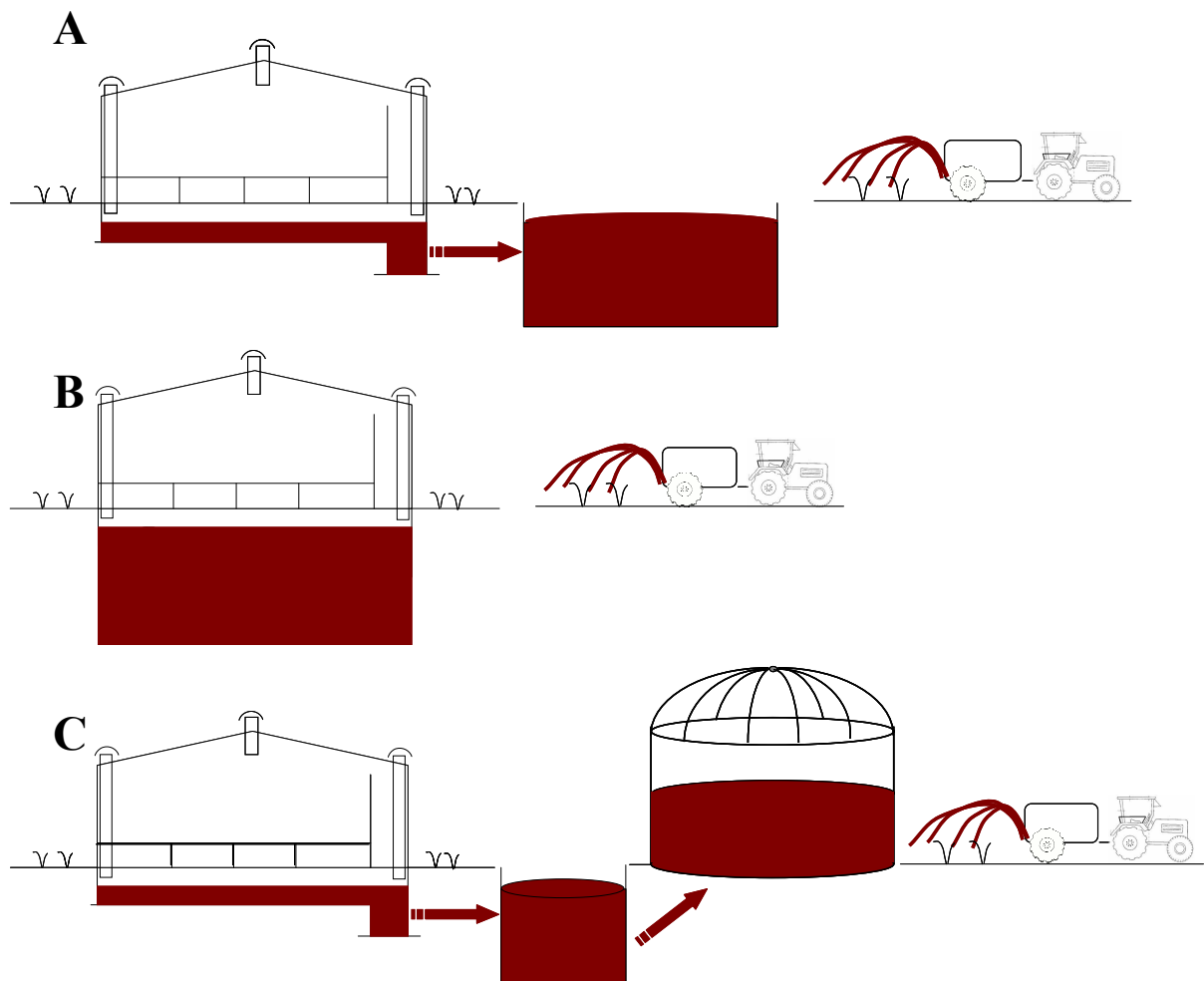


Figure 2
Les différents systèmes de gestion des lisiers de porcs
(A) pré-fosses avec fosse, (B) fosse profonde,
(C) pré-fosses avec fosse et unité de traitement anaérobie.

Tableau 2
Volumes de lisier produits ($L \cdot animal^{-1} \cdot j^{-1}$) en fonction du stade physiologique de l'animal, pour un élevage naisseur-engraisseur de 100 truies présentes (Levasseur, 1998)

| | Truies allaitantes | Truies gestantes | Porcelets en post-sevrage | Porcs en engraissement |
|-----------------------------|--------------------|------------------|---------------------------|------------------------|
| Lisiers produits en moyenne | 16,4 | 15,0 | 1,8 | 3,7 |

Une alternative à cette gestion existe, l'intégralité du lisier est alors stockée dans une fosse dite « fosse profonde » située sous le bâtiment d'élevage (profondeur supérieure à 2 m : figure 2-B). Le recensement agricole réalisé en 2008 (Agreste-Primeur, 2010) met en évidence que 34% des élevages porcins en France sont équipés avec des fosses profondes tandis que la moitié est équipée d'un système de pré-fosses couplé à une fosse.

La capacité totale de ces équipements de stockage des lisiers est variable. La réglementation impose que l'exploitation ait la capacité de stocker le lisier produit sur une période de 4 à 6 mois.

En règle générale les lisiers de porcs sont des fertilisants complexes qui renferment des éléments majeurs (azote minéral, orthophosphate, phosphore phytique, potassium) mais aussi des amendements organiques (matière organique) ainsi que des éléments mineurs ou micro-éléments (cuivre, zinc). Ils sont majoritairement valorisés par épandage sur les terres agricoles pour les productions végétales (Levasseur, 2005).

Dans certains cas, la filière de gestion peut-être plus complexe. Ainsi, des systèmes de traitement et/ou de valorisation peuvent s'intercaler entre le stockage et l'épandage des lisiers. Dans les zones en excédents structurels, définies par le décret relatif à la protection des eaux contre la pollution par les nitrates d'origine agricole (CEE-96-676, 1991), des systèmes de traitement sont installés pour traiter les excédents d'azote et de phosphore générés par l'exploitation. De plus, des filières de valorisation du lisier de porcs, telles que des procédés de méthanisation, peuvent être mises en place (figure 2-C). La méthanisation à la ferme repose sur l'utilisation des lisiers auxquels sont ajoutés des co-substrats énergétiques tels que des déchets issus de l'industrie agro-alimentaire, des collectivités et des exploitations agricoles. Cinquante installations en fonctionnement ou en projet étaient recensées fin 2008 (figure 3).

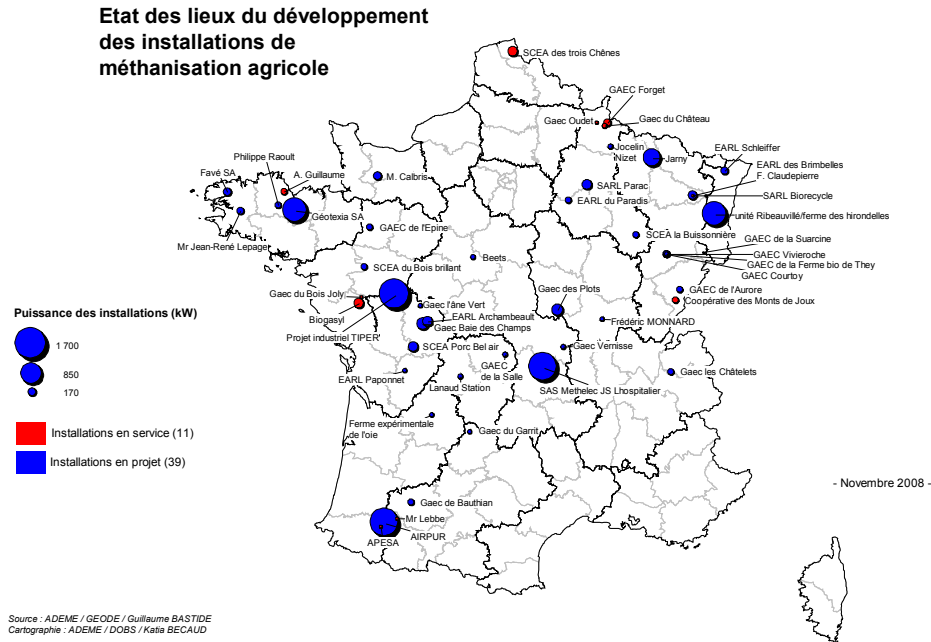


Figure 3
Etat des lieux du développement des installations de méthanisation agricole en France
(Source : Ademe, 2008)

2.2. Composition du lisier de porcs

Les lisiers de porcs ont des caractéristiques extrêmement variables suivant les stades physiologiques des animaux, les caractéristiques des aliments, les modes de conduite de l'élevage et la durée de stockage. Leurs teneurs en matière sèche (MS) et volatile (MV), la demande chimique en oxygène (DCO) et le carbone organique total (COT) varient d'un facteur souvent supérieur à 10 (tableau 3). Leurs teneurs en acides gras volatils (AGV) sont très variables de 0,5 à 16,6 g.L⁻¹ et sont fortement corrélées à la durée de stockage du lisier (Peu et al., 2004). Les concentrations en azote total (NTK) sont comprises entre 1,9 et 8,3 g-N.L⁻¹. L'azote ammoniacal (NH₄⁺) soluble représente en moyenne 70% de l'azote total des lisiers porcins et provient principalement de l'hydrolyse rapide de l'urée (Beline et al., 1998). Le reste de l'azote est sous forme organique (protéines et acides aminés) et est principalement localisé dans les matières en suspension (MES).

Tableau 3
Composition des lisiers porcins et bovins (*données Cemagref 1994 à 2005*)

| Caractéristiques | Lisiers de porcs | |
|---|------------------|-------|
| | Min* | Max** |
| pH | 7,2 | 8,2 |
| MS (g.kg ⁻¹) | 10 | 134 |
| MV (g.kg ⁻¹) | 6 | 102 |
| MES (g.kg ⁻¹) | 21 | 102 |
| DCO total (gO ₂ .kg ⁻¹) | 20 | 139 |
| DCO soluble (gO ₂ /kg) | 3 | 104 |
| COT total (gC.kg ⁻¹) | 10 | 55 |
| COT soluble (gC.kg ⁻¹) | 2 | 20 |
| AGV (g.kg ⁻¹) | 0,5 | 16,6 |
| NTK (gN.kg ⁻¹) | 1,9 | 8,3 |
| NH ₄ ⁺ (gN.kg ⁻¹) | 1,3 | 5,5 |
| COT/NTK | 2 | 7 |
| Soufre total (gS.kg ⁻¹) | 0,6 | 0,9 |

**valeurs minimales et **maximales observées.*

2.3. Les pollutions agricoles liées à la gestion des lisiers de porcs

L'utilisation des déjections animales telles que le lisier de porcs en excès par rapport aux besoins réels des cultures, entraîne une accumulation des éléments fertilisants dans le sol et un transfert vers les eaux (Martinez & Le Bozec, 2000). Les pollutions agricoles des eaux superficielles, souterraines et littorales sont essentiellement dues aux nitrates et au phosphore. La lixiviation des nitrates au-delà de la zone racinaire des sols contribue à la pollution des eaux souterraines. Le phosphore quant à lui est entraîné par érosion et transféré des sols vers les rivières par les eaux de pluie.

Concernant les sols, les apports élevés et répétés de quantités excessives de lisier et de fumier peuvent conduire à une accumulation de certains composés comme le phosphore et les métaux lourds dans les sols agricoles (Coppenet et al., 1993).

L'activité d'élevage est aussi à l'origine de pollutions atmosphériques par l'émission d'un grand nombre de composés gazeux (figure 4). Parmi ces gaz, certains sont particulièrement préoccupants tels le dioxyde de carbone, l'ammoniac, le méthane, le protoxyde d'azote et l'hydrogène sulfuré (Hartung and Phillips, 1994a).

Le dioxyde de carbone provient essentiellement de l'air expiré par les animaux et dans une moindre mesure du stockage des déjections. Les émissions d'ammoniac perdues par volatilisation proviennent essentiellement du stockage du lisier dans les fosses et les pré-

fosses et de l'épandage sur les terres agricoles. Les gaz à effet de serre ainsi que l'hydrogène sulfuré sont aussi émis au cours de la gestion des effluents d'élevage. Le méthane et l'hydrogène sulfuré sont produits principalement au cours des fermentations entériques et du stockage anaérobie des déjections animales. Pour le protoxyde d'azote, sa production est liée au processus de nitrification-dénitrification après épandage du lisier sur les sols.

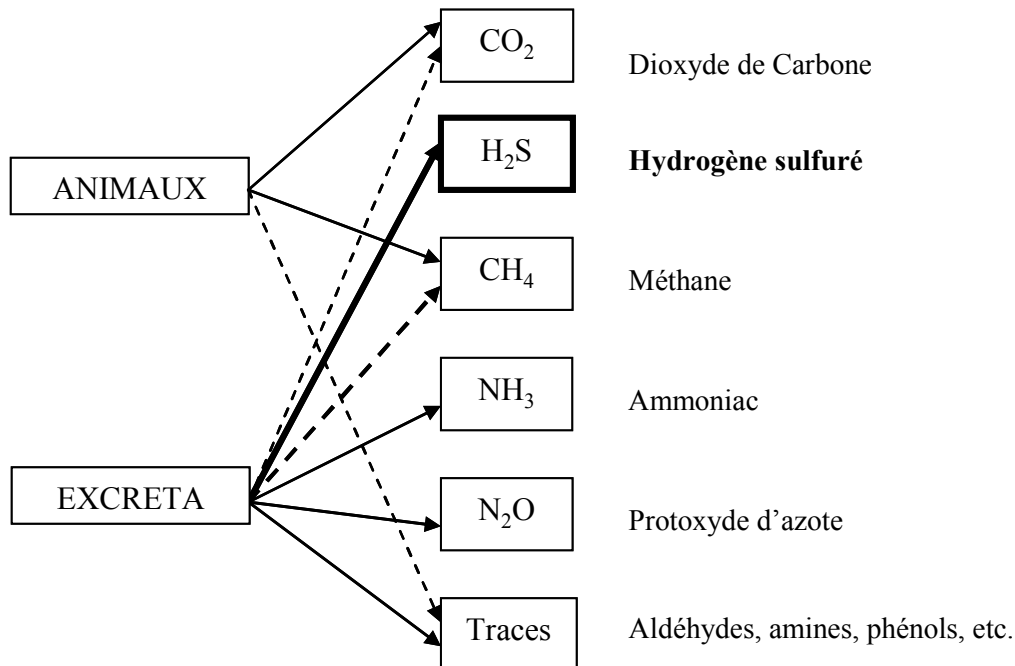


Figure 4
Principales émissions de gaz polluants résultant des activités d'élevage
(Hartung and Phillips, 1994a)

3. L'hydrogène sulfuré

3.1. Histoire de sa découverte

La molécule d'hydrogène sulfuré a été découverte en 1773 par Rouelle sans que celui-ci ne publie ses résultats. En 1785, Mr. de la Metherie, docteur en médecine, publia un essai analytique sur « l'air pur et les différentes espèces d'air ». Dans cet essai, l'auteur fit une synthèse de connaissances sur ce gaz.

« Tous les chimistes qui avaient travaillé sur les combinaisons du soufre avec les alkalis ou les chaux calcaires et métalliques, s'étaient aperçus qu'en y versant des acides, il s'en exhalait une vapeur très-puante. Meyer l'avait particulièrement observé et avait vu qu'elle pouvait s'enflammer. Rouelle le jeune l'enflamma également et en constata un grand nombre de propriétés ; Cette espèce d'air fut ensuite examinée avec beaucoup plus de soin par

Schéele, qui l'appela air puant du soufre. Bergman qui s'en est également occupé, l'a nommé air hépatique, parce qu'on le dégage ordinairement en versant un acide sur du foie de soufre ou hépar ; tous les chimistes s'en sont tenus à cette dénomination jusqu'à ce moment... »

Ainsi, déjà à la fin du 18^{ème} siècle, les différentes propriétés de l'hydrogène sulfuré, avaient été découvertes telles que son inflammabilité, ainsi que sa production à partir de certains minerais. Le « foie de soufre » est l'ancienne définition permettant de décrire les métaux combinés avec du soufre sous sa forme sulfure du type réalgar (AsS), blende (ZnS), galène (PbS), pyrite (FeS) etc.

L'hydrogène sulfuré est communément dénommé hydrure de soufre, sulfure de dihydrogène, acide sulfhydrique, gaz d'égouts, gaz des marécages, gaz d'œuf pourri.

3.2. Caractéristiques physico-chimiques

L'hydrogène sulfuré est le résultat de la combinaison de deux éléments : l'hydrogène H et le soufre S, soit la formule H₂S.

3.2.1. Propriétés en phase gazeuse

A température ambiante et à pression atmosphérique, l'hydrogène sulfuré est un gaz incolore, présentant une odeur caractéristique d'«œuf pourri ». C'est un composé stable, en l'absence de catalyseur. Sa dissociation en hydrogène et en soufre intervient à des températures très élevées (1200°K) (Norman, 1984). Ce gaz est inflammable en présence de comburant tel que l'oxygène. Sa combustion conduit à la production de dioxyde de soufre (SO₂). C'est un gaz qui est soluble dans l'eau et dans des solvants organiques tels que l'éthanol, l'éther et le glycérol. Les différentes propriétés physiques du gaz sont décrites dans le tableau 4.

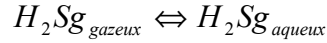
Tableau 4
Principales caractéristiques de l'hydrogène sulfuré

| Caractéristiques | Valeurs |
|--|------------|
| Numéro CAS* | 7783-06-04 |
| Masse Molaire (g.mol ⁻¹) | 34,08 |
| Point de fusion / point d'ébullition (°C) | -86/-60,2 |
| Pression de vapeur saturante (20°C) (MPa) | 1,82 |
| Masse volumique du gaz (1,013 bar au point d'ébullition) (kg.m ⁻³) | 3,16 |
| Solubilité dans l'eau, (1,013 bar et 0°C) (volume/volume) | 4,67 |
| Conductivité thermique (1,013 bar et 0 °C) (mW(m.K) ⁻¹) | 12,98 |

**Chemical Abstract Service*

3.2.2. Equilibre du sulfure d'hydrogène entre une phase gazeuse et une phase aqueuse

Le sulfure d'hydrogène présent dans une phase gazeuse donne lieu en présence d'une phase aqueuse à une réaction d'absorption suivie d'une réaction de dissociation (Roustan, 2003). A l'interface gaz liquide, cette réaction est schématisée par la réaction suivante :



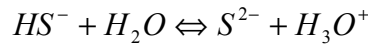
La loi de Henry, relative à cet équilibre de dissolution, est décrite par les équations suivantes :

$$[H_2S]_{aqueux} H'_{H_2S-eau} = y_{H_2S} P \quad (\text{Phase gazeuse parfaite})$$

$$[H_2S]_{aqueux} = [H_2S]_{gaz} \alpha_{H_2S-eau} \quad (\text{Phase liquide parfaite})$$

Les constantes H'_{H_2S-eau} et α_{H_2S-eau} ne dépendent que de la température avec H'_{H_2S-eau} : $10,13 \cdot 10^{-5} \text{ Pa.l}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ et α_{H_2S-eau} : 2,45 à 25 °C.

En milieu aqueux le sulfure d'hydrogène se comporte comme un diacide faible suivant les deux réactions :



Avec, HS^- l'ion hydrogénosulfure et S^{2-} l'ion sulfure.

Chacune de ces réactions est caractérisée par une constante d'équilibre Ka qui fait intervenir les concentrations des espèces mises en jeu :

$$Ka_{H_2S/HS^-} = \frac{[H_3O^+] \cdot [HS^-]}{[H_2S]}$$

$$Ka_{HS^-/S^{2-}} = \frac{[H_3O^+] \cdot [S^{2-}]}{[HS^-]}$$

Ces constantes d'équilibre dépendent de la température :

$$Ka_{H_2S/HS^-} = 3,64 \cdot 10^{-3} \exp(-3131/T) ; Ka_{HS^-/S^{2-}} = 6,37 \cdot 10^{-5} \exp(-5990/T)$$

A 25°C, le Ka_{H_2S/HS^-} est de $1,0 \cdot 10^{-7}$ (pKa=7,00) et le $Ka_{HS^-/S^{2-}}$ est de $1,2 \cdot 10^{-13}$ (pKa=12,92).

La figure 5 représente les fractions de chacune des formes du diacide pour une température de 25°C en fonction du pH.

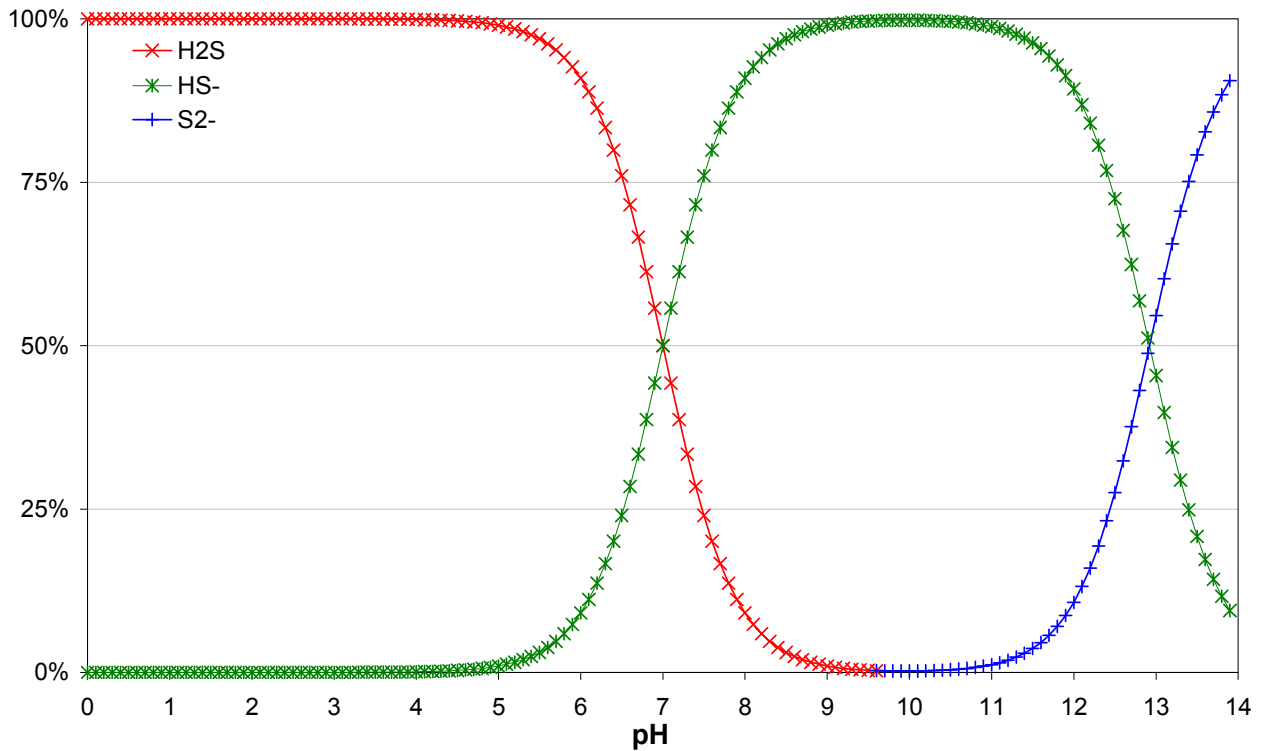


Figure 5
Proportions relatives des formes acido-basiques H₂S/HS⁻ et S²⁻ (en milieu aqueux)

La concentration totale (C_T) en phase aqueuse des espèces sulfurées (sulfure d'hydrogène aqueux, ion hydrogénosulfure et sulfure) est :

$$C_T = [H_2S]_{\text{aqueux}} + [HS^-] + [S^{2-}]$$

Les équations précédentes permettent de relier la concentration totale (C_T) à l'équilibre, à la composition de la phase gazeuse, et de la phase liquide avec le pH.

$$C_T = [H_2S]_{\text{gaz}} \alpha_{H_2S - \text{eau}} (1 + 10^{\text{pH} - \text{p}K_{a_{H_2S/HS^-}}} + 10^{2\text{pH} - \text{p}K_{a_{H_2S/HS^-}} - \text{p}K_{a_{HS^-/S^{2-}}}})$$

La dissolution du sulfure d'hydrogène dans l'eau dépend des réactions de dissociation qui accompagnent cette mise en solution. En milieu acide la forme majoritaire est la forme non dissociée. En milieu basique ($8,5 < \text{pH} < 11,5$) la forme prédominante est l'ion hydrogénosulfure. En milieu très basique ($\text{pH} > 11,5$) les ions sulfures apparaissent et peuvent conduire à la formation de sels peu solubles (sulfure de fer ou de cuivre). La concentration en sulfure d'hydrogène non dissocié est alors si faible que la phase gazeuse en équilibre aurait une teneur pratiquement nulle en H₂S.

3.3. Sources d'émissions connues

Il existe très peu de données sur les sources et les volumes d'H₂S émis dans l'atmosphère. Cependant, il est estimé que plus de 100 millions de tonnes seraient transférées vers l'atmosphère chaque année (Beauchamp et al., 1984; Cantrell and Young, 2009; Millot et al., 1995). Ces émissions sont soit d'origine anthropogénique, soit d'origine naturelle. Les émissions naturelles sont essentiellement dues :

- à la décomposition par les micro-organismes du soufre protéique contenu dans les végétaux et les animaux,
- au pétrole brut et au gaz naturel,
- à l'activité volcanique et aux sources géothermales.

Les sources anthropogéniques représentent de l'ordre de 3% des émissions totales (Millot et al., 1995), elles sont principalement associées à l'activité industrielle. Parmi celles-ci peuvent être mentionnées :

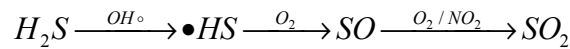
- les raffineries de pétrole et de gaz naturel, les centrales à charbon,
- le traitement des graisses et des huiles animales, les sucreries, l'industrie de la pêche, les laiteries, les fromageries, les brasseries,
- la production et le stockage de déchets liquides, les réseaux d'assainissement des eaux, les élevages intensifs,
- les usines à papiers, les travaux d'asphalte, les manufactures de fibres synthétiques et de caoutchouc, les tanneries et laineries, les mines et la transformation de minerais (or, cuivre, plomb), la métallurgie.

Ces sources d'origine humaine sont très variées et la liste mentionnée ci-dessus n'est pas exhaustive. Par ailleurs, il convient de souligner qu'en absence d'obligation réglementaire, les industriels émetteurs d'hydrogène sulfuré dans l'atmosphère ne fournissent aucune donnée sur les flux émis (INERIS, 2009).

3.4. Impact sur l'environnement

Quand l'hydrogène sulfuré est transféré vers l'atmosphère, il est rapidement oxydé en dioxyde de soufre (SO₂). Le temps de séjour d'une molécule d'hydrogène sulfuré dans la troposphère terrestre a été calculé à 18 heures (Beauchamp et al., 1984). Cette réaction d'oxydation implique deux intermédiaires : •HS (radical sulfure) et SO (monoxyde de soufre). En présence d'un radical hydroxyle (OH•), l'H₂S est transformé en radical sulfure et subit 2

oxydations pour former du monoxyde de soufre puis du dioxyde de soufre. La réaction globale est représentée par l'équation suivante :



Le dioxyde de soufre se recombine ensuite avec l'humidité contenue dans l'atmosphère pour produire de l'acide sulfurique qui retombe avec la pluie sous forme de pluies acides.

3.5. Effets sur la santé

L'hydrogène sulfuré est un gaz extrêmement toxique pour les humains. Ainsi, à forte concentration dans l'air (> 700ppm), il peut être mortel. Il est reconnu dans la littérature que sa toxicité et son action rapide ressemblent aux intoxications au cyanure d'hydrogène (Oesterhelweg and Puschel, 2008). Cependant, à faible concentration et pour des expositions longues, l'hydrogène sulfuré peut aussi causer des effets notoires sur la santé. Les différentes toxicités aiguës et chroniques sont présentées ci-dessous.

3.5.1. Exposition aiguë

3.5.1.1. Mécanisme d'action

La voie pulmonaire d'absorption de l'hydrogène sulfuré semble être la voie principale d'exposition au toxique. Cependant, d'autres voies d'absorption peuvent être impliquées (peau, système digestif) mais semblent être peu importantes chez l'homme (Beauchamp et al., 1984).

Après absorption pulmonaire, l'hydrogène sulfuré est dissous dans le sang. Le pH du sang (7,3) solubilise une partie sous forme d'ion sulfure, l'autre restant sous forme gazeuse. Les deux formes du soufre, en raison de leur forte solubilité lipidique sont distribuées dans tout l'organisme et se retrouvent notamment au niveau du cerveau, du foie, des reins et des intestins (Beauchamp et al., 1984; Christia-Lotter et al., 2007; Guidotti, 1996).

Les sulfures présents dans le sang interagissent avec des enzymes et d'autres macromolécules telles que l'hémoglobine et la myoglobine pour former des sulfhémoglobines. Cependant, les quantités produites sont insuffisantes pour contribuer à la toxicité aiguë de l'H₂S. Par contre, la plupart des macromolécules ayant des ponts disulfures sont facilement perturbées par la présence de sulfure. Les enzymes cibles et critiques qui sont très souvent rapportées dans la littérature sont les cytochromes oxydases impliquées dans le système de transport des

électrons de la phosphorylation oxydative, principal système de production énergétique de la cellule (Guidotti, 1996). La toxicité aiguë serait donc due à l'inactivation de ces enzymes qui jouent un rôle essentiel dans le métabolisme aérobie.

L' H_2S est principalement éliminé par des mécanismes d'oxydation qui le transforment en thiosulfate et en sulfates. Il est essentiellement éliminé sous formes de sulfates, de thiosulfates dans les urines et à un degré moindre, par voie biliaire dans les selles (figure 6).

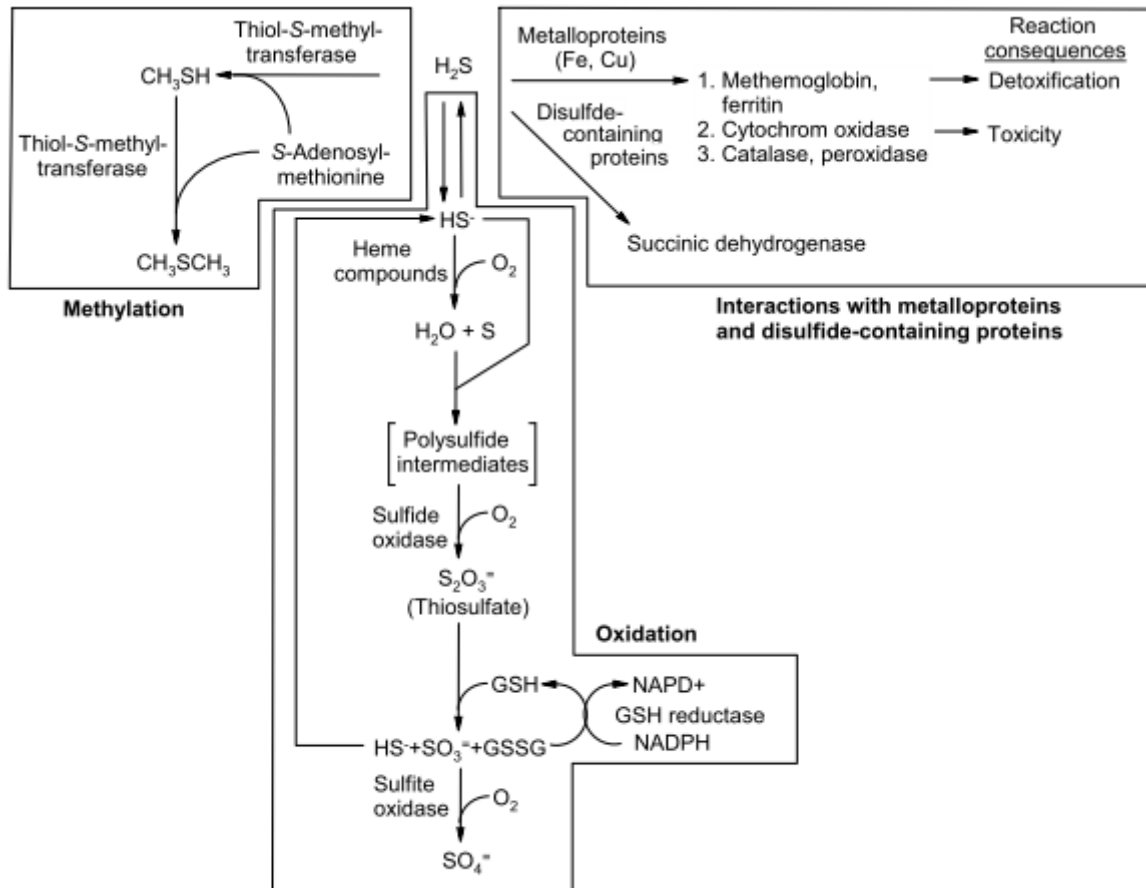


Figure 6
Métabolisme de l'hydrogène sulfuré d'après (Beauchamp et al., 1984)

3.5.1.2. Cas d'expositions rapportés dans la littérature

Les accidents graves liés à l' H_2S sont rares, alors que les accidents bénins semblent être plus fréquents mais ne sont pas toujours recensés. En effet, les symptômes engendrés par l'inhalation de ce toxique n'entraînent pas obligatoirement de consultation médicale et les symptômes ne sont pas reconnus par les médecins (Novotny-Baumann, 2008). Le nombre

annuel d'intoxications à l'H₂S n'est pas connu. En France, il n'existe pas de système de centralisation des informations concernant ces intoxications (Novotny-Baumann, 2008).

Les données bibliographiques qui se rapportent aux cas de toxicité aiguë sont présentées dans le tableau 5. Elles ont été sélectionnées en s'appuyant sur la synthèse bibliographique de Novotny-Baumann en 2008, complétée avec des articles parus depuis cette date. Les données parues entre 1964 et 2010 représentées dans le tableau 5, issues de 57 articles scientifiques, précisent la gravité des symptômes (mortalité), les sur-accidents survenus lors du secours des victimes, les origines géographiques des cas d'intoxication et les sources incriminées. De plus, des données complémentaires ont été recueillies, notamment les concentrations en H₂S sur le lieu de l'accident (quand ces chiffres étaient disponibles) et une attention particulière a été portée sur le déroulement du scénario de l'accident.

Il ressort de cette revue de littérature que 46 % des cas d'intoxication aiguë rapportés ont eu lieu aux Etats Unis et sont relatés par des scientifiques américains. Toutefois, ce chiffre élevé peut-être attribué non pas à un nombre de cas plus important aux Etats-Unis mais à un report plus systématique des accidents dans la littérature scientifique. Malgré ce biais, indépendamment de la localisation, il apparaît que les accidents liés à une intoxication aiguë sont souvent mortels puisque 33% des victimes sont décédées. Ces intoxications sont directement liées à une forte exposition des personnes au toxique. Les concentrations en H₂S mesurées sur les lieux des accidents, quand celles-ci ont pu être mesurées, étaient dans la plupart des cas élevées et supérieures à 400 ppm, ce qui confirme les données consacrées aux effets physiologiques publiées antérieurement (tableau 6) (Beauchamp et al., 1984; Guidotti, 1996; Oesterhelweg and Puschel, 2008; Querellou et al., 2005)

Tableaux 5
Cas d'expositions reportés dans la littérature

| [H ₂ S] Ppm | Exposition mortelle | Exposition non-mortelles | Sur-accidents | Situation d'exposition | | | Référence |
|---------------------------|------------------------|-----------------------------|---------------|------------------------|--------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| | | | | Sources d'exposition | Pays | Origine du gaz | |
| - | 3 | - | Oui | Egouts | USA | Décomposition matière organique | (Adelson and Sunshine, 1966) |
| - | 2 | - | Non | Pétrolier | Irlande | Pétrole, gaz et charbon | (Ago et al., 2008) |
| - | - | 1 | Non | Effluents d'élevage | Danemark | Décomposition matière organique | (Arentoft et al., 1993) |
| 1000 | - | 4 | Oui | Tannerie | Nouvelle-Zélande | Chimique | (Audeau et al., 1985) |
| - | 13 | 208 | Non | Combustible fossile | Canada | Pétrole, gaz et charbon | (Burnett et al., 1977) |
| - | 1 | - | Non | NaHS | USA | Chimique | (Chaturvedi et al., 2001) |
| - | 1 | - | Non | Egouts | France | Décomposition matière organique | (Christia-Lotter et al., 2007) |
| - | - | 2 | Oui | Effluents d'élevage | Nouvelle Zélande | Décomposition matière organique | (Couch et al., 2005) |
| - | 1 | 1 | Non | Hotel | Turquie | Sources géothermales | (Daldal et al., 2010) |
| - | 3 | 4 | Oui | Vidange réservoir | Taiwan | Sources géothermales | (Deng and Chang, 1987) |
| - | 5 | 1 | Oui | Effluents d'élevage | USA | Décomposition matière organique | (Donham et al., 1982) |
| 1000 | - | 1 | Non | Raffinerie | USA | Pétrole, gaz et charbon | (Gabbay et al., 2001) |
| - | 1 | 1 | Oui | Chimie du Cobalt | Inde | Industriel | (Gangopadhyay and Das, 2007) |
| >750 | - | 1 | Non | Œufs en décomposition | USA | Décomposition matière organique | (Gerasimon et al., 2007) |
| - | 3 | 2 | Non | Egouts | France | Décomposition matière organique | (Guillon et al., 1983) |
| - | - | 5 | Non | Chimie du Cobalt | Australie | Industriel | (Gunn and Wong, 2001) |
| - | 1 | - | Non | Effluents d'élevage | Australie | Décomposition matière organique | (Hagley and South, 1983) |
| - | 4 | 4 | Non | Egouts | USA | Décomposition matière organique | (Hall and Rumack, 1997) |
| - | - | 2 | Non | Asphalte | USA | Pétrole, gaz et charbon | (Hoidal et al., 1986) |
| - | 1 | 1 | Non | Fongicide | Ca(S) _n | Chimique | (Horowitz et al., 1997) |
| - | 3 | - | Oui | Vidange réservoir | Japon | Décomposition matière organique | (Kage et al., 2004) |
| - | 1 | - | Non | Bac de décantation | Japon | Sources géothermales | (Kage et al., 1998) |
| - | 3 | 1 | Oui | Réservoir | Japon | Industriel | (Kage et al., 2002) |
| - | - | 1 | Non | Réservoir | Canada | Pétrole, gaz et charbon | (Kemper, 1966) |
| - | - | 1 | Non | - | - | Pétrole, gaz et charbon | (Kilburn, 1993) |
| - | 2 | 50 | - | Benzyl Polysulfuré | - | Industriel | (Kleinfeld et al., 1964) |
| - | 2 | - | Non | Egouts | USA | Décomposition matière organique | (Knight and Presnell, 2005) |
| - | 49 | 37 | Oui | Effluents d'élevage | Suisse | Décomposition matière organique | (Knoblauch and Steiner, 1999) |
| 8000 | 2 | - | Non | Effluents d'élevage | Japon | Décomposition matière organique | (Kojima and Kobayashi, 1979) |
| - | - | 6 | Non | Abattoir | UK | Décomposition matière organique | (Luck and Kaye, 1989) |
| - | 1 | 1 | Non | Egouts | France | Décomposition matière organique | (Millot et al., 1995) |

| | | | | | | | |
|--------|----|----|-----|---------------------|--------------|---------------------------------|----------------------------------|
| - | 1 | 2 | Oui | Effluents d'élevage | USA | Décomposition matière organique | (Morse et al., 1981) |
| - | - | 1 | Non | Maintenance | Corée du Sud | Pétrole, gaz et charbon | (Nam et al., 2004) |
| >500 | - | 2 | Non | Habitation | USA | - | (Nelson and Robinson, 2002) |
| - | - | 1 | Non | Pisciculture | USA | Décomposition matière organique | (Nikkanen and Burns, 2004) |
| - | 10 | - | Oui | Effluents d'élevage | Allemagne | Décomposition matière organique | (Oosterhelweg and Puschel, 2008) |
| - | 3 | 1 | Non | Effluents d'élevage | USA | Décomposition matière organique | (Osbern and Crapo, 1981) |
| - | 1 | 10 | Non | Habitation | UK | Décomposition matière organique | (Parra et al., 1991) |
| - | - | 1 | Non | Plâtres | USA | Industriel | (Peters, 1981) |
| - | 1 | 2 | Oui | Egouts | France | Décomposition matière organique | (Querellou et al., 2005) |
| - | - | 1 | Non | - | USA | Industriel | (Ravizza et al., 1982) |
| - | - | 3 | Non | Papeteries | Espagne | Industriel | (Sanz-Gallen et al., 1994) |
| - | - | 1 | Oui | Egouts | USA | Décomposition matière organique | (Schneider et al., 1998) |
| - | 1 | - | Non | Déchets | Australie | Industriel | (Simson and Simpson, 1971) |
| > 700 | - | 1 | Non | Réservoir | USA | Pétrole, gaz et charbon | (Smilkstein et al., 1985) |
| - | 4 | - | Non | IAA | Inde | Décomposition matière organique | (Singh, 2010) |
| - | - | 1 | Non | Effluents d'élevage | Irlande | Décomposition matière organique | (Spiers and Finnegan, 1986) |
| - | - | 1 | Non | Na ₂ S | USA | Chimique | (Stine et al., 1976) |
| - | - | 3 | Non | Raffinerie | USA | Pétrole, gaz et charbon | (Tanaka et al., 1999) |
| - | - | 1 | Non | IAA | USA | Industriel | (Tvedt et al., 1991) |
| - | - | 1 | Non | Effluents d'élevage | USA | Décomposition matière organique | (Tvedt et al., 1991) |
| - | - | 2 | Oui | IAA | USA | Industriel | (Tvedt et al., 1991) |
| - | - | 1 | Non | Tannerie | USA | Chimique | (Tvedt et al., 1991) |
| - | - | 1 | Non | Plate forme | USA | Pétrole, gaz et charbon | (Tvedt et al., 1991) |
| 400 | - | 1 | Non | NaHS | USA | Chimique | (Vathenen et al., 1988) |
| - | - | 4 | Oui | - | USA | Industriel | (Whitcraft et al., 1985) |
| > 1000 | 1 | - | Non | Egouts | USA | Décomposition matière organique | (Yalamanchili and Smith, 2008) |

Tableau 6
Effets physiologiques en fonction des concentrations en H₂S

| [H ₂ S] ppm | Sensations et symptômes |
|------------------------|--|
| 0,02-0,13 | Perceptions olfactives (odeurs d'œufs pourris) |
| >50 | Irritation des muqueuses (yeux et voies respiratoires) |
| >100 | Irritation de la gorge |
| >100-150 | Perte de conscience |
| 250-500 | Excitation, mal de tête, cyanose, œdème pulmonaire |
| 500-100 | Ataxie, nausées, vertiges, facultés intellectuelles perturbées |
| >1000 | Apnée, paralysie du système nerveux (mort en quelques minutes) |
| >5000 | Mort imminente |

Bien que l'hydrogène sulfuré soit détecté à un niveau très bas de concentration (0,1 ppm) (tableau 6), ce sont les fortes concentrations en H₂S dans l'air qui sont la cause des accidents. L'hydrogène sulfuré engendre une sidération olfactive pour des teneurs supérieures à 100 ppm, rendant le toxique indétectable par le sens olfactif.

A partir du tableau 5 une répartition sectorielle des accidents a été réalisée et est présentée sur la figure 7.

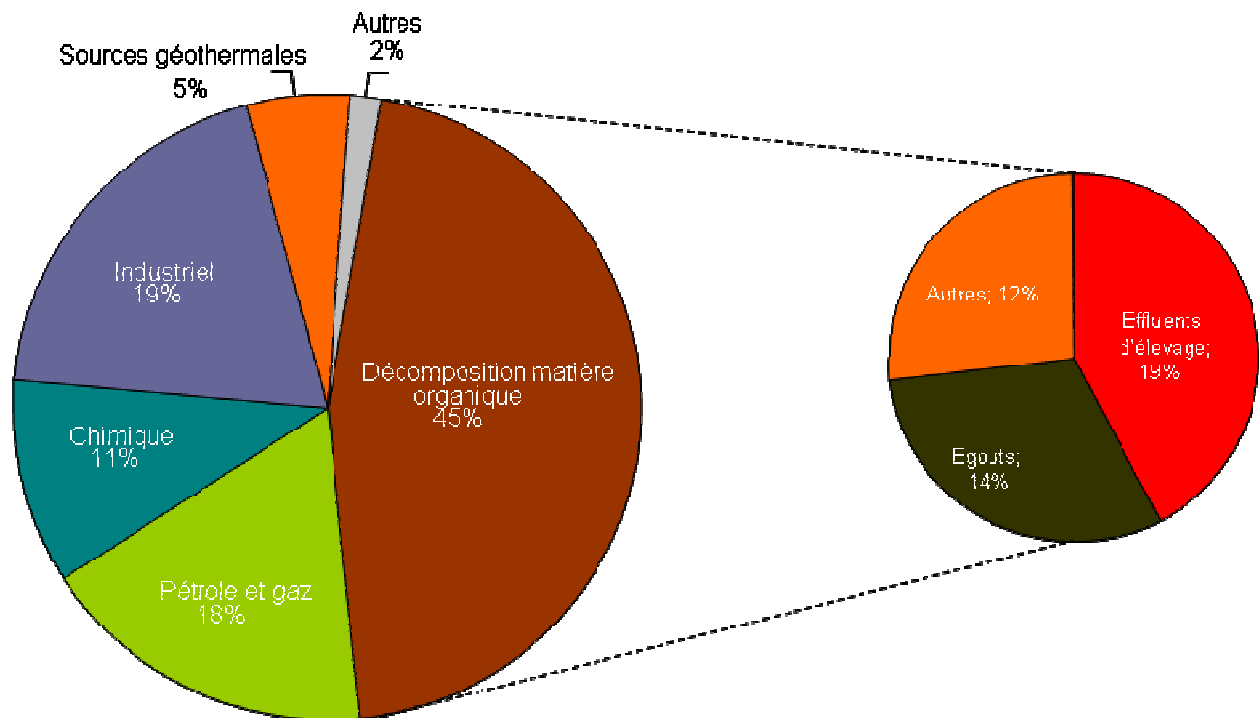


Figure 7
Répartition sectorielle des intoxications aiguës recensées dans la littérature

Comme le montrent le tableau 5 et la figure 7, la majorité des cas d'intoxication sont recensés dans un contexte professionnel. Néanmoins, et dans une moindre mesure, les sources

naturelles conduisent aussi à des expositions accidentelles. Celles-ci impliquent très souvent les sources géothermales. Trois études mentionnent en effet des intoxications suite à des vidanges de réservoirs dans des stations électriques géothermiques (Deng and Chang, 1987; Kage et al., 1998) et une autre étude rapporte un accident dans un hôtel qui proposait du thermalisme (Daldal et al., 2010). Cependant, les cas d'intoxication les plus fréquents impliquant des origines naturelles concernent des mines de minerais soufrés (Nickel, Cobalt, ...) ou l'exploitation de pétrole brut et de gaz naturel.

Les expositions accidentelles reportées dans la littérature sont principalement liées aux activités humaines. Les techniciens procédant à l'extraction, au raffinage du pétrole et du gaz naturel, naturellement riches en H₂S sont exposés à des intoxications aiguës. Les industries chimiques, agro-alimentaires et de transformation des minerais sont elles aussi susceptibles d'entraîner des expositions. Ces secteurs d'activités sont responsables de 48 % des cas recensés (tableau 5).

La dégradation de matière organique semble être l'origine majeure de la production de ce gaz mortel. Sous cette dénomination, deux types de situations sont à considérer : le travail dans les égouts (14%) et les travaux impliquant la manipulation d'effluents d'élevage (19%). Dans ces deux situations, la source est liée à la décomposition anaérobie de substances organiques et minérales sous l'action de micro-organismes. Ainsi, en présence de micro-organismes « sulfurogènes », le soufre contenu dans les effluents est transformé en H₂S (Mackie et al., 1998) et conduit à des accidents souvent mortels (Beauchamp et al., 1984; Gerasimon et al., 2007; Oesterhelweg and Puschel, 2008; Querellou et al., 2005). Les accidents liés à la manipulation des effluents d'élevage, ont principalement lieu dans les bâtiments et les fosses où sont stockés les effluents et plus rarement pendant l'épandage. En raison du caractère exceptionnel de ces accidents et de la non-formation des travailleurs, les risques sont non-maîtrisés et les personnes exposées ne réagissent pas correctement. Très souvent des personnes à proximité tentent de porter assistance à la victime inconsciente provoquant dans la plupart des cas un sur-accident (tableau 5). Ces sur-accidents sont plus fréquemment retrouvés dans des situations impliquant les manipulations d'effluents (45% des cas). Oesterhelweg et al. (2008) ont publié un cas de sur-accident ayant occasionné 3 victimes successives qui ont tenté de porter secours à leur collègue.

3.5.1.3. Etude du risque lié à l'exposition à l'hydrogène sulfuré, cas particulier de l'élevage porcin

La présence d' H_2S dans les effluents d'élevage peut conduire à des intoxications aiguës (tableau 6) lorsque sa concentration est supérieure à 500 ppm. Les élevages de porcs sont particulièrement concernés par ce risque qui correspond à la probabilité de rencontre entre un danger (l'hydrogène sulfuré) et une exposition (concentration en H_2S supérieure à 500 ppm). Afin d'évaluer les différentes expositions des travailleurs dans le cas particulier des élevages porcins, les concentrations en H_2S relevées dans les bâtiments, à proximité des fosses de stockage des effluents et lors de l'épandage, ont fait l'objet d'une synthèse bibliographique présentée dans le tableau 7.

Les teneurs les plus élevées ont été observées au dessus des fosses de stockage où elles peuvent atteindre des concentrations de l'ordre de plusieurs milliers de ppm. L'agitation entraîne une augmentation de ces teneurs (figure 8). Lors de l'épandage, les teneurs en H_2S sont inférieures à 20 ppm. L' H_2S reste néanmoins problématique en raison de son implication dans la génération des mauvaises odeurs.

A la vue des données recueillies dans la littérature, le risque d'une exposition mortelle à l' H_2S semble être très faible dans les bâtiments d'élevage et plus important lors des reprises des effluents. Cependant, ce risque n'est pas maîtrisé car il est très difficile d'évaluer et de prédire l'exposition des travailleurs.

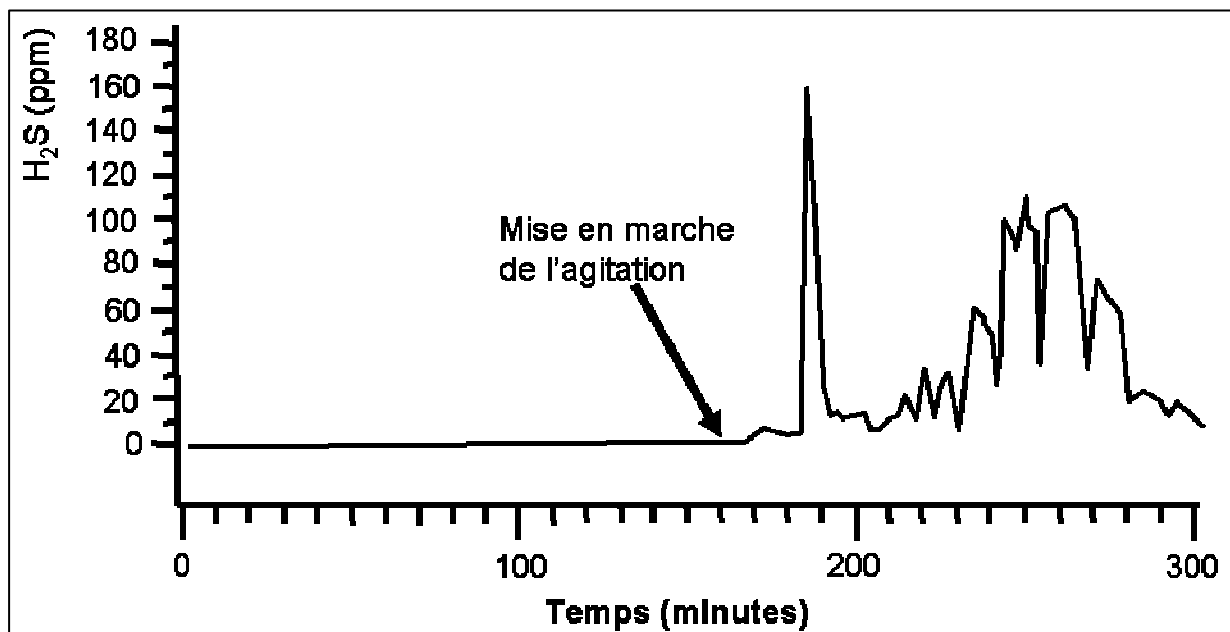


Figure 8
Concentration en H_2S mesurée dans un bâtiment d'élevage pendant le brassage du lisier contenu dans une fosse profonde (Patni and Clarke, 1991)

Tableau 7

Concentrations en hydrogène sulfuré mesurées dans les bâtiments d'élevage porcin, au dessus des fosses de stockage et lors de l'épandage du lisier de porcs

| [H ₂ S] Moyenne, [min-max] | Localisation de la mesure | Type de batiment | Localisation | Références |
|--|--|---|--------------|--------------------------------|
| 624 ppb [120-2174] | - | Bâtiment d'élevage sur caillebotis | USA | (Avery et al., 1975) |
| 90 ppb | - | Bâtiment d'élevage sur caillebotis | USA | (Muehling, 1970) |
| 380 ppb | - | Bâtiment d'élevage sur caillebotis | USA | (Zhang et al., 1998) |
| 180-232 ppb [18-1107] | au dessus des pré-fosses / au niveau des extracteurs d'air | Bâtiment d'élevage sur caillebotis | USA / | (Ni et al., 2002) |
| 19 ppb [6-52] | 1,2 m au dessus des pré-fosses | Bâtiment d'élevage sur caillebotis | UE | (Louhelainen et al., 2001) |
| 102 ppb [30-180] | 1,5 m au dessus des pré-fosses | Bâtiment d'élevage sur caillebotis, ventilation forcée | Taiwan | (Chang et al., 2001) |
| 47-996 ppb | au niveau des extracteurs d'air | Bâtiment d'élevage sur caillebotis | USA | (Blunden et al., 2008) |
| 296 ppb [74-672] | 1,5 m au dessus des pré-fosses | Bâtiment d'élevage sur caillebotis, fosse profonde, ventilation naturelle | Corée du Sud | (Kim et al., 2008) |
| 612 ppb [122-1235] | 1,5 m au dessus des pré-fosses | Bâtiment d'élevage sur caillebotis, fosse profonde, ventilation forcée | Corée du Sud | (Kim et al., 2008) |
| 115 ppb [47-313] | 1,5 m au dessus des pré-fosses | Bâtiment d'élevage sur caillebotis, fosse profonde, ventilation naturelle | Corée du Sud | (Kim et al., 2008) |
| 270 ppb [87-912] | 1,5 m au dessus des pré-fosses | Bâtiment d'élevage sur caillebotis, évacuation de lisier forcée, ventilation forcée | Corée du Sud | (Kim et al., 2008) |
| 138 ppb [46-290] | 1,5 m au dessus des pré-fosses | Bâtiment d'élevage sur litière accumulée | Corée du Sud | (Kim et al., 2008) |
| 1-150 ppm | Ambiance du bâtiment | Bâtiment d'élevage après agitation du lisier contenu dans la fosse profonde | USA | (Patni and Clarke, 1991) |
| 1320 ppm [43-5690] | Au-dessus de la surface du lisier stocké | Bâtiment d'élevage, porcs en post-sevrage sur caillebotis, fosse profonde | USA | (Donham et al., 1988) |
| 1380 ppm [116-6040] | Au-dessus de la surface du lisier stocké | Bâtiment d'élevage, truies sur caillebotis, fosse profonde | USA | (Donham et al., 1988) |
| 10 900 ppm [96-75 900] | Au-dessus de la surface du lisier stocké | Bâtiment d'élevage, porcs en engraissement sur caillebotis, fosse profonde | USA | (Donham et al., 1988) |
| 14 ppm | 10 m sous le vent après épandage | - | France | (Belli Filho and Martin, 1996) |

Il est aussi intéressant de noter que de faibles niveaux de concentration sont détectés dans le voisinage des porcheries. Une étude conduite par Donham et al. (2006) met en évidence un résiduel d'H₂S compris entre 0,7 et 30 ppb dans l'air en fonction du type d'élevage. Cette exposition permanente et significative est évaluée comme une toxicité chronique.

3.5.2. Exposition chronique

3.5.2.1. Impacts sur la santé

Selon l'INERIS (2009), l'exposition intermittente mais répétée à des concentrations faibles d'H₂S (quelques ppb à 10 ppm) entraînerait des manifestations variables (céphalée, asthénie, troubles de la mémoire, nausée, anorexie). Toutefois, très peu de données sont actuellement disponibles dans la littérature sur ces effets chroniques. Certains auteurs suggèrent qu'aucune corrélation significative ne peut être faite entre ces expositions et les symptômes (Beauchamp et al., 1984), tandis que d'autres, à l'exemple de Durand and Wilson (2006), démontrent le contraire. Ces auteurs ont étudié l'exposition chronique à l'hydrogène sulfuré d'une population localisée à Rotorua en Nouvelle Zélande située à proximité d'une source géothermale dégageant de l'hydrogène sulfuré en continu. Dans cette ville, les émissions d'H₂S sont très hétérogènes avec des concentrations dans l'air ambiant comprises entre 30 ppb jusqu'à 1 ppm, avec 30% de la population exposée (habitant à moins de 4 km de la source). Pour cette étude, 11 années de collecte de données ont été réalisées et les résultats montrent que l'incidence d'une pathologie respiratoire est plus importante pour les résidents vivant à proximité de la source géothermale comparativement à l'ensemble de la population. Le risque relatif de développer une maladie respiratoire a été multiplié par 5. Plus précisément le risque est multiplié par 5 pour la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) et par 8 pour l'asthme. Cette étude qui révèle l'impact de l'exposition continue des populations à l'hydrogène sulfuré est unique dans la littérature. En effet, la plupart des articles évaluent la toxicité chronique avec des mélanges de toxiques associant les poussières, les gaz et les micro-organismes rendant impossible l'attribution d'une pathologie à l'un ou l'autre de ces toxiques.

3.5.2.1. Exposition chronique des agriculteurs dans les élevages porcins

L'évolution des modes de production agricole a paradoxalement contribué à la fois à l'amélioration des conditions de travail et à une exposition accrue aux risques respiratoires. Le confinement des animaux ainsi que l'augmentation de leur densité dans les bâtiments

d'élevage, en particulier pour la production porcine, ont conduit, de manière significative, à augmenter l'intensité et la durée de l'exposition aux toxiques de l'air intérieur (Kirkhorn and Garry, 2000). L'hydrogène sulfuré répertorié comme l'un de ces toxiques est responsable, pour partie, des pathologies respiratoires des agriculteurs. Les statistiques de la médecine du travail dans le secteur agricole montrent que les prévalences des maladies du système respiratoire sont plus importantes que dans l'ensemble de la population (Eduard et al., 2009; Gassner and Spuhler, 1995; Iversen, 1997; Kirkhorn and Garry, 2000; Laplante et al., 2007; Linaker and Smedley, 2002; Omland, 2002; Von Essen and Donham, 1999). Néanmoins, en raison de la faible proportion que représente la population employée dans l'agriculture, les maladies respiratoires chez ces personnes ne représentent pas un problème majeur de santé publique. Les pathologies les plus fréquentes sont la rhinite et l'asthme (Nejjari et al., 1996). De rares cas de pneumopathies ont été décrits.

Plusieurs facteurs peuvent expliquer les prévalences élevées de ces maladies respiratoires, notamment l'exposition à différents toxiques tels que les poussières organiques (moisissures, spores, aliments...), les poussières inorganiques (silicates), les produits chimiques (pesticides, fertilisants, désinfectants etc.), les gaz (ammoniac, hydrogène sulfuré, oxyde d'azote, gaz d'échappement) et les agents infectieux (fièvre Q, tuberculose bovine, psittacose, etc.).

Le lien entre les pathologies et l'exposition aux différents toxiques est difficile à établir. Cependant, récemment Eduard et al. (2009) ont essayé de corréler les expositions des travailleurs du secteur agricole aux différentes sources de contamination selon plusieurs critères : (i) les différents types de productions agricoles (production de végétaux ou production d'animaux), (ii) le sexe (homme ou femme) et (iii) le tabagisme. Plusieurs toxiques (poussières organiques, silice, spores de champignons, spores d'actinomycètes, acariens, bactéries, endotoxines, glucanes, ammoniac et hydrogène sulfuré) ont été mesurés sur 127 fermes. Pendant deux années, plus de 8 000 agriculteurs ont été suivis par questionnaires et par évaluation spirométrique (mesure de la respiration). Les résultats de cette étude montrent que chez les agriculteurs, les prévalences de la bronchite chronique, de la BPCO, et la réduction des fonctions respiratoires ont été augmentées par rapport à l'ensemble de la population. Les éleveurs sont plus fortement impactés et présentent des diminutions significatives du volume expiratoire maximum (-41mL pour l'ensemble et -29 mL pour les producteurs de porcs). Le nombre d'années de travail dans les exploitations semble avoir un impact significatif sur ce volume expiratoire maximal (-3mL.an⁻¹). Une analyse en régression multiple a permis d'attribuer les pathologies à un toxique. Les bronchites chroniques seraient

causées par des expositions répétées aux poussières, la BCPO serait liée à l'exposition à l'ammoniac, la diminution du volume expiratoire maximale serait due à l'hydrogène sulfuré (baisse de 56 mL en cas de forte exposition (1 ppm)).

3.5.3 Obligations réglementaires

L'hydrogène sulfuré est un gaz très toxique et très inflammable. Des mesures de prévention particulièrement strictes s'imposent lors de son utilisation et de toute opération au cours de laquelle il peut apparaître (INRS, 2009). Les prescriptions doivent être prises dans toutes les zones susceptibles d'entraîner une exposition aiguë à ce toxique. Des valeurs limites d'exposition professionnelle ont été définies dans le Code du Travail (décret 2008-244 du 7 mars 2008) et sont présentées dans le tableau 8.

Tableau 8
Valeurs limites d'exposition professionnelle

| VLEP* Pays | Moyenne pondérée sur 8h | | Court terme | |
|----------------------------|-------------------------|--------------------|-------------|--------------------|
| | ppm | mg.m ⁻³ | ppm | mg.m ⁻³ |
| France (valeur indicative) | 5 | 7 | 10 | 14 |
| USA (ACGIH)** | 10 | - | 15 | - |
| Allemagne (valeur MAK)*** | 5 | 7,1 | - | - |

*VLEP : Valeur Limite d'Exposition Professionnelle

** ACGIH : American Conference of Governmental Industrial Hygienists

*** valeur MAK : Maximale ArbeitsplatzKonzentration, valeur moyenne pondérée sur une journée de travail de 8 heures pour une semaine de 40 heures

En France, les valeurs maximales d'exposition professionnelle à l'hydrogène sulfuré, définies par le Code du Travail, ne doivent pas dépasser 5 ppm sur 8 heures de travail avec des valeurs d'exposition maximale de 10 ppm. La comparaison de ces obligations réglementaires aux concentrations retrouvées dans les environnements des élevages de porcs (tableau 7) met en évidence des situations où le Code du Travail est respecté notamment dans les bâtiments d'élevage, et à l'inverse des situations où il n'est pas respecté surtout au moment des reprises des effluents stockés dans les fosses de stockage.

En complément aux obligations réglementaires décrites ci-dessus, le Code du Travail prévoit des recommandations qui sont applicables dans toute les zones de travail où de l'hydrogène sulfuré est présent et notamment :

- l'instruction du personnel vis-à-vis des risques graves d'intoxication, d'incendie et d'explosion présentés par le sulfure d'hydrogène, des précautions à observer et des mesures à prendre en cas d'accident.
- l'interdiction d'accès des zones où existe un risque d'exposition aux personnes non autorisées.
- la possession d'appareils de protection respiratoire autonomes isolants pour certains travaux de courte durée, à caractère exceptionnel, et pour les interventions d'urgence.
- le contrôle en continu de la teneur de l'atmosphère en sulfure d'hydrogène afin de donner l'alarme dès que la concentration dépasse le seuil compatible avec la sécurité du personnel (10 ppm dans un atelier) sans se fier à l'odeur, car le gaz provoque rapidement une anesthésie olfactive. Si possible, maintenir la concentration à des valeurs notablement plus faibles que la valeur limite d'exposition pour assurer simultanément la salubrité du local et le confort des salariés.

Ces recommandations sont très peu observées dans le secteur agricole. Actuellement, aucune formation des travailleurs n'est réalisée sur ce risque et il est très rare de trouver des équipements de protection individuelle permettant de protéger les travailleurs ainsi que des détecteurs de ce gaz toxique dans les bâtiments, ou sur les personnes amenées à manipuler les effluents (Muhlbauer et al., 2008).

3.6. La nuisance olfactive

Une nuisance olfactive ou « mauvaise odeur » est liée à la présence d'un ou plusieurs composés chimiques dans l'air.

3.6.1. Les odeurs en élevage porcin

Les premiers travaux consacrés aux odeurs émises par les élevages porcins ont été publiés dans les années 80. Plusieurs chercheurs (Spoelstra, 1980; Williams, 1984) ont essayé de relier les émissions gazeuses odorantes aux molécules présentes dans les échantillons de gaz. Dans leur revue bibliographique, O'Neill and Phillips en 1992 ont recensé l'ensemble des composés identifiables dans l'air des bâtiments d'élevage. Ils ont ainsi identifié 168 composés à la sortie des ventilateurs des bâtiments. Ces composés dont le seuil de perception odorant (ODT ; Odor Detection Thresholds) était compris entre $0,0000003 \text{ mg.m}^{-3}$ et l'infini (sans odeur) ont été regroupés en 11 familles comprenant notamment les composés soufrés. Parmi

les 168 composés, 30 présentent un ODT inférieur à $0,001 \text{ mg.m}^{-3}$ et sont donc particulièrement odorants (tableau 9).

Tableau 9
Principaux composés ayant un faible ODT présents dans l'air des bâtiments d'élevage (O'Neill et al., 1992)

| Plage d'ODT mg.m^{-3} | Composés |
|-----------------------------------|--|
| | Noms |
| $\leq 0,00001$ | méthanethiol (méthylmercaptan), 2-propanethiol (isopropylmercaptan), 2-propène-1-thiol (allylmercaptan), 2,3-butanedioine |
| 0,000011-0,00005 | acide phénylactétique, éthanethiol (éthylmercaptan), 4-méthylphénol (p-crésol) |
| 0,000051-0,0001 | hydrogène sulfuré, 1-octène-3-one |
| 0,00011-0,00025 | benzenethiol (thiophénol), 2,4-decadienal, acide 3-méthylbutanoïque (<i>iso</i> -valérique), 2,6-diméthylphénol, 3-méthylphénol, 2,4-nonadienal, decanal |
| 0,00026-0,005 | Triméthylamine, acide octanoïque (acide caprylique), nonanal, diméthylsulfide (méthylthiométhane), éthyldithioéthane, 2-phényléthanol, 3-méthylindole (skatole), acide butanoïque (acide butyrique), 2-méthylphénol, 2-butène-1-thiol (crotylmercaptan), 2-nonanal |
| 0,00051-0,001 | Indole, acide pentanoïque (acide valérique), butanal |

Les mercaptans ont des seuils de détection très faibles, proches du centième de picogramme par mètre cube d'air. Les acides carboxyliques, les aldéhydes, les composés phénolés, les composés soufrés et les amines sont également très odorants. L'hydrogène sulfuré n'est pas aussi odorant que les autres composés soufrés avec un ODT plus fort. Cependant son seuil de perception olfactif reste faible, de l'ordre de $0,0001 \text{ mg.m}^{-3}$.

3.6.2 Concentrations retrouvées dans l'air des bâtiments d'élevage porcin

Hartung and Phillips (1994b), Hobbs et al. (1998), Zahn et al. (2001), ont suivi les émissions de gaz odorant à la sortie des ventilateurs d'une porcherie et au cours du stockage du lisier. Les concentrations des diverses molécules odorantes retrouvées sont présentées dans le tableau 10.

Les quantifications des molécules odorantes réalisées dans ces trois études mettent en évidence que des faibles quantités de composés soufrés sont émises par rapport aux autres molécules, acides carboxyliques notamment. L' H_2S y est à chaque fois retrouvé et les concentrations mesurées dans les bâtiments sont du même ordre de grandeur que celles rapportées dans la littérature et résumées dans le tableau 7.

Tableau 10
Concentration en molécules odorantes retrouvées dans l'air extrait des bâtiments d'élevage

| Composés retrouvés dans l'air | | Concentrations mesurées (mg.m ⁻³) | | |
|-------------------------------|---------------------|---|-----------------------|--------------------------------|
| | | Bâtiment ^a | Bâtiment ^b | Fosse de stockage ^b |
| Acides carboxyliques | Acide acétique | 0,189 | 0,281 | 0,262 |
| | Acide propionique | 0,156 | 0,126 | 0,050 |
| | Acide iso-butyrique | 0,318 | 0,023 | 0,107 |
| | Acide butyrique | 0,040 | 0,142 | 0,586 |
| | Acide iso-valérique | 0,035 | 0,073 | 0,098 |
| | Acide valérique | 0,049 | 0,43 | 0,360 |
| | Acide n-héxanoïque | 0,010 | nd | 0,010 |
| | Acide i-héxanoïque | 0,004 | nd | 0,105 |
| | Acide heptanoïque | 0,003 | nd | 0,008 |
| | Acide octanoïque | 0,005 | | |
| | Acide pelargonique | 0,004 | | |
| Phénols et indoles | Phénol | 0,023 | 0,009 | 0,024 |
| | p-crésol | 0,039 | 0,085 | 0,032 |
| | 4-éthylphénol | | 0,003 | 0,002 |
| | Indole | 0,0011 | nd | 0,0011 |
| | Skatole | 0,0011 | 0,0005 | 0,0014 |
| Amines | Diméthylamine | 2,0 | | |
| | Triméthylamine | 2,2 | | |
| | Ammoniac | 8,5 | 9,6 | 7,9 |
| Composés soufrés | Mercaptan | | | |
| | Dimethyl sulfure | | | |
| | Dimethyl disulfure | | 0,012 | nd |
| | Dimethyl trisulfure | | | |
| | Hydrogène sulfuré | 2 | 0,054 | 0,048 |
| Autres gaz | Acétone | 0,33 | | |

^a(Hartung and Phillips, 1994b) ; ^c(Zahn et al., 2001) : air extrait des bâtiments.

^b(Zahn et al., 2001) : air environnant une fosse de stockage.

(nd : non détectés)

3.6.3. L'hydrogène sulfuré, la nuisance olfactive et l'élevage porcin

Comme le montrent les études présentées ci-dessus, les composés soufrés participent fortement aux nuisances olfactives rencontrées dans l'élevage porcin sur toute la filière de gestion des effluents. Toutes les molécules odorantes de cette famille possèdent un seuil de perception faible et sont émises en quantité importante dans les bâtiments d'élevage et lors des opérations de stockage et d'épandage des effluents.

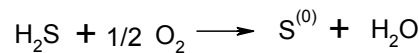
Cependant, Jacobson (1997) a essayé de relier la nuisance olfactive aux émissions d'hydrogène sulfuré au cours du stockage de diverses déjections. La corrélation entre ces

deux paramètres est assez mauvaise ($r = 0,2$) ce qui n'est pas surprenant dans la mesure où les odeurs sont associées à plusieurs molécules formant un panache malodorant.

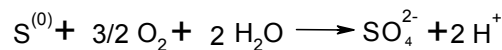
3.7. Un gaz corrosif

3.7.1. Mécanisme d'action

Les surfaces au contact des atmosphères humides plus ou moins chargées en H_2S peuvent-être la source de développement de biofilms bactériens contenant des micro-organismes autotrophes sulfo-oxydants du genre *Thiobacillus* (Gadekar et al., 2006; Visser et al., 1997). Ces bactéries sont capables d'oxyder l' H_2S pour former du soufre à l'état élémentaire (S^0) et/ou de l'acide sulfurique (H_2SO_4) (Zhang et al., 2008) :

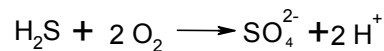


$$(\Delta G^0 = -209,4 \text{ kJ.mol}^{-1})$$



$$(\Delta G^0 = -587,1 \text{ kJ.mol}^{-1})$$

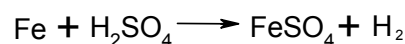
Soit :



$$(\Delta G^0 = -798,2 \text{ kJ.mol}^{-1})$$

Les ratios de mélange des deux gaz (oxygène et hydrogène sulfuré) modulent la production d'acide sulfurique et/ou d'hydrogène sulfuré. En condition limitante en oxygène, le produit principal de cette oxydation est le soufre (Diaz et al., 2010).

Le processus de corrosion est le résultat de la réaction de l'acide sulfurique avec les matériaux qui composent la surface où se développe le biofilm (métaux, ciment etc.). Par exemple pour le fer, l'acide sulfurique formé conduit à la production du sulfate de fer (II) selon la réaction suivante :



Pour les surfaces de type béton à base de ciment, l'acide sulfurique réagit avec les constituants du ciment pour former de l'ettringite ($3CaO \cdot Al_2O_3 \cdot 3CaSO_4 \cdot 31H_2O$), provoquant un gonflement et à terme, une désagrégation du matériau durci (Zhang et al., 2008).

3.7.2. Impact pour le secteur agricole, cas particulier de la méthanisation agricole.

Les structures en béton et en acier installées dans les élevages porcins (bâtiments, fosses de stockage) sont souvent exposées à des gaz plus ou moins chargés en H₂S (tableau 7). Cette exposition cause une corrosion prématurée des aciers et la dégradation des bétons ce qui impose un renouvellement plus rapide des installations (Assaad Abdelmsee et al., 2008). Différents auteurs ont testé la résistance des bétons aux attaques agressives de l'hydrogène sulfuré. Les bétons de formulation classique sont sensibles aux expositions. Cependant, l'ajout de silice (Idriss et al., 2001) ou l'incorporation en plus forte concentration de tricalcium aluminate (Assaad Abdelmsee et al., 2008) diminue cette sensibilité.

Pour les installations de production de biogaz à la ferme, l'H₂S est aussi problématique dans la mesure où le biogaz contient toujours de l'hydrogène sulfuré. En fonction des substrats utilisés pour alimenter les digesteurs, les teneurs en H₂S peuvent dépasser les 20 000 ppm (tableau 11).

Tableau 11
Comparaison des constituants du gaz naturel et du biogaz.

| | <i>Gaz Naturel</i> | <i>Biogaz</i> |
|--|--------------------|-------------------------|
| Méthane (CH ₄ , %) | 91 | 55-70 |
| Ethane (C ₂ H ₆ , %) | 5,1 | 0 |
| Propane (C ₃ H ₈ , %) | 1,8 | 0 |
| Butane (C ₄ H ₁₀ , %) | 0,9 | 0 |
| Pentane (C ₅ H ₁₂ , %) | 0,3 | 0 |
| Dioxyde de carbone (CO ₂ , %) | 0,6 | 30 - 45 |
| Azote (N ₂ , %) | 0,3 | 0 - 2 |
| Hydrogène (H ₂ , %) | 0 | 0 |
| Hydrogène Sulfuré (H₂S, ppm) | ~1 | 100 - >20 000 |
| Ammoniac (NH ₃ , ppm) | 0 | ~100 |
| Humidité relative (%) | trace | saturé |
| Pouvoir énergétique (kCal.m ⁻³) | 10000 | ~5000 |

La présence d'H₂S dans le biogaz conduit également à des problèmes de corrosion. Les équipements les plus sensibles sont les conduites d'acheminement du biogaz et les équipements de valorisation énergétique (tableau 12). En effet l'hydrogène sulfuré se retrouve dans les chambres de combustion en mélange avec l'oxygène pour former des oxydes de soufre corrodant les équipements et diminuant de fait, leur durée de vie (Diaz et al., 2010). La plupart des constructeurs de systèmes de valorisation énergétique du biogaz fonctionnant au biogaz agricole garantissent leurs matériels pour des biogaz ayant des concentrations maximales en H₂S comprises entre 1 et 7% (Wellinger and Linberg, 2000) (tableau 12).

Tableau 12
Systèmes de valorisation énergétique *versus* teneur en H₂S et contraintes liées à la technologie choisie (Wellinger and Linberg, 2000)

| Type de valorisation | H ₂ S | Autres contraintes |
|---|------------------|---|
| Chaudière | <1000 ppm | <i>Evacuer les condensats</i> |
| Moteur à combustion interne (co-génératrices) | <100 ppm | <i>Sans composés organométalliques Evacuer les condensats</i> |
| Microturbines | <70000 ppm | <i>Sans composés organométalliques Evacuer les condensats</i> |
| Cellules de carburant | <1 ou <20 ppm | <i><10 ppm CO ; <20 ppm H₂O ; <1 ppm halogènes</i> |
| Moteur Stirling | <1000 ppm | <i>Evacuer les condensats</i> |
| Adduction au réseau | <4 ppm | <i>>95% CH₄ ; <0.003 H₂O.m⁻³</i> |

Pour pallier ce problème, les biogaz agricoles doivent être traités avant leur utilisation. Ces traitements mettent en œuvre (i) des procédés d'absorption chimique en phase solide, (ii) des techniques de perméation membranaire ou (iii) des techniques biologiques. Pour l'absorption chimique, l'H₂S est piégé en faisant circuler les biogaz dans un filtre solide ou liquide contenant des oxydes métalliques (Fe₂O, ZnO) pour le faire précipiter sous forme de blende (ZnS) et de sulfure de fer (III) (Fe₂S₃). Les techniques de perméation membranaire imposent la mise sous pression du biogaz (5 bars) permettant ainsi de séparer l'H₂S et le dioxyde de carbone à travers un filtre de cellulose. Enfin, les techniques biologiques d'épuration du biogaz, encore appelées désulfuration biocatalytique, permettent de transformer l'H₂S en soufre élémentaire grâce au développement des bactéries sulfo-oxydantes appartenant au genre *Thiobacillus*, sous réserve qu'un apport d'oxygène soit réalisé dans le biogaz (Zicari, 2003). Cette technique assez rustique est très utilisée pour traiter les biogaz agricoles avant leur emploi dans les installations de valorisation énergétique (Diaz et al., 2010).

3.8. Résumé des impacts et des nuisances pour la production porcine

Cette première partie de la synthèse bibliographique met en lumière la problématique de l'hydrogène sulfuré et la gestion des effluents d'élevage en se focalisant principalement sur la filière porcine. L'évolution des modes de production agricole a paradoxalement contribué à la fois à l'amélioration des conditions de travail et à une exposition accrue aux risques d'exposition aiguës et chroniques à l'hydrogène sulfuré. A l'heure actuelle ce risque est sous-estimé et non-contrôlé par la profession malgré les accidents mortels et les pathologies à long

terme décrits dans la littérature. De plus, dans la problématique des odeurs liées à la gestion des lisiers de porcs, l' H_2S est un contributeur conséquent sans qu'un lien direct ne soit pour autant mis en évidence. Enfin, l'hydrogène sulfuré est aussi un gaz corrosif qui détériore les équipements agricoles, réduisant leur durée de vie et impactant leur coût de maintenance.

4. Les processus biologiques responsables de la production de l'hydrogène sulfuré

4.1. Le cycle du soufre et ses biotransformations

Dans la biosphère, de nombreuses réactions biologiques ont lieu entre les sulfures, les sulfates et les formes intermédiaires d'oxydo-réduction qui participent au cycle du soufre (figure 9). Les bactéries et les végétaux interviennent activement dans ce cycle, ils sont capables d'assimiler le soufre minéral sous forme de sulfate et de sulfure pour synthétiser des acides aminés soufrés (réduction assimilatrice du sulfate). De plus, les bactéries sulfo-oxydantes oxydent les composés soufrés à l'état réduit (oxydation biologique), et les bactéries sulfato-réductrices réduisent les sulfates (réduction dissimilatrice du sulfate) et les formes partiellement oxydées du soufre. L'hydrogène sulfuré (H_2S) est le produit généralement excrété lors du métabolisme du soufre élémentaire et des sulfates, par les bactéries sulfo/sulfato-réductrices. Il est aussi le produit de la minéralisation des composés organiques soufrés (Lens and Kuenen, 2001).

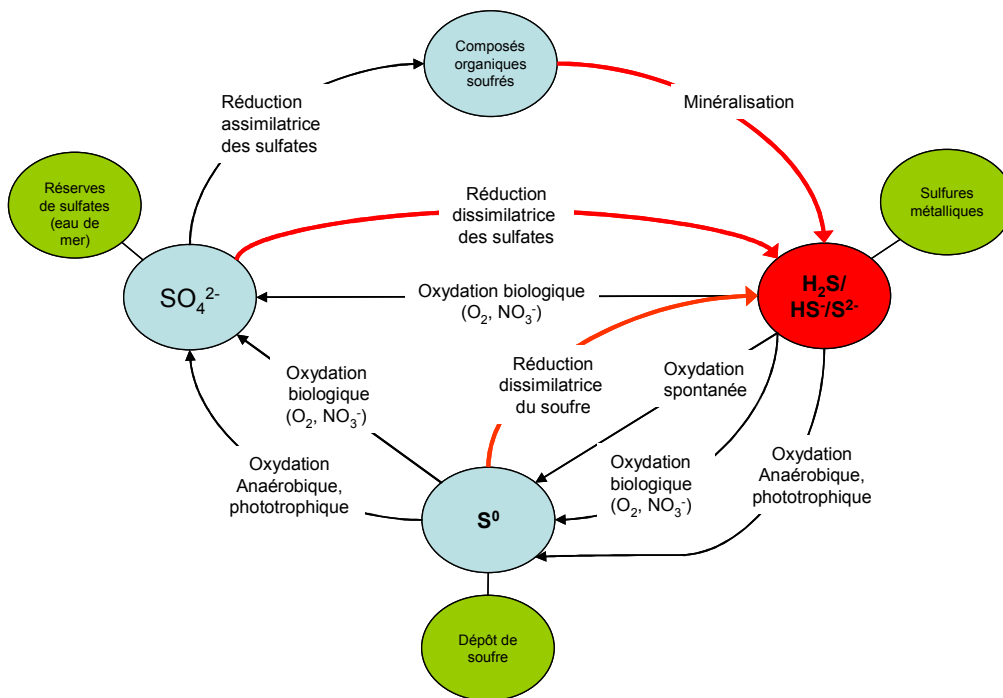


Figure 9

Le cycle du soufre et les voies de production de l'hydrogène sulfuré
(Lens et al., 2001 d'après Robertson et al., 1992)

Dans les effluents d'élevage, la dégradation anaérobie des composés soufrés conduit à la formation d'hydrogène sulfuré. Différents mécanismes biologiques sont impliqués dans cette dégradation des matières organiques et minérales. Le principal est le processus anaérobie de biodégradation ou la digestion anaérobie.

4.2. La digestion anaérobie

La digestion anaérobie est un processus biologique qui, en absence d'oxygène, minéralise la matière organique biodégradable en produisant un biogaz qui se compose essentiellement, de méthane et de dioxyde de carbone (Moletta, 2008). Ce processus implique une cascade de réactions biochimiques réalisées par une succession de micro-organismes spécialisés. La figure 10 met en évidence que ce processus conduit aussi à la production d'autres gaz et notamment à de l'hydrogène sulfuré.

4.2.1. La biochimie et la microbiologie de la digestion anaérobie

Le processus de dégradation anaérobie se déroule en plusieurs étapes qui sont réalisées par des groupes microbiens formant un réseau trophique : la dépolymérisation des macromolécules(1), l'acidogénèse(2), l'acétogénèse(3) et la méthanogénèse (figure 10). En présence de sulfates, une étape supplémentaire s'ajoute aux précédentes, la sulfato-réduction(5).

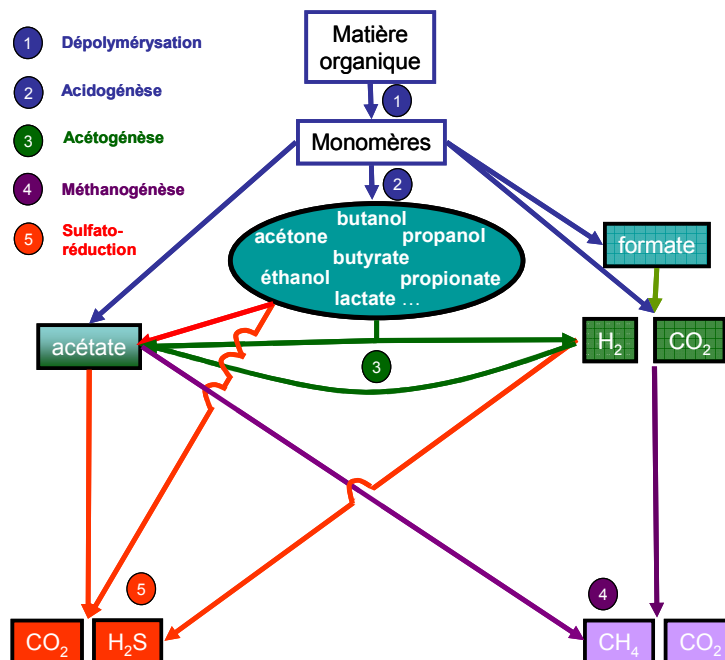


Figure 10
Principaux processus de dégradation de la matière organique en présence (en rouge) ou non de sulfates

4.2.2. La dépolymérisation des macromolécules

La dépolymérisation des macro-molécules est la première étape de conversion de la matière organique. Elle consiste en une hydrolyse de polymères (protéines, lipides etc.) par des hydrolases extracellulaires qui libèrent ainsi les monomères. Elle est également réalisée par des mécanismes non-hydrolytiques et notamment grâce à des enzymes du type lyase qui sont capables de briser diverses liaisons chimiques par d'autres voies cataboliques (ex : décarboxylases, aldolases, deshydratases). Les produits résultant de cette première étape dépendent des substrats initiaux. La dépolymérisation des lipides conduit à la libération du glycérol et d'acides gras (Vidal et al., 2000). La biodégradation des protéines conduit à la production de polypeptides puis d'acides aminés. Les polysaccharides tels que la cellulose et l'hémicellulose sont dégradés pour produire des monosaccharides constitutifs (glucose, fructose, arabinose, ...). Certains polymères de la matière organique, à l'exemple de la lignine, sont plus ou moins réfractaires à cette première étape (Chynoweth et al., 1998).

4.2.3. L'acidogénèse

L'acidogénèse est un mécanisme de conversion intracellulaire des produits solubles issus de l'étape de dépolymérisation de la matière organique en composés tels que l'eau, le dihydrogène, le dioxyde de carbone, les alcools, l'ammoniac et les acides gras volatils.

Les monosaccharides sont utilisés directement par les micro-organismes et forment du fructose-6-P (Prescott et al., 2002). Ce dernier est utilisé par de nombreux micro-organismes grâce à la glycolyse. Cette étape leur permet de produire de l'énergie sous forme d'ATP et de pouvoir réducteur, NADH₂. Le produit formé, le pyruvate, en l'absence d'oxygène est utilisé par les bactéries fermentaires pour donner un mélange d'acides organiques incluant les acides gras volatils (AGV) (figure 11). Les AGV sont des acides carboxyliques ayant un squelette de 2 à 6 carbones. Les sept principaux AGV produits par cette étape et retrouvés dans les effluents porcins sont l'acide acétique, l'acide propionique, l'acide butyrique et iso-butyrique, l'acide valérique et iso-valérique (Peu et al., 2004).

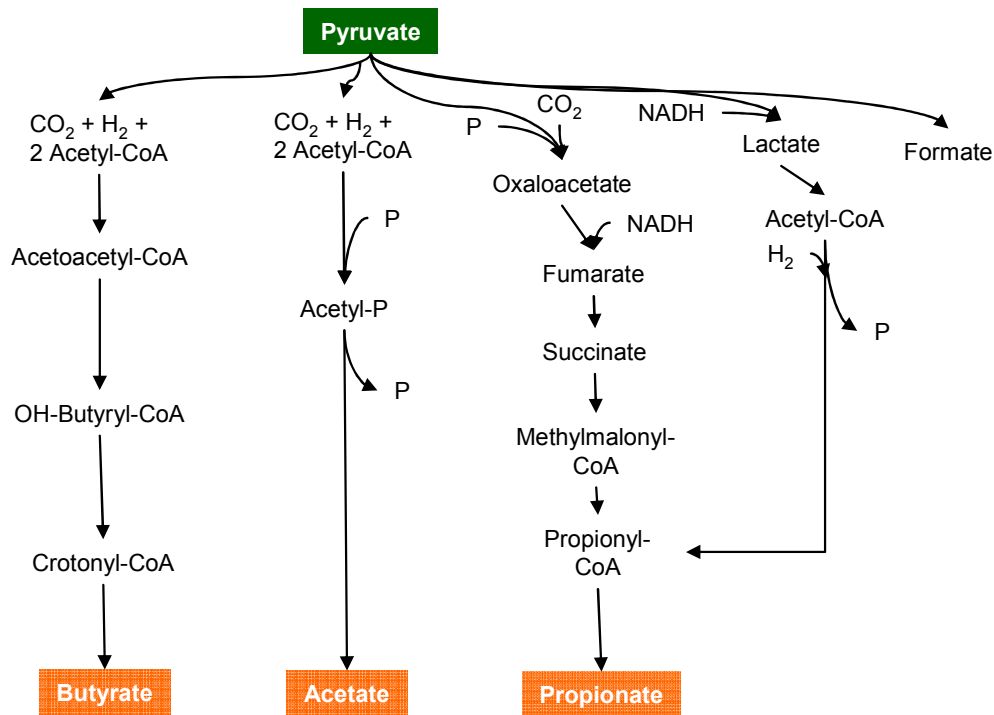
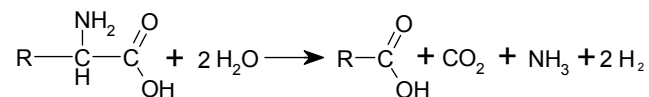


Figure 11

Exemple de réactions fermentaires conduisant à la production d'AGV à partir du pyruvate (d'après Prescott et al., 2002)

Les acides aminés produits à l'étape de la dépolymérisation sont transportés dans les cellules bactériennes et sont utilisés grâce à une réaction de désamination (Mackie et al., 1998; Zhu et al., 1999) :



Cette réaction produit un acide organique ainsi qu'un ion ammonium. L'acide organique produit est fonction du résidu R porté par le carbone. Une grande diversité d'acides gras volatils peut être produite à partir des 20 acides aminés existants (Zhu et al., 1999). Les acides gras possédant des ramifications, tels que l'acide *iso*-butyrique, l'acide *iso*-valérique et l'acide α -methylbutyrique, sont issus de la dégradation par désamination de la valine, l'isoleucine et de la leucine, respectivement.

Certaines bactéries anaérobies peuvent aussi fermenter les acides aminés pour produire de l'ATP en oxydant un acide aminé et en utilisant un second comme accepteur final d'électron (réaction de Stickland) (figure 12). Cette réaction génère de l'ammonium et des acides gras volatils. Elle peut également générer de l'hydrogène sulfuré et des amines (Mackie et al., 1998).

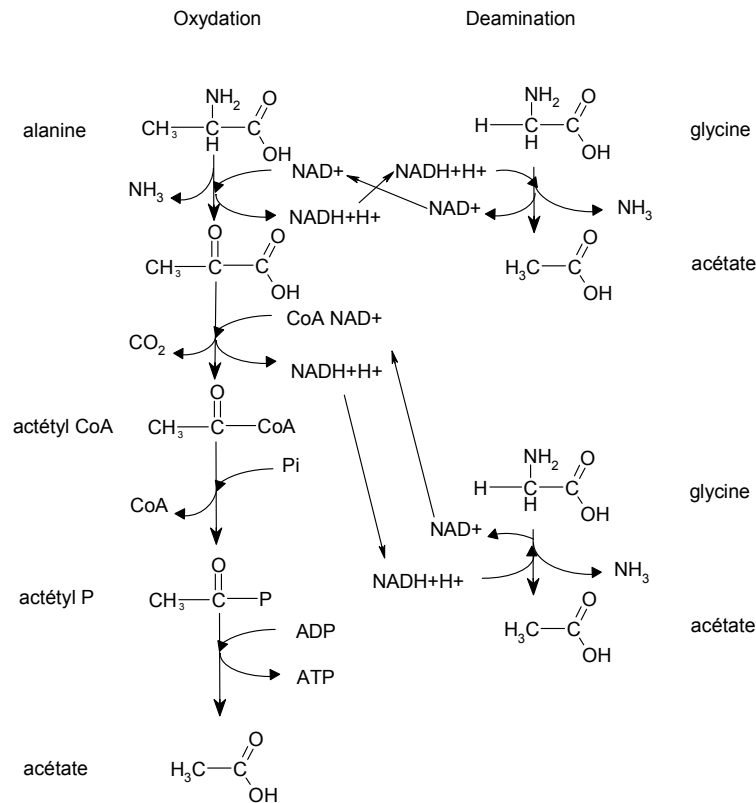


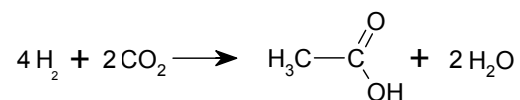
Figure 12
Exemple de réaction de Stickland à partir d'alanine et de glycine.
(d'après Mackie et al., (1998))

L'ensemble de ces deux réactions (dépolymérisation des macromolécules et acidogénèse) est réalisé par divers micro-organismes qui appartiennent aux phyla des *Fimicutes* et des α et γ *Proteobacteria*. Dans les fosses de stockage du lisier de porcs, ces phyla sont essentiellement représentés par des bactéries appartenant aux genres *Clostridium*, *Bacteroides*, *Bacillus* et *Lactobacillus* (Peu et al., 2006; Supaphol et al., 2011).

4.2.4. L'acétogénèse

L'acétogénèse constitue l'ensemble des réactions biologiques qui conduisent à la production d'acétate. Cette étape est réalisée par deux groupes microbiens qui consomment respectivement le CO_2 et l'hydrogène (bactéries homoacétogènes) ou les AGV (bactéries acétogènes productrices obligées d'hydrogène).

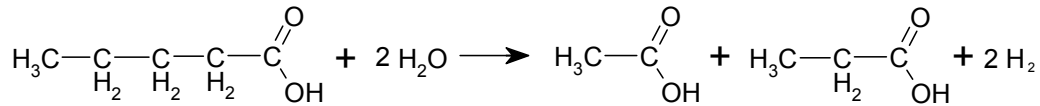
L'acétogénèse réalisée par les homoacétogènes conduit à la production d'acétate par réduction du dioxyde de carbone et de l'hydrogène selon l'équation suivante :



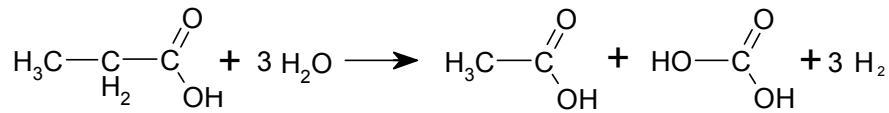
$$(\Delta G_0 = -95 \text{ kJ.mol}^{-1})$$

Cette réaction est réalisée par des bactéries autotrophes ou mixotrophes qui réduisent le CO₂ par une voie particulière ; la voie de Wood ou de l'acétyl CoA (Hattori, 2008). Les micro-organismes les mieux connus pour ce métabolisme particulier sont *Clostridium thermoaceticum* et les genres *Acetobacterium* et *Sporomusa*.

Les micro-organismes producteurs obligés d'hydrogène (OPHA en anglais) convertissent les acides gras volatils en acétate, CO₂ et hydrogène (Drake, 1994). Les conversions du valérate et du propionate respectivement sont présentées :



$$(\Delta G_0 = +48,1 \text{ kJ.mol}^{-1})$$



$$(\Delta G_0 = +76,1 \text{ kJ.mol}^{-1})$$

Ces réactions sont thermodynamiquement impossibles dans les conditions standards (variation d'enthalpie libre positive). Par contre elles peuvent avoir lieu si la concentration en hydrogène dans le milieu est faible (loi de Nerst). L'hydrogène ne doit pas s'accumuler et doit être consommé conjointement à sa production. Pour cela une syntrophie étroite avec d'autres micro-organismes, notamment les méthanogènes hydrogénotrophes ou les sulfatoréducteurs, est nécessaire (Hattori, 2008). La consommation de l'hydrogène par ces micro-organismes permet de maintenir la concentration dans le milieu suffisamment faible pour que la réaction soit thermodynamiquement possible (figure 13).

Cette niche écologique qui joue pourtant un rôle primordial dans la méthanisation est très difficile à étudier et les connaissances actuelles sur les micro-organismes impliqués sont rares. Seules quelques espèces bactériennes à l'exemple de *Syntrophomonas wolfei*, *Syntrophomonas sapovorans* et *Syntrophomonas wolinii* ont été identifiées. La syntrophie de cette réaction a été mise en évidence avec des *Desulfovibrio sp.* (bactéries sulfato-réductrices) et des *Methanobrevibacter hungatei* (archaea méthanogènes).

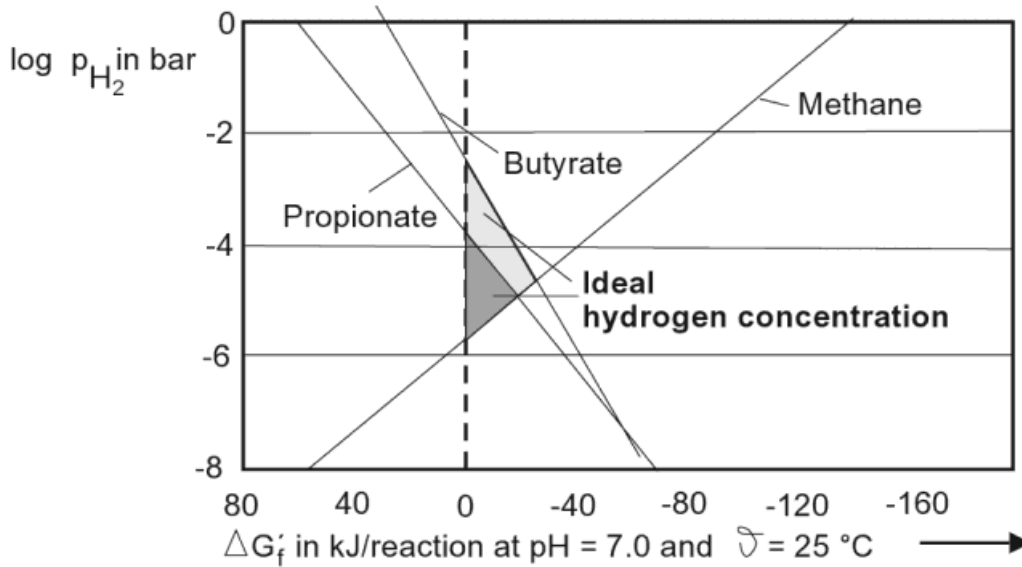


Figure 13

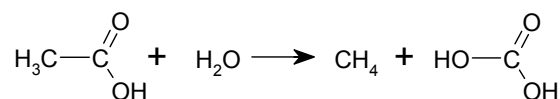
Influence de la pression partielle en hydrogène sur l'enthalpie libre (G') pour les réactions d'acétogénèse (OPHA) du butyrate et du propionate

La variation d'enthalpie libre de la réaction de méthanogénèse à partir du dihydrogène et du dioxyde de carbone permet de visualiser la zone de pression partielle en H_2 où la réaction est thermodynamiquement réalisable (Drake, 1994)

4.2.5. La méthanogénèse

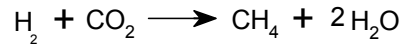
C'est au cours de cette étape terminale de la minéralisation de la matière organique que les molécules produites au cours des étapes précédentes sont converties en méthane (Ferry, 1993). Elles sont transformées par deux voies métaboliques principales, à partir de l'acétate et à partir du couple CO_2/H_2 (figure 10). La première voie est appelée méthanogénèse acétotrophe, la seconde méthanogénèse hydrogénotrophe. D'autres voies métaboliques plus marginales existent. Elles impliquent l'utilisation du formate, du méthanol, des méthylamines et des méthylmercaptans (Ferry, 1993; Garcia et al., 2000).

Les méthanogènes acétotrophes convertissent l'acétate en dioxyde de carbone et en méthane. La décarboxylation de l'acétate fait intervenir deux réactions couplées dont le bilan d'enthalpie libre rend thermodynamiquement possible la production de méthane (Drake, 1994).



$$(\Delta G_0 = -31 \text{ kJ.mol}^{-1})$$

Les méthanogènes hydrogénotrophes réduisent le dioxyde de carbone avec le dihydrogène pour former du méthane et de l'eau.



$$(\Delta G_0 = -136 \text{ kJ.mol}^{-1})$$

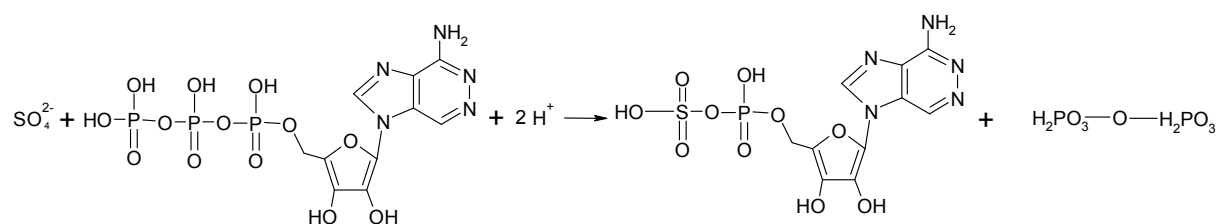
Les réactions biologiques conduisant à la production de méthane sont réalisées par des archaea méthanogènes. Ces micro-organismes au métabolisme anaérobie strict appartiennent à 5 ordres : les *Méthanopyrales*, les *Métanosarcinales*, les *Méthanococcales*, les *Méthanobactériales* et les *Méthanomicrobiales*. Actuellement, une vingtaine de genres et plus de 150 espèces sont décrites (Garcia et al., 2000).

4.2.6. La sulfato-réduction

En présence de sulfate dans le milieu, d'autres réseaux trophiques peuvent se mettre en place et notamment la sulfato-réduction (figure 10). Les micro-organismes capables d'utiliser pour leur métabolisme une grande variété de substrats organiques tels que les AGV, l'acétate et l'hydrogène et d'utiliser un composé soufré comme accepteur final d'électrons de leurs réactions d'oxydo-réductions sont appelés « micro-organismes sulfato / sulfo / sulfito / thiosulfato-réducteurs ». Les micro-organismes sulfato-réducteurs partagent la propriété de réduction dissimilatrice du sulfate : ils utilisent principalement le sulfate comme accepteur terminal d'électrons qu'ils réduisent en sulfure (S^{2-}) (Muyzer and Stams, 2008) (figure 9).

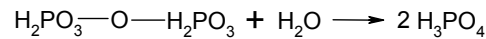
4.2.6.1. Activation du sulfate et production de sulfure

D'un point de vue thermodynamique, le sulfate représente la forme la plus oxydée du soufre (+6) et constitue un mauvais accepteur final d'électrons puisque le potentiel redox du couple $\text{SO}_4^{2-}/\text{S}^{2-}$ est de -210 mV. Ce très faible potentiel redox ne permet donc pas l'utilisation directe du sulfate comme accepteur d'électrons. Cette utilisation implique dans un premier temps une activation biologique du sulfate, catalysée par l'ATP sulfurylase pour former de l'adénosine-phosphosulphate et du pyrophosphate (Muyzer and Stams, 2008) selon l'équation suivante :



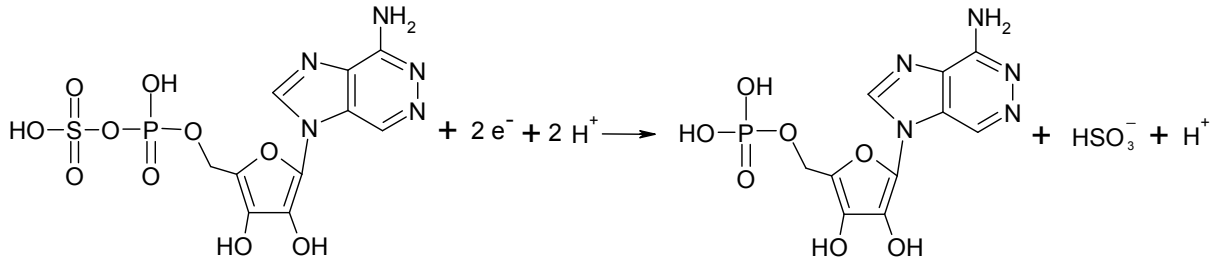
$$(\Delta G_0 = +46 \text{ kJ.mol}^{-1})$$

D'un point de vue thermodynamique, la formation de pyrophosphate est défavorable. Celui-ci doit être hydrolysé par une pyrophosphatase selon la réaction :



($\Delta G_0 = +22 \text{ kJ.mol}^{-1}$)

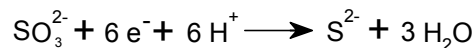
Dans un deuxième temps, l'adénosine phosphosulfate est réduite en sulfite et en adénosine monophosphate.



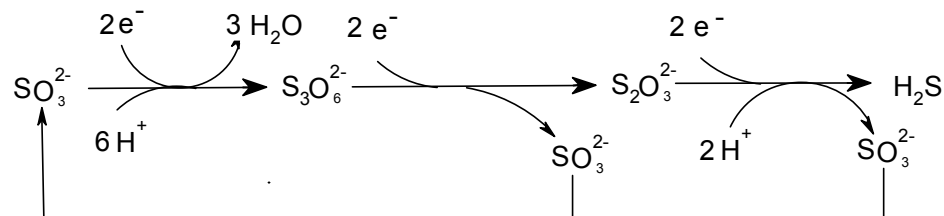
($\Delta G_0 = -69 \text{ kJ.mol}^{-1}$)

La première étape de la sulfato-réduction est donc consommatrice d'énergie. Ensuite, les sulfites produits sont à leur tour réduits avec l'hydrogène comme donneur d'électrons pour former des sulfures. D'un point de vue thermodynamique, cette réaction présente un ΔG_0 de -174 kJ.mol^{-1} permettant la production d'au moins deux ATP.

Enfin, deux mécanismes sont discutés dans la littérature pour la réduction du sulfite en sulfure. Le premier est une réduction à 6 électrons en une seule étape catalysée par une sulfite réductase :



Dans le second mécanisme, appelé voie du trithionate, le bisulfite est réduit *via* la formation de deux intermédiaires le trithionate et le thiosulfate par trois enzymes : la sulfite réductase, la trithionate réductase et la thiosulfate réductase (Hansen, 1994; Muyzer and Stams, 2008).



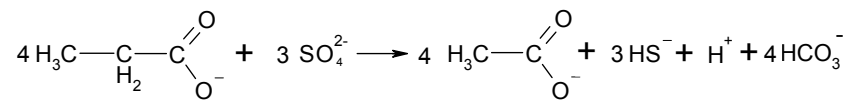
4.2.6.2. Métabolisme des sulfato-réducteurs

Les micro-organismes capables de réaliser les réactions de sulfato-réduction constituent un groupe particulier fondé sur leurs caractéristiques phénotypiques et non sur leur filiation génétique. En effet, ces micro-organismes sont très dispersés dans l'arbre phylogénétique

bactérien et archaea. Ils sont retrouvés dans divers phyla tels que les *Proteobacteria*, les *Firmicutes*, les *Thermodesulfobacteria*, les *Nitrospira* et les *Euryarchaeota* (Leloup, 2004). Malgré cette hétérogénéité génotypique, les micro-organismes sulfato-réducteurs sont classés en deux groupes.

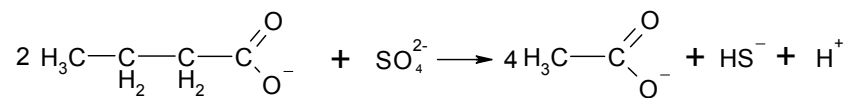
Le premier comprend des bactéries homoacétogènes (Garcia and Roger, 2000) utilisatrices des substrats intermédiaires issus de l'acidogénèse (pyruvate, lactate, certains AGV, le dihydrogène etc.) et n'effectuant qu'une oxydation incomplète de leurs substrats en acétate et/ou en hydrogène sulfuré.

- Oxydation du propionate :



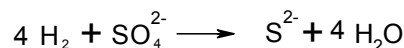
($\Delta G_0 = -37,7 \text{ kJ.mol}^{-1}$)

- Oxydation du butyrate :



($\Delta G_0 = -27,8 \text{ kJ.mol}^{-1}$)

- Oxydation de l'hydrogène :

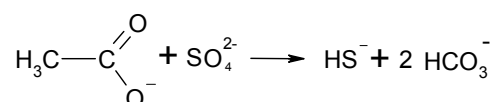


($\Delta G_0 = -151,9 \text{ kJ.mol}^{-1}$)

Ce groupe est essentiellement représenté par les genres *Desulfovibrio*, *Desulfobotulus*, *Desulfotomaculum*, *Desulfomicrobium*, *Desulfomonile*, *Desulfobulbus*, *Desulfohalobium*, *Desulfonatronovibrio*, *Thermodesulfobacterium* et *Thermodesulfovibrio* (Garcia and Roger, 2000).

Le second groupe comprend les sulfato-réducteurs qui effectuent une oxydation complète du substrat et utilisent principalement l'acétate et quelques acides gras ainsi que d'autres composés comme les composés aromatiques pour produire du dioxyde de carbone et de l' H_2S .

Oxydation de l'acétate :



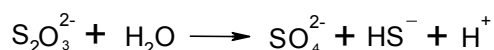
($\Delta G_0 = -47,6 \text{ kJ.mol}^{-1}$)

Les genres les plus souvent décrits dans la littérature (Garcia and Roger, 2000) sont : *Desulfobacter*, *Desulfobacterium*, *Desulfococcus*, *Desulfoarculus*, *Desulfobacca*, *Desulfocapsa*, *Desulfotomaculum*, *Desulfonema*, *Desulfosarcina*, *Desulfobacula*, *Desulfacinum*, *Desulforhabdus*, *Desulfocella*, *Desulforhopalus*, *Desulfocapsa*, *Archaeoglobus* et *Thermodesulforhabdus* (Garcia and Roger, 2000).

Le soufre élémentaire (S^0), les sulfites (SO_3^{2-}) et le thiosulfate ($S_2O_3^{2-}$) peuvent aussi être utilisés comme accepteurs finaux d'électrons en condition anaérobie. Les micro-organismes sulfo-réducteurs comprennent des genres particuliers tels que les *Desulfuromonas* et les *Desulfurella* (sulfato-réducteurs) mais aussi d'autres genres tels que les *Pseudomonas* et les *Thermotoga* (Moser et al, 1996). Les sulfite et thiosulfate- réducteurs regroupent des bactéries de l'ordre des *Clostridiales* principalement (*Clostridium*, *Desulfitobacterium*, *Dethiosulfovibrio*).

Le rôle des bactéries sulfato-réductrices ne se limite pas à la réduction des composés soufrés. Ainsi dans les environnements aquatiques, pauvres en sulfates, elles contribuent à la fermentation et à l'oxydation anaérobie des composés organiques. Certaines espèces appartenant aux genres *Desulfovibrio* et *Desulfomicrobium* sont capables de croître en fermentant le pyruvate pour former de l'acétate, du dioxyde de carbone et de l'hydrogène. Ces bactéries sont aussi capables d'oxyder le lactate et l'éthanol en acétate, seulement si l'hydrogène produit au cours de la réaction est consommé par les archaea méthanogènes (Bryant et al., 1977). Leur implication dans le processus de dégradation anaérobie de la matière organique est parfois si important que ces bactéries constituent la communauté bactérienne dominante de la phase acidogène (Chartrain and Zeikus, 1986).

Par ailleurs, le métabolisme des bactéries sulfato-réductrices peut être très versatile. Certaines souches de *Desulfovibrio desulfuricans* (souche CSN) sont ainsi capables de réaliser la réduction dissimilatrice non seulement des composés soufrés inorganiques mais aussi des composés azotés et de l'oxygène ainsi que l'oxydation de composés soufrés. Elles peuvent également réaliser la disproportionation des composés soufrés inorganiques (production de sulfure et de sulfate à partir d'un thiosulfate) (Dilling and Cypionka, 1990) :



($\Delta G_0 = -21,9 \text{ kJ.mol}^{-1}$)

4.2.7. Compétition entre les archaea méthanogènes et les bactéries sulfato-réductrices

En présence d'une concentration non limitante en sulfate, les bactéries sulfato-réductrices entrent en compétition avec trois groupes de micro-organismes : les archaea méthanogènes et les bactéries homoacétogènes pour les substrats communs tels que l'hydrogène et/ou l'acétate et les bactéries acétogènes pour les substrats communs tels que les AGV autres que l'acétate.

La compétition vis-à-vis de l'hydrogène est en faveur de la sulfato-réduction. Ainsi, les ΔG_0 de l'homoacétogénèse, de la méthanogénèse et de la sulfato-réduction sont respectivement de -95, -136, -151,9 kJ.mol⁻¹ (Stams et al., 2005). L'affinité des sulfato-réductrices pour l'hydrogène est supérieure à celle des méthanogènes, puisque la constante de demi-saturation (K_s) de la méthanogénèse hydrogénotrophique est 1,1 Pa contre 0,2 pour la sulfato-réduction. La compétition entre les méthanogènes acétoclastes et les sulfato-réductrices est moins marquée pour l'acétate. Dans les digesteurs anaérobies où l'acétate est en forte concentration, l'ajout de sulfate n'engendre pas de basculement de la méthanogénèse vers la sulfato-réduction du fait des facteurs de croissance des micro-organismes qui sont à l'avantage des méthanogènes.

Enfin les bactéries acétogènes productrices obligées d'hydrogène sont peu compétitives vis-à-vis des sulfato-réductrices (Stams et al., 2005). Ainsi à titre d'exemple, il a été observé que le consortium syntrophique *Syntrophobacter/Methanobrevibacter* disparaît au profit du développement des bactéries sulfato-réductrices (Uberoi and Bhattacharya, 1997; Visser et al., 1993). Selon Stams et al. (2005), la syntrophie serait détournée vers la sulfato-réduction. Les bactéries acétogènes productrices obligées d'hydrogène s'associeraient préférentiellement aux sulfato-réductrices dont le K_s vis-à-vis du dihydrogène est plus faible que celui des méthanogènes. L'utilisation du dihydrogène par les sulfato-réductrices entraînerait une concentration en H₂ plus faible dans le milieu favorisant la croissance des bactéries acétogènes productrices obligées d'hydrogène. Stams et al. (2005) rapportait que la concentration en sulfate est déterminante dans cette réorientation syntrophique au profit de la sulfato-réduction.

Les interactions compétitives entre les archaea méthanogènes et les bactéries sulfato-réductrices dépendent également de facteurs écologiques qui peuvent être déterminants par rapport aux considérations thermodynamiques et cinétiques, notamment les propriétés d'agrégation et le rapport entre la quantité de matière organique et la quantité de sulfate disponibles (Stams et al., 2005). Un faible rapport élimine toute activité méthanogène du

milieu et à l'inverse, un rapport élevé entraîne la prédominance de la méthanogénèse (figure 14).

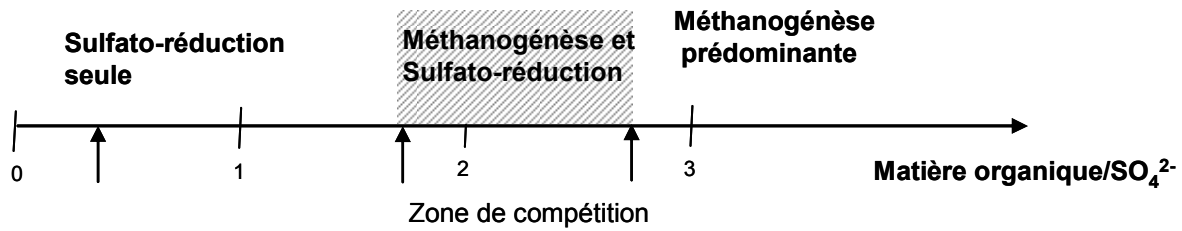


Figure 14

Compétition entre les bactéries sulfato-réductrices et les archaea méthanogènes en fonction du rapport entre la charge organique et la concentration de sulfate (Hao et al., 1996).

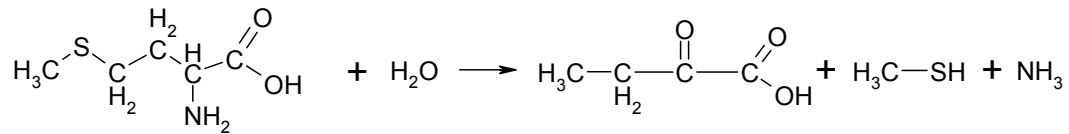
(La concentration en matière organique est caractérisée par la demande chimique en oxygène, DCO)

4.2.8. Toxicité de l'hydrogène sulfuré dans les écosystèmes microbiens anaérobies

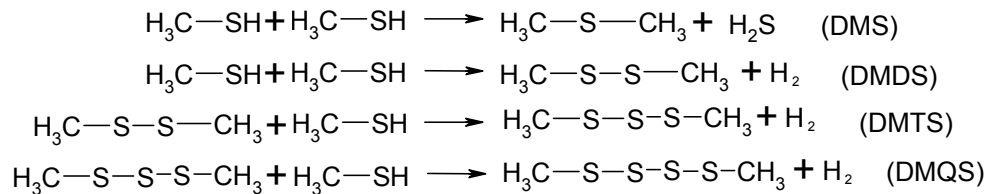
La toxicité de l'H₂S est multiple, elle peut-être directe et liée aux sulfures dissous ou indirecte et liée à la précipitation des métaux indispensables aux méthanogènes (Florencio et al., 1994). La toxicité directe du H₂S est due à la perméabilisation des membranes cellulaires et à l'établissement de ponts di-sulfures entre les chaînes polypeptidiques, dénaturant ainsi les protéines cytoplasmiques (Chen et al., 2008). Différents seuils d'inhibition sont mentionnés dans la littérature. Ils sont déterminés le plus souvent par la mise en contact du sulfure d'hydrogène avec des cultures pures d'archaea méthanogènes ou avec des boues de digesteur anaérobie. Les seuils d'inhibition sont déterminés pour un substrat donné par la concentration inhibant 50 % (CI50) de l'activité des micro-organismes à un pH donné. Le tableau 13 présente les différentes valeurs relevées dans la littérature.

Il apparaît que les CI50 sont très variables, les valeurs retrouvées dans la littérature s'échelonnent de 33 à 1000 mg S.L⁻¹ (O'Flaherty et al., 1998; Visser et al., 1993). Les valeurs les plus faibles sont retrouvées aux pH les plus acides et les plus fortes aux pH les plus basiques. Par ailleurs, ces mesures de pH permettent de calculer la quantité d'hydrogène sulfuré présent sous sa forme dissoute (H₂S_d) (tableau 13). A l'inverse, la concentration en H₂S_d inhibant 50% de l'activité de l'écosystème est plus faible aux pH basiques et plus forte aux pH acides. La toxicité à l'hydrogène sulfuré des écosystèmes microbiens est sous la double dépendance de la quantité totale d'hydrogène sulfuré présent et du pH.

La fermentation des acides aminés produit dans un premier temps des composés soufrés intermédiaires du type mercaptans (Landaud et al., 2008) et dans un deuxième temps de l' H_2S , comme l'illustre l'exemple de la dégradation de la méthionine :

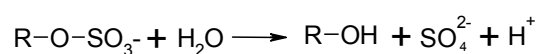


Cette réaction biologique est réalisée par un processus enzymatique basé sur une enzyme clé, la méthionine- γ -déméthiolase, retrouvée chez de nombreux micro-organismes fermentaires tels que *Lactobacillus* (Landaud et al., 2008). Le méthylmercaptopan (MT) produit est ensuite utilisé pour l'anabolisme des micro-organismes ou est excrété dans le milieu. Une fois dans la phase liquide, le méthylmercaptopan peut être transféré vers la phase gazeuse et peut participer au panache odorant (tableau 10). Il peut aussi être transformé pour former des diméthylsulfures (DMS), des diméthyldisulfures (DMDS), des diméthyltrisulfures (DMTS), et des diméthyltetrasulfures (DMQS). Cette transformation qui est seulement chimique, est catalysée par des ions présents en solution (Chin and Lindsay, 1994) :



Les méthylmercaptans issus de ces réactions peuvent être utilisés en anaérobiose par des archaea méthanogènes utilisant le méthanol, les méthylamines ou les méthylmercaptans. Ils participent à la production de méthane et d'hydrogène sulfuré. Van Leerdam et al. (2008) ont mis en évidence dans des digesteurs anaérobies la présence de ce type de méthanogénèse réalisée par des archaea du genre *Metanolobus*.

Enfin, les constituants de la matière organique qui présentent des fonctions ester-sulfates comme les glycosaminoglycanes peuvent être hydrolysés par des sulfatases et libérer des ions sulfates. Ceux-ci sont ensuite réduits par réduction dissimilatrice pour produire de l'hydrogène sulfuré.



Ces enzymes sont retrouvées chez de nombreux micro-organismes et entre autre chez des micro-organismes anaérobies tels que les *Propionibacterium* (Hoeffler, 1977).

4.4. Résumé sur les voies de production de l'hydrogène sulfuré

L'hydrogène sulfuré dans le contexte de l'élevage porcin avec ou sans unités de méthanisation est produit principalement par la dégradation anaérobie des effluents d'élevage et/ou des co-substrats introduits dans la filière. Les principales voies de production recensées dans la littérature sont la réduction dissimilatrice des sulfates et la minéralisation des composés organiques soufrés. La réduction dissimilatrice des sulfates est réalisée par un groupe de micro-organismes au métabolisme particulier, les sulfato-réducteurs. En condition anaérobie, ils sont capables d'utiliser le sulfate comme accepteur final d'électrons pour produire des sulfures. Ce groupe microbien est en concurrence directe avec d'autres micro-organismes qui interviennent dans la dégradation anaérobie des effluents, notamment ceux qui sont responsables de l'acétogénèse et de la méthanogénèse. Cette concurrence métabolique est presque toujours à l'avantage des sulfato-réducteurs. Par ailleurs, l'hydrogène sulfuré produit au cours de ces étapes de la transformation du soufre est toxique pour les flores microbiennes qui sont présentes dans ces environnements anaérobies.

5. Conclusion et présentation des chapitres

Au regard de cette synthèse bibliographique, plusieurs pistes de recherche peuvent être explorées dans l'objectif de réduire et/ou de contrôler la production de l'hydrogène sulfuré sur certaines étapes clés de la filière de gestion des lisiers de porcs, notamment au cours du stockage ou de la méthanisation des effluents.

Les travaux de recherche présents dans la littérature et concernant le stockage des effluents visent à réduire la concentration en hydrogène sulfuré dans les ambiances de travail. Deux axes de recherche ont ainsi été développés. Le premier axe est focalisé sur le traitement de l'hydrogène sulfuré dans la phase gazeuse, le plus souvent par des procédés de biofiltration (Saha et al., 2010), ou par l'incorporation d'additifs dans les lisiers (agents masquant, neutralisants chimiques, produits biologiques, adsorbants, déodorants chimiques et inhibiteurs biologiques). Le second axe se situe plus en amont de la filière et s'appuie sur la composition des régimes alimentaires des animaux qui est couplée aux pollutions gazeuses générées par les lisiers (Aarnink and Verstegen, 2007; Stevens et al., 1993). Malgré sa complexité nécessitant de prendre en compte non seulement l'impact sur les effluents mais aussi les effets sur les animaux, l'optimisation environnementale des stratégies alimentaires représente une piste de recherche intéressante. Pourtant, à ce jour, peu d'études scientifiques rapportent des données

reliant la composition des régimes alimentaires des porcs et la production d'hydrogène sulfuré dans le lisier au cours du stockage.

De même, la méthanisation du lisier, le plus souvent réalisée avec des co-substrats, représente également une étape de la filière dont le fonctionnement peut être influencé par la production d'hydrogène sulfuré. A ce jour, la plupart des études sont focalisées sur le traitement du biogaz et peu de travaux relie la composition des effluents et des co-substrats avec la production d'hydrogène sulfuré.

C'est pourquoi, le premier travail de cette thèse, qui se décompose en différentes étapes complémentaires, vise à définir une gestion intégrée des intrants dans la ration alimentaire des porcs afin de satisfaire aux exigences zootechniques de croissance tout en réduisant les risques de production d'hydrogène sulfuré au cours du stockage du lisier de porc.

Le second travail comprend ensuite plusieurs étapes qui ont pour objectif de définir une gestion intégrée des effluents et des co-substrats utilisables dans la filière de méthanisation agricole afin d'optimiser la production de biogaz tout en réduisant la production d'hydrogène sulfuré.

Ce document est structuré en quatre parties principales constituées de manuscrits soumis à des journaux scientifiques et d'une conclusion générale.

Le Chapitre I présente une analyse des ingrédients majeurs qui composent les aliments porcins, notamment par rapport à leur teneur en soufre, ainsi que deux essais expérimentaux. Le premier a été réalisé *in-vivo* sur des porcs en engraissement afin d'évaluer la rétention et l'excrétion du soufre selon différents régimes alimentaires. Le second essai expérimental présente les transformations du soufre excrété au cours du stockage anaérobie du lisier. Ce chapitre rappelle les principales voies de production de l'hydrogène sulfuré et les risques occasionnés par la manipulation des lisiers. Ce chapitre fait l'objet d'un article soumis à **Journal of Environmental Quality**.

Le Chapitre II est constitué d'une analyse de l'abondance et de la diversité des micro-organismes sulfato-réducteurs présents dans les lisiers de porcs supplémentés ou non en sulfate et en acides gras volatils. Dans ce chapitre, une présentation des connaissances actuelles des mécanismes biologiques ainsi que des micro-organismes impliqués dans la sulfato-réduction a été réalisée. Les travaux de recherche sont présentés sous la forme d'un article en vue d'une soumission à la revue **FEMS Microbiology Ecology**.

Le Chapitre III présente une comparaison de 37 substrats et co-substrats utilisables en méthanisation en fonction de leur teneur en soufre. Un potentiel sulfurogène a été calculé sur la base des potentiels de production de biogaz et de leur teneur en soufre pour chacun des substrats et co-substrats utilisés. Une synthèse des systèmes de traitement du biogaz vis-à-vis de la teneur en hydrogène sulfuré a été réalisée en se focalisant plus particulièrement sur la technologie utilisée en méthanisation agricole. Le travail expérimental est repris dans un article soumis à la revue **Bioresource Technology**.

Le Chapitre IV est constitué d'une étude de cas de méthanisation d'algues vertes d'échouage en co-digestion avec du lisier de porcs. Cette étude expérimentale a permis d'évaluer la faisabilité d'utiliser un tel co-substrat dans les unités de méthanisation agricole notamment par rapport à la production d'hydrogène sulfuré. Ce chapitre présente les différents enjeux de l'utilisation des algues vertes comme co-substrat. Les résultats expérimentaux sont repris dans un article soumis à la revue **Bioresource Technology**.

REFERENCES

- Aarnink A.J.A., Verstegen M.W.A. (2007) Nutrition, key factor to reduce environmental load from pig production. **Livestock Science** 109:194-203
- Adelson L., Sunshine I. (1966) Fatal hydrogen sulfide intoxication. Report of three cases occurring in a sewer. **Archives of pathology** 81:375-380.
- Ademe. (2008) Etat des lieux du développement des installations de méthanisation agricole en France.
- Ago M., Ago K., Ogata M. (2008) Two fatalities by hydrogen sulfide poisoning: Variation of pathological and toxicological findings. **Legal Medicine** 10:148-152.
- Agreste-Primeur. (2010) La gestion des effluents dans les élevages porcins 248.
- Arentoft H., Stolberg E.F., Ekelund S. (1993) Hydrogen sulfide poisoning in a farmer. **Svovlbrinteforgiftning hos en landmand**. 155:4187-4188.
- Assaad Abdelmseeh V., Jofriet J., Hayward G. (2008) Sulphate and sulphide corrosion in livestock buildings, Part I: Concrete deterioration. **Biosystems Engineering** 99:372-381.
- Audeau F.M., Gnanaharan C., Davey K. (1985) Hydrogen sulphide poisoning: associated with pelt processing. **N Z Med J** 98:145-7.
- Avery G.L., Merva G.E., Gerrish J.B. (1975) Hydrogen sulfide production in swine confinement units. **Transactions of the ASAE** 18:149-151.
- Beauchamp R.O., Jr., Bus J.S., Popp J.A., Boreiko C.J., Andjelkovich D.A. (1984) A critical review of the literature on hydrogen sulfide toxicity. **Crit Rev Toxicol** 13:25-97.
- Beline F., Martinez J., Marol C., Guiraud G. (1998) Nitrogen transformations during anaerobically stored N-15-labelled pig slurry. **Bioresource Technology** 64:83-88.
- Béline F. (2001) Le traitement biologique aérobie du lisier de porc - Les transformations de l'azote et les émissions gazeuses polluantes, Antony.
- Belli Filho P., Martin G. (1996) Procédé de réduction des odeurs d'un lisier stocké en fosse couverte, Journées de la Recherche Porcine, JRP, Paris. pp. 225-230.
- Blunden J., Aneja V.P., Westerman P.W. (2008) Measurement and analysis of ammonia and hydrogen sulfide emissions from a mechanically ventilated swine confinement building in North Carolina. **Atmospheric Environment** 42:3315-3331.
- Bryant M.P., Campbell L.L., Reddy C.A., Crabill M.R. (1977) Growth of desulfovibrio in lactate or ethanol media low in sulfate in association with H₂ utilizing methanogenic bacteria. **Applied and Environmental Microbiology** 33:1162-1169.
- Burnett W.W., King E.G., Grace M., Hall W.F. (1977) Hydrogen sulfide poisoning: review of 5 years' experience. **Canadian Medical Association Journal** 117:1277-1280.
- Cantrell L., Young M. (2009) Fatal fall into a volcanic fumarole. **Wilderness and Environmental Medicine** 20:77-79.
- CEE-96-676. (1991) Décret relatif à la protection des eaux contre la pollution par les nitrates d'origine agricole, in: CEE (Ed.).
- Chang C.W., Chung H., Huang C.F., Su H.J.J. (2001) Exposure assessment to airborne endotoxin, dust, ammonia, hydrogen sulfide and carbon dioxide in open style swine houses. **Annals of Occupational Hygiene** 45:457-465.
- Chartrain M., Zeikus J.G. (1986) Microbial ecophysiology of whey biomethanation: Characterization of bacterial trophic populations and prevalent species in continuous culture. **Applied and Environmental Microbiology** 51:188-196.
- Chaturvedi A.K., Smith D.R., Canfield D.V. (2001) A fatality caused by accidental production of hydrogen sulfide. **Forensic Science International** 123:211-214.
- Chen Y., Cheng J.J., Creamer K.S. (2008) Inhibition of anaerobic digestion process: A review. **Bioresource Technology** 99:4044-4064.

- Chin H.W., Lindsay R.C. (1994) Ascorbate and transition-metal mediation of methanethiol oxidation to dimethyl disulfide and dimethyl trisulfide. **Food Chemistry** 49:387-392.
- Christia-Lotter A., Bartoli C., Piercecchi-Marti M.D., Demory D., Pelissier-Alicot A.L., Sanvoisin A., Leonetti G. (2007) Fatal occupational inhalation of hydrogen sulfide. **Forensic Science International** 169:206-209.
- Chynoweth D.P., Wilkie A.C., Owens J.M. (1998) Anaerobic processing of piggery slurry : a review, Eight World Conference on Animal Production, Seoul, Korea. pp. 39.
- Coppenet M., Golven J., Simon J.C., Lecorre L., Leroy M. (1993) Chemical Evolution of Soils in Intensive Animal-Rearing Farms - the Example of Finistere. **Agronomie** 13:77-83.
- Couch L., Martin L., Rankin N. (2005) Near death episode after exposure to toxic gases from liquid manure. **New Zealand Medical Journal** 118.
- Daldal H., Beder B., Serin S., Sungurtekin H. (2010) Hydrogen sulfide toxicity in a thermal spring: A fatal outcome. **Clinical Toxicology** 48:755-756.
- Deng J.F., Chang S.C. (1987) Hydrogen sulfide poisonings in hot-spring reservoir cleaning: Two case reports. **American Journal of Industrial Medicine** 11:447-451.
- Diaz I., Lopes A.C., Perez S.I., Fdz-Polanco M. (2010) Performance evaluation of oxygen, air and nitrate for the microaerobic removal of hydrogen sulphide in biogas from sludge digestion. **Bioresource Technology** 101:7724-7730.
- Dilling W., Cypionka H. (1990) Aerobic respiration in sulfate-reducing bacteria. **FEMS Microbiology Letters** 71:123-128.
- Donham K.J., Yeggy J., Dague R.R. (1988) Production rates of toxic gases from liquid swine manure: Health implications for workers and animals in swine confinement buildings. **Biological Wastes** 24:161-173.
- Donham K.J., Knapp L.W., Monson R., Gustafson K. (1982) Acute toxic exposure to gases from liquid manure. **Journal of Occupational Medicine** 24:142-145.
- Donham K.J., Lee J.A., Thu K., Reynolds S.J. (2006) Assessment of air quality at neighbor residences in the vicinity of swine production facilities. **J Agromedicine** 11:15-24.
- Drake H.L. (1994) Acetogenesis Kluwer Academic Pub.
- Durand M., Wilson J.G. (2006) Spatial analysis of respiratory disease on an urbanized geothermal field. **Environmental Research** 101:238-245.
- Eduard W., Pearce N., Douwes J. (2009) Chronic bronchitis, COPD, and lung function in farmers: the role of biological agents. **Chest** 136:716-25.
- Eurostat. (2010) www.eurostat.com.
- Ferry J. (1993) Methanogenesis Chapman & Hall, New York.
- Florencio L., Field J.A., Lettinga G. (1994) Importance of cobalt for individual trophic groups in an anaerobic methanol-degrading consortium. **Applied and Environmental Microbiology** 60:227-234.
- Gabbay D.S., De Roos F., Perrone J. (2001) Twenty-foot fall averts fatality from massive hydrogen sulfide exposure. **J Emerg Med** 20:141-4.
- Gadekar S., Nemati M., Hill G.A. (2006) Batch and continuous biooxidation of sulphide by Thiomicrospira sp. CVO: Reaction kinetics and stoichiometry. **Water Research** 40:2436-2446.
- Gangopadhyay R.K., Das S.K. (2007) Accident due to release of hydrogen sulphide in a manufacturing process of cobalt sulphide - Case study. **Environmental Monitoring and Assessment** 129:133-135.
- Garcia J.-L., Roger P. (2000) Le cycle du soufre, Université de provence, Université de Méditerranée, Ecole supérieure d'Ingénieurs de Luminy, Département de Génie Biologique et Microbiologie Appliquée, Marseille-Luminy. pp. 29.

- Garcia J.L., Patel B.K.C., Ollivier B. (2000) Taxonomic phylogenetic and ecological diversity of methanogenic Archaea. **Anaerobe** 6:205-226.
- Gassner M., Spuhler T. (1995) [Why do farmers die more often from lung diseases?]. **Schweiz Med Wochenschr** 125:667-75.
- Gerasimon G., Bennett S., Musser J., Rinard J. (2007) Acute hydrogen sulfide poisoning in a dairy farmer. **Clin Toxicol (Phila)** 45:420-3.
- Guidotti T.L. (1996) Hydrogen sulphide. **Occupational Medicine** 46:367-371.
- Guillon F., Mignee C., Wallon C.G., Durigon M. (1983) Concerning five acute deadly poisonings involving hydrogen sulphide A propos de cinq intoxications aiguës mortelles mettant en cause l'hydrogène sulfuré. **Arch mal prof.** 44:483-488.
- Gunn B., Wong R. (2001) Noxious gas exposure in the outback: two cases of hydrogen sulfide toxicity. **Emerg Med (Fremantle)** 13:240-6.
- Hagley S.R., South D.L. (1983) Fatal inhalation of liquid manure gas. **Medical Journal of Australia** 2:459-460.
- Hall A.H., Rumack B.H. (1997) Hydrogen sulfide poisoning: an antidotal role for sodium nitrite? **Vet Hum Toxicol** 39:152-4.
- Hansen T.A. (1994) Metabolism of sulfate-reducing prokaryotes. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology** 66:165-185.
- Hao O.J., Chen J.M., Huang L., Buglass R.L. (1996) Sulfate-reducing bacteria. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology** 26:155-187.
- Hartung J., Phillips V.R. (1994a) Control of Gaseous Emissions From Livestock Buildings and Manure Stores. **J. agri. Engng. Res.** 57:173-189.
- Hartung J., Phillips V.R. (1994b) Control of Gaseous Emissions from Livestock Buildings and Manure Stores. **Journal of Agricultural Engineering Research** 57:173-189.
- Hattori S. (2008) Syntrophic acetate-oxidizing microbes in methanogenic environments. **Microbes and Environments** 23:118-127.
- Hobbs P.J., Misselbrook T.H., Pain B.F. (1998) Emission rates of odorous compounds from pig slurries. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 77:341-348.
- Hoeffler U. (1977) Enzymatic and hemolytic properties of Propionibacterium acnes and related bacteria. **Journal of Clinical Microbiology** 6:555-558.
- Hoidal C.R., Hall A.H., Robinson M.D., Kulig K., Rumack B.H. (1986) Hydrogen sulfide poisoning from toxic inhalations of roofing asphalt fumes. **Ann Emerg Med** 15:826-30.
- Horowitz B.Z., Marquardt K., Swenson E. (1997) Calcium polysulfide overdose: A report of two cases. **Journal of Toxicology - Clinical Toxicology** 35:299-303.
- Huai L., Chen N., Yang W., Bai G. (2009) Metabolic control analysis of L-cysteine producing strain TS1138 of Pseudomonas sp. **Biochemistry (Moscow)** 74:288-292.
- Idriss A.F., Negi S.C., Jofriet J.C., Hayward G.L. (2001) Effect of hydrogen sulphide emissions on cement mortar specimens. **Canadian Biosystems Engineering / Le Genie des biosystems au Canada** 43:523-528.
- INERIS. (2009) Sulfure d'hydrogène, fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques INERIS.
- INRS. (2009) Sulfure d'hydrogène, Fiche toxicologique FT 32 INRS.
- Iversen M. (1997) Predictors of long-term decline of lung function in farmers. **Monaldi Arch Chest Dis** 52:474-8.
- Kage S., Ito S., Kishida T., Kudo K., Ikeda N. (1998) A fatal case of hydrogen sulfide poisoning in a geothermal power plant. **J Forensic Sci** 43:908-10.

- Kage S., Kashimura S., Ikeda H., Kudo K., Ikeda N. (2002) Fatal and nonfatal poisoning by hydrogen sulfide at an industrial waste site. **Journal of Forensic Sciences** 47:652-655.
- Kage S., Ikeda H., Ikeda N., Tsujita A., Kudo K. (2004) Fatal hydrogen sulfide poisoning at a dye works. **Leg Med (Tokyo)** 6:182-6.
- Karhadkar P.P., Audic J.-M., Faup G.M., Khanna P. (1987) Sulfide and sulfate inhibition of methanogenesis. **Water Research** 21:1061-1066.
- Kemper F.D. (1966) A near-fatal case of hydrogen sulfide poisoning. **Canadian Medical Association Journal** 94:1130-1131.
- Kilburn K.H. (1993) Case report: profound neurobehavioral deficits in an oil field worker overcome by hydrogen sulfide. **Am J Med Sci** 306:301-5.
- Kim K.Y., Jong Ko H., Tae Kim H., Shin Kim Y., Man Roh Y., Min Lee C., Nyon Kim C. (2008) Quantification of ammonia and hydrogen sulfide emitted from pig buildings in Korea. **Journal of Environmental Management** 88:195-202.
- Kirkhorn S.R., Garry V.F. (2000) Agricultural lung diseases. **Environ Health Perspect** 108 Suppl 4:705-12.
- Kleinfeld M., Giel C., Rosso A. (1964) Acute hydrogen sulphide intoxication; an unusual source of exposure. **Ind Med Surg** 33:656-60.
- Knight L.D., Presnell S.E. (2005) Death by sewer gas: Case report of a double fatality and review of the literature. **American Journal of Forensic Medicine and Pathology** 26:181-185.
- Knoblauch A., Steiner B. (1999) Major accidents related to manure: A case series from Switzerland. **International Journal of Occupational and Environmental Health** 5:177-186.
- Kojima T., Kobayashi H. (1979) Fatal hydrogen sulfide intoxication. Report of two cases occurring on an excreta storage ship. **Japanese Journal of Legal Medicine** 33:126-131.
- Koster I.W. (1986) Characteristics of the pH-influenced adaptation of methanogenic sludge to ammonium toxicity. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology** 36:445-455.
- Landaud S., Helinck S., Bonnarne P. (2008) Formation of volatile sulfur compounds and metabolism of methionine and other sulfur compounds in fermented food. **Applied Microbiology and Biotechnology** 77:1191-1205.
- Laplante J.J., Dalphin J.C., Piarroux R., Reboux G., Roussel S. (2007) Lung diseases in farmers. **Rev Prat** 57:56-9.
- Leloup J. (2004) Etude de la communauté microbienne sulfato-réductrice (portant le gène *dsrAB*) dans les vasières de l'estuaire de Seine, UFR Sciences et Techniques, Université de Rouen. (*Doctoral Dissertation*)
- Lens P.N.L., Kuenen J.G. (2001) The biological sulfur cycle: Novel opportunities for environmental biotechnology. **Water Sci Technology** 44:57-66.
- Levasseur P. (1998) Composition et volume de lisier de porc, données bibliographiques. **Techni-porcs** 21:17-24.
- Levasseur P. (2005) Composition des effluents porcins et de leurs co-produits de traitement. Quantités produites. Institut Technique du Porc ed., Paris.
- Linaker C., Smedley J. (2002) Respiratory illness in agricultural workers. **Occup Med (Lond)** 52:451-9.
- Louhelainen K., Kangas J., Veijanen A., Viilos P. (2001) Effect of in situ composting on reducing offensive odors and volatile organic compounds in swineries. **American Industrial Hygiene Association Journal** 62:159-167.

- Luck J., Kaye S.B. (1989) An unrecognised form of hydrogen sulphide keratoconjunctivitis. **British Journal of Industrial Medicine** 46:748-749.
- 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.
- Martinez J., Le Bozec G. (2000) Pig manure and environmental concerns in Europe. **Cahiers de l'Agricultures** 9:181-190.
- Millot E., Compagnon F., Bouvet F. (1995) Les intoxications à l'hydrogène sulfuré: à propos de deux cas. **Urgences Médicales** 14:29-35.
- Moletta R. (2008) La Méthanisation. Tech et Doc ed. Lavoisier, Paris.
- Morse D.L., Woodbury M.A., Rentmeester K., Farmer D. (1981) Death caused by fermenting manure. **Journal of the American Medical Association** 245:63-64.
- Muehling A.J. (1970) Gases and odors from stored swine waste. **Journal of Animal Science** 30:526-530.
- Muhlbauer R.V., Swestka R.J., Burns R.T., Xin H., Hoff S., Li H. (2008) Development and testing of a hydrogen sulfide detection system for use in swine housing. pp. 4029-4048.
- Muyzer G., Stams A.J.M. (2008) The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. **Nature Reviews Microbiology** 6:441-454.
- Nam B., Kim H., Choi Y., Lee H., Hong E.S., Park J.K., Lee K.M., Kim Y. (2004) Neurologic sequela of hydrogen sulfide poisoning. **Ind Health** 42:83-7.
- Nejjari C., Tessier J.F., Letenneur L., Dartigues J.F., Barberger-Gateau P., Salamon R. (1996) Prevalence of self-reported asthma symptoms in a French elderly sample. **Respiratory Medicine** 90:401-408.
- Nelson K., Robinson D.L. (2002) A case review: near fatal residential hydrogen sulfide exposure. **Air Med J** 21:46-8.
- Ni J.Q., Heber A.J., Diehl C.A., Lim T.T., Duggirala R.K., Haymore B.L. (2002) Characteristics of hydrogen sulfide concentrations in mechanically ventilated swine buildings. **Canadian Journal of Biosystem Engineering** 44:611-619.
- Nikkanen H.E., Burns M.M. (2004) Severe hydrogen sulfide exposure in a working adolescent. **Pediatrics** 113:927-9.
- Norman J.H. (1984) Hydrogen Production from In-Situ Partial Burning of H₂S, GA Technologies Inc., San Diego, CA, USA.
- Novotny-Baumann M. (2008) Intoxications par l'hydrogène sulfuré : revue de littérature, prise en charge et prévention., Faculté de Médecine Paris-Descartes, Université Paris-Descartes (Paris 5), Paris. pp. 105. (*Doctoral Dissertation*)
- O'Flaherty V., Mahony T., O'Kennedy R., Colleran E. (1998) Effect of pH on growth kinetics and sulphide toxicity thresholds of a range of methanogenic, syntrophic and sulphate-reducing bacteria. **Process Biochemistry** 33:555-569.
- O'Neill D.H., Phillips V.R. (1992) A review of the control of odour nuisance from livestock buildings: Part 3, properties of the odorous substances which have been identified in livestock wastes or in the air around them. **Journal of Agricultural Engineering Research** 53:23-50.
- O'Neill D.H., Stewart I.W., Phillips V.R. (1992) A review of the control of odour nuisance from livestock buildings: Part 2, The costs of odour abatement systems as predicted from ventilation requirements. **Journal of Agricultural Engineering Research** 51:157-165.
- Oesterhelweg L., Puschel K. (2008) "Death may come on like a stroke of lightning": phenomenological and morphological aspects of fatalities caused by manure gas. **Int J Legal Med** 122:101-7.

- Omland O. (2002) Exposure and respiratory health in farming in temperate zones--a review of the literature. **Ann Agric Environ Med** 9:119-36.
- Osbern L.N., Crapo R.O. (1981) Dung lung: A report of toxic exposure to liquid manure. **Annals of Internal Medicine** 95:312-314.
- Parra O., Monso E., Gallego M., Morera J. (1991) Inhalation of hydrogen sulphide: A case of subacute manifestations and long term sequelae. **British Journal of Industrial Medicine** 48:286-287.
- Patni N.K., Clarke S.P. (1991) Transient hazardous conditions in animal building due to manure gas released during slurry mixing. **Applied Engineering in Agriculture** 7:478-484.
- Peters J.W. (1981) Hydrogen sulfide poisoning in a hospital setting. **JAMA** 246:1588-9.
- Peu P., Beline F., Martinez J. (2004) Volatile fatty acids analysis from pig slurry using high-performance liquid chromatography. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry** 84:1017-1022.
- Peu P., Brugère H., Pourcher A.M., Kérourédan M., Godon J.J., Delgenès J.P., Dabert P. (2006) Dynamics of a pig slurry microbial community during anaerobic storage and management. **Applied and Environmental Microbiology** 72:3578-3585.
- Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A. (2002) *Micobiology*.
- Querellou E., Jaffrelot M., Savary D., Savry C., Perfus J.P. (2005) [Fatal outcome of an hydrogen sulfide poisoning]. **Ann Fr Anesth Reanim** 24:1302-4.
- Ravizza A.G., Carugo D., Cerchiari E.L., Cantadore R., Bianchi G.E. (1982) The treatment of hydrogen sulfide intoxication: oxygen versus nitrites. **Vet Hum Toxicol** 24:241-2.
- Roustan M. (2003) Transferts gaz-liquide dans les procédés de traitement des eaux et des effluents gazeux Tec & Doc, Paris.
- Sanz-Gallen P., Nogue S., Palomar M., Rodriguez M., Marti M.J., Munne P. (1994) [Acute poisoning caused by hydrogen sulphide: clinical features of 3 cases]. **An Med Interna** 11:392-4.
- Saha C.K., Zhang G., Kai P., Bjerg B. Effects of a partial pit ventilation system on indoor air quality and ammonia emission from a fattening pig room. **Biosystems Engineering** 105:279-287
- Schneider J.S., Tobe E.H., Mozley Jr P.D., Barniskis L., Lidsky T.I. (1998) Persistent cognitive and motor deficits following acute hydrogen sulphide poisoning. **Occupational Medicine** 48:255-260.
- Simson R.E., Simpson G.R. (1971) Fatal hydrogen sulphide poisoning associated with industrial waste exposure. **Medical Journal of Australia** 1:331-334.
- Singh A. (2010) Strange cases of hydrogen sulphide poisoning: Case report with review on effects of H₂S and precautions. **Medico-Legal Update** 10:3-4.
- Smilkstein M.J., Bronstein A.C., Pickett H.M., Rumack B.H. (1985) Hyperbaric oxygen therapy for severe hydrogen sulfide poisoning. **J Emerg Med** 3:27-30.
- Soto M., Mendez R., Lema J.M. (1993) Sodium inhibition and sulphate reduction in the anaerobic treatment of mussel processing wastewaters. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology** 58:1-7.
- Spiers M., Finnegan O.C. (1986) Near death due to inhalation of slurry tank gases. **Ulster Med J** 55:181-3.
- Spoelstra S.F. (1980) Origin of objectionable odorous components in piggery wastes and the possibility of applying indicator components for studying odour development. **Agriculture and Environment** 5:241-260.
- Stams A.J.M., Plugge C.M., de Bok F.A.M., van Houten B., Lens P., Dijkman H., Weijma J. (2005) Metabolic interactions in methanogenic and sulfate-reducing bioreactors. **Water Science and Technology** 52:13-20.

- Stevens R.J., Laughlin R.J., Frost J.P. (1993) Effects of Diet and Storage Time on the Concentration of Sulfide in Dairy-Cow Slurry. **Bioresource Technology** 45:13-16
- Stine R.J., Slosberg B., Beacham B.E. (1976) Hydrogen sulfide intoxication. A case report and discussion of treatment. **Ann Intern Med** 85:756-8.
- Supaphol S., Jenkins S.N., Intomo P., Waite I.S., O'Donnell A.G. (2011) Microbial community dynamics in mesophilic anaerobic co-digestion of mixed waste. **Bioresource Technology** 102:4021-4027.
- Takahashi Y., Yoshida A., Nagata E., Hoshino T., Oho T., Awano S., Takehara T., Ansai T. (2011) Streptococcus anginosus-cysteine desulphydrase gene expression is associated with abscess formation in BALB/c mice. **Molecular Oral Microbiology** 26:221-227.
- Tanaka S., Fujimoto S., Tamagaki Y., Wakayama K., Shimada K., Yoshikawa J. (1999) Bronchial injury and pulmonary edema caused by hydrogen sulfide poisoning. **Am J Emerg Med** 17:427-9.
- Tvedt B., Edland A., Skyberg K., Forberg O. (1991) Delayed neuropsychiatric sequelae after acute hydrogen sulfide poisoning: affection of motor function, memory, vision and hearing. **Acta Neurol Scand** 84:348-51.
- Uberoi V., Bhattacharya S.K. (1997) Sulfate-reducing bacteria in anaerobic propionate systems. **Journal of Environmental Engineering** 123:675-682.
- van Leerdam R.C., de Bok F.A.M., Bonilla-Salinas M., van Doesburg W., Lomans B.P., Lens P.N.L., Stams A.J.M., Janssen A.J.H. (2008) Methanethiol degradation in anaerobic bioreactors at elevated pH (≥ 8): Reactor performance and microbial community analysis. **Bioresource Technology** 99:8967-8973.
- Vathenen A.S., Emberton P., Wales J.M. (1988) Hydrogen sulphide poisoning in factory worker. **Lancet** 1:305.
- Vidal G., Carvalho A., Mendez R., Lema J.M. (2000) Influence of the content in fats and proteins on the anaerobic biodegradability of dairy wastewaters. **Bioresource Technology** 74:231-239.
- Visser A., Nozhevnikova A.N., Lettinga G. (1993) Sulphide inhibition of methanogenic activity at various pH levels at 55°C. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology** 57:9-13.
- Visser J.M., Robertson L.A., Van Verseveld H.W., Kuenen J.G. (1997) Sulfur production by obligately chemolithoautotrophic Thiobacillus species. **Applied and Environmental Microbiology** 63:2300-2305.
- Von Essen S., Donham K. (1999) Illness and injury in animal confinement workers. **Occup Med** 14:337-50.
- Wellinger A., Linberg A. (2000) Biogas Upgrading and Utilization. International Energy Association ed., Paris, France.
- Whitcraft D.D., 3rd, Bailey T.D., Hart G.B. (1985) Hydrogen sulfide poisoning treated with hyperbaric oxygen. **J Emerg Med** 3:23-5.
- Williams A.G. (1984) Indicators of piggery slurry odour offensiveness. **Agricultural Wastes** 10:15-36.
- Yalamanchili C., Smith M.D. (2008) Acute hydrogen sulfide toxicity due to sewer gas exposure. **Am J Emerg Med** 26:518 e5-7.
- Yano T., Fukamachi H., Yamamoto M., Igarashi T. (2009) Characterization of L-cysteine desulphydrase from Prevotella intermedia. **Oral Microbiology and Immunology** 24:485-492.
- Zahn J.A., Hatfield J.L., Laird D.A., Hart T.T., Do Y.S., DiSpirito A.A. (2001) Functional classification of swine manure management systems based on effluent and gas emission characteristics. **Journal of Environmental Quality** 30:635-647.

- Zhang L., De Schryver P., De Gussemé B., De Muynck W., Boon N., Verstraete W. (2008) Chemical and biological technologies for hydrogen sulfide emission control in sewer systems: A review. **Water Research** 42:1-12.
- Zhang Y., Tanaka A., Dosman J.A., Senthilselvan A., Barber E.M., Kirychuk S.P., Holfeld L.E., Hurst T.S. (1998) Acute respiratory responses of human subjects to air quality in a swine building. **Journal of Agricultural Engineering Research** 70:367-373.
- Zhu J., Riskowski G.L., Torremorell M. (1999) Volatile fatty acids as odor indicators in swine manure - A critical review. **T. ASAE** 42:175-182.
- Zicari S.M. (2003) Removal of hydrogen sulfide from biogas using cow-manure compost, Faculty of the Graduate School of Cornell University, Cornell. pp. 109. (*Doctoral Dissertation*)

Chapitre 2 :
Contrôler les formes
soufrées présentes dans les
lisiers de porcs en utilisant
l'approche nutritionnelle

Chapitre 2 : Contrôler les formes soufrées présentes dans les lisiers de porcs en utilisant l'approche nutritionnelle.

Avant-propos :

Parmi les composés soufrés volatils produits au cours du stockage anaérobie des effluents d'élevage, certains sont préoccupants, notamment ceux responsables des odeurs. Le plus dangereux est certainement l'hydrogène sulfuré (H_2S) car il est toxique, non odorant à forte concentration et létal. Le plus souvent, le risque d'exposition maximale à l' H_2S survient lorsque l'effluent est agité dans une fosse avant sa reprise pour l'épandage sur les parcelles agricoles. En partant de l'hypothèse que l'hydrogène sulfuré émis au cours du stockage des effluents est directement lié à la qualité des aliments donnés aux animaux, l'objectif principal de ce travail était de comparer l'impact de différentes formulations des aliments sur la production d'hydrogène sulfuré des lisiers.

Notre approche expérimentale a consisté à (i) analyser les teneurs en soufre des principaux ingrédients utilisables pour formuler les rations alimentaires des animaux, (ii) à étudier *in-vivo* des régimes alimentaires contrastés afin de déterminer la part du soufre retenue et excrétée par les animaux et (iii) à étudier le devenir de la principale forme excrétée au cours d'une simulation de stockage anaérobie.

Le modèle animal qui a été utilisé pour cette étude est le porc. Dans un premier temps, nous avons évalué les teneurs en soufre total de 76 matières premières entrant dans la formulation des aliments en utilisant les données des tables de composition et de valeur nutritive des matières premières destinées aux animaux d'élevage de l'AFZ (Association Française de Zootechnie). Ensuite nous avons réalisé des expérimentations, *in-vivo*, sur des porcs castrés logés individuellement dans des cages métaboliques afin de collecter leurs excréments. En s'appuyant sur l'analyse des matières premières, nous avons formulé onze régimes expérimentaux constitués principalement de blé et de tourteaux de soja. Les régimes se différenciaient par leur concentration en tourteaux, ceux-ci étant remplacés partiellement par des ingrédients riches en soufre. Pour chaque expérience, nous avons mesuré la rétention du soufre par les animaux ainsi que les niveaux d'excrétion. Enfin, après avoir caractérisé la principale forme chimique du soufre excrétée par les porcs nous avons réalisé des simulations de stockage anaérobie afin de déterminer le devenir du soufre présent dans le lisier et d'étudier sa transformation en hydrogène sulfuré.

Pascal PEU^{1†}, Sylvie PICARD¹, Jean-Yves DOORMAD², Patrick DABERT¹.

¹*Cemagref, UR GERE. 17 avenue de Cucillé, CS 64427, F-35044 Rennes, France.*

Université Européenne de Bretagne, F-35000 Rennes, France.

²*INRA Agrocampus Ouest, UMR 1079 SENAH, 35590 Saint-Gilles, France.*

Managing sulfur content of pig diets to control sulfide production during anaerobic storage of
pig slurry

† corresponding author

Mailing adress: *Cemagref, UR GERE. 17 avenue de Cucillé, CS 64427, F-35044 Rennes, France.*

Phone: 33 2 23 48 21 45

Fax: 33 2 23 48 21 15

e-mail: pascal.peu@cemagref.fr

ABSTRACT

The composition of pig feed influences both sulfur intake and excretion. The objectives of this study were to determine the effect of sulfur content in their feed on sulfur excretion in pig feces and urine, to identify the speciation of the sulfur excreted, and the fate of sulfur in pig slurry during anaerobic storage. The sulfur content of 76 different raw materials generally used for the formulation of pig diets was evaluated using data from INRA-AFZ database. Total sulfur content ranged between 0.8 and 15.3 g S.kg⁻¹ dry material with different ratio of nitrogen as protein to sulfur amino acids (N:S-SAA) and of nitrogen to total sulfur (N:S). In vivo experiments were conducted on castrated male pigs individually housed in metabolic cages to enable collection of the excreta. Eleven experimental diets mainly based on wheat/soybean meal were compared. They differed in the incorporation of different ingredients wheat dried distiller's grains with soluble, sugar beet pulp or rapeseed meal. Sulfur content of the diets varied between 3.1 and 8.3 g S.pig⁻¹.d⁻¹. For all experiments, sulfur retention by animals was close to 1.1 g S.pig⁻¹.d⁻¹ and S excretion ranged from 1.5 to 6.9 g S.pig⁻¹.d⁻¹. Excretion in urine represented 55% of total excretion. Sulfur was excreted as 100% sulfate in urine and 50% sulfate in feces. The fate of sulfates in fresh pig slurry was studied during anaerobic storage by spiking raw pig slurry with sulfate and volatile fatty acids. Sulfates were consumed rapidly with high production of sulfides.

Keywords: sulfur, sulfate, sulfides, feedstuffs, pig slurry, anaerobic storage.

INTRODUCTION

Under the present regulations concerning livestock manure management, particularly in the European pig industry, slurry is collected from barns and stored in storage tanks inside and/or outside the livestock buildings, before spreading on farmland. During this storage period, the prevailing anaerobic conditions allow the production and accumulation of sulfur (S) compounds. Among the molecules produced, some are of particular concern since they are responsible for foul odors and/or are dangerous for health. According to Spoelstra (1980), the major S compounds responsible for odors are hydrogen sulfide (H_2S) and methanethiol. Other authors (Clanton and Schmidt, 2000) added dimethyl-sulfide, dimethyl-disulfide, dimethyl-trisulfide, carbon disulfide and carbonyl sulfide to the list of gaseous S compounds. Handling these types of livestock manure can be also dangerous when gaseous S forms dissolved in the liquid phase are suddenly transferred and released to the gas phase (Mackie et al., 1998; O'Neill and Phillips, 1992). The most dangerous S gas compound is probably H_2S , as it is toxic and even lethal at high concentrations (Oesterhelweg and Puschel, 2008). Jacobson et al. (1997) collected air samples from the headspace above the manure storage units in swine, dairy, beef and poultry facilities over a two year period and found between 17 and 1200 odor units and H_2S concentrations ranging from 6 to 118 ppm. In most cases, the maximum exposure to H_2S occurs when the slurry has been stored anaerobically and is then mixed before spreading on the land, and this phenomenon is known as “ H_2S Burst-release” (Ni et al., 2009). The acute toxicity of H_2S absorbed by inhalation is well documented (Oesterhelweg and Puschel, 2008). In France, to protect exposed populations (mainly in the industry), toxicity thresholds were identified and a threshold of 5 ppm for 8 h of work exposure set (Bonnard et al., 2009).

In pig slurry, H_2S is produced for different reasons. First, in anaerobic conditions, the sulfate in pig excreta (urine and feces) can be reduced into sulfite and sulfide by sulfate reducing bacteria (Spoelstra, 1980). This pathway is known as dissimilatory sulfate reduction (Arogo et al., 2000; Elferink et al., 1994). The microorganisms involved are terminal degraders of organic matter and are widely present in anaerobic ecosystems (Elferink et al., 1994; Stams et al., 2005). Second, H_2S formation may result from the mineralization of organic compounds containing S, such as undigested proteins (in the feed or due to endogenous losses) that contain methionine, cystine and cysteine amino acids that can be reduced to pyruvate, methanethiol, dimethyl-sulfide, dimethyl-disulfides, dimethyl-trisulfides and H_2S (Eriksen et al., 2010; Mackie et al., 1998).

Acknowledging the fact that the feed is ultimately a major source of S in manure, it was hypothesized that H₂S production and emission could be reduced by reducing excess nutrients and selecting low S feedstuffs. Le et al. (2007) conducted an experiment to evaluate the effects of diet supplementation with sulfur amino acid (SAA) (3 times the requirement) on odor production. They found that SAA supplementation increased the emission and the intensity of the odor in the air above the manure pit and suggested that SAA should be formulated close to real requirements. However, depending on the type of feedstuffs used, pig diets also contain other forms of S and especially inorganic S. The first objective of this study was to determine the total S content of the different feedstuffs usually used to prepare pig feed and to evaluate the contribution of S from SAA. The second objective was to analyze the fate of the ingested S using different diets by characterizing the main forms of S excreted in urine and feces. Finally, the fate of excreted S was evaluated during a pig slurry storage simulation experiment.

MATERIALS AND METHODS

The turnover of S between feed consumption and the storage of pig slurry storage was investigated using three approaches. First, feedstuff S was characterized using data in a published ingredients database (INRA-AFZ, 2004). Secondly, results of an in-vivo experiment were used for the quantitative determination of retention, excretion and speciation of S by pigs. Finally, a laboratory experiment was performed to analyze conversion of S in anaerobic storage conditions.

Feedstuff characterization

The chemical characteristics of 76 different feedstuffs were extracted from the “feedbase” of the French Association for Animal Production (INRA-AFZ, 2004). For all feedstuffs described in the INRA-AFZ database, information concerning protein content, SAA (methionine and cystine) and total S are available from standardized laboratories (standardized by international standardization bodies: ISO, AFNOR and CEN). From these data, we calculated the total nitrogen (N) content and the S content from SAA (S-SAA) of each feedstuff as follows:

$$N \text{ (g)} = \text{crude protein (g)} / 6.25$$

$$S\text{-SAA (g)} = 32.06 \times \left[\frac{\text{methionine (g)}}{149.2} - \frac{\text{cystine (g)}}{240.3} \right]$$

where 6.25 is the ratio of crude protein (CP) to N in a typical protein, 32.06, 149.2 and 240.3 are the molecular weights of S, methionine and cystine, respectively, and 2 is the number of S atoms in each cystine molecule. For each ingredient, two N to sulfur ratios were calculated, one taking amino acids S (N:S-SAA) into account and another using total S (N:S) (Magee et al., 2004).

In vivo determination of retention, excretion and speciation of S by pigs

The excreta from two in vivo experiments were used to analyze S retention and excretion by pigs. The first experiment is described in detail in a previous paper (Cozannet et al., 2010) and was originally designed to evaluate the nutritional value of different wheat dried distiller's grains with solubles (DDGS). Briefly, five growing pigs per diet (Piétrain x (Landrace x Large white)), initial live weight: 62 kg (\pm 1.5 kg) were housed individually in an environmentally controlled room in metabolism cages equipped for separate collection of feces and urine. Pigs were adapted to the diet and to the cage for 10 days (d) before excreta were collected for a period of 10 days. During the adaptation period, the feed supply was gradually increased to 2.2 kg and remained at 2.2 kg throughout the collection period. All the pigs received their feed in mashed form, twice daily, in two equal meals, and had free access to water. During the collection period, feed, feces and urine were collected daily, pooled and stored at 4 °C. At the end of the collection period, feces and urine were homogenized and sampled. From this experiment, six diets (five diets with DDGS plus the control) were selected based on their sulfur content (table 1). The second experiment used to provide excreta is described in detail in Jarret et al. (2011). The same protocol as described above was used for animal housing and collection of excreta. Fives diets were compared (four pigs per diet): two control diets (low and high crude protein content), and three other diets with the addition of 20% of either wheat DDGS, sugar beet pulp or rapeseed (table 1).

Fate of sulfur during storage

For the storage simulation study, raw pig slurry was collected from a commercial farrow-to-finish pig farm (dry matter: 49.3 g.l⁻¹, volatile solids: 36.0 g.l⁻¹, total Kjeldahl N: 3.9 g.l⁻¹, pH: 8.5). Two liters each of four well-mixed slurry samples were placed in four jars. To study the fate of sulfate in anaerobic storage conditions, sodium sulfate (Na₂SO₄) was spiked into the initial slurry in two jars to reach concentrations of 1.2 and 2.4 g S- SO₄²⁻.l⁻¹. To restore the initial characteristics of this slurry and particularly its volatile fatty acid (VFA) contents (Williams et al. 1981), acetate, propionate and butyrate were added to reach 3, 2 and 2 g.l⁻¹

respectively. Two jars were used as controls (raw pig slurry alone or plus VFA). Thereafter, the jars were kept open to allow the gas produced to escape and were incubated in a water bath at 20 °C for 45 days. Sulfate and VFA were measured every two or three days for two weeks at the beginning of the experiment and once a week thereafter. Based on the same sampling frequency, total sulfide and pH content were determined.

Analysis

Physico chemical characterizations

Dry matter (DM) and ash content were determined in diets, feces and urine and Kjeldahl nitrogen content in the diets using standard methods (APHA, 1998). pH was measured with a hand held pH meter (Hanna).

Total sulfur

Elementary analysis of S was performed using a specific analyzer (SC-144DR, LECO, USA) for diets, feces and urine. Fresh samples to be analyzed were first dried at 105 °C and the solids were ground with a mortar. An aliquot was placed into a basket, covered with vanadium pentoxide and placed in the furnace (at 1350 °C) under continuous pure oxygen flow causing S oxidation into sulfur dioxide. Combustion gas and particularly sulfur dioxide content was analyzed by an internal infrared detector to determine the S content of the sample. Calibration was performed with known amounts of S using standard coal supplied by the manufacturer (LECO, USA).

Total dissolved sulfides (TDS)

Determination of TDS was carried out using the procedure of Ubuka et al., (2001). Samples of fresh pig slurry of about 5 ml were mixed with zinc acetate (2M) to precipitate total dissolved sulfides as zinc sulfide, with a mixing ratio of 1:5. The solution was centrifuged at 12 000 g for 20 min and the pellet was suspended in oxygen free distilled water. An aliquot (0.5 ml) of this suspension was then placed in a chromatography vial and acidified with pure concentrated phosphoric acid (25µl). The tube was capped tightly and left for one hour at 80 °C. During this period, zinc sulfide precipitate volatilized into the headspace as H₂S gas. The headspace of the vial was analyzed using a gas chromatography (30 m, CP-Sil CB 5, GC 450 Varian, USA) equipped with a specific detector for S compounds (Pulsed Flame Photometric Detector). Calibration was done using the same procedure with pure sodium sulfide.

Determination of sulfate and volatile fatty acids (VFA)

Sulfates were analyzed in an ion chromatograph (DX120, Dionex, USA) fitted with an AS9HC column coupled with a conductimeter for sulfate followed by post column suppression of eluent ions. Liquid samples were initially centrifuged at 20 000g for 20 min and the supernatants were diluted (25 times) and injected into the ion chromatograph. For feeds and feces, potassium chloride (1M) extraction was done with a ratio of 5:100 (w/w). After separation, the peaks of each anion were quantified by comparison with standard anion solutions. For VFA determination, the samples were prepared in the same way and the soluble fraction was analyzed by high performance liquid chromatography (Ultimate 3000, Dionex, USA)(Peu et al., 2004).

Statistical analysis

Data were analyzed using mixed linear procedures in STATVIEW II (SAS Institute Inc.) Statistical significance was defined as $P < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Evaluation of total sulfur content of feed ingredients

Based on information in the feed database of the French Association for Animal Production (INRA-AFZ, 2004), the S content of 76 raw feedstuffs commonly used for the formulation of pig diets ranges from less than 0.8 g total S per kg dry weight for dehydrated sweet potatoes to 15.3 g S.kg⁻¹ for yeast vinasse (figure 1). The S content of whole cereal grains (wheat, corn, barley, rice, sorghum, triticale, rye) is relatively low, usually close to 1.4 g S.kg⁻¹ ± 0.3. Cereals and their by-products have average contents of around 2.1 g S.kg⁻¹ ± 1.2. The average S content of oilseeds is higher, ranging between 1.9 g S.kg⁻¹ for soybean and 3.6 g S.kg⁻¹ for rapeseed. The total S content of oilseed meal is generally 1.5 times higher than that in the original oilseed due to the removal of oil during industrial processing. For instance, total S content of rapeseed meal is 6.6 g S.kg⁻¹ after oil extraction while the S concentration of rapeseed is 3.6 g S.kg⁻¹. Sugar and starch by-products and oilseed meal have the highest total S contents of all plant-based ingredients (3.4 and 3.7 g S.kg⁻¹ respectively). Feedstuffs of animal origin contain higher concentrations of total S than most ingredients of plant origin. Total S content of milk by-products can reach 3.4 g S.kg⁻¹ ± 1.2 and of fish meal, 7 g S.kg⁻¹ ±

0.3. In the greatest part, data in the INRA-AFZ dataset are in good agreement (less than 20% differences) with the values of US feedstuffs obtained by Kerr et al. (2008).

For each group of ingredients, the bars in figure 1 show the maximum and minimum of S content of the feedstuffs in the group concerned. Major variations in S concentration were observed for cereals and their by-products, for oilseed meal and for milk by-products. For cereals, lower values were observed for grains and higher for processed ingredients such as wheat gluten feed (3.4 g S.kg⁻¹) or wheat/corn DDGS (3.6 g S.kg⁻¹) and the highest values for corn gluten meal (6.5 g S.kg⁻¹). In the same cereal by-products supplied by US firms, Kerr et al. (2008) measured higher S contents: 10.6 g S.kg⁻¹ ± 1.1 for corn gluten meal, 7.5 g S.kg⁻¹ ± 0.5 for corn gluten feed and 6.7 g S.kg⁻¹ ± 2.3 for DDGS. These authors suggested that the high concentrations measured in cereal by-products can be explained by the processing technique used. For oilseed meal, total S values ranged between 1.1 and 6.6 g S.kg⁻¹, the maximum S content being measured in rapeseed meal. The particularly high S content in rapeseed, a plant from the *Brassicaceae* family, is due to its high glucosinolate concentration (β-thio-d-glucopyranose), which contributes significantly to total S content. For example, glucosinolate concentrations in rapeseed range from 0.4 to 1.4 g S.kg⁻¹ depending on the cultivar (Tripathi and Mishra, 2007).

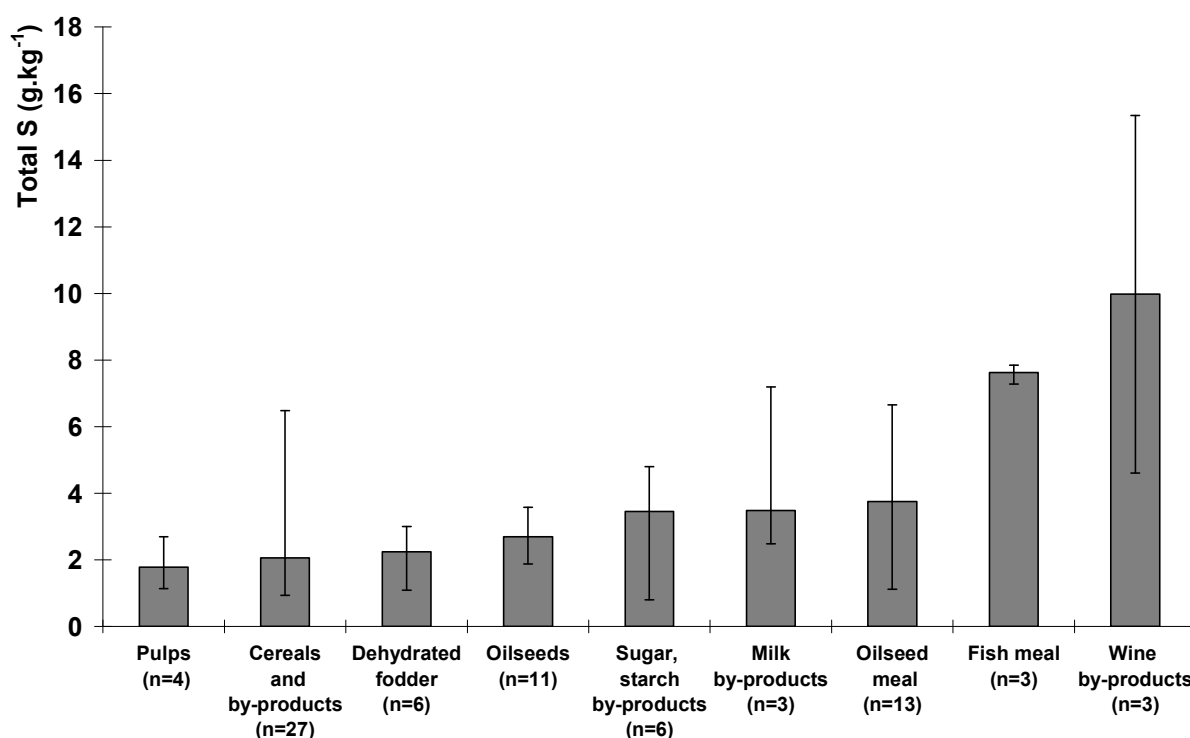


Figure 1

Average total S content of feedstuffs commonly used in pig feed (Dry matter basis, minimum and maximum values are given for each group, n is the number of feedstuffs in each group).

Figure 2 shows the N:S-SAA and N:S ratios. Overall, the N:S-SAA ratio for all feedstuffs in the INRA-AFZ (2004) table averaged 22.0 ± 2.9 . The N:S ratio was lower (13.1 ± 4.2) but more variable. This result highlights the rather low variability of the SAA to protein ratio among the feedstuffs we analyzed, which tended to be lower for cereals and cereal by-products. The N:S ratio was always lower than the N:S-SAA ratio ($P < 0.001$) for all feedstuffs analyzed, indicating that S-SAA represents only a part of total S (68% on average). This difference indicates that in some feedstuffs a significant proportion of total S is present in another form than SAA, mainly as inorganic S, i.e. as sulfates, sulfites, etc. (Magee et al., 2004). Comparing N:S-SAA and N:S ratios thus enables determination of the inorganic load of each ingredient. Four groups of feedstuffs displayed marked differences between their N:S-SAA and N:S ratios: more than 70% difference for molasses, starch by-products and sugar beet pulps and close to 40% difference for milk by-products, dehydrated fodder and wine by-products. It can thus be concluded that large amounts of inorganic sulfur are recovered in these ingredients. In most cases, the presence of inorganic sulfur was the consequence of the process used to produce the feedstuffs. For molasses and starch by-products, alkali is often used for processing and is then neutralized with sulfuric acid. In the same way, for dried alfalfa and grass, pulps, milk by-products and wine by-products bio-chemical reactions are buffered by adding sulfuric acid to control variations in pH.

These results suggest that the wide range of variation in the total S content of feed ingredients could affect total S feed intake and consequently S excretion by animals, with subsequent impacts on gaseous S emissions from slurry during anaerobic storage. Moreover, since the main ingredients of pig diets are cereals such as wheat, barley and corn, which have a low S content, variation in S content of feed is strongly correlated with the addition of other ingredients, especially when sulfuric acid is used during processing.

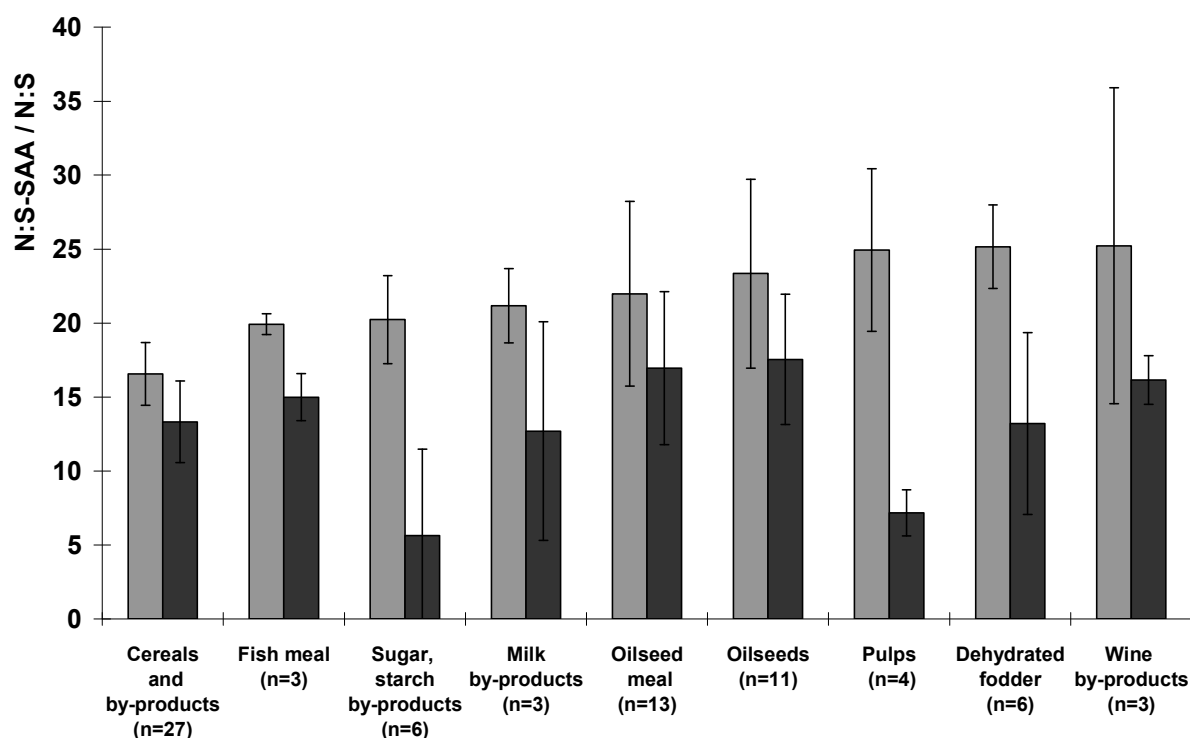


Figure 2: Feedstuffs N:S-SAA (grey) and N:S ratios (black). (Bars indicate standard deviations; n is the number of feedstuffs in each group)

Sulfur balance in growing pigs

In the *in vivo* studies, all animals remained healthy throughout the period of the experiment and no feed spillage or refusal was observed. Daily body weight (BW) gain over the collection period was positive in both experiments (701 g.d⁻¹ and 911 g.d⁻¹ respectively) and was not affected by the different treatments.

Table 1 lists the results of the analysis of S content of diets in the 11 diets. Total S content varied between 1.5 and 4.1 g S.kg⁻¹. Diet 8 had the lowest S content, this was a low protein diet based on wheat and soybean meal exclusively, with a total CP content of 13%. Two diets containing 25% DDGS (diets 3 and 4) had the highest S content. There was also marked variation in S content between the diets containing DDGS, despite a similar incorporation rate (20 to 25%); total S ranged from 2.06 to 4.10 g S.kg⁻¹ in diets 2 and 3 respectively. The DDGS used were obtained from different suppliers with different production processes. In spite of these wide variations in total S content, S-SAA contents did not differ significantly between diets and ranged between 1.13 and 1.69 g S-SSA.kg⁻¹, suggesting that most of the difference in S content originated from inorganic S.

The N:S-SAA ratio (table 1) was calculated for all diets according to the INRA-AFZ database (2004) for S content and the total Kjeldahl N content analyzed in each diet. The results, $18.6 \text{ g.g}^{-1} (\pm 1.3) \text{ N:S-SAA}$, revealed a limited difference between diets. The N:S ratio varied much more between diets, the lowest value (7.0) was found in diets 3 and 4 and the highest (15.7) in diet 7. These results reflect the significant contribution of inorganic sulfur from by-products (Kerr et al., 2008). However, the characterization of sulfate content in the diets (table 1) did not explain all the inorganic sulfur content. On average only 13% of the total sulfur content was recovered as sulfate. The difference between measured total S and S-SAA and S-SO_4^{2-} reflects the lack of inorganic sulfur balance. This could indicate either that sulfate bonds were not efficiently extracted by the chemical procedure used for analysis or that other inorganic S forms are present in the diets and these were not analyzed.

Table 2 lists the daily average sulfur balance of experimental pigs from feed ingestion up to excretion of urine and feces. Pearson correlation coefficients for protein, S-SAA, S and S-SO_4^{2-} are also presented in table 3. Apparent S digestibility was calculated as the difference between S intake and S excretion in feces. It was clear that increasing the S content of the diet resulted in a corresponding increase in the amount of S absorbed, whereas apparent digestibility remained relatively constant at around 79% ($\pm 4\%$) of S intake. Similar results were reported by Eriksen et al. (2010) and Nørgaard et al. (2010), who measured 84% apparent digestibility of S in growing pigs fed diets supplemented with methionine and benzoic acid.

Average S retained (i.e. the difference between S intake and S excretion in urine and feces) was $1.1 \text{ g S.pig}^{-1}.\text{d}^{-1} (\pm 0.8)$. This S retention was independent of the other S parameters analyzed, and particularly S-SAA and S intake (table 3). Similar results were reported by Eriksen et al. (2010) in growing pigs fed with different amounts of methionine. In their study, S retention was close to $1.5 \text{ g S.pig}^{-1}.\text{d}^{-1}$ and tended to be higher for the diets supplemented with benzoic acids. This constant S retention suggests that S intake was sufficient to maximize retention and that the supply of SAA exceeded the requirements for maintenance and growth. Braude and Esnaola (1973) estimated that for optimal performance, nitrogen retention and carcass leanness was obtained for growing pigs (20-60 kg BW) with a minimum of $4 \text{ g.kg}^{-1} \text{ SAA}$ in the diet ($0.96 \text{ g S-SAA.kg}^{-1}$). Heger et al. (2008) evaluated the dose-response relationship to limiting amino acid intake and especially SAA in growing pigs. According to their results, the total SAA daily requirement for a 50-kg pig was about 13.5 g.d^{-1} , corresponding to about 6.7 g.kg^{-1} . According to the InraPorc model (van Milgen et al., 2008), the digestible SAA requirement of growing pigs decreases from 5.0 g.kg^{-1} at 30 kg

BW, to 2.8 g.kg^{-1} at 110 kg BW, corresponding to a total of 5.7 and 3.2 g.kg^{-1} , respectively. Based on these results, we calculated that the SAA supply was slightly below the requirement in diets 1, 7, 8 and 10, but did not affect daily body weight gains.

Dietary S content strongly affected S concentration in feces and urine. All supplementary S above retention was excreted ($R^2=0.75$), whatever the S form ingested by the pigs. In agreement with the results of Heger et al. (2008), the supply of SAA beyond actual requirements was not retained by the growing pigs but was excreted. In all experiments described in this study, an average of around 55% ($\pm 18\%$) of S intake was recovered in urine, whereas only 20% ($\pm 5\%$) was recovered in feces.

The sulfate content of pig feed, feces and urine was also determined. Sulfate excreted was determined by summing sulfate recovered in feces and in urine (table 2). Whatever the diet, sulfate represented 90% ($\pm 16\%$) of total S excretion (table 3). Speciation of urinary S excretion showed that sulfate was the major form of S ($107\% \pm 27\%$), whereas in feces 50% ($\pm 26\%$) of S excreted was extractable sulfate. In the reconstituted slurry obtained by the mixing urine and feces in the proportions originally excreted, total S and sulfates ranged between $0.3\text{-}1.9 \text{ g S.kg}^{-1}$ and $0.3\text{-}1.7 \text{ g S-SO}_4^{2-}.\text{kg}^{-1}$, with the extreme values being obtained in diets 1 and 4. Although dietary S-SAA in diets 1 and 7) was close to the minimum level able to sustain normal pig growth, total sulfur and sulfate were still present in significant amounts in excreta (close to 0.5 g S.kg^{-1}). Since sulfate concentration in drinking water was negligible ($10 \text{ mg S-SO}_4^{2-}.\text{l}^{-1}$), we can conclude that sulfates present in pig slurries mainly originated from the feed. Further reduction in S excretion via SAA intake may therefore be difficult to achieve. In addition, it appears difficult to reduce inorganic S intake in these diets because the N:S-SAA and N:S ratios (table 1) were very similar, indicating that the inorganic S content of these diets was already very low.

Similar results were found by Clark et al. (2005) and Eriksen et al. (2010), who also measured an increase in S excretion by increasing dietary content by SAA. Eriksen et al. (2010) measured a sulfate concentration of $1 \text{ g S-SO}_4^{2-}.\text{kg}^{-1}$ in the slurry resulting from a pig diet enriched with methionine (10 g.kg^{-1}).

Table 1
Composition of the different diets and results of chemical analysis

| Composition(%) | Diets - Experiment 1 | | | | | | Diets - Experiment 2 | | | | |
|---|----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|----------------------|-------|-------|-------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
| Wheat | 87.25 | 64.82 | 64.82 | 64.82 | 64.82 | 64.82 | 79.52 | 89.21 | 69.53 | 58.14 | 69.03 |
| Soybean meals | 10.00 | 7.43 | 7.43 | 7.43 | 7.43 | 7.43 | 16.54 | 6.58 | 6.45 | 19.02 | 7.67 |
| Wheat DDGS | | 25.00 | 25.00 | 25.00 | 25.00 | 25.00 | | | 20.00 | | |
| Sugar beet pulp | | | | | | | | | | 20.00 | |
| Rapeseed meal | | | | | | | | | | | 20.00 |
| Dicalcium phosphate | 0.7 | 0.7 | 0.7 | 0.7 | 0.7 | 0.7 | 0.5 | 0.6 | 0.8 | 0.7 | 0.3 |
| Calcium carbonate | 1.1 | 1.1 | 1.1 | 1.1 | 1.1 | 1.1 | 1,75 | 1,92 | 1,70 | 0,96 | 1,78 |
| Salt | 0.45 | 0.45 | 0.45 | 0.45 | 0.45 | 0.45 | 0.45 | 0.45 | 0.45 | 0.45 | 0.45 |
| Vitamin premix [†] | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| Analysed level | | | | | | | | | | | |
| Dry matter (%) | 87.6 | 87.6 | 88.3 | 88.2 | 88.2 | 87.2 | 87.3 | 87.5 | 88.4 | 87.5 | 81.4 |
| Ash (%) | 4.70 | 5.47 | 5.64 | 5.80 | 5.29 | 5.36 | 5.76 | 5.47 | 6.07 | 6.47 | 6.29 |
| CP (%) | 14 | 17.5 | 19 | 17.9 | 18.4 | 17.9 | 16.5 | 13 | 16.5 | 16.5 | 16.5 |
| S (g.kg ⁻¹ DM) | 1.63 | 2.06 | 4.11 | 3.77 | 2.59 | 2.57 | 1.68 | 1.49 | 2.33 | 1.99 | 1.90 |
| S-SAA [‡] (g.kg ⁻¹ DM) | 1.23 | 1.56 | 1.56 | 1.56 | 1.56 | 1.56 | 1.35 | 1.13 | 1.44 | 1.24 | 1.69 |
| S-SO ₄ ²⁻ (g.kg ⁻¹ DM) | 0.12 | 0.45 | 0.63 | 0.55 | 0.23 | 0.22 | 0.16 | 0.17 | 0.34 | 0.28 | 0.15 |
| N:S-SAA | 18.3 | 18.0 | 19.5 | 18.4 | 18.9 | 18.4 | 19.6 | 18.42 | 18.30 | 21.30 | 15.65 |
| N:S | 13.7 | 13.6 | 7.4 | 7.6 | 11.4 | 11.1 | 15.7 | 13.98 | 11.31 | 13.29 | 13.92 |

[†] Supplied per kilogram of diet (as-fed basis): vitamin A, 10,000 IU; vitamin D 3 , 2,000 IU; vitamin E, 20 mg; vitamin K 3 , 2 mg; thiamine, 2 mg; riboflavin, 5 mg; niacin, 20 mg; pantothenic acid, 10 mg; pyridoxine, 5 mg; biotin, 0.2 mg; folic acid, 1 mg; vitamin B 12 , 0.03 mg; choline chloride, 600 mg; ascorbic acid, 40 mg; Fe, 100 mg; Cu, 20 mg; Zn, 100 mg; Mn, 40 mg; I, 0.6 mg; Se, 0.3 mg; and Co, 1 mg.

[‡] Calculated values obtained from INRA-AFZ (2004) database.

Table 2
Daily average sulfur balance in growing pigs fed diets with different in total S contents

| | Diets - Experiment 1 | | | | | | Diets - Experiment 2 | | | | |
|--|----------------------|--------|--------|--------|--------|--------|----------------------|--------|--------|--------|--------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
| Protein ingested (g) | 282.9 | 354.0 | 383.5 | 362.4 | 356.9 | 346.4 | 346.5 | 273.0 | 346.5 | 346.5 | 346.5 |
| S-SAA [†] ingested (g) | 2.48 | 3.15 | 3.14 | 3.15 | 3.02 | 3.01 | 2.83 | 2.37 | 3.03 | 2.60 | 3.54 |
| S ingested (g) | 3.29 | 4.17 | 8.31 | 7.63 | 5.02 | 4.97 | 3.54 | 3.12 | 4.90 | 4.17 | 3.98 |
| S-SO ₄ ingested (g) | 0.26 | 0.37 | 1.35 | 1.18 | 0.50 | 0.48 | 0.34 | 0.37 | 0.72 | 0.59 | 0.32 |
| S urinary excreted (g) | 0.92 | 3.43 | 3.35 | 5.33 | 3.86 | 2.35 | 1.48 | 1.69 | 2.88 | 1.64 | 2.88 |
| | (0.29) | (0.65) | (0.59) | (0.71) | (0.74) | (0.29) | (0.73) | (0.74) | (0.68) | (0.68) | (0.60) |
| S faeces excreted (g) | 0.64 | 0.58 | 2.08 | 1.59 | 0.86 | 0.97 | 0.58 | 0.57 | 1.24 | 0.99 | 1.06 |
| | (0.10) | (0.11) | (0.24) | (0.15) | (0.09) | (0.09) | (0.06) | (0.10) | (0.08) | (0.13) | (0.11) |
| S excreted (g) | 1.55 | 4.00 | 5.43 | 6.93 | 4.72 | 3.32 | 2.06 | 2.26 | 4.12 | 2.63 | 3.95 |
| S retained (g) | 1.74 | 0.17 | 2.87 | 0.70 | 0.31 | 1.65 | 1.48 | 0.87 | 0.78 | 1.54 | 0.04 |
| S-SO ₄ ²⁻ urinary excreted (g) | 1.41 | 2.17 | 3.88 | 5.63 | 4.37 | 3.49 | 1.81 | 1.65 | 2.40 | 1.71 | 2.30 |
| | (0.55) | (0.64) | (0.68) | (0.68) | (0.60) | (0.36) | (0.89) | (0.72) | (1.16) | (0.71) | (0.41) |
| S-SO ₄ ²⁻ faeces excreted (g) | 0.25 | 0.86 | 0.68 | 0.60 | 0.72 | 0.50 | 0.24 | 0.39 | 0.59 | 0.31 | 0.71 |
| | (0.05) | (0.10) | (0.06) | (0.07) | (0.11) | (0.08) | (0.02) | (0.06) | (0.04) | (0.04) | (0.16) |
| S-SO ₄ ²⁻ excreted (g) | 1.66 | 3.03 | 4.56 | 6.23 | 5.09 | 3.99 | 2.05 | 2.03 | 2.99 | 2.02 | 3.01 |

(standard deviation in brackets)

[†] Calculated values obtained from INRA-AFZ (2004) database

Table 3

Correlation coefficients between the different criteria.

| | Protein ingested | S-SAA [†] ingested | S ingested | S-SO ₄ ²⁻ ingested | N:SAA | N:S | S urinary excreted | S faeces excreted | S excreted | S retained | S-SO ₄ ²⁻ urinary excreted | S-SO ₄ ²⁻ faeces excreted | S-SO ₄ ²⁻ excreted |
|--|------------------|-----------------------------|------------|--|-------|-------|--------------------|-------------------|------------|------------|--|---|--|
| Protein ingested | 1.00 | | | | | | | | | | | | |
| S-SAA [†] ingested | 0.75 | 1.00 | | | | | | | | | | | |
| S ingested | 0.71 | 0.47 | 1.00 | | | | | | | | | | |
| S-SO ₄ ²⁻ ingested | 0.61 | 0.30 | 0.96 | 1.00 | | | | | | | | | |
| N:S-SAA | 0.14 | -0.54 | 0.14 | 0.28 | 1.00 | | | | | | | | |
| N:S | -0.56 | -0.37 | -0.96 | -0.92 | -0.10 | 1.00 | | | | | | | |
| S urinary excreted | 0.65 | 0.67 | 0.74 | 0.63 | -0.22 | -0.73 | 1.00 | | | | | | |
| S faeces excreted | 0.64 | 0.47 | 0.93 | 0.94 | 0.09 | -0.89 | 0.57 | 1.00 | | | | | |
| S excreted | 0.71 | 0.68 | 0.87 | 0.79 | -0.15 | -0.85 | 0.97 | 0.75 | 1.00 | | | | |
| S retained | 0.07 | -0.33 | 0.36 | 0.43 | 0.57 | -0.32 | -0.35 | 0.43 | -0.15 | 1.00 | | | |
| S-SO ₄ ²⁻ urinary excreted | 0.61 | 0.50 | 0.83 | 0.71 | -0.03 | -0.85 | 0.88 | 0.64 | 0.89 | -0.03 | 1.00 | | |
| S-SO ₄ ²⁻ faeces excreted | 0.57 | 0.78 | 0.44 | 0.30 | -0.47 | -0.42 | 0.76 | 0.34 | 0.71 | -0.46 | 0.49 | 1.00 | |
| S-SO ₄ ²⁻ excreted | 0.64 | 0.57 | 0.83 | 0.69 | -0.09 | -0.84 | 0.92 | 0.64 | 0.92 | -0.09 | 0.99 | 0.59 | 1.00 |

Correlation whose absolute value is above 0.57 is different from 0 (P < 0.05)

[†] Calculated values obtained from INRA-AFZ (2004) database

Sulfate fate during storage of pig slurry

The sulfur balance in growing pigs showed that S excreted by pigs is mainly in the form of sulfate and that the amount excreted depends mainly on S intake.

The fate of the excreted sulfate in slurry during anaerobic storage was evaluated in batch series assays (figures 3.a, 3.b and 3.c). Results of the control experiment with only the addition of VFA are presented in figure 3.a. The initial sulfate content of the slurry was very low and remained under the threshold detection limit throughout the assay. VFA were consumed from the beginning of the experiment. The velocities calculated from the kinetics of apparent VFA consumption were 15, 18 and 23 $\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ for propionate, butyrate and acetate, respectively. These results are in good agreement with previously published results (Peu et al., 2004). In anaerobic storage conditions, propionate and butyrate are consumed by acetogenic micro-organisms to form acetate and hydrogen, which is subsequently consumed syntrophically by methanogens to form methane (Ferry, 1992). For acetate, the kinetic pattern is thus the sum of two phenomena, firstly acetate is consumed by methanogens and secondly acetate is produced by acetogenic micro-organisms from a variety of energy and carbon sources. Twenty-three days after the beginning of the experiment, the acetate balance showed that the major phenomenon occurring in the assays was acetate consumption by methanogens. The same trends were recorded in the control jar containing only raw pig slurry (data not shown). Sulfate content remained under the threshold detection limit and residual VFA were consumed and reached detection limit after 10 days (data not shown).

In presence of sulfate and in both experiments (figures 3.b, 3.c), consumption of acetate, propionate and butyrate was more efficient. After only 14 days of storage, propionate and butyrate concentrations reached the detection limit. Average velocity for acetate, propionate and butyrate was higher than in absence of sulfate: 41, 59 and 63 $\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$, respectively. In the 1 g S-SO₄²⁻ supplementation assay (figure 3.b), the sulfate concentration reached the detection limit within 17 days, while in the 2 g S-SO₄²⁻ supplementation assay, the concentration was still 460 mg S-SO₄²⁻.l⁻¹ after 45 days of storage. TDS appeared in the slurry at the same time in both assays and reached maximum values of 875 and 1501 mg S-TDS.l⁻¹, 17 and 23 days after sulfate addition, respectively. From these data, it was possible to determine a sulfate consumption velocity of 44 and 55 $\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ for the two assays, respectively. This sulfate consumption and accumulation of dissolved sulfide coupled with an increase in apparent VFA consumption suggests that dissimilatory sulfate reduction and sulfate reducing micro-organisms were involved in the process (Elferink et al., 1994). In a

recent study, Cook et al. (2008) quantified sulfate reducing bacteria using a molecular approach based on specific target genes. They detected sulfate reducers in pig slurry storage pits with target gene copies ranging from 7×10^3 up to 8×10^7 copies.ml⁻¹. This study revealed that sulfate reducing species involved in this environment are related to *Desulfobulbus sp.*, *Desulfovibrio sp.* and *Desulfobacterium sp.* *Desulfobulbus sp.* known to degrade propionate, butyrate and acetate at the oxic/anoxic interface where oxygen is limiting but nutrient sources are not.

The increased consumption velocity observed for acetate, propionate and butyrate also indicates that the sulfate reducers outcompeted both the obligated hydrogen producers, acetogens and methanogens (Bhattacharya et al., 1996; Uberoi and Bhattacharya, 1997).

In a recent experiment, Eriksen et al. (2010) studied the impact of dietary methionine supplementation on the emission of sulfur compounds during storage of reconstituted pig slurry. In the same way as in our study, sulfate was the main source of sulfur in pig excrement particularly with methionine enriched diets. Fresh pig slurries resulting from these experiments were used for a 112-day simulation of anaerobic storage. Similarly to the results presented here, dissimilatory sulfate reduction occurred and sulfides were produced in pig slurries from pig diets supplemented with methionine. However, unlike the results of our study, the kinetics of VFA was not affected (control vs. methionine enriched diet).

In our study, at the end of experiments, 49% of the added sulfate was recovered as TDS in the 1 g S-SO₄²⁻ assay and 19% in the 2 g S-SO₄²⁻ assay, and 19% residual sulfate content in the 2 g S-SO₄²⁻ assay. On average, S unbalance in the two supplementation assays accounted for more than 50% of the added sulfate, mainly imputable to gaseous transfer to the air as hydrogen sulfide gas but also to biological transformation in the slurry as proposed by Eriksen et al. (2010). These authors suggested the existence of a sulfur cycle during pig slurry storage and also that sulfate reduction into sulfide is not the only biological transformation. Sulfide could also be methylated to form methanethiol and further dimethyl-sulfide, which can then be demethylated to form *a novo* hydrogen sulfide.

Changes in the pH of slurry during the storage period were also recorded in our study (data not shown). In all jars with added sulfate, the initial pH (8.5) dropped significantly after 15 days of incubation to reach 8.1 but increased thereafter. This drop was significantly correlated with sulfide production and could be attributed to the presence of additional H⁺ ions associated with the dissociation of H₂S produced in slurry (Arogo et al., 2000). Without added sulfate, the pH was not significantly affected during the storage simulation.

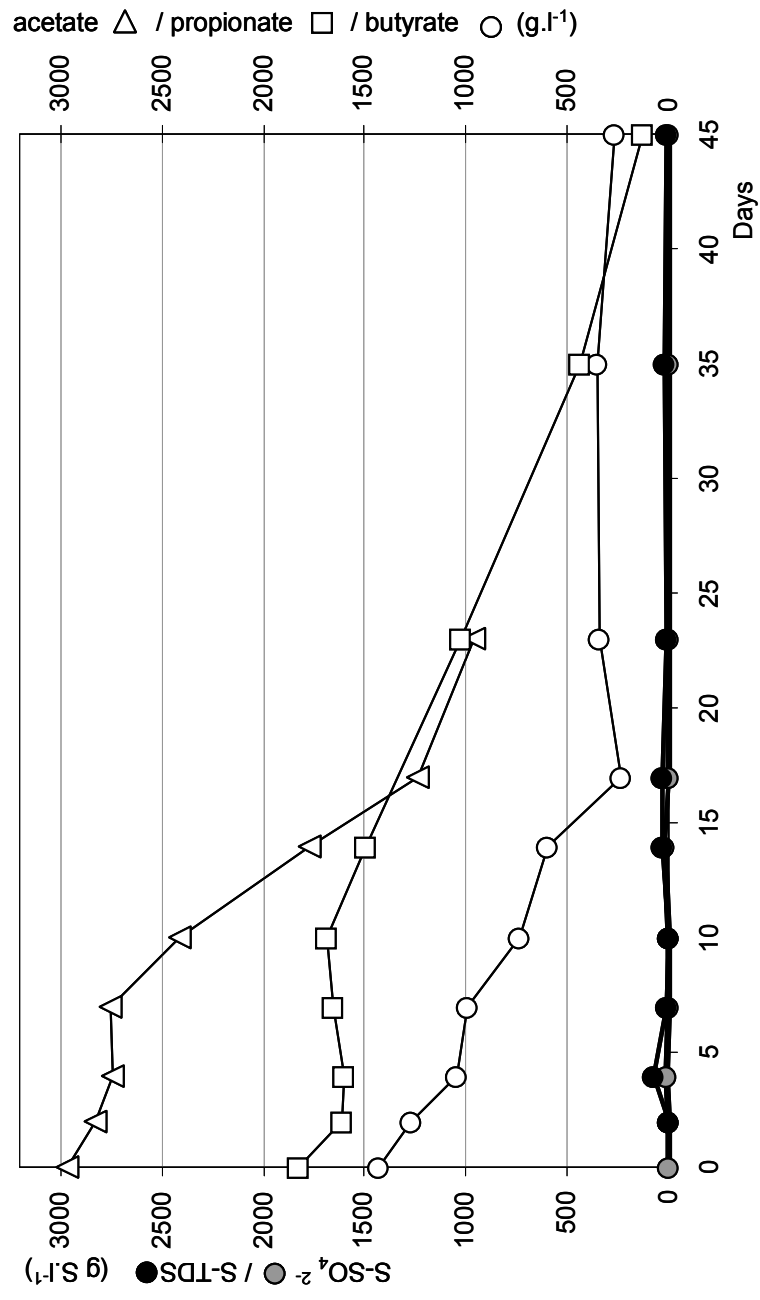


Figure 3a

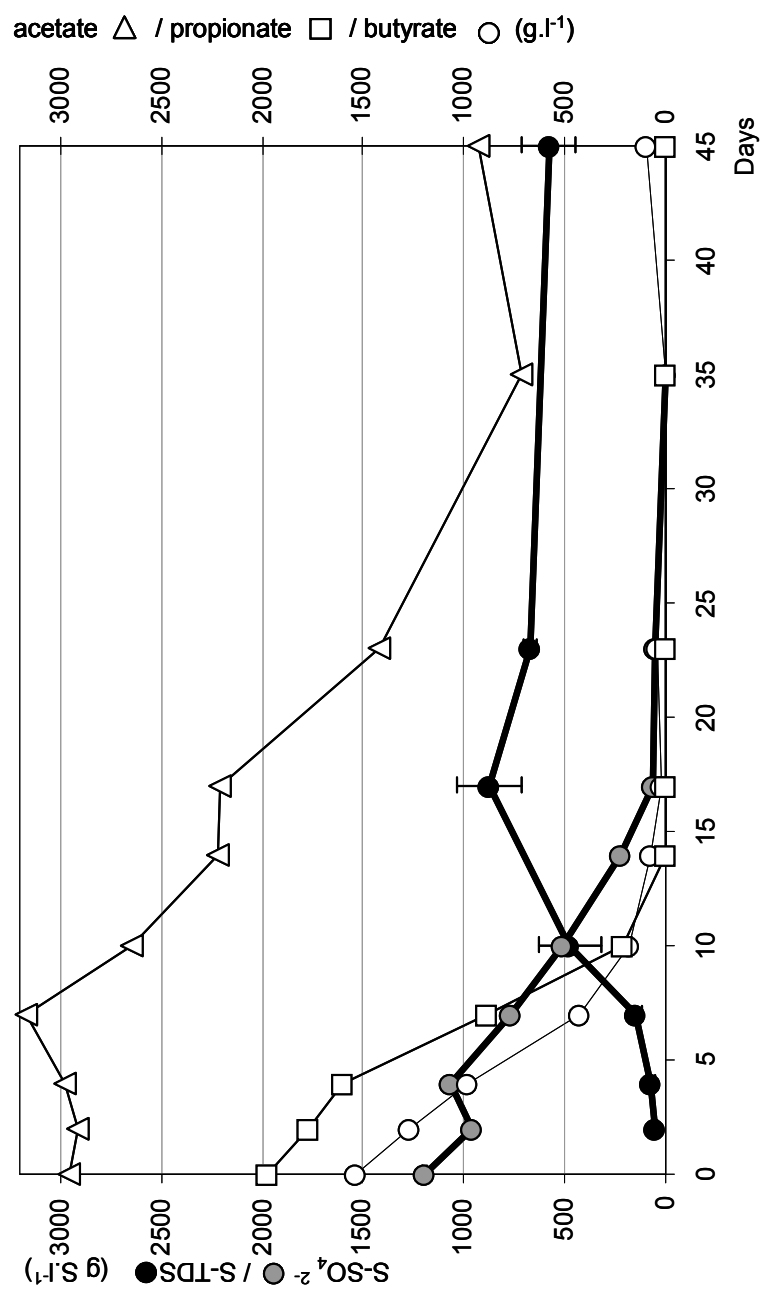


Figure 3b

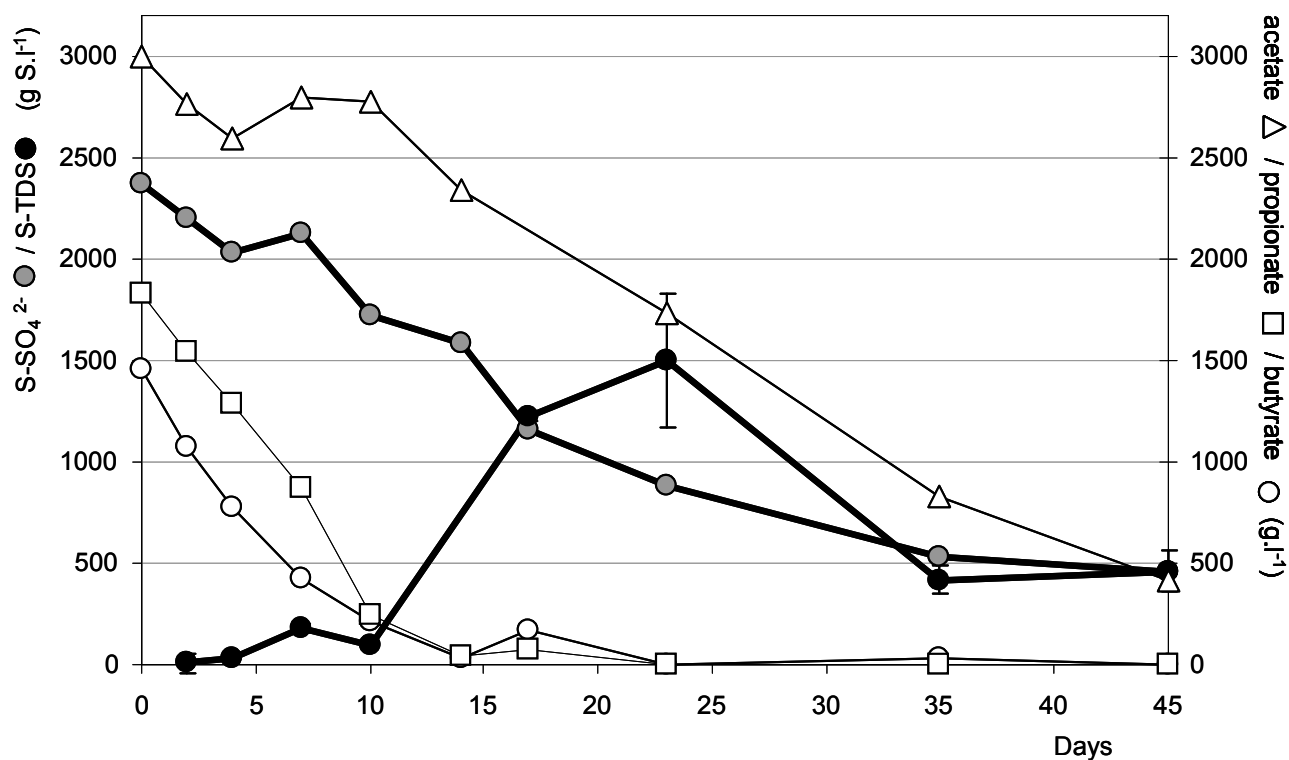


Figure 3c

Figures 3a, b, c.

Kinetics of sulfate consumption and total dissolved sulfide production during lab scale pig slurry storage experiment after sulphate (3.b; 3c) and VFA addition (3.a; 3.b; 3.c)

CONCLUSIONS AND TECHNICAL IMPLICATIONS

S content of feedstuffs influences total S content in pig diets. S in feedstuffs is mainly present as organic S in SAA and as inorganic sulfur mainly as S salts (not required by the animals). Feeding pigs with diets containing different types and amounts of S showed that apparent S digestibility is about 80 % of S intake. S is mainly excreted as sulfate in urine. Although dietary S in the control diets was reduced to the minimum level required to sustain normal pig growth, sulfate was still excreted in rather large amounts, suggesting that further reduction in S excretion may be difficult to achieve because SAA intake was already reduced to the minimum and the contribution of inorganic sulfur was already low. The simulation of anaerobic storage of pig slurry with high levels of sulfate led to the biological transformation of S into TDS within a few days. Depending on storage conditions, TDS may be transferred to the gas phase and thus contribute to odor emissions and present a risk of intoxication for both farmers and pigs. Our results indicate that maximum total S content could also be considered with the aim of reducing sulfide production during manure storage.

ACKNOWLEDGEMENTS

Thanks are due to Pierre Cozannet (PhD Student, INRA) and Nathalie Josselin-Le Bris (ECOBIO - U.M.R. 6553 CNRS, I.F.R CAREN, Université de Rennes I) for their help with animal experiments and analysis, respectively. We acknowledge the French Environment and Energy Management Agency (ADEME) for funding this work. Part of the material used in this experiment was obtained from a French cooperative programme on the nutritional value of wheat DDGS in pigs and poultry, involving INRA (UMR1079 SENA, UR83 Recherches Avicoles), Arvalis–Institut du Végétal, Ajinomoto Eurolysine S.A.S. and Adisseo France SAS. Their contribution is gratefully acknowledged.

REFERENCES

- APHA. 1998 Standards methods for the Examination of Water and Wastewater. 20th ed. American Public Health Assoc., Washington, DC.
- Arogo J., Zhang R.H., Riskowski G.L., Day D.L. 2000. Hydrogen sulfide production from stored liquid swine manure: A laboratory study. *Transactions of the Asae* 43:1241-1245.
- Bhattacharya S.K., Uberoi V., Dronamraju M.M. 1996. Interaction between acetate fed sulfate reducers and methanogens. *Water Research* 30:2239-2246.
- Bonnard N., Clavel T., Falcy M., Hesbert A., Jargot D., Reynier M., Schneider O. 2009. Sulfure d'hydrogène, in: INRS Ed., 7783-06-4. pp. 8.
- Braude R., Esnaola M.A. 1973. Methionine + cystine requirements of growing pigs. Performance, nitrogen retention and carcass composition of growing pigs given semi purified diets supplemented with graded levels of DL methionine. *BRIT.J.NUTR.* 30:437-445.
- Clanton C.J., Schmidt D.R. 2000. Sulfur compounds in gases emitted from stored manure. *Transactions of the Asae* 43:1229-1239.
- Clark O.G., Morin B., Zhang Y.C., Sauer W.C., Feddes J.J.R. 2005. Preliminary investigation of air bubbling and dietary sulfur reduction to mitigate hydrogen sulfide and odor from swine waste. *Journal of Environmental Quality* 34:2018-2023.
- Cook K.L., Whitehead T.R., Spence C., Cotta M.A. 2008. Evaluation of the sulfate-reducing bacterial population associated with stored swine slurry. *Anaerobe* 14:172-180.
- Cozannet P., Primot Y., Gady C., Metayer J.P., Lessire M., Skiba F., Noblet J. 2010. Energy value of wheat distillers grains with solubles for growing pigs and adult sows. *Journal of Animal Science* 88:2382-2392.
- Elferink S., Visser A., Pol L.W.H., Stams A.J.M. 1994. Sulfate Reduction in Methanogenic Bioreactors. *Fems Microbiology Reviews* 15:119-136.
- Eriksen J., Adamsen A.P.S., Norgaard J.V., Poulsen H.D., Jensen B.B., Petersen S.O. 2010. Emissions of Sulfur-Containing Odorants, Ammonia, and Methane from Pig Slurry: Effects of Dietary Methionine and Benzoic Acid. *Journal of Environmental Quality* 39:1097-1107.
- Ferry J.G. 1992. Methane from Acetate. *Journal of Bacteriology* 174:5489-5495.
- Heger J., Krizova L., Sustala M., Nitrayova S., Patras P., Hampel D. 2008. Individual response of growing pigs to sulfur amino acid intake. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 92:18-28.
- INRA-AFZ. 2004. Tables de composition et de valeur nutritive des matières premières destinées aux animaux d'élevage: porcs, volailles, bovins, ovins, caprins, lapins, chevaux, poissons, Paris, France.
- Jarret G., Martinez, J., Dourmad, J. Y. 2011. Effect of biofuel co-products in pig diets on the excretory patterns of N and C and on the subsequent ammonia and methane emissions from pig effluent. *Animal (in press)*.
- Jacobson L.D., Clanton C.J., Schmidt D.R., Radman C., Nicolai R.E., Janni K.A. 1997. Comparison of hydrogen sulfide and odor emissions from animal manure storages, in: *EurAgEng Ed., Ammonia and odors control from animal production facilities*, Winkeloord.
- Kerr B.J., Ziemer C.J., Weber T.E., Trabue S.L., Bearson B.L., Shurson G.C., Whitney M.H. 2008. Comparative sulfur analysis using thermal combustion or inductively coupled plasma methodology and mineral composition of common livestock feedstuffs. *Journal of Animal Science* 86:2377-2384.

- Le P.D., Aarnink A.J.A., Jongbloed A.W., Van Der Peet Schwing C.M.C., Ogink N.W.M., Versiegen M.W.A. 2007. Effects of crystalline amino acid supplementation to the diet on odor from pig manure. *Journal of Animal Science* 85:791-801.
- 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.
- Magee E.A., Curno R., Edmond L.M., Cummings J.H. 2004. Contribution of dietary protein and inorganic sulfur to urinary sulfate: Toward a biomarker of inorganic sulfur intake. *American Journal of Clinical Nutrition* 80:137-142.
- Ni J.Q., Heber A.J., Sutton A.L., Kelly D.T. 2009. Mechanisms of gas releases from swine wastes, *Transactions of the ASABE*. pp. 2013-2025.
- Nørgaard J.V., Fernández J.A., Eriksen J., Olsen O.H., Carlson D., Poulsen H.D. 2010. Urine acidification and mineral metabolism in growing pigs fed diets supplemented with dietary methionine and benzoic acid. *Livestock Science* 134:113-115.
- O'Neill D.H., Phillips V.R. 1992. A review of the control of odor nuisance from livestock buildings: Part 3, properties of the odorous substances which have been identified in livestock wastes or in the air around them. *Journal of Agricultural Engineering Research* 53:23-50.
- Oesterhelweg L., Puschel K. 2008. "Death may come on like a stroke of lightning ..." - Phenomenological and morphological aspects of fatalities caused by manure gas. *International Journal of Legal Medicine* 122:101-107.
- Peu P., Beline F., Martinez J. 2004. Volatile fatty acids analysis from pig slurry using high-performance liquid chromatography. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 84:1017-1022.
- Spoelstra S.F. 1980. Origin of Objectionable Odorous Components in Piggery Wastes and the Possibility of Applying Indicator Components for Studying Odor Development. *Agriculture and Environment* 5:241-260.
- Stams A.J.M., Plugge C.M., de Bok F.A.M., van Houten B., Lens P., Dijkman H., Weijma J. 2005. Metabolic interactions in methanogenic and sulfate-reducing bioreactors. *Water Science and Technology* 52:13-20.
- Tripathi M.K., Mishra A.S. 2007. Glucosinolates in animal nutrition: A review. *Animal Feed Science and Technology* 132:1-27.
- Uberoi V., Bhattacharya S.K. 1997. Sulfate-reducing bacteria in anaerobic propionate systems. *Journal of Environmental Engineering* 123:675-682.
- Ubuka T., Abe T., Kajikawa R., Morino K. 2001. Determination of hydrogen sulfide and acid-labile sulfur in animal tissues by gas chromatography and ion chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 757:31-37.

Chapitre 3 :
Réponse des communautés
sulfato-réductrices du lisier de
porcs à des ajouts de sulfate et
d'acides gras volatils

Chapitre 3 : Réponse des communautés sulfato-réductrices du lisier de porcs à des ajouts de sulfate et d'acides gras volatils.

Avant-propos :

Les travaux réalisés dans le chapitre 2 ont montré que les sulfates sont excrétés par les porcs via les urines et les fèces. Dans les bâtiments d'élevage équipés de pré-fosses ou de fosses profondes, les urines et les fèces se retrouvent mélangées pour former du lisier. Lorsque celui est fraîchement constitué, les teneurs en sulfates peuvent être très élevées selon le régime alimentaire appliqué aux animaux. Dans les conditions anaérobies de stockage, les sulfates sont consommés et transformés en sulfures, probablement par réduction dissimilatrice par des micro-organismes sulfato-réducteurs. Notre objectif était d'une part de quantifier et d'évaluer la diversité des micro-organismes sulfato-réducteurs et d'autre part d'étudier le comportement de ce groupe de bactéries dans un lisier additionné ou non de sulfates et d'acides gras volatils. En raison de la complexité des communautés microbiennes impliquées dans la sulfato-réduction, celles-ci ont été analysées par la recherche du gène (*dsrAB*), commun à l'ensemble de ces micro-organismes et codant pour une enzyme spécifique de leur métabolisme, la bi-sulfite réductase.

Les bactéries totales et les bactéries sulfato-réductrices ont été quantifiées au début de l'expérience et après 45 jours de stockage lors de la simulation réalisée dans le chapitre 2 pour étudier l'impact des sulfates et des acides gras volatils sur la production d'hydrogène sulfuré du lisier de porcs.

Parallèlement, des inventaires moléculaires ont été effectués par clonage et séquençage de l'ADN codant pour le gène *dsrAB* afin d'estimer la diversité de ces micro-organismes. La comparaison des séquences aux bases de données internationales a permis l'identification partielle des micro-organismes dominants. L'implication des différents micro-organismes a été mise en lien avec les voies métaboliques.

Pascal Peu^{1†}, Anne-Marie Pourcher¹, Patrick Dabert¹

¹*Cemagref, UR GERE. 17 avenue de Cucillé, CS 64427, F-35044 Rennes, France.*

Université Européenne de Bretagne, F-35000 Rennes, France.

Réponse des communautés sulfato-réductrices du lisier de porcs à des ajouts de sulfate et
d'acides gras volatils

† corresponding author

Mailing adress: *Cemagref, UR GERE. 17 avenue de Cucillé, CS 64427, F-35044 Rennes, France.*

Phone: 33 2 23 48 21 45

Fax: 33 2 23 48 21 15

e-mail: *pascal.peu@cemagref.fr*

RÉSUMÉ

L'évolution des pratiques d'élevage des porcs a paradoxalement contribué à la fois à l'amélioration des conditions de travail et à une exposition accrue aux risques d'exposition aiguë et chronique à l'hydrogène sulfuré. A l'heure actuelle ce risque est sous-estimé et non-contrôlé par la profession malgré les accidents mortels et les pathologies à long terme décrits dans la littérature. L'hydrogène sulfuré produit dans ces élevages est le résultat de l'activité anaérobie des micro-organismes sulfato-réducteurs qui dégradent la matière organique et minérale contenue dans les lisiers. Actuellement peu d'études ont été réalisées pour décrire cette communauté microbienne dans cet environnement. Le but de ce travail est donc d'étudier l'abondance ainsi que la diversité de ces micro-organismes lors de simulations de stockage de lisiers de porcs supplémentés ou non en sulfate et en acides gras volatils (AGV). Les résultats principaux de cette étude montrent que les bactéries sulfato-réductrices ont une abondance faible (10^6 à 10^8 bactéries /g de matière sèche) par rapport à l'ensemble des bactéries présentes dans le lisier de porcs (10^9 à 10^{10} bactéries /g de matière sèche). Malgré cette faible abondance, les sulfates ajoutés sont réduits par réduction dissimilatrice et cette réaction est couplée à la présence d'acides gras volatils. Pour l'ensemble des essais réalisés, la diversité des sulfato-réducteurs, analysée grâce au gène *dsrAb*, est faible. Trois grandes familles sont principalement présentes : les *Desulfobacteriaceae*, les *Desulfobulbaceae* et les *Desulfovibrionaceae*. Une grande partie des micro-organismes mis en évidence est génétiquement éloignée des bactéries cultivées à ce jour. Enfin, cette étude souligne la grande versatilité de la communauté qui s'adapte aux conditions que le milieu lui impose.

Mots clés : Bactéries sulfato-réductrices, lisier de porcs, dsrAB, stockage

INTRODUCTION

La gestion des effluents porcins et plus particulièrement du lisier de porcs (mélange des fèces, des urines et d'eaux de lavage) est à l'origine de différentes pollutions de l'air, de l'eau et du sol (Martinez and Le Bozec, 2000). Parmi les pollutions olfactives, certaines molécules du panache odorant sont préoccupantes car elles présentent des risques pour les personnes qui manipulent ces effluents agricoles. L'hydrogène sulfuré (H_2S) est un de ces composés. Outre le fait que ce gaz a une odeur très particulière « d'œuf pourri », il est à l'origine (i) d'intoxications aiguës qui peuvent être mortelles (Oesterhelweg and Puschel, 2008) et (ii) d'intoxications chroniques qui sont nocives à long terme (Eduard *et al.*, 2009).

Différentes études montrent que des émissions d'hydrogène sulfuré sont observées dans les unités d'élevage porcin, plus particulièrement dans les bâtiments où les déjections sont stockées sous les animaux et autour des fosses de stockage situées en extérieur (Donham *et al.*, 1988; Patni and Clarke, 1991). Ces émissions ont pour origine la dégradation anaérobie des matières organiques et minérales contenues dans les urines et les fèces des animaux (Mackie *et al.*, 1998). Dans cet environnement particulier, l'hydrogène sulfuré peut être produit par différentes voies : (i) la minéralisation des matières organiques soufrées telles que les protéines et acides aminés non digérés qui sont hydrolysés pour former des composés intermédiaires du type mercaptans (Landaud *et al.*, 2008) et de l' H_2S et (ii) la réduction des composés soufrés oxydés tels que le sulfate par une réaction biologique anaérobie, la sulfato-réduction (Elferink *et al.*, 1994; Tang *et al.*, 2009).

La sulfato-réduction semble privilégiée pour expliquer l'origine de la production d' H_2S dans les lisiers (Cook *et al.*, 2008). Cependant, elle suppose la présence de micro-organismes spécifiques, les sulfato-réducteurs, ainsi que de leur substrat, le sulfate. Malgré ce constat, les caractérisations physico-chimiques des lisiers de porcs trouvées dans la littérature ne mentionnent que très rarement la présence de composés soufrés oxydés, par contre, des formes réduites dissoutes sont souvent retrouvées telles que le sulfure (Snell-Castro *et al.*, 2005). Pour lever cette ambiguïté, des études récentes (Eriksen *et al.*, 2010; Peu *et al.*, 2011) ont recherché le devenir des éléments soufrés présents dans les rations alimentaires données aux porcs. Ces travaux mettent en évidence que 80% du soufre contenu dans les aliments passe la barrière intestinale des animaux. Une partie de ce soufre est retenue par les animaux tandis que l'excédent est excrété principalement sous la forme de sulfate dans les urines. En fonction de la formulation de l'aliment, le lisier frais obtenu par le mélange des fèces et des

urines peut contenir des concentrations en sulfate supérieures à $1\text{g S-SO}_4^{2-}\cdot\text{L}^{-1}$. Par ailleurs, la caractérisation des communautés microbiennes des matières fécales porcines, par des techniques culturales et moléculaires, met en évidence la présence de micro-organismes sulfato-réducteurs (Lin *et al.*, 1997; Ushida *et al.*, 2002) sans pour autant que ces derniers ne fassent partie de la flore dominante (Leser *et al.*, 2002). Les deux conditions nécessaires à la sulfato-réduction semblent donc réunies dans les lisiers frais.

A ce jour, les micro-organismes sulfato-réducteurs ont principalement été étudiés dans les environnements anoxiques ou anaérobies tels que les milieux marins (Leloup *et al.*, 2009), les installations de traitement des effluents (Lens *et al.*, 1995) et le tube digestif humain (Macfarlane *et al.*, 1992). Ils utilisent pour leur métabolisme le sulfate comme accepteur final d'électrons en couplage avec l'oxydation de composés organiques tels que les acides gras volatils (Elferink *et al.*, 1994). Peu d'études se sont focalisées sur les communautés sulfato-réductrices présentes dans les effluents agricoles tels que le lisier de porcs, que ce soit par des techniques culturales (Kosińska and Miśkiewicz, 1997) ou moléculaires (Spence *et al.*, 2008). L'étude de ces communautés est complexe, même si elles sont étudiées depuis longtemps (Postgate, 1963). D'un point de vue taxonomique, les micro-organismes sulfato-réducteurs constituent un groupe particulier fondé sur des caractéristiques phénotypiques et non sur une filiation génétique. Il en résulte que ces micro-organismes sont très dispersés dans l'arbre phylogénétique bactérien et archaea. Ils sont retrouvés dans divers phyla tels que les *Proteobacteria*, les *Firmicutes*, les *Thermodesulfobacteria*, les *Nitrospira* et les *Euryarchaeota* (Leloup, 2004). Pour étudier l'ensemble de la diversité de ces micro-organismes, des outils moléculaires doivent être employés qui ciblent : soit les gènes codant pour les ARNr microbiens, soit le gène codant pour la bi-sulfite réductase (gène *dsrAB*), une enzyme spécifique du métabolisme des sulfato-réducteurs (Wagner *et al.*, 1998).

Les objectifs de cette étude sont d'évaluer l'abondance et la diversité des micro-organismes sulfato-réducteurs présents dans les lisiers de porcs et d'étudier leur évolution lors du stockage anaérobie avec ou sans ajout de sulfate et/ou d'acides gras volatils afin de mieux comprendre les voies métaboliques qui sont engagées dans les réactions.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Methodologie

Les expérimentations de stockage ont été réalisées à partir d'un lisier brut, prélevé dans une fosse de stockage sur une unité d'élevage porcin naisseur-engraisseur où l'ensemble des lisiers produits par l'exploitation sont mélangés (Côte d'Armor, France). Après homogénéisation ce lisier a été réparti dans 3 pots de 2 L pour simuler des conditions de stockage en fosse. Le premier pot n'a subi aucun ajout et constitue le lisier témoin (lisier T). Les deux autres pots correspondent aux deux essais réalisés (lisiers S et SF) pour étudier le devenir des sulfates par ajouts de sulfate de sodium (Na_2SO_4) à une concentration finale proche de $1 \text{ g de S-SO}_4^{2-} \cdot \text{L}^{-1}$. Le lisier SF, a reçu aussi de l'acétate, du propionate et du butyrate pour atteindre les concentrations finales de 3, 1,5 et 2 gL^{-1} , respectivement. Les trois lisiers (T, S et SF) ont été incubés dans un bain marie à $20 \text{ }^\circ\text{C}$ pendant 45 jours. Les pots sont restés ouverts durant toute la durée de l'expérimentation pour permettre aux gaz de s'échapper. Pour l'ensemble de ces expérimentations, les lisiers ont été échantillonnés au début de l'essai et après 45 jours de stockage.

Caractérisation physico-chimique des lisiers

Les caractérisations physico-chimiques ont été réalisées sur les lisiers T, S et SF avant et après incubation. La détermination des matières sèches, des matières organiques et de l'azote total Kjeldahl des lisiers a été réalisée selon les méthodes publiées par l'(APHA, 1998)

Détermination des sulfates

Les lisiers (15 ml) ont été centrifugés (20 min, 12 000g). Le surnageant a été filtré à $0,45 \mu\text{m}$ sur filtre de cellulose et dilué au $25^{\text{ème}}$. Les sulfates ont été caractérisés par chromatographie ionique (DX 120, Dionex USA).

Détermination des acides gras volatils (AGV)

La détection et la quantification des AGV ont été réalisées par chromatographie liquide à haute performance (UltiMate 3000, Dionex USA) sur le surnageant des lisiers obtenu après centrifugation (20 min, 12 000g) selon *Peu et al.* (2004). La détermination chromatographique a été réalisée en diluant 10 fois le surnageant dans le l'eau milliQ. Cette méthode permet d'identifier et de quantifier six AGV : acides acétique, propionique, butyrique, isobutyrique, valérique et isovalérique.

Analyses des communautés sulfato-réductrices et bactériennes

L'analyse quantitative ainsi que l'analyse de la diversité des communautés microbiennes ont été réalisées sur le lisier témoin utilisé au début de l'expérimentation (lisier Ti) ainsi que sur les lisiers après 45 jours de stockage (lisiers Tf, SF et S)

Extraction des acides nucléiques

Les acides nucléiques totaux ont été extraits à partir de 1 g d'échantillon de lisier (poids humide) à l'aide du kit QIAamp DNA Stool Mini (Quiagen, Hilden, Allemagne). En suivant le protocole du fournisseur. La concentration et la pureté des ADN extraits ont été déterminées par spectrophotométrie en calculant l'absorbance à 260 nm et le ratio A_{260}/A_{280} (NanoDrop ND-1000, Thermo Scientific USA).

*Quantification des ADNr 16S et du gène *dsrAB**

Les bactéries totales ont été quantifiées par PCR en temps réel (PCRq) avec la technique SyberGreen en ciblant la région V3 de l'ADNr 16S. Le protocole est inspiré de celui décrit par Delbes et al. (2001). Les amorces utilisées sont : sens 5'-ACGGTCCAGACTCCTACGGG-3' et anti-sens 5'-TTACCGCGGCTGCTGGCAC-3' à la concentration finale de 400 nM. Les amplifications sont réalisées sur un thermocycleur Chromo4 (BioRad) dans des tubes de 200 μ L avec 12,5 μ L de mélange réactionnel iQ SyberGreen supermix (Biorad, USA), 5,5 μ L d'eau ppi et 2 μ L d'ADN d'échantillon (dilué au 10^{ème}) ou d'étalon. Le déroulement des cycles PCR est le suivant : 10 min à 94°C, puis 40 cycles de 30 sec à 94°C, 30 sec à 61°C, 30 sec à 72°C et lecture de la fluorescence.

Pour la quantification du gène *dsrA*, la même technique a été employée avec le jeu d'amorces décrit par Wagner et al. (1998) : DSR1F sens 5'-ACSCACTGGAAGCACG-3' et DSR4R anti-sens 5'-GTGTAGCAGTTACCGCA-3' à une concentration finale de 200 nM. Les amplifications ont été réalisées dans des tubes de 200 μ L avec 12,5 μ L de mélange réactionnel iQ SyberGreen supermix (Biorad, USA), 5,5 μ L d'eau ppi et 2 μ L d'ADN d'échantillon (dilué au 10^{ème}) ou d'étalon. Les cycles d'amplification sont : 20 sec à 95°C, puis 40 cycles de 15 sec à 94°C, 20 sec à 54°C et 2 min à 72°C et lecture de la fluorescence.

La quantification a été obtenue par mesure de la fluorescence à chaque cycle d'amplification et comparaison avec une gamme étalon. Chaque mesure a été réalisée en triplicata.

Construction des gammes étalon

Les gammes étalon de PCRq pour les couples d'amorces ciblant les gènes ARNr 16S et *dsrA* (numéro d'accension AY167478) ont été obtenues à partir de plasmides linéaires ayant comme insert chacun des gènes. Les plasmides ont été extraits à partir de souches de collection du laboratoire avec le kit «Wizard Plus SV Minipreps DNA purification System (Promega, USA). Les plasmides extraits ont ensuite été linéarisés par l'enzyme de restriction *Hind* III (Promega, USA) suivant les recommandations du fournisseur. Enfin, la concentration en ADN des plasmides linéarisés a été analysée sur gel d'électrophorèse à 1,5% et par spectrophotométrie à 260 nm afin de déterminer le nombre de copie du plasmide (μL^{-1}). Une gamme d'étalonnage a été réalisée par dilution successive. Pour chaque gamme étalon, des dilutions contenant de 10^1 à 10^{10} copies de gènes par μL ont été testées en triplicata. L'évaluation des performances de ces réactions a été déterminée grâce à l'efficacité, le coefficient de corrélation et la gamme de linéarité de la gamme étalon (tableau 1). Les coefficients de variation lors d'une même amplification étaient proches de 20% et de 5% pour l'ADNr 16S et le gène *dsrAB* respectivement.

Tableau 1

Equation reliant le cycle seuil (Ct) et le logarithme des concentrations des standards

| Cible | Equation | R^2 | Efficacité (%)* | Gamme linéaire |
|--------------|------------------|-------|-----------------|----------------|
| ADNr 16S | $y=-3,157+42,4$ | 0.99 | 107 | 10^2-10^8 |
| <i>dsrAB</i> | $y=-3,071x+35,9$ | 0.99 | 111 | 10^3-10^8 |

* efficacité = $(10^{(-1/\text{pente})}-1) \times 100$

Construction des banques de clones

Pour réaliser les banques de clones, les gènes *dsrAB* ont été amplifiés en suivant le protocole décrit ci-dessus avec le même jeu d'amorces à la même concentration mais avec le mélange réactionnel suivant dans un tube de 200 μL : 2,5 μL de tampon *RedTaq* (10x), 2 μL de dNTP (2,5 mM), 0,5 μL de *RedTaq* polymérase (500 mM), 1 μL de chaque amorce DSR1F/DSR4F (5 μM), 1 μL d'ADN dilué au $10^{\text{ème}}$ de chaque échantillon. Les amplifications ont été réalisées sur un thermocycleur MJ mini (BioRad, Hercules, USA) avec les cycles suivants : une étape de dénaturation initiale de 20 sec à 95°C, suivi de 30 cycles de 15 sec à 94°C, 20 sec à 54°C, 1 min 30 sec à 72°C et d'une étape d'élongation finale de 10 min à 72°C. La qualité des produits de PCR a été visualisée sur gel d'électrophorèse à 1,5% afin de vérifier la présence d'une bande de 1,9 kb.

Les amplicons obtenus pour les ADN des 4 lisiers testés ont été insérés dans le vecteur pSC-A du kit de clonage StrataClone PCR Cloning Kit (Stratagene). Ce vecteur a été ensuite utilisé pour transformer des *Escherichia coli* compétentes (Strataclone SoloPack, Stratagene) qui ont été sélectionnées sur milieu LB-Agar contenant de l'ampicilline et du X-Gal. La taille des fragments d'ADN portés par les plasmides recombinants a été vérifiée par PCR avec les amorces T7 sens 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' et P13 antisens 5'-GACCATGATTACGCCAA-3'. L'ensemble de ces réactions a été réalisé selon les instructions du fabricant (Statagene, USA).

Analyse comparative des séquences du gène dsrAB

Les séquences totales du gène *dsrAB* (1,9 kb) de 380 souches de référence provenant de la banque de données GenBank (Benson *et al.*, 2003) ont été utilisées pour construire une matrice de distance génétique. Après importation dans la base de données ARB (Ludwig *et al.*, 2004), les séquences nucléotidiques ont été alignées de façon automatique avec ClustalW et vérifiées manuellement avec l'éditeur de ARB. Ensuite, un arbre phylogénétique a été construit en utilisant les méthodes du « neighbour joining » et du « maximum de parcimonie ». La robustesse de l'arbre consensus obtenu a été déterminée par la méthode du « bootstrap » en réitérant les calculs (1000 fois).

Pour chacune des 4 banques de clones construites précédemment, une quarantaine de clones en moyenne a été séquencée et déposée dans la base de données GenBank sous les numéros d'accès suivants : XXXX. Les séquences obtenues ont ensuite été ajoutées dans la matrice de distance construite précédemment en utilisant ARB treeing tool-Parsimony_Interactive qui permet d'intégrer des séquences partielles dans un arbre phylogénétique en modifiant le moins possible sa topologie globale.

Analyses statistiques

Les courbes de raréfaction des banques de clones ont été réalisées grâce au logiciel aRarefactwin (<http://www.uga.edu/strata/software/index.html>) et les indices de couverture ont été déterminés par la formule suivante $I_c = [1 - (n/N) * 100]$ avec n le nombre de phylotypes représentés par une séquence unique et N le nombre total de séquences analysées (Leloup *et al.*, 2009).

RÉSULTATS

Caractéristiques physico-chimiques des lisiers

L'analyse des paramètres physico-chimiques du lisier brut prélevé en fosse de stockage (lisier T initial) montre qu'il contient 49,3 g.L⁻¹ de matières sèches, 36,0 g.L⁻¹ de matières organiques, 3,9 g.L⁻¹ d'azote total Kjeldahl, 1776 mg.L⁻¹ d'acides gras volatils, et a un pH de 8,5. Ce lisier ne contient pas de sulfates (en dessous du seuil de détection). Cette composition est en accord avec les données de la littérature (Snell-Castro *et al.*, 2005).

Pour étudier le devenir des sulfates en condition de stockage des lisiers, des ajouts de sulfates (lisiers S et SF) ont été réalisés afin de se rapprocher des valeurs d'un lisier frais (1 gS-SO₄²⁻) (Eriksen *et al.*, 2010; Peu *et al.*, 2011). Des ajouts d'acétate, de propionate et de butyrate ont aussi été réalisés en suivant le même objectif mais seulement dans le lisier SF (Peu *et al.*, 2004; Williams and Evans, 1981) (tableau 2). Après 45 jours de stockage anaérobie, les AGV et les sulfates ont été mesurés pour les trois lisiers et sont présentés dans le tableau 2.

Pour le lisier témoin sans sulfates (lisier T), les 45 jours de stockage conduisent à une consommation partielle des AGV avec 24 % d'AGV résiduels présents dans le lisier en fin d'incubation. Les sulfates restent en dessous du seuil de détection. Pour les lisiers S et SF, le comportement des sulfates ajoutés est différent en fonction de la quantité d'AGV initialement présente. En l'absence d'AGV ajoutés, 56 % des sulfates initialement présents sont toujours présents à la fin de l'expérimentation ainsi que des traces d'acétate (lisier S). Pour le lisier SF, après 45 jours de stockage, les concentrations en sulfates sont en dessous du seuil de détection, de l'acétate et du propionate sont mesurés à une concentration proche de 1 g.L⁻¹ et de traces respectivement.

Pour les lisiers S et SF, en fin de stockage, le produit de la réduction dissimilatrice des sulfates, le sulfure est retrouvé à une concentration proche de 500 mg S²⁻.L⁻¹.

Tableau 2
Caractéristiques chimiques des lisiers testés

| | STD (mg S ²⁻ .L ⁻¹)* | | SO ₄ ²⁻ (mg.L ⁻¹) | | AGV (mg.L ⁻¹) <i>acétate</i> <i>propionate</i> <i>butyrate</i> | |
|------------------|---|--------------|---|--------------|---|-------------------------------------|
| | <i>initial</i> | <i>final</i> | <i>initial</i> | <i>final</i> | <i>initial</i> | <i>final</i> |
| Lisier T | <i>nd</i> | <i>nd</i> | <i>nd</i> | <i>nd</i> | 1220 450 140 | 290 140 <i>nd</i> |
| Lisier S | <i>nd</i> | 470 | 1210 | 680 | 1180 430 140 | 50 <i>nd</i> <i>nd</i> |
| Lisier SF | <i>nd</i> | 580 | 1190 | <i>Nd</i> | 2960 1540 1970 | 930 90 <i>nd</i> |

nd : non détecté

* STD : Sulfure Total Dissous d'après Peu et al. (2011)

Quantification des communautés bactériennes et sulfato-réductrices

Les micro-organismes sulfato-réducteurs (BSR) et l'ensemble des bactéries (BT) ont été quantifiés au début et à la fin des simulations de stockage de lisier (tableau 3). L'abondance des micro-organismes a été déterminée par PCRq, en admettant que le nombre moyen de copies de gène par cellule codant pour l'ARNr 16S était de 3,6 (Klappenbach *et al.*, 2001) et de 1 pour le gène *dsrA* (Klein *et al.*, 2001). La quantification des BT du lisier au début de l'essai était en moyenne de $1,7 \cdot 10^9$ cellules.gMS⁻¹ tandis que le nombre moyen de BSR était de $4,5 \cdot 10^6$ cellules.gMS⁻¹. Les BSR représentaient donc 0,26 % de la communauté totale des bactéries. Après les 45 jours de stockage, le nombre de BT et de BSR évolue. Une augmentation significative d'un facteur compris entre 4 et 10 est mesuré pour les BT et d'un facteur compris entre 5 et 33 pour les BSR. L'accroissement des deux communautés a été le plus fort pour le lisier SF. De fait, les ratios BSR/BT évoluent avec un maximum retrouvé pour le lisier S (1,72%). L'ensemble de ces dénombrements moléculaires est exprimé en matière sèche car celle-ci a évolué au cours de l'expérimentation de stockage partant de 4,6 % pour s'établir à 7,7% en moyenne à la fin.

Tableau 3
Caractéristiques microbiologiques des lisiers testés

| | BT** (a) (cellules.gMS⁻¹) | BSR* (b) (cellules.gMS⁻¹) | Ratio (b)/(a) (%) |
|------------------|---|---|------------------------------|
| Lisier Ti | 1,72.10 ⁹ (8,2.10 ⁷) | 4,5.10 ⁶ (7,8.10 ⁵) | 0,26 |
| Lisier Tf | 6,8.10 ⁹ (7,8.10 ⁸) | 2,4.10 ⁷ (5,1.10 ⁶) | 0,36 |
| Lisier S | 1,8.10 ¹⁰ (2,4.10 ⁸) | 1,5.10 ⁸ (3,5.10 ⁷) | 0,86 |
| Lisier SF | 4,7.10 ⁹ (2,2.10 ⁸) | 8,1.10 ⁷ (2,0.10 ⁷) | 1,72 |

*BSR : estimation du nombre de bactéries sulfato-réductrices par le nombre de copies de gène *dsrAB* (1 copie par cellule, (Klein *et al.*, 2001))

** Bactéries totales : estimation du nombre de bactéries total par le nombre de copies de gène codant pour l'ARNr 16S (3,6 copies par cellule, (Klappenbach *et al.*, 2001))
(Les données entre parenthèses indiquent l'écart-type de la mesure)

Analyse des banques de clones

Pour évaluer la diversité des micro-organismes sulfato-réducteurs ainsi que leur évolution, les gènes *dsrA* du lisier T aux temps initial (Ti) et final (Tf) et des lisiers S et SF au temps final ont été clonés et séquencés. Sur l'ensemble des 4 lisiers analysés, 37, 26, 29 et 35 clones provenant respectivement des lisiers Ti, Tf, SF et S ont été retenus pour l'analyse phylogénétique. En moyenne, pour chaque séquence, 800 pb étaient directement exploitables. L'arbre phylogénétique ainsi construit est présenté sur la figure 1. Lorsque la similarité des séquences est supérieure à 90 %, elles sont regroupées dans un même phylotype («Operational Taxonomic Unit») (Cook *et al.*, 2008). Pour l'ensemble des lisiers étudiés 8 phylotypes ont ainsi été créés : DSR-1 à DSR-8 (figure 1).

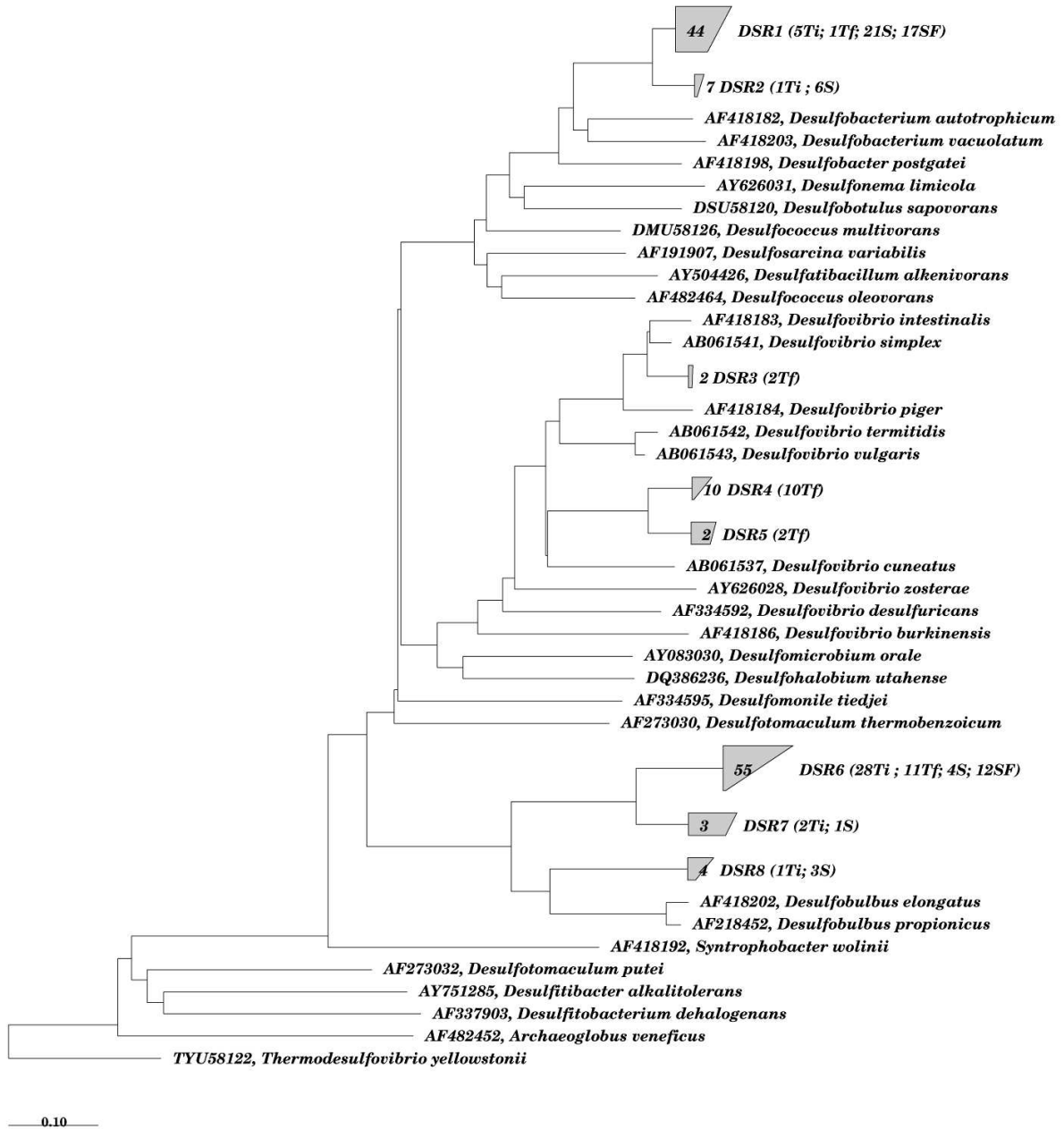


Figure 1

Arbre phylogénétique des micro-organismes sulfato-réducteurs obtenu avec les méthodes d'analyse du logiciel ARB (Ludwig *et al.*, 2004). Les séquences du gène *dsrA* des souches de références accompagnées de leur numéro d'accès ont été obtenues à partir de la base de données GenBank. Les séquences réalisées dans cette étude constituent les phylotypes DSR. Pour chaque phylotype, les données entre parenthèses indiquent le nombre de séquences obtenues à partir des lisiers Ti : lisier témoin initial, Tf : lisier témoin final, S : lisier avec ajout de sulfate seul et SF : lisier avec ajouts de sulfate et d'AGV. (La barre d'échelle indique le pourcentage de substitution nucléotidique).

Les phylotypes DSR-1 et DSR-2 sont placés dans l'embranchement de l'arbre correspondant à la famille des *Desulfobacteriaceae* et ne sont proches d'aucune espèce cultivée. Le micro-organisme cultivé le plus proche est *Desulfobacterium autotrophicum* avec

une homologie de 86 %. Les phylotypes DSR-3, DSR-4 et DSR-5 sont placés dans l'embranchement correspondant à la famille des *Desulfovibrionaceae*. Ces trois phylotypes ne sont observés que dans le lisier témoin après incubation (Tf). Le phylotype DSR-3 est très proche de l'espèce *Desulfovibrio intestinalis* (93,5 % d'homologie), tandis que les phylotypes DSR-4 et DSR-5 ne sont proches d'aucun micro-organisme cultivé. L'espèce la plus proche de ces deux phylotypes est un *Desulfovibrio cuneatus* avec une homologie de 80 %. Les phylotypes DSR-6, DSR-7 et DSR-8 sont placés dans l'embranchement de l'arbre correspondant à la famille des *Desulfobulbaceae*, ces phylotypes ne sont proches d'aucun micro-organisme cultivé. Dans l'arbre phylogénétique, les deux espèces les plus proches sont *Desulfovibrio propionicus* et *Desulfovibrio elongatus* avec une homologie inférieure à 80 %. Les phylotypes DSR-1 des *Desulfobacteriaceae* et DSR-6 des *Desulfobulbaceae* sont largement dominants pour les 127 séquences analysées puisqu'ils regroupent respectivement 35 et 43 % des séquences.

Le tableau 4 et la figure 2 présentent la distribution des phylotypes observés dans les différents lisiers.

Tableau 4
Phylotypes et nombre de séquences BSR obtenus pour chacun des lisiers étudiés.

| | <i>Phylotypes</i> | <i>Nombre de séquences</i> | <i>% de séquences</i> | <i>Indice de couverture (%)</i> |
|------------------|-------------------|----------------------------|-----------------------|---------------------------------|
| Lisier Ti | DSR1 | 5 | 13,5 | 94,5 |
| | DSR2 | 1 | 2,7 | |
| | DSR6 | 28 | 75,7 | |
| | DSR7 | 2 | 5,4 | |
| | DSR8 | 1 | 2,7 | |
| Lisier Tf | DSR1 | 1 | 3,8 | 96,1 |
| | DSR3 | 2 | 7,7 | |
| | DSR4 | 10 | 38,5 | |
| | DSR5 | 2 | 7,7 | |
| | DSR6 | 11 | 42,3 | |
| Lisier S | DSR1 | 21 | 60,0 | 97,1 |
| | DSR2 | 6 | 17,1 | |
| | DSR6 | 4 | 11,4 | |
| | DSR7 | 1 | 2,9 | |
| | DSR8 | 3 | 8,6 | |
| Lisier SF | DSR1 | 17 | 58,6 | 100 |
| | DSR6 | 12 | 41,4 | |

Le lisier Ti utilisé au début des expérimentations contient 5 phylotypes sur les 8 retrouvés pour l'ensemble des échantillons. Seuls les phylotypes appartenant à la famille des

Desulfovibrionaceae ne sont pas observés. Le phylotype DSR-6, appartenant à la famille des *Desulfobulbaceae*, est le plus représenté (75 % des séquences). Après 45 jours de stockage (lisier Tf), la communauté sulfato-réductrice de ce lisier a évolué puisque 3 phylotypes nouveaux sont apparus (DSR-3, DSR-4 et DSR-5) tandis 3 autres ne sont plus détectés (DSR-2, DSR-7 et DSR-8). Les phylotypes apparus sont de la famille des *Desulfovibrionaceae* avec DSR-4 qui représente 38% des séquences de l'inventaire pour cette famille. Seuls les phylotypes DSR-1 et DSR-6 initialement présents dans le lisier Ti sont retrouvés dans le lisier Tf.

Pour le lisier supplémenté en sulfates seulement (Lisier S), la richesse en phylotypes est équivalente à celle du lisier d'origine puisque les mêmes phylotypes sont observés. Cependant, le phylotype DSR-1 est beaucoup plus représenté puisqu'il totalise 60 % des séquences analysées. Pour le lisier SF, supplémenté en sulfates et AGV, la richesse du lisier est fortement réduite puisque seulement deux phylotypes dominent l'ensemble de la communauté : DSR-1 et DSR-6 avec 59 et 41 % des séquences respectivement.

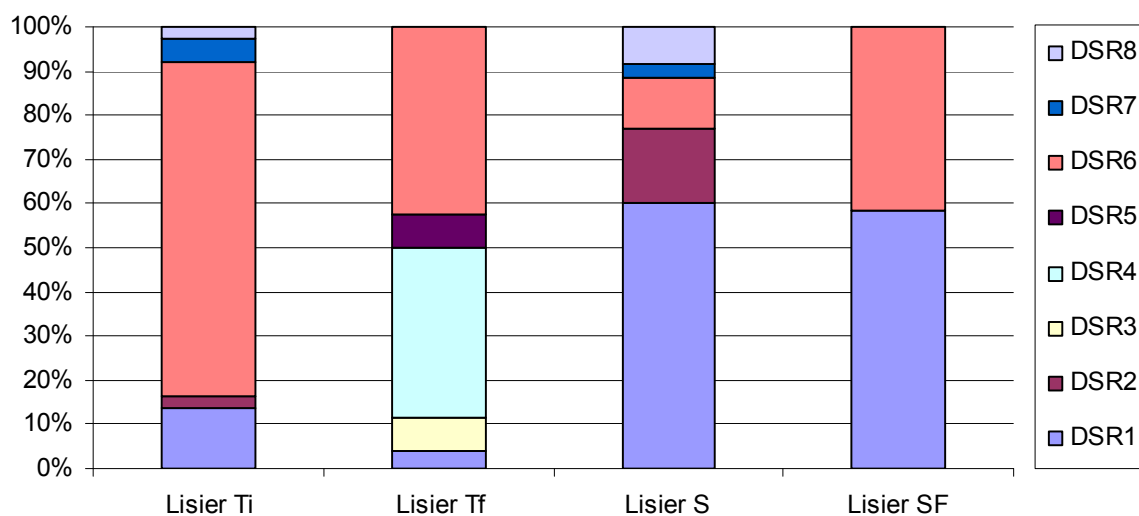


Figure 2
Distribution des phylotypes BSR observés dans les différents lisiers en % du total.

Grace à ces données, l'indices de couverture (Bik *et al.*, 2006) de la diversité des bactéries sulfato-réductrices de chacune des banques de clones a pu être déterminé. En complément, l'évaluation statistique de chacune des banques de clones a été effectuée par une analyse de la raréfaction (Singleton *et al.*, 2001) (figure 3).

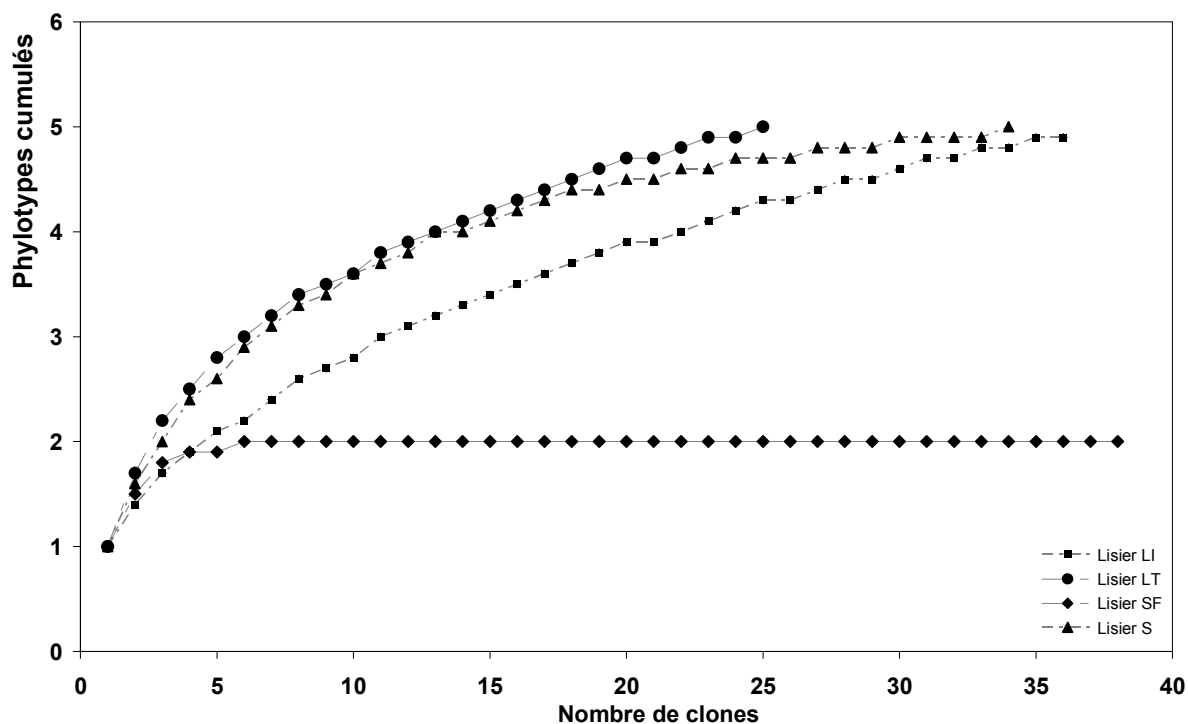


Figure 3

Analyse de la raréfaction des banques de clones obtenues avec les 4 lisiers, réalisée grâce au logiciel aRarefactwin 1.3.

Cette analyse montre que pour le lisier SF, le nombre de clones séquencés est très supérieur au nombre requis par rapport à la faible diversité contenue dans l'échantillon. En revanche, pour les lisiers Ti et Tf, un nombre de clones supérieur aurait été souhaitable. Cependant, les indices de couverture de la diversité sont compris entre 94,5 et 100 %, reflétant un bon taux de couverture de la diversité par les inventaires moléculaires réalisés pour chacun des lisiers.

DISCUSSION

L'évolution des caractéristiques physico-chimiques du lisier entre le début et la fin des expérimentations de stockage révèle un comportement différent pour les 3 essais. Pour l'ensemble des expérimentations, le stockage a été réalisé en condition anaérobie équivalentes, les seules différences étant la quantité de sulfates et/ou d'AGV ajoutés. Pour le lisier témoin sans ajout (lisier T), les AGV diminuent sur la période de stockage. Cette diminution est le résultat de la dégradation en condition anaérobie des substrats simples comme les AGV pour former du méthane. Ce processus de digestion anaérobie a déjà été mis en évidence par Martinez *et al.* (2003) pour des lisiers de porc stockés. Il consiste en une

cascade de réactions biologiques où les intermédiaires métaboliques tels que l'acétate, le propionate et le butyrate sont à la fois produits et consommés (Garcia *et al.*, 2000). La présence de ces intermédiaires métaboliques dans le lisier témoin initial reflète le dysfonctionnement de la chaîne de dégradation au profit des réactions en amont (hydrolyse, acidogénèse et acétogénèse) par rapport à celles se situant en aval (acétogénèse et méthanogénèse). A la fin de la simulation de stockage, la présence d'acétate résiduel confirme ce déséquilibre entre les acétogènes et les méthanogènes respectivement (Ferry, 1993).

Pour les deux lisiers supplémentés en sulfate (lisiers S et SF), le comportement des AGV est différent, ils sont consommés plus rapidement. Cette disparition s'accompagne de la disparition des sulfates et de l'apparition de sulfures totaux dissous (les résultats sont présentés dans le chapitre 2). Pour ces deux essais, les sulfures dissous qui n'étaient pas quantifiables au début des expérimentations, sont mesurés à des concentrations proches de $500 \text{ mg S}^{2-} \cdot \text{L}^{-1}$ après 45 jours de stockage. Ces résultats mettent en évidence la mise en place de la réduction dissimilatrice des sulfates, un processus biologique en compétition avec l'acétogénèse et la méthanogénèse (Stams *et al.*, 2005).

L'abondance des BSR retrouvées dans le lisier de départ (lisier Ti) est faible ($9,7 \cdot 10^7$ cellules.mL⁻¹ de lisier frais) et représente moins de 0,3 % de l'ensemble des BT. Ce résultat est conforme avec ceux présentés par Cook *et al.* (2008) qui estiment la communauté des BSR dans les lisiers de porcs, à moins de 1% des BT. L'inventaire moléculaire des BT réalisé par Snell-Castro *et al.* (2005) sur des lisiers (202 séquences) confirme aussi indirectement ce résultat car il ne met en évidence aucune bactérie sulfato-réductrice. Le stockage de ce lisier conduit (lisier Tf) à une augmentation significative de l'abondance des communautés BT et BSR. Cette augmentation pourrait s'expliquer par le fait que le lisier est essentiellement composé de résidus digestifs qui se dégradent et participent à la croissance bactérienne et que certaines BSR possèdent une grande versatilité métabolique (Leloup *et al.*, 2009).

L'analyse de la diversité des BSR des lisiers montre que celle-ci est limitée. Huit phylotypes ont été déterminés, un seul d'entre eux est proche d'une espèce de *Desulfovibrio intestinalis*, les 7 autres ne sont proches d'aucun organisme cultivable. Ce résultat est là aussi conforme avec ceux obtenus par Snell-Castro *et al.* (2005) qui mettent en évidence que le lisier était principalement composé de bactéries à ce jour non cultivées (64 %). Cependant, les phylotypes retrouvés dans notre étude sont quand même affiliés à 3 familles connues de BSR : les *Desulfobacteriaceae*, les *Desulfobulbaceae*, et les *Desulfovibrionaceae*. Les résultats publiés par Cook *et al.* (2008) vont dans le même sens, les phylotypes observés dans leurs lisiers appartiennent aux familles des *Desulfobulbaceae* et des *Desulfovibrionaceae* sans que ceux-ci

ne soient proches d'espèces cultivables. Par contre leur inventaire basé sur l'analyse de 82 séquences ne met pas en évidence de phylotypes appartenant aux *Desulfobacterium sp.*

Le lisier Ti est principalement composé d'un phylotype dominant appartenant au *Desulfobulbus sp.* (75% des séquences). Cette famille des *Desulfobulbacea* est souvent retrouvée dans des environnements tels que les systèmes de traitement des eaux usées ou encore dans les tubes digestifs des mammifères (Gibson *et al.*, 1988) ainsi que dans des lisiers stockés (Cook *et al.*, 2008). Les espèces de cette famille ont un métabolisme particulier, en présence de sulfate, elles oxydent les AGV autres que l'acétate en acétate et en l'absence de sulfate, elles fermentent un grand nombre de composés organiques tels que le pyruvate (Icgen *et al.*, 2007; Widdel and Pfennig, 1982). Par contre en présence de propionate et de sulfate, le métabolisme des *Desulfobulbus sp.* s'oriente vers l'oxydation partielle du propionate en acétate (Icgen *et al.*, 2007).

Dans le lisier Tf, la diversité des BSR évolue et se rapproche de celle décrite par Cook *et al.* (2008). Le phylotype des *Desulfobulbacea* (DSR-6) est encore bien représenté avec 42 % des séquences analysées. Par contre 53 % des séquences retrouvées appartiennent à la famille des *Desulfovibrionacea* (DSR-3, DSR4 et DSR5). Aucun phylotype dans le lisier Ti n'appartenait à cette famille qui devait faire partie des sous-dominants. Les espèces de *Desulfovibrio sp.* sont décrites dans la littérature comme des sulfato-réducteurs ayant un métabolisme versatile pouvant utiliser la fermentation en conditions limitantes en sulfate (Raskin *et al.*, 1996). Pour le lisier Tf, les sulfates étant absents au début de l'expérimentation, la communauté DSR a évolué, et après 45 jours, des micro-organismes sulfato-réducteurs au métabolisme plus versatile sont devenus dominants.

Pour le lisier S, tous les phylotypes initialement présents sont retrouvés avec des BSR proches des *Desulfobacterium sp.* qui dominent la communauté BSR. Cette dominance est liée au fait qu'une grande partie des espèces qui composent ce groupe utilisent l'acétate comme donneur d'électron et que ce dernier est le principal acide gras présent dans le lisier (Icgen *et al.*, 2007).

Pour le lisier SF, l'ajout simultané de sulfate et d'AGV a conduit à une simplification de la communauté des BSR, seuls des phylotypes appartenant aux *Desulfobacteriaceae* et aux *Desulfobulbacea* (DSR-1 et DSR-6) sont représentés. Pour ces deux phylotypes, les genres les plus proches sont les *Desulfobacterium sp.* et les *Desulfobulbus sp.* En présence de propionate et de sulfate, la croissance des *Desulfobulbus sp.* couplée à celle des *Desulfobacterium sp.* est conforme avec les données de la littérature (Raskin *et al.*, 1996). Pour le lisier SF, les

Desulfobulbus sp. sont impliqués principalement dans le métabolisme du propionate, du butyrate et des sulfates et les *Desulfobacterium* sp. utilisent l'acétate et les sulfates.

L'étude de la diversité des BSR du lisier de porcs met en lumière différentes conclusions notamment d'un point de vue métabolique. Avec ces différents essais à partir d'un même lisier initial, cette étude montre que les communautés BSR sont très versatiles et que certains groupes sont plus spécialisés pour un environnement donné (avec ou sans sulfate et AGV). Le lisier de porcs est le continuum du tube digestif des animaux où une grande diversité de micro-organismes a pu être mise en évidence (Leser *et al.*, 2002). Bien que la rareté des substrats tend à la simplification de l'écosystème microbien (Peu *et al.*, 2006), les micro-organismes sous dominants peuvent redevenir dominants et l'image de l'écosystème obtenue à un moment donné peut vite évoluer en fonction des conditions environnementales.

CONCLUSION

L'étude de la diversité des BSR du lisier met en évidence une abondance limitée dans cet environnement. La plupart des familles de BSR observées dans les lisiers étudiés sont retrouvées dans la littérature à part deux phylotypes appartenant aux *Desulfobacterium* sp. Dans le lisier de porcs, une très grande majorité des BSR mises en évidence n'est proche d'aucune bactérie cultivée. Dans notre étude, les principales familles impliquées dans la consommation des sulfates du lisier sont les *Desulfobulbacea* et les *Desulfobacteriaceae*.

RÉFÉRENCES

- APHA. (1998) Standards methods for the Examination of Water and Wastewater. 20th ed. , Washington, DC.
- Benson D.A., Karsch-Mizrachi I., Lipman D.J., Ostell J., Wheeler D.L. (2003) GenBank. **Nucleic Acids Res.** 31:23-27.
- Bik E.M., Eckburg P.B., Gill S.R., Nelson K.E., Purdom E.A., Francois F., Perez-Perez G., Blaser M.J., Relman D.A. (2006) Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 103:732-737.
- Cook K.L., Whitehead T.R., Spence C., Cotta M.A. (2008) Evaluation of the sulfate-reducing bacterial population associated with stored swine slurry. **Anaerobe** 14:172-180.
- Donham K.J., Yeggy J., Dague R.R. (1988) Production rates of toxic gases from liquid swine manure: Health implications for workers and animals in swine confinement buildings. **Biological Wastes** 24:161-173.
- Eduard W., Pearce N., Douwes J. (2009) Chronic bronchitis, COPD, and lung function in farmers: the role of biological agents. **Chest** 136:716-25.
- Elferink S., Visser A., Pol L.W.H., Stams A.J.M. (1994) Sulfate Reduction in Methanogenic Bioreactors. **Fems Microbiology Reviews** 15:119-136.
- Eriksen J., Adamsen A.P.S., Norgaard J.V., Poulsen H.D., Jensen B.B., Petersen S.O. (2010) Emissions of Sulfur-Containing Odorants, Ammonia, and Methane from Pig Slurry: Effects of Dietary Methionine and Benzoic Acid. **Journal of Environmental Quality** 39:1097-1107.
- Ferry J. (1993) Methanogenesis Chapman & Hall, New York.
- Garcia J.L., Patel B.K.C., Ollivier B. (2000) Taxonomic phylogenetic and ecological diversity of methanogenic Archaea. **Anaerobe** 6:205-226.
- Gibson G.R., Macfarlane G.T., Cummings J.H. (1988) Occurrence of sulphate-reducing bacteria in human faeces and the relationship of dissimilatory sulphate reduction to methanogenesis in the large gut. **Journal of Applied Bacteriology** 65:103-111.
- Icgen B., Moosa S., Harrison S.T.L. (2007) A study of the relative dominance of selected anaerobic sulfate-reducing bacteria in a continuous bioreactor by fluorescence in situ hybridization. **Microbial Ecology** 53:43-52.
- Klappenbach J.A., Saxman P.R., Cole J.R., Schmidt T.M. (2001) Rnndb: The ribosomal RNA operon copy number database. **Nucleic Acids Research** 29:181-184.
- Klein M., Friedrich M., Roger A.J., Hugenholtz P., Fishbain S., Abicht H., Blackall L.L., Stahl D.A., Wagner M. (2001) Multiple lateral transfers of dissimilatory sulfite reductase genes between major lineages of sulfate-reducing prokaryotes. **Journal of Bacteriology** 183:6028-6035.
- Kosińska K., Miśkiewicz T. (1997) Degradation of organic substances by *Deulfovibrio desulfuricans* in liquid manure from industrial pig farming. **Biotechnology Letters** 19:515-519.
- Landaud S., Helinck S., Bonnarme P. (2008) Formation of volatile sulfur compounds and metabolism of methionine and other sulfur compounds in fermented food. **Applied Microbiology and Biotechnology** 77:1191-1205.
- Leloup J. (2004) Etude de la communauté microbienne sulfato-réductrice (portant le gène *dsrAB*) dans les vasières de l'estuaire de Seine, UFR Sciences et Techniques, Université de Rouen. (*Doctoral Dissertation*)
- Leloup J., Fossing H., Kohls K., Holmkvist L., Borowski C., Jørgensen B.B. (2009) Sulfate-reducing bacteria in marine sediment (Aarhus Bay, Denmark): Abundance and

- diversity related to geochemical zonation. **Environmental Microbiology** 11:1278-1291.
- Lens P.N., Depoorter M.P., Cronenberg C.C., Verstraete W.H. (1995) Sulfate-Reducing and Methane Producing Bacteria in Aerobic Waste-Water Treatment Systems. **Water Research** 29:871-880.
- Leser T.D., Amenuvor J.Z., Jensen T.K., Lindecrone R.H., Boye M., Moøller K. (2002) Culture-independent analysis of gut bacteria: The pig gastrointestinal tract microbiota revisited. **Applied and Environmental Microbiology** 68:673-690.
- Lin C., Raskin L., Stahl D.A. (1997) Microbial community structure in gastrointestinal tracts of domestic animals: Comparative analyses using rRNA-targeted oligonucleotide probes. **FEMS Microbiology Ecology** 22:281-294.
- Ludwig W., Strunk O., Westram R., Richter L., Meier H., Yadhukumar, Buchner A., Lai T., Steppi S., Jobb G., Forster W., Brettske I., Gerber S., Ginhart A.W., Gross O., Grumann S., Hermann S., Jost R., König A., Liss T., Lussmann R., May M., Nonhoff B., Reichel B., Strehlow R., Stamatakis A., Stuckmann N., Vilbig A., Lenke M., Ludwig T., Bode A., Schleifer K.H. (2004) ARB: a software environment for sequence data. **Nucleic Acids Res.** 32:1363-1371.
- Macfarlane G.T., Gibson G.R., Beatty E., Cummings J.H. (1992) Estimation of Short-Chain Fatty-Acid Production From Protein By Human Intestinal Bacteria Based On Branched-Chain Fatty-Acid Measurements. **Fems Microbiology Ecology** 101:81-88.
- 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.
- Martinez J., Le Bozec G. (2000) Pig manure and environmental concerns in Europe. **Cahiers de l'Agricultures** 9:181-190.
- Martinez J., Guiziou F., Peu P., Gueutier V. (2003) Influence of treatment techniques for pig slurry on methane emissions during subsequent storage. **Biosyst. Eng.** 85:347-354.
- Oesterhelweg L., Puschel K. (2008) "Death may come on like a stroke of lightning ..." - Phenomenological and morphological aspects of fatalities caused by manure gas. **International Journal of Legal Medicine** 122:101-107.
- Patni N.K., Clarke S.P. (1991) Transient hazardous conditions in animal building due to manure gas released during slurry mixing. **Applied Engineering in Agriculture** 7:478-484.
- Peu P., Beline F., Martinez J. (2004) Volatile fatty acids analysis from pig slurry using high-performance liquid chromatography. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry** 84:1017-1022.
- Peu P., Picard S., Dourmad J.Y., Dabert P. (2011) Managing sulphur content of pig diets to control sulphides production during pig slurry anaerobic storage. **Journal of Environmental Quality (soumis)**.
- Peu P., Brugère H., Pourcher A.M., Kérouédan M., Godon J.J., Delgenès J.P., Dabert P. (2006) Dynamics of a pig slurry microbial community during anaerobic storage and management. **Applied and Environmental Microbiology** 72:3578-3585.
- Postgate J.R. (1963) Versatile medium for the enumeration of sulfate-reducing bacteria. **Applied microbiology** 11:265-267.
- Raskin L., Rittmann B.E., Stahl D.A. (1996) Competition and coexistence of sulfate-reducing and methanogenic populations in anaerobic biofilms. **Applied and Environmental Microbiology** 62:3847-3857.
- Singleton D.R., Furlong M.A., Rathbun S.L., Whitman W.B. (2001) Quantitative Comparisons of 16S rRNA Gene Sequence Libraries from Environmental Samples. **Applied and Environmental Microbiology** 67:4374-4376.

- Snell-Castro R., Godon J.J., Delgenes J.P., Dabert P. (2005) Characterisation of the microbial diversity in a pig manure storage pit using small subunit rDNA sequence analysis. **Fems Microbiol. Ecol.** 52:229-242.
- Spence C., Whitehead T.R., Cotta M.A. (2008) Development and comparison of SYBR Green quantitative real-time PCR assays for detection and enumeration of sulfate-reducing bacteria in stored swine manure. **Journal of Applied Microbiology** 105:2143-2152.
- Tang K., Baskaran V., Nemati M. (2009) Bacteria of the sulphur cycle: An overview of microbiology, biokinetics and their role in petroleum and mining industries. **Biochemical Engineering Journal** 44:73-94.
- Ushida K., Maekawa M., Arakawa T. (2002) Influence of dietary supplementation of herb extracts on volatile sulfur production in pig large intestine. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology** 48:18-23.
- Wagner M., Roger A.J., Flax J.L., Brusseau G.A., Stah D.A. (1998) Phylogeny of dissimilatory sulfite reductase supports an early origin of sulfate respiration. **J. Bacteriol.** 180:2975-2982.
- Widdel F., Pfennig N. (1982) Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids. II. Incomplete oxidation of propionate by *Desulfobulbus propionicus* gen. nov., sp. nov. **Archives of Microbiology** 131:360-365.
- Williams A.G., Evans M.R. (1981) Storage of Piggery Slurry. **Agricultural Wastes** 3:311-321.

Chapitre 4 :
Détermination d'un « potentiel
sulfurogène » pour différentes
matières premières utilisables
en co-digestion anaérobie dans
la filière agricole.

Chapitre 4 : Détermination d'un « potentiel sulfurogène » pour différentes matières premières utilisables en co-digestion anaérobie dans la filière agricole.

Avant-propos :

L'ajout de co-substrats riches en soufre dans les unités de méthanisation de lisier peut favoriser le développement des bactéries sulfato-réductrices et ainsi conduire à une augmentation de la concentration d'hydrogène sulfuré dans le biogaz. Un choix de co-substrats fortement concentrés en soufre peut donc produire un biogaz pouvant détériorer les équipements de valorisation énergétique. Il nous paraissait donc intéressant de caractériser un ensemble de co-substrats utilisables en digestion anaérobie à la ferme afin d'évaluer leur potentiel de production d'hydrogène sulfuré.

Notre approche expérimentale a consisté à (i) collecter plusieurs co-substrats en provenance de différents secteurs (industries agro-alimentaires, collectivités locales et cultures agricoles), (ii) caractériser ces co-substrats par des paramètres physico-chimiques et (iii) déterminer leur potentiel de production de biogaz et d'hydrogène sulfuré.

Dans un premier temps, nous avons collecté 37 déchets et effluents provenant de diverses origines. Ces co-substrats ont été caractérisés pour leur teneur en composés élémentaires tels que le carbone, l'azote et le soufre. Enfin, leur potentiel bio-méthanogène ainsi que leur potentiel de production de biogaz et d'hydrogène sulfuré ont été analysés.

La caractérisation chimique des co-substrats a permis de déterminer une spéciation partielle des formes du soufre qui les compose. En combinant les analyses chimiques aux potentiels biogaz nous avons déterminé un potentiel maximum de production d'hydrogène sulfuré (potentiel sulfurogène) qui a fait l'objet d'un modèle prédictif.

Peu^{1†} P., Picard¹ S., Girault¹ R., Béline¹ F., Bridoux³ G., Dabert¹ P.

¹*Cemagref, UR GERE. 17 avenue de Cucillé, CS 64427, F-35044 Rennes, France.*

Université Européenne de Bretagne, F 35000 Rennes France.

³*SAUR, Société d'Aménagement Urbain et Rural, Département de Recherche et de Développement, 2 rue de la
Bresle 78312 Maurepas France.*

Prediction of hydrogen sulphide production during anaerobic digestion of organic substrates

† corresponding author

Mailling adress: *Cemagref, UR GERE. 17 avenue de Cucillé, CS 64427, F-35044 Rennes, France.*

Phone: 33 2 23 48 21 45

Fax: 33 2 23 48 21 15

e-mail: *pascal.peu@cemagref.fr*

ABSTRACT

The main objective of this study was to predict the hydrogen sulphide content of raw biogas produced during anaerobic mono-digestion of 37 different feedstocks originating from urban wastewater treatment plants, farms, agri-food facilities and municipal wastes. Total sulphur and carbon contents of the feedstock were analysed. Total sulphur content ranged from 1 to 29.6 mg.kg⁻¹ of total solids, and 25 feedstocks contained less than 5 mg.kg⁻¹. The biochemical methanogenic potential and maximum biogas production of each feedstock combined with its S content allowed the prediction of H₂S in the raw biogas. A model to link H₂S in biogas with the C:S ratio was established. Based on this model, a maximum C:S ratio of 40 in feedstock was determined to limit the hydrogen sulphide in raw biogas to less than 2% (volume/volume).

Keywords: *anaerobic digestion, feedstock, sulphur, hydrogen sulphide, biogas.*

INTRODUCTION

The French agricultural biogas sector is mainly developing in areas where livestock effluents are produced (Beline et al., 2010). In 2009, 15 facilities were already operating and 90 plants were under construction or planned. The sector is expanding rapidly and new anaerobic plants are being built to respond to the increasing demand for renewable energy. Livestock wastes appear to be a substrate of interest but have one major disadvantage: low organic content coupled with low biodegradability (Vedrenne et al., 2008). Consequently, using manure on its own in anaerobic digesters is relatively rare and co-substrates are often added to increase biogas production (Mata-Alvarez et al., 2000). In France, energy crops are not encouraged and the primary vocation of agricultural production is still food. For this reason, most co-substrates used for agricultural biogas plants originate from (i) agricultural waste, crop residues (residues from field crops, market gardening, catch crops, silage, etc.), (ii) industrial waste or by-products (from slaughterhouses, food processing or wastewater treatment plants), or (iii) organic municipal wastes (green waste, restaurant refusals, harvested seaweed). The feedstocks used in anaerobic digesters have a wide range of chemical characteristics and some are particularly suitable for biogas production. Nevertheless, some of their compounds can have adverse effects on anaerobic digestion, especially their sulphur content. The inorganic and organic sulphur (S) content in feedstock can be reduced (Elferink et al., 1994) or mineralized under anaerobic conditions (Mackie et al., 1998) resulting in the formation of dissolved sulphides which can be transferred to the biogas in the form of hydrogen sulphide (H₂S). H₂S smells bad, is toxic, and can damage most equipment, including combined heat and power engines. For example, as recommended by most manufacturers, for trouble free operation of combined heat and power installations the H₂S in biogas must be lower than 100 to 500 mg_{Nm}⁻³ (65 and 330 ppm) depending on the equipment concerned (Wellinger and Linberg, 2000).

Pollution of biogas by hydrogen sulphide can be prevented (or H₂S removed) at different levels (i) during the anaerobic process itself, (ii) by treating the biogas or (iii) by controlling the feedstocks.

In anaerobic digesters, the harmful action of sulphide in the reactor can be controlled by adding chemical compounds such as specific inhibitors of sulphide producing microorganisms (Isa and Anderson, 2005) or sulphide scavengers, mainly metal ions, to precipitate the

sulphide. Due to the high technicality of these manipulations and the high cost of the products used, only the oil industry and wastewater treatment plants use these techniques.

In most anaerobic digesters, sulphide is removed from the biogas using physical-chemical or biological techniques. Different traps are used such as dry removal processes with metal oxides like iron and zinc oxides, alkaline solids (hydrated lime), adsorbents (molecular sieves, activated carbon) or acid washing (Cirne et al., 2008). A simple biological technique is creating micro-aerobic conditions in the gasometer by adding 2-6% air to the biogas. The presence of oxygen encourages the growth of chemoautotroph microorganisms like the genus *Thiobacillus*, which oxidise hydrogen sulphide into elemental S and sulphate (Cirne et al., 2008; Diaz et al., 2010). Under oxygen limiting conditions, the major end product is elemental S while in fully oxygenated conditions H₂S is completely oxidised into sulphate. This biological process is often described in the literature, and on German farms, most full scale anaerobic reactors use this desulphurisation technique (Cirne et al., 2008).

However, biological desulphurisation does have some limitations:

1. After desulphurisation, the concentration of residual H₂S may still be higher than the manufacturer's recommendations for combined heat and power equipment. For efficient biological desulphurisation, the concentration of H₂S in the raw biogas cannot exceed 1.5 to 2% (Cirne et al., 2008).
2. The amount of air and particularly of oxygen added to the biogas should be limited to avoid explosive gas mixtures and biogas dilution to ensure satisfactory biogas combustion properties and a good methane number (Rahmouni et al., 2003).
3. H₂S production in the reactor should be constant to ensure the efficiency of removal since oxidation is based on a biological process involving microorganisms with limited growth efficiency.

For these reasons, to design an efficient H₂S removal process, knowledge of the capacity of the substrates to produce H₂S is required.

Purpose: The main objective of this study was to predict raw H₂S biogas content (sulphidogenic potential) in different feedstocks that could be used in anaerobic farm digesters.

METHODS

Sulphidogenic potential means the inherent ability of a feedstock to produce H₂S during anaerobic digestion. Predicted biogas H₂S content was determined using an indirect method by coupling maximum biogas production of the feedstock, organic matter, and sulphur and nitrogen characterisation.

Feedstocks

Thirty-seven potential feedstocks were sampled from urban wastewater treatment plants, farms, agri-food facilities and municipal wastes (Table 1). Ten kilograms of each product were directly aliquoted and then divided into two subsamples. One part was frozen (-20 °C) to prevent degradation and the other was refrigerated for measurement of biochemical methanogenic potential. For chemical determinations, solid feedstock samples were thawed and ground in a meat grinder (Kenwood, Pro 1600) to render them homogenous. For liquid samples, homogenisation was done with a simple lab stirrer.

Table 1

Origin of feedstocks

| Urban waste water treatment plant | Agriculture | | Agri-food facilities | | | | Municipal waste |
|-----------------------------------|---------------------|------------------------|---------------------------------|-------------------------|--------------------|--------------------------|--------------------------------|
| | Cover crops | Animal waste | Industrial wastewater treatment | Fatty effluents | Vegetable residues | Others | |
| Primary sludge | Camelina crops | Farm manure | Biological sludge (n=3) | Grease trap waste (n=3) | Carrot pulp | Rumen content | Restaurant refusals |
| Biological sludge | White mustard crops | Dairy cow slurry (n=2) | Screening refusal (n=2) | | Onion pulp | Meat waste | Dehydrated restaurant refusals |
| DAF sludge* | Brown mustard crops | Pig faeces (n=2) | | Shallot pulp | Bovine blood | Harvested red seaweeds | |
| | Radish crops | Pig slurry (n=2) | | | Pig mucus | Harvested green seaweeds | |
| | Soybean crops | | | | Pig bristles | Lawn mowings | |
| | | | | | Fish viscera | | |

*Dissolved Air Flotation sludge

Biochemical methanogenic potential (BMP) and maximum biogas production.

The biochemical methanogenic potential of each substrate was determined according to (Vedrenne et al., 2008) and the standard NF EN ISO 11734 (AFNOR, 1998). It is based on measuring the pressure generated by the production of biogas in a closed bottle at a fixed volume, in anaerobic conditions and in the presence of the substrate and of an inoculum in mesophilic conditions (38 °C). The sample was diluted with a nutritive solution to avoid inhibition and to maintain a fixed total liquid volume between the tests. Biogas was collected and its methane and carbon dioxide contents were determined by gas chromatography (Lucas et al., 2007). BMP was performed in triplicate with controls (inoculum only) until biogas production ceased. Maximum biogas production was also measured during these tests.

The inoculum we used was obtained from a well established anaerobic pilot plant (100 l) acclimated to degrade pig slurry supplemented with horse feed as co-substrate (mixture of lignocellulose materials 18%, proteins 12% and lipids 2.5%) to obtain an organic loading rate of 2 g VS.d⁻¹.l⁻¹. The anaerobic sludge produced by this digester has been shown to degrade several different organic materials and is a satisfactory medium to study anaerobic degradation of a wide range of feedstocks (data not shown). To maximise the biodegradation rate and ensure that the methane potential was achieved, an inoculum:substrate ratio of between 0.5 to 3 was applied in accordance with the results of previous studies (Chynoweth et al., 1998; Labatut et al., 2011).

Physical-chemical characterisation

Total solids (TS), volatile solids (VS), total Kjeldahl nitrogen (TKN) and total ammoniacal nitrogen (TAN) were measured using standard methods (APHA, 2000).

Carbon and sulphur elementary analysis

Elementary analysis of carbon (C) and S was performed using specific analysers according to the manufacturer's instructions (Thermo Flash 2000 and LECO SC-144DR, respectively). For C determination, samples were homogenised and mixed with alumina according to their total solids content. Samples were then placed in a tin capsule in a combustion furnace heated to 1000 °C. During combustion, an oxygen flux oxidised all forms of C into carbon dioxide. The gas stream was then analysed by chromatography with catharometric detection. Calibration was done using different levels of aspartic acid. Similar procedures were used for S

determination. The samples were first dried at 105 °C and then ground with a mortar. An aliquot was placed in a basket and covered with vanadium pentoxide. The basket containing the mixture was heated in the furnace at 1350 °C under a continuous flow of pure oxygen causing oxidation of all S forms into sulphur dioxide. The combustion gas -and particularly sulphur dioxide content- was analysed by an internal infrared detector to determine the S content of the samples. Specific calibration was performed using known amounts of S from standard coal (LECO, USA). The C:S ratios were determined for each feedstock analysed.

Calculation of crude protein content, carbon biodegradability and sulphidogenic potential

The contribution of each feedstock to crude proteins can be calculated using its nitrogen content (i.e. TKN and TAN):

Crude proteins (g.kg^{-1}) = (TKN-TAN) * 6.25 (Dintzis et al., 1988),

where 6.25 is the average ratio of protein N in a typical protein.

Carbon biodegradability was calculated with a C balance between C recovered in the biogas at the end of the BMP test and the C content of the feedstock before the anaerobic tests.

Sulphidogenic potential is the inherent ability of a feedstock to produce H_2S during anaerobic digestion. Predicted biogas H_2S (sulphidogenic potential) content in normal conditions was determined using two distinct models, one using total S analysis and biogas production, and the other by estimating S biodegradability from C biodegradability.

RESULTS AND DISCUSSION

Characteristics of feedstocks

Table 2 lists TS and VS values of feedstocks on a wet basis. TS content in all the samples ranged from 38.5 g.kg^{-1} in pig slurry to 975.4 g.kg^{-1} for dehydrated restaurant refusals. Average TS content was calculated at 228 $\text{g.kg}^{-1} \pm 175$. This high variation is due to the wide range of sample types. Biological sludges, pig and cattle slurries have a high water content with TS values that are often below 69 g.kg^{-1} . These low TS levels are an advantage for farms that use liquid manure as the main substrate for continuous stirring co-digestion; and a disadvantage from an energy point of view (Mata-Alvarez et al., 2000). The average VS level was 81% ± 16 of TS, giving an average TS:VS ratio of 1.3.

Table 2
Feedstock characteristics and sulphidogenic potential

| | TS | VS | Total S | Total C | Crude proteins | BMP | Total biogas | C/S | Predicted H ₂ S (SP1) | Predicted H ₂ S (SP2) |
|---|--------------------|--------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|--|-------------------------------------|-------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| | g.kg ⁻¹ | g.kg ⁻¹ | g.kgTS ⁻¹ | g.kg ⁻¹ TS | g.kgTS ⁻¹ | Nm ³ CH ₄ .kgVS ⁻¹ | Nm ³ .kgTS ⁻¹ | g.g ⁻¹ | % | % |
| Feedstock from urban waste water treatment plant | | | | | | | | | | |
| <i>Primary sludge</i> | 52.8 | 44.5 | 4.5 | 339.7 | - | - | - | 74.7 | - | - |
| <i>Biological sludge (1)</i> | 57.0 | 45.8 | 8.6 | 505.3 | 493.4 | 255.5 | 18.6 | 58.6 | 1.9 | 0.6 |
| <i>DAF sludge</i> | 47.6 | 36.3 | 8.4 | 576.5 | 154.0 | 806.1 | 39.4 | 68.7 | 0.7 | 0.5 |
| Feedstock from agricultural resources | | | | | | | | | | |
| Cover crops | | | | | | | | | | |
| <i>Camelina crops</i> | 213.0 | 178.0 | 4.0 | 394.4 | 132.9 | 234.3 | 84.2 | 98.6 | 0.7 | 0.4 |
| <i>White mustard crops</i> | 228.0 | 194.0 | 3.3 | 390.4 | 100.9 | 222.5 | 86.4 | 117.6 | 0.6 | 0.3 |
| <i>Brown mustard crops</i> | 173.0 | 154.0 | 3.7 | 514.5 | 98.3 | 264.1 | 87.5 | 137.9 | 0.5 | 0.3 |
| <i>Radish crops</i> | 301.0 | 126.0 | 3.4 | 245.8 | 62.3 | 236.7 | 67.6 | 73.2 | 1.0 | 0.5 |
| <i>Soybean crops</i> | 249.0 | 84.0 | 2.4 | 152.6 | 78.8 | 305.0 | 58.2 | 63.3 | 0.7 | 0.6 |
| Animal waste | | | | | | | | | | |
| <i>Farm manure</i> | 225.2 | 209.9 | 1.2 | 297.3 | 71.3 | 271.5 | 103.0 | 245.3 | 0.2 | 0.2 |
| <i>Dairy cow slurry (1)</i> | 31.0 | 26.0 | 2.8 | 477.4 | 141.1 | 326.9 | 13.4 | 170.5 | 0.5 | 0.2 |
| <i>Dairy cow slurry (2)</i> | 106.9 | 79.2 | 3.8 | 429.3 | 140.9 | 238.7 | 28.3 | 112.7 | 1.0 | 0.3 |
| <i>Pig faeces (1)</i> | 362.0 | 280.0 | 3.1 | 360.0 | 147.8 | 304.0 | 135.1 | 115.4 | 0.6 | 0.3 |
| <i>Pig faeces (2)</i> | 390.0 | 320.0 | 3.9 | 398.0 | 124.8 | 328.0 | 166.6 | 102.4 | 0.6 | 0.4 |
| <i>Pig slurry (1)</i> | 43.2 | 30.4 | 8.0 | 349.3 | 172.2 | 230.0 | 9.8 | 43.6 | 2.5 | 0.9 |
| <i>Pig slurry (2)</i> | 38.5 | 25.0 | 8.0 | 411.9 | 204.0 | 140.2 | 5.5 | 51.5 | 3.9 | 0.7 |
| Feedstock from agri-food facilities | | | | | | | | | | |
| Industrial wastewater treatments | | | | | | | | | | |
| <i>Biological sludge PS* (2)</i> | 60.3 | 47.8 | 8.3 | 553.0 | 130.3 | 259.5 | 18.0 | 66.6 | 1.9 | 0.6 |
| <i>Biological sludge DMI** (3)</i> | 69.2 | 40.0 | 7.0 | 319.4 | 445.2 | 282.8 | 16.9 | 45.8 | 2.0 | 0.8 |
| <i>Biological sludge PI*** (4)</i> | 61.6 | 41.3 | 4.7 | 348.4 | 456.8 | 205.9 | 13.7 | 74.2 | 1.5 | 0.5 |
| <i>Screening refusal PS (1)</i> | 328.6 | 310.8 | 5.1 | 500.9 | 338.7 | 545.7 | 247.7 | 97.9 | 0.5 | 0.4 |
| <i>Screening refusal CS**** (2)</i> | 176.2 | 163.2 | 2.8 | 531.4 | 227.5 | 490.2 | 119.2 | 189.5 | 0.3 | 0.2 |

Chapitre 4 : Détermination d'un « potentiel sulfurogène » pour différentes matières premières utilisables en co-digestion anaérobie dans la filière agricole.

| Fatty effluents | | | | | | | | | | |
|---------------------------------------|-------|-------|------|-------|-------|--------|-------|-------|------|-----|
| Grease trap waste CS (1) | 237.7 | 231.6 | 1.0 | 765.9 | 42.6 | 863.4 | 271.7 | 797.9 | 0.1 | 0.0 |
| Grease trap waste PI (2) | 361.3 | 350.0 | 1.5 | 702.3 | 67.7 | 1011.5 | 454.8 | 478.9 | 0.1 | 0.1 |
| Grease trap waste PS (3) | 557.1 | 552.6 | 1.5 | 609.2 | 102.5 | 902.9 | 648.3 | 412.0 | 0.1 | 0.1 |
| Vegetable residues | | | | | | | | | | |
| Carrot pulp | 177.1 | 166.7 | 1.1 | 447.2 | 93.1 | 330.6 | 107.7 | 389.0 | 0.1 | 0.1 |
| Onion pulp | 211.5 | 194.6 | 3.0 | 434.5 | 122.5 | 416.7 | 153.1 | 142.6 | 0.3 | 0.3 |
| Shallot pulp | 226.7 | 212.7 | 3.4 | 456.0 | 144.6 | 413.3 | 169.9 | 134.8 | 0.3 | 0.3 |
| Others | | | | | | | | | | |
| Rumen content CS | 166.3 | 155.4 | 1.5 | 493.6 | 124.2 | 341.1 | 82.7 | 325.6 | 0.2 | 0.1 |
| Meat waste PI | 330.3 | 293.9 | 4.9 | 626.5 | 332.2 | 871.0 | 346.9 | 127.3 | 0.3 | 0.3 |
| Bovine blood CS | 155.8 | 145.1 | 6.8 | 505.1 | 925.0 | 454.9 | 92.3 | 74.5 | 0.8 | 0.5 |
| Pig mucus PS | 190.5 | 169.1 | 7.7 | 526.0 | 695.1 | 579.5 | 141.6 | 68.6 | 0.7 | 0.5 |
| Pig bristles PS | 285.5 | 278.4 | 26.0 | 492.5 | 904.2 | 277.3 | 105.5 | 18.9 | 4.9 | 2.0 |
| Fish viscera | 418.0 | 380.0 | 4.6 | 568.6 | 269.6 | 657.9 | 403.0 | 122.6 | 0.3 | 0.3 |
| Feedstock from municipal waste | | | | | | | | | | |
| Canteen refusals (1) | 271.3 | 257.5 | 3.6 | 545.1 | 244.2 | 570.8 | 249.6 | 151.4 | 0.3 | 0.2 |
| Dehydrated Canteen refusals (2) | 975.4 | 827.1 | 4.0 | 464.2 | 305.0 | 395.3 | 535.9 | 116.2 | 0.5 | 0.3 |
| Harvested red seaweeds | 200.9 | 120.2 | 23.3 | 276.2 | 136.9 | 133.1 | 25.6 | 11.9 | 12.8 | 3.2 |
| Harvested green seaweeds | 222.0 | 128.0 | 29.6 | 203.4 | 141.0 | 132.8 | 26.0 | 6.9 | 17.7 | 5.5 |
| Lawn mowings | 238.2 | 187.5 | 5.5 | 438.2 | 220.4 | 289.6 | 86.7 | 79.2 | 1.1 | 0.5 |

*Pig Slaughterhouse, ** Dairy Milk Industry, *** Pig industry, **** Cattle slaughterhouse

Sulphur content and speciation

In all feedstocks analysed in this study, total sulphur content varied between 1 and 29.6 gS.kgTS⁻¹ (table 2). Minimum values were obtained for DAF fatty influents and maximum for harvested green seaweed. Three groups could be distinguished, one with values > 20 g S.kgTS⁻¹ (harvested algae and pig bristles), another group with intermediate values ranging from 5.5 to 8.7 g S.kgTS⁻¹ (animal wastes and biological sludge), and a third group with an S content < 5 g S.kgTS⁻¹ (the remaining feedstocks). The S content of our set of potential feedstocks was low, as more than 68% had a sulphur content < 5 g S.kgTS⁻¹.

To complete this analysis, CP content was determined using coupled NTK and TAN analyses (table 2). Sulphur amino acid content (S-SAA) of the feedstocks was determined using CP and S-SAA content of an ideal protein with a constant CP:S-SAA ratio of 79 (Sriperm et al., 2010).

Estimated S content versus CP content is presented in figure 1. Fourteen feedstocks (39%) were close to the ideal CP:S-SAA ratio (under 30% variation, see dotted line in figure 2) suggesting that their main sulphur content can be explained by their S-SAA content. For all other feedstocks, different explanations are required. In the harvested seaweeds, the sulphur content was as high as their nitrogen content and accounted for 2.9% and 2.3% of their dry matter respectively. This high S content was directly linked with the presence of residual seawater, which has a high concentration of sulphate (0.9 gS-SO₄²⁻.l⁻¹) and to the particular chemical composition of algae that contain a large amount of sulphur polysaccharides (Lahaye and Robic, 2007). In animal wastes, and particularly in pig slurry, metal sulphides (chalcocite, sphalerite, pyrite, etc.) are present in quantities that increase the total S content (Legros et al., 2010). Among catch crops and crops residues, cruciferous plants contain significant amounts of glucosinolate compounds at concentrations that range between 6 and 200 µmol.g⁻¹ of fresh material (Tripathi and Mishra, 2007). Shallot and onion pulps also contain allicin compounds (Asili et al., 2010) (0.7 to 3 g.kg of fresh material), which contain S atoms in their molecular structure. Pig bristles sampled in a piggery slaughterhouse had a high crude protein content (904 g.kg⁻¹ TS) along with a high S content (26 g S.kg⁻¹ TS). This particularity can be explained by the presence of keratin, a rich sulphur crude protein that composes hair, bristles, wool and fur (Marshall et al., 1991). Elemental sulphur analyses of pure keratin revealed that S represented close to 5% of TS. In the present study, collected pig bristles waste was mixed with other residues (skin, fat) and the resulting S content was below values usually obtained for keratin. Bovine blood is mainly composed of serum and cells

which contain high crude protein like albumin and globulin. Surprisingly, despite the fact that this feedstock is mainly composed of proteins, no direct relationship was found between CP and S-SAA.

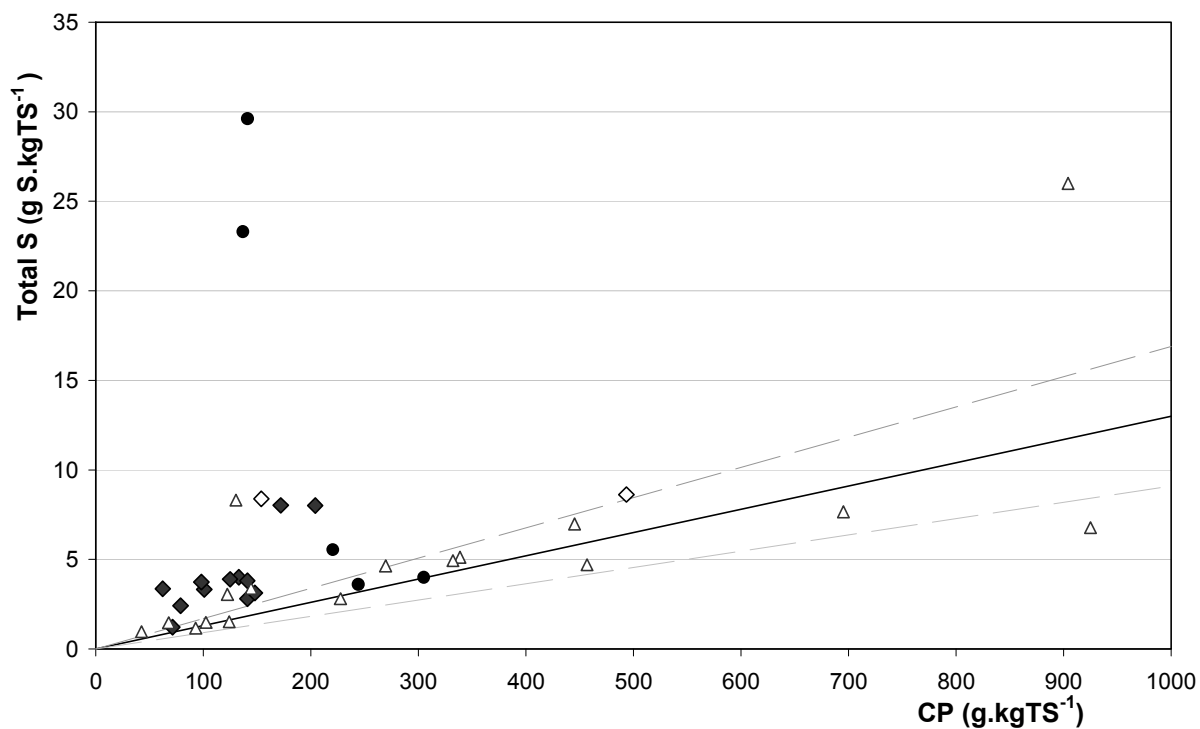


Figure 1

Total sulphur versus protein content of different feedstock from: urban waste water treatment plant◇, agricultural resources◆, from agro-food facilities△, from municipal waste● (Solid line represents sulphur amino acid content for a typical protein and dotted line the 30% variation)

Anaerobic digestion tests

BMP and carbon biodegradability

Table 2 shows the results of the individual BMP assays performed on the 37 feedstocks. The feedstocks were classified in three groups according to the methane yields obtained: one group with fatty substrates (grease trap waste, fish viscera, DAF sludge, meat wastes) with values ranging between 657 and 1011 $\text{Nm}^3\text{CH}_4.\text{kgVS}^{-1}$; another group in which BMP ranged from 330 to 579 $\text{Nm}^3\text{CH}_4.\text{kgVS}^{-1}$ which included screening and restaurant refusals, vegetable residues and rumen content; and a third group, comprising the remaining feedstocks, having lower BMP contents (under 300 $\text{Nm}^3\text{CH}_4.\text{kgVS}^{-1}$).

Carbon biodegradability was also estimated for all the samples analysed: in the first group, carbon biodegradability represented an average of 87% of the carbon input recovered in the biogas. In the second and the third groups, the average values were 77% and 43% respectively. Substrates with high lipid content and high carbon biodegradability, such as grease trap waste, had higher methane yields. In contrast, feedstocks with high lignocellulosic content combined with low carbon biodegradability, such as harvested algae, had a lower methane yield. These results are in agreement with previously published findings (Labatut et al., 2011). Results of the BMP assays reported in this study are in accordance with previous data published in the literature (El-Mashad and Zhang, 2010; Labatut et al., 2011; Vedrenne et al., 2008; Ward et al., 2008; Zhu et al., 2011).

Sulphidogenic potential

With S content and biogas production, a predictive hydrogen sulphide concentration (% v:v) in the biogas named “sulphidogenic potential” can be calculated for each feedstock used as a single substrate in anaerobic digestion processes. Two distinct sulphidogenic potentials can be determined. One takes total sulphur into account under the hypothesis that the entire S content is transformed into dissolved sulphides and totally transferred to the biogas. This potential is considered as the maximum value for H_2S biogas concentration (SP1). The second potential is determined using carbon biodegradability, and is based on the hypothesis that S and C contents of feedstocks have a similar biodegradability (SP2). The second restrictive simulation was run to determine a lower range of sulphidogenic potential. More precise S speciation is needed to be more accurate especially for inorganic S forms such as sulphate. Values for these potentials (SP1 and SP2) are listed in table 2. Predicted H_2S content of biogas ranged from 0.1 to more than 17% and from 0 to 5.5% for SP1 and SP2 respectively.

In both simulations, the lowest values were obtained for fatty effluents and the highest values for harvested seaweeds. For several feedstocks, including biological sludge, pig slurries, pig bristles and harvested seaweeds, the predicted H₂S content calculated with SP1 ranged between 1 to 3.9%, whereas values obtained with SP2 were lower, especially for biological sludge and pig slurry (< 1%). Depending on the sulphur speciation, the biodegradability of the sulphur content in these wastes was limited by the fact that it is primarily precipitated or bound (Legros et al., 2010), making it unavailable for further biochemical transformations. Using these data, it is possible to build a model directly linking the C:S ratios of a feedstock to its sulphidogenic potential (SP1) (figure 2). In our dataset, a raw H₂S biogas content < 2% (i.e. that required for efficient biological desulphurisation), was correlated with substrates with a C:S ratio > 40.

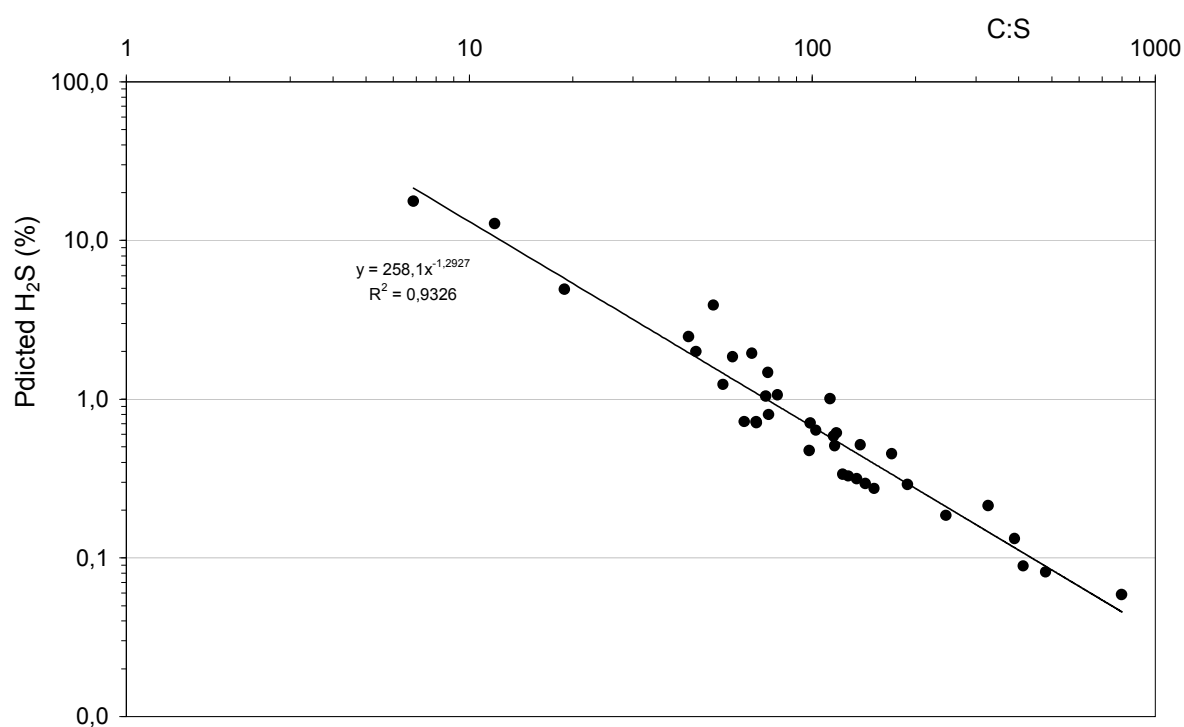


Figure 2

Sulphidogenic potential (SP1) of feedstock as a function of the C:S ratios

This predictive model allows H₂S content in the biogas to be predicted as a security indicator, by analysing the C and S contents of feedstocks without the time consuming determination of BMP and biogas production.

For co-digestion, using the model avoids the need for operators to feed the reactor with a substrate with high sulphidogenic potential. For example, in a farm co-digestion reactor which

used dairy cow slurry as the main substrate, green algae could be used at a maximum ratio of 5 (slurry:algae, v/v) before overloading biological desulphurisation. However, in this case study, there were two limitations involved in using green algae, the TS of the mixture and the low BMP.

CONCLUSION

This inventory enabled various feedstocks that could be used in agricultural anaerobic digestion to be classified according to their sulphur content. Our results showed that the S content of most feedstocks was low. The total biogas production of each feedstock coupled with its S content allowed the prediction of H₂S concentrations in the biogas under two hypotheses: total transfer of S content into the gas phase or only by estimating biodegradable S. With our dataset, it was possible to directly link predicted H₂S with the C:S ratio. This model makes it possible to predict the maximum H₂S concentration using total C/S analyses without having to determine BMP and total biogas.

REFERENCES:

- AFNOR. 1998. NF EN ISO 11734 - Qualité de l'eau - Evaluation de la biodégradabilité anaérobie "ultime" des composés organiques dans les boues de digesteurs - Méthode par mesurage de la production de biogaz.
- Asili, A., Behravan, J., Reza Naghavi, M., Asili, J. 2010. Genetic diversity of persian shallot (*Allium hirtifolium*) ecotypes based on morphological traits, allicin content and RAPD markers. *Open Access Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 1(1), 1-6.
- Beline, F., Dabert, P., Peu, P., Girault, R. 2010. Methane production from farm effluents in France and Europe : principle, inventory and prospects. *Fourrages*(203), 155-161.
- Chynoweth, D.P., Wilkie, A.C., Owens, J.M. 1998. Anaerobic processing of piggery slurry : a review. *Eight World Conference on Animal Production*, 28 juin - 4 juillet, Seoul, Korea. pp. 39.
- Cirne, D.G., van der Zee, F.P., Fernandez-Polanco, M., Fernandez-Polanco, F. 2008. Control of sulphide during anaerobic treatment of S-containing wastewaters by adding limited amounts of oxygen or nitrate. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 7(2), 93-105.
- Diaz, I., Lopes, A.C., Perez, S.I., Fdz-Polanco, M. 2010. Performance evaluation of oxygen, air and nitrate for the microaerobic removal of hydrogen sulphide in biogas from sludge digestion. *Bioresource Technology*, 101(20), 7724-7730.
- Dintzis, F.R., Cavins, J.F., Graf, E., Stahly, T. 1988. Nitrogen-to-protein conversion factors in animal feed and fecal samples. *Journal of Animal Science*, 66(1), 5-11.
- El-Mashad, H.M., Zhang, R. 2010. Biogas production from co-digestion of dairy manure and food waste. *Bioresource Technology*, 101(11), 4021-4028.
- Elferink, S., Visser, A., Pol, L.W.H., Stams, A.J.M. 1994. Sulfate Reduction in Methanogenic Bioreactors. *Fems Microbiology Reviews*, 15(2-3), 119-136.
- Isa, M.H., Anderson, G.K. 2005. Molybdate inhibition of sulphate reduction in two-phase anaerobic digestion. *Process Biochemistry*, 40(6), 2079-2089.
- Labatut, R.A., Angenent, L.T., Scott, N.R. 2011. Biochemical methane potential and biodegradability of complex organic substrates. *Bioresource Technology*, 102(3), 2255-2264.
- Lahaye, M., Robic, A. 2007. Structure and functional properties of Ulvan, a polysaccharide from green seaweeds. *Biomacromolecules*, 8(6), 1765-1774.
- Legros, S., Doelsch, E., Chaurand, P., Rose, J., Masion, A., Borschneck, D., Proux, O., Hazemann, J.L., Briois, V., Ferrasse, J.H., Saint Macary, H., Bottero, J.Y. 2010. Investigation of copper and zinc speciation in pig slurry by a multitechnique approach RAMIRAN, Treatment and use of organic residues in agriculture: Challenges and opportunities towards sustainable management, Lisbonne. FAO. pp. 130.
- Lucas, T., Le Ray, D., Peu, P., Wagner, M., Picard, S. 2007. A new method for continuous assessment of CO₂ released from dough baked in ventilated ovens. *Journal of Food Engineering*, 81(1), 1-11.
- 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(5), 1331-1342.
- Marshall, R.C., Orwin, D.F.G., Gillespie, J.M. 1991. Structure and biochemistry of mammalian hard keratin. *Electron Microscopy Reviews*, 4(1), 47-83.
- Mata-Alvarez, J., Macé, S., Lladrés, P. 2000. Anaerobic digestion of organic solid wastes. An overview of research achievements and perspectives. *Bioresource Technology*, 74(1), 3-16.

- Rahmouni, C., Le Corre, O., Tazerout, M. 2003. Online determination of natural gas properties. *Comptes Rendus Mecanique*, 331(8), 545-550.
- Sriperm, N., Pesti, G.M., Tillman, P.B. 2010. The distribution of crude protein and amino acid content in maize grain and soybean meal. *Animal Feed Science and Technology*, 159(3-4), 131-137.
- Tripathi, M.K., Mishra, A.S. 2007. Glucosinolates in animal nutrition: A review. *Animal Feed Science and Technology*, 132(1-2), 1-27.
- Vedrenne, F., Béline, F., Dabert, P., Bernet, N. 2008. The effect of incubation conditions on the laboratory measurement of the methane producing capacity of livestock wastes. *Bioresource Technology*, 99(1), 146-155.
- Ward, A.J., Hobbs, P.J., Holliman, P.J., Jones, D.L. 2008. Optimisation of the anaerobic digestion of agricultural resources. *Bioresource Technology*, 99(17), 7928-7940.
- Wellinger, A., Linberg, A. 2000. *Biogas Upgrading and Utilization*. International Energy Association ed, Paris, France.
- Zhu, Z., Hsueh, M.K., He, Q. 2011. Enhancing biomethanation of municipal waste sludge with grease trap waste as a co-substrate. *Renewable Energy*, 36(6), 1802-1807.

Chapitre 5 :
Essai de valorisation de la
biomasse algues (*Ulva* sp.) par
co-digestion anaérobie avec du
lisier de porcs.

Chapitre 5 : Essai de valorisation de la biomasse algues (Ulva sp.) par co-digestion anaérobie avec du lisier de porcs.

Avant-propos :

Dans le contexte breton, les algues vertes d'échouage semblent à priori des substrats intéressants pour la co-digestion anaérobie des effluents agricoles en raison des volumes disponibles collectés sur les plages, du manque de filière de valorisation, et de la proximité entre les lieux de collecte et les installations de méthanisation à la ferme. Toutefois le potentiel sulfurogène très élevé des algues pourrait limiter leur valorisation par la filière de méthanisation.

Afin d'évaluer la faisabilité de l'utilisation des algues vertes en co-digestion anaérobie avec du lisier de porcs, nous avons étudié leur biodégradabilité anaérobie ainsi que le comportement du soufre contenu dans ce co-substrat.

La biodégradabilité des algues a été étudiée de deux façons distinctes. Nous avons dans un premier temps mesuré le potentiel bio-méthanogène maximum. En complément à cette détermination, nous avons réalisé un fractionnement de la matière organique afin d'évaluer les fractions réfractaire et biodégradable.

Nous avons ensuite mis en place une série d'essais de co-digestion avec du lisier de porcs et des algues vertes sur 3 pilotes instrumentés (digesteur anaérobie infiniment mélangé) afin de valider à petite échelle les potentiels bio-méthanogènes initialement mesurés et d'estimer la proportion de soufre transformée en hydrogène sulfuré. Un inhibiteur spécifique de la sulfato-réduction a été ajouté dans l'un des réacteurs afin de bloquer la réduction des sulfates.

Pour chaque pilote, des bilans matière ont été effectués à l'équilibre hydraulique sur la demande chimique en oxygène, le carbone total et le soufre total afin de valider les hypothèses de transformation de la matière organique.

Peu^{1†} P., Sassi² J.-F., Girault¹ R., Picard¹ S., Béline¹ F., Dabert¹ P.

¹Cemagref, UR GERE. 17 avenue de Cucillé, CS 64427, F-35044 Rennes, France.

Université Européenne de Bretagne, F-35000 Rennes, France.

²Centre d'Etude et de Valorisation des Algues, Presqu'île de Pen Lan - BP 3 - L'Armor-
Pleubian, F-22610 Pleubian, France.

Essai de valorisation de la biomasse algues (*Ulva* sp.) par co-digestion anaérobie avec du
lisier de porcs.

† corresponding author

Mailing adress: *Cemagref, UR GERE. 17 avenue de Cucillé, CS 64427, F-35044 Rennes, France.*

Phone: 33 2 23 48 21 45

Fax: 33 2 23 48 21 15

e-mail: *pascal.peu@cemagref.fr*

ABSTRACT

We investigated the feasibility and risk of hydrogen sulphide production of using seaweed stranded on beaches as a co-substrate for anaerobic digestion of pig slurry. The biochemical methane potential of *Ulva sp.* was measured and three-month co-digestion tests with pig slurry were carried out at pilot scale in the laboratory. The methanogenic potential of *Ulva sp.* was low compared to that of other potential co-substrates available for use by farmers: 148 $\text{Nm}^3\text{CH}_4\cdot\text{t}^{-1}$ of volatile solids or 19 $\text{Nm}^3\text{CH}_4\cdot\text{t}^{-1}$ of crude product. When used as a co-substrate, *Ulva sp.* seaweed did not notably disrupt the process of digestion. However, at equilibrium, the biogas produced by co-digestion of seaweed and pig manure (48%/52% w/w) contained 3.5% H_2S , making it unsuitable for energy recovery without treatment. An attempt was made to control these emissions by adding a specific inhibitor but without success due to acclimation of the microbial community.

INTRODUCTION

In Brittany (France), several coastal towns are struggling with the management of green waste from the sea, particularly the development of eutrophic marine plants, which leads to massive amounts of seaweed called "green tides" stranded on beaches. This is an annual phenomenon which usually occurs from late spring to early autumn. The total amount of stranded seaweed collected annually in these areas is 70 000 m³ (Charlier et al., 2007), but in the most affected bays, the amount collected on a single beach can reach 20 000 m³ per year (Charlier et al., 2007). In comparison, the amount of "terrestrial" green waste collected and treated in Brittany in 2001 was about 140 000 tons.

Due to its foul odour, natural anaerobic biodegradation of seaweed on the beach causes a nuisance to the neighbourhood. The particular metabolism of marine algae like green tide *Ulva sp.* results in a high plant sulphur (S) content (Percival and McDowell, 1967) leading to the emission of substantial amounts of gaseous sulphur compounds including hydrogen sulphide (H₂S), carbon disulphide and mercaptans (methyl sulphide and associates) during anaerobic decomposition of the algae (Charlier et al., 2007). These emissions are not only a source of bad odours but can also cause acute or chronic inhalation at the scene of green tides which are most often frequented by tourists. To manage these problems, local authorities collect the seaweed, and generally store it temporarily before spreading it on agricultural land. However, the sustainability of this chain management is compromised by the huge amount of seaweed, because during late spring and summer when it is collected, agricultural land is not available as it is occupied by crops (wheat and maize), and in addition, the salt and sand contents of the seaweed limit the quantities that can be spread on the land.

Different treatments have been explored to improve the management of this waste including anaerobic digestion (Charlier et al., 2007). Anaerobic digestion can remove some of the organic matter and produce a biogas mainly composed of methane (CH₄) and carbon dioxide (CO₂). Several studies have been performed using *Ulva sp.* as a substrate in anaerobic digesters in batch or continuous reactors (Briand and Morand, 1997; Bruhn et al., 2011; Habig et al., 1984). These authors demonstrated that *Ulva sp.* can be used in batch reactors or in completely stirred reactors. However, they also pointed out that (i) the methane yield is low, around 0.2 Nm³CH₄.kg⁻¹ volatile solids (VS) with a VS biodegradability of 50% (Morand and Briand, 1997; Rigonistern et al., 1990), (ii) the seasonality of the production of seaweed is a barrier to its use in continuous operating digesters and (iii) the potential high H₂S content of the biogas is expected to be an issue. Due to the low CH₄ yield of *Ulva sp.*, Briand and

Morand, (1997) and Morand et al., (2006) suggested pressing the seaweed and treating only the extracted juice. Other authors (Briand and Morand, 1997; Bruhn et al., 2011) used drying and grinding procedures or proposed co-digestion of seaweed with other organic substrates, such as livestock manures (Briand and Morand, 1997). Livestock manures are recognized as potentially useful substrates because of their nutrient content, which matches the levels required for anaerobic biomass growth, their high buffering capacity which would allow the pH of the digester to be stabilised, and their capacity to dilute solids, thereby facilitating the handling of solids and improving their digestibility (Angelidaki et al., 1997). Since several farm-based biogas plants which treat mainly animal manure are already running or under construction in areas close to the beaches where large amounts of seaweed are collected, the main objective of the present study was to analyse the feasibility and the benefit of anaerobic co-digestion of green tide *Ulva sp.* with pig slurry by (1) evaluating biodegradability of this seaweed during co-digestion with pig manure, (2) determining the fate of *Ulva sp.* sulphur content, focussing particularly on the production of H₂S (Bruhn et al., 2011), and (3) evaluating different techniques to reduce H₂S production.

MATERIALS AND METHODS

1. Substrates: *Ulva sp.* seaweed and pig slurry

The *Ulva* thalli used in this study of potential biochemical methanogenesis and for anaerobic digestion tests was collected shortly after stranding on Hillion beaches (Côtes d'Armor, Brittany, France). The main species of *Ulva* that can be harvested on these beaches are *Ulva armoricana* (Robic et al., 2009). Seaweed was picked up by hand and placed in plastic bags, without washing and then ground wet and centrifuged at 5 000 g for 20 min on the same day. A concentrated homogeneous mash was obtained that was used as a substrate for the experiments. The pig slurry used for all experiments was collected at a commercial farrowing-weaning-finishing pig farm (Côtes d'Armor, Brittany, France) (table 1).

2. Anaerobic digester procedure

For this study, three continuously stirred anaerobic reactors (R1-R3) were designed with a working volume of $3.5 \text{ l} \pm 0.05 \text{ l}$. The reactors were completely stirred and operated in

mesophilic conditions (38 °C + / -1 ° C) with a hydraulic residence time (HRT) of close to 30 days. The first digester (R1) was fed with a mixture of seaweed and pig slurry at a weight ratio of 48% and 52%, respectively. The second reactor (R2) was fed with the same mix as R1 and used to minimize H₂S emissions. To this end, a sulphate reduction inhibitor was added when the H₂S concentration in the biogas in the reactor exceeded 2%. The inhibitor used was potassium molybdate which was added sequentially to reach 3 mM in the digester (Isa & Anderson, 2005). The third reactor (R3) was fed with pig slurry only. Feeding procedures were based on each HRT. Feedings were carried out sequentially on the basis of one cycle of 2 or 3 days: 250 g of substrate was fed on the first day followed by one or two day(s) without feeding. The initial anaerobic sludge used as inoculum came from a pilot reactor with a higher capacity that had been in operation for over one year and had been fed with a mixture of pig slurry and horse feed. The three reactors were monitored for a period of three months. No significant technical incident occurred during the course of the experiment. The performance of each reactor was measured individually, including biogas production measured by wet tip gas meters (Massé et al., 2010). Biogas concentrations of CH₄, CO₂ and H₂S were determined by online chromatographic analysis (μGC, 4900 Varian USA) twice a day. For each reactor, different yields were calculated:

(1) Anaerobic biodegradability yield (ABY): $(\text{influentCOD} - \text{effluentCOD}) / \text{influentCOD}$.

This yield characterises the reduction in the total organic load of the substrate.

(2) Apparent anaerobic biodegradability yield (AABY): $\text{CH}_4\text{COD} / \text{influentCOD}$.

This second yield represents bioconversion of CH₄ in the influent organic matter.

(3) Real anaerobic biodegradability yield (RABY): $\text{CH}_4\text{COD} / \text{CH}_{4\text{max}}\text{COD}$.

This yield represents the balance between the best methane potential obtained during BMP tests and production of CH₄ by the reactor (table 3).

With:

influentCOD : chemical oxygen demand of the influent.

effluentCOD : oxygen demand of the effluent.

CH_4COD : chemical oxygen demand calculated from CH₄ produced in the reactor.

$\text{CH}_{4\text{max}}\text{COD}$: chemical oxygen demand calculated from CH₄ production with BMP.

3. Anaerobic biodegradation potential

The potential of *Ulva* anaerobic biodegradation was evaluated using two methods, the biochemical methanogenic potential and the so called "anaerobic respirometry" test.

3.1 Biochemical methanogenic potential (BMP)

Measuring BMP determines the maximum CH₄ production for a given substrate. The procedure used in our laboratory was developed by Vedrenne et al., (2008). It is based on measuring the pressure generated by biogas production in a closed bottle for a fixed volume of substrate, in anaerobic conditions, and in the presence of an inoculum, in mesophilic conditions (38 °C). The measurement was coupled with the determination of the CH₄ and CO₂ biogas content by gas chromatography (GC) (Lucas et al., 2007). BMP was carried out in triplicate with controls (inoculum only) until biogas production ceased, i.e. a period of 30 days for pig slurry and 40 days for seaweed.

3.2 Determination of the anaerobic biodegradation kinetics of *Ulva sp* using "anaerobic respirometry" tests

The principle of the "anaerobic respirometry" test is to determine the amount and biodegradation kinetic parameters associated with the various organic fractions (COD fractions) of a substrate by numerical interpretation of methane production rate (MPR) curves obtained in batch experiments. These curves are obtained with a pulse of substrates in the presence of a non-limiting amount of anaerobic biomass (Yasui et al., 2008; Girault et al., 2010).

To obtain MPR curves, batch reactors with about 1 L of working volume were used. They were continuously mixed and maintained in mesophilic conditions (38 °C). Biogas production was continuously monitored by pressure measurements, and biogas composition (CH₄ and CO₂ content) was analysed at intervals by GC (Lucas et al., 2007). Firstly, the reactors were filled with an inoculum from the anaerobic digester operated for over one year and fed with the mixture of pig slurry and horse feed used previously. Then the headspace of each reactor was purged with a mixture of N₂ and CO₂ gas (70%/30%). After one day of MPR stabilisation, a substrate pulse was injected and MPR was monitored for a period of 13 days. The amount of seaweed substrate added was calculated to obtain a pulse with a base weight

ratio of 0.2:1 (chemical oxygen demand of seaweed versus inoculum VS). To obtain the MPR curves specific to green seaweed, the control MPR obtained without substrate was subtracted. To interpret MPR curves for characterisation, a specific numerical model was used (Batstone et al., 2000; Girault et al., 2010). Fractionation of the substrate was obtained by optimising the numerical representation of experimental MPR curves. This procedure, which is described in detail in Girault et al. (2010), allows fractionation of the substrate organic matter into three categories: (i) one in which the hydrolysis step is not rate limiting, (ii) one in which the hydrolysis step is rate limiting (associated with a hydrolysis constant) and (iii) one for which the organic matter is refractory.

4. Physico chemical characterisation

Chemical oxygen demand (COD), total solids (TS), volatile solids (VS), Total suspended solids (TSS), volatile suspended solids (VSS), total Kjeldahl nitrogen (TKN) and total ammoniacal nitrogen (TAN) were determined using standard methods (APHA, 1998).

4.1 Carbon and sulphur elementary analysis

Elementary analyses of carbon (C) and S were performed using specific analysers (Thermo Flash 2000, USA and LECO SC-144DR, USA, respectively). For C determination, fresh samples were manually homogenised and mixed with alumina according to their dry matter content, placed in a tin capsule and burned in a combustion furnace (at about 1000 °C) under continuous pure oxygen flow causing oxidation of C into CO₂. The gas stream was then analysed by chromatography with catharometric detection. Calibration was done with different levels of aspartic acid. For S determination, similar procedures were used, but the sample was first dried at 105 °C and the solids were ground using a mortar. An aliquot was placed in a basket, covered with vanadium pentoxide and placed in the furnace (at 1350 °C) under continuous pure oxygen flow causing S oxidation into sulphur dioxide. The combustion gas, particularly sulphur dioxide content, was analysed by an internal infrared detector to determine the S content of the sample. Specific calibration was performed with known quantities of S from standard coal (LECO, USA).

4.2 Total dissolved sulphide (TDS)

TDS was determined following the procedure of Ubuka et al., (2001). Fresh samples of about 5 ml were mixed with zinc acetate (2M) to precipitate dissolved sulphides as zinc sulphide, with a mixing ratio of 1:5. The solution was centrifuged at 12 000 g for 20 min and the pellet was suspended in oxygen free distilled water. An aliquot (0.5 ml) of this suspension was then placed in a chromatography vial and acidified with pure concentrated phosphoric acid (25 µl). The tube was capped tightly and left for one hour at 80° C. During this procedure, zinc sulphide precipitate volatilised into the headspace as H₂S gas. The headspace of the vial was analysed by gas chromatography in a 30 m, CP-Sil CB 5, (Varian 450 GC, USA) equipped with a specific detector for S compounds (Pulsed Flame Photometric Detector). Calibration was performed using the same procedure with pure sodium sulphide.

4.3 Determination of sulphate, chlorides and volatile fatty acids (VFA)

For anion analysis, two liquid chromatography techniques were used, ionic chromatography (DX 120, Dionex, USA) fitted with an AS9HC column coupled with a conductimeter for sulphates and chlorides. Detection was by conductimetry coupled with post-column suppression of eluent ions. Samples were initially centrifuged at 20 000 g for 20 min and supernatants were diluted 25 times and injected into the ion chromatograph. After separation, peaks for each anion were integrated and quantified by comparing their area with those of standard anion solutions. For VFA determination, the same sample preparation technique was used and the soluble fraction was analysed by high performance liquid chromatography (Ultimate 3000, Dionex, USA) (Peu et al., 2004) for six VFA: acetic, propionic, butyric, isobutyric, valeric and isovaleric acids.

4.5 Biogas analysis

The biogas produced by the digesters was directly analysed by online analysers. Reactors were connected to the analyser with Silcosteel® (Restek, USA) tubing, fittings, and valves to prevent S adsorption. Biogas analysis was performed by gas chromatography (µGC 4900, Varian, USA) equipped with a dual module fitted with 10 m PPQ and 20 m 5Å Molecular sieve with micro-catharometric detectors. Helium was used as carrier gas allowing separation

and quantification of compounds such as CO₂, CH₄, and H₂S. Calibration was performed using reference mixtures of gases (Air Liquide, France).

RESULTS AND DISCUSSION

1. Characterisation of the substrates.

1.1 Physicochemical properties of the substrates used

The physical and chemical characteristics of pig slurry, *Ulva sp.* and the mixture used for these experiments are listed in table 1.

Total solids represented 22% of centrifuged ground seaweeds, whereas total solids of freshly harvested whole seaweed represented only 10%. TS of the seaweed pig slurry mixture represented 12.2%, of which minerals (mainly sand) accounted for around 50%.

Total COD of the mixture was 84 gO₂.kg⁻¹ while the values for slurry and seaweed were only 40 gO₂.kg⁻¹ and 140 gO₂.kg⁻¹, respectively. Soluble COD of the mixture was about one quarter of total COD. VFA content in the soluble fraction represented less than 15% of total soluble COD.

Nitrogen content of the mixture was higher than that of pig slurry alone. Green seaweed provided a significant amount of organic nitrogen accounting for 5 g.kg⁻¹. This TKN is typical of nitrophilic algal biomass harvested in eutrophic zones (Rigonistern et al., 1990). Habig et al., (1984) showed that nitrogen content of *Ulva sp.* is dependent on the nitrogen content of the culture media.

Total S of ground seaweed, pig slurry and for the mixture was respectively 6.4, 0.4 and 2.6 g S.kg⁻¹ of the crude product. Total S content of the *Ulva sp.* was similar to its nitrogen content accounting for 2.8% of TS vs. 2.3% of TS for nitrogen. In a recent publication by Bruhn et al., (2011), the S content of ash from *Ulva lactuca* was reported to be 1.95% of TS, which is in agreement with our results. The high S content in seaweed is directly related to (i) the presence of residual seawater with high sulphate contents (0.9 gS-SO₄²⁻.l⁻¹) and (ii) the particular chemical composition of *Ulva sp.* The *Ulva* cell wall comprises up to 29% of ulvan, a sulphated polysaccharide in which sulphate moieties account for between 16% and 23% of the total weight of the polysaccharide (Lahaye et al., 1999; Lahaye and Robic, 2007), and also

a significant amount of dimethylsulfoniopropionate, an S-containing metabolite whose content can reach 4% of the dry weight of the seaweed (Van Alstyne and Puglisi, 2007).

Table 1: Physico-chemical characteristics of the influent and effluent of the four reactors at equilibrium

| | COD | Soluble COD | Acetate | Propionate | Butyrate | Total carbon | NTK | NH ₄ | Total sulphur | Sulphates | Total sulphides | Chlorides | ph | TS | VS | SS | SVS |
|--|---|-----------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|---|---------------------|---------------------|---------------------|--|---------------------|----------------------|-------------|---|---|---|---|
| | g O ₂ .l ⁻¹ / g O ₂ .kg ⁻¹ | g O ₂ .l ⁻¹ | g.l ⁻¹ | g.l ⁻¹ | g.l ⁻¹ | g C.l ⁻¹ / g C.kg ⁻¹ | g N.l ⁻¹ | g N.l ⁻¹ | g S.l ⁻¹ | g S- SO ₄ .l ⁻¹ | g S.l ⁻¹ | g Cl.l ⁻¹ | | g.l ⁻¹ / g.kg ⁻¹ | g.l ⁻¹ / g.kg ⁻¹ | g.l ⁻¹ / g.kg ⁻¹ | g.l ⁻¹ / g.kg ⁻¹ |
| <i>Ulva sp.</i>¹ | 140.5 | - | - | - | - | 43.7 | 5.05 | 0.06 | 6.44 | - | - | - | - | 222 | 128 | - | - |
| Influent R1- R2² | 84.0 | 24.0 | 1.5 | 1.3 | 0.1 | 34.7 | 4.11 | 1.31 | 2.60 | 1.20 | 0.05 | - | 6.71 | 122.1 | 60.4 | 96.7 | 52.5 |
| Sd | 5.7 | 4.7 | | | | 3.2 | 0.15 | 0.08 | | - | - | | | 6.2 | 2.2 | 2.9 | 3.5 |
| Influent R3³ | 40.0 | 8.0 | 0.4 | 0.1 | 0.0 | 18.8 | 3.74 | 2.55 | 0.36 | 0.01 | 0.04 | - | 7.76 | 43.1 | 30.4 | 28.7 | 22.0 |
| Sd | 0.1 | 2.4 | | | | 0.7 | 0.00 | 0.02 | - | - | - | | | 0.6 | 0.4 | 3.5 | 2.7 |
| Effluent R1 | 64.5 | 13.8 | 2.1 | 0.3 | 0.01 | 29.5 | 4.96 | 2.78 | 1.16 | 0.21 | 0.45 | 5.55 | 7.60 | 66.0 | 34.7 | 62.3 | 39.0 |
| Sd | 12.0 | 3.3 | | | | 6.1 | 0.52 | 0.19 | 0.05 | 0.04 | - | 0.59 | | 13.7 | 8.1 | 4.5 | 2.4 |
| Effluent R2 | 67.9 | 17.8 | 2.7 | 0.4 | 0.9 | 30.5 | 4.87 | 2.56 | 1.37 | 0.64 | 0.43 | 6.43 | 7.50 | 68.7 | 39.9 | 79.3 | 42.0 |
| Sd | 9.1 | 3.6 | | | | 5.8 | 0.30 | 0.05 | 0.05 | 0.16 | 0.15 | 0.56 | | 23.1 | 9.1 | 15.67 | 1.6 |
| Effluent R3 | 25.7 | 12.0 | 0.1 | 0.1 | 0.0 | 11.3 | 3.67 | 2.85 | 0.39 | 0.01 | 0.02 | 1.31 | 7.76 | 30.9 | 16.8 | 12.4 | 8.4 |
| Sd | 2.0 | 1.1 | | | | 0.6 | 0.04 | 0.06 | 0.10 | 0.00 | 0.01 | 0.03 | | 9.81 | 2.27 | 1.39 | 0.72 |

¹ centrifuged and ground seaweed

² mixture 48% *Ulva* / 52% pig slurry weight basis

³ pig slurry alone

1.2 BMP and anaerobic biodegradability characterisation of *Ulva sp.*

The BMP of each substrate was measured separately. The average BMP for seaweed was $19 \text{ Nm}^3\text{CH}_4.\text{t}^{-1}$ of raw product, corresponding to $148 \text{ Nm}^3\text{CH}_4.\text{t}^{-1}\text{VS}$ or $146 \text{ Nm}^3\text{CH}_4.\text{t}^{-1}\text{COD}$. For pig slurry, the BMP was lower on a weight/crude basis: $7 \text{ Nm}^3\text{CH}_4.\text{t}^{-1}$ that is $310 \text{ Nm}^3\text{CH}_4.\text{t}^{-1}\text{VS}$ or $175 \text{ Nm}^3\text{CH}_4.\text{t}^{-1}\text{COD}$. Based on the BMP measurements, the expected methane yield for the mixture was calculated at $13 \text{ Nm}^3\text{CH}_4.\text{t}^{-1}$ or $139 \text{ Nm}^3\text{CH}_4.\text{t}^{-1}\text{VS}$, considering an arithmetic average. Similar batch experiments with anaerobic digestion of *Ulva sp.* (Habig et al., 1984) showed that methane production is directly correlated with the nitrogen content of the *Ulva* thalli. After 28 days of incubation at $32 \text{ }^\circ\text{C}$, the methane potential ranged between 130 and $200 \text{ Nm}^3\text{CH}_4.\text{t}^{-1}\text{VS}$. The lower was the N content of *Ulva sp.*, the higher was the methane yield. The methane yield of the anaerobic digestion of *Ulva sp.* was also analysed by Bruhn et al., (2011) with different pre-treatments (washing, maceration, chopping, thermal treatment and drying/grinding). After 42 days of incubation, the methane yield ranged from $157 \text{ Nm}^3\text{CH}_4.\text{t}^{-1}\text{VS}$ for thermally treated seaweeds to $271 \text{ Nm}^3\text{CH}_4.\text{t}^{-1}\text{VS}$ for unwashed macerated seaweeds. Briand and Morand, (1997) obtained results with similar magnitude with mesophilic anaerobic batch tests, with methane yields of between 96 and $177 \text{ Nm}^3\text{CH}_4.\text{t}^{-1}\text{VS}$ respectively for washed seaweeds and dried ground pre-treatments until the production of biogas ceased. Considering the chemical composition of *Ulva sp.*, Briand and Morand, (1997) estimated that the maximum theoretical methane yield was $400 \text{ Nm}^3\text{CH}_4.\text{t}^{-1}\text{VS}$. For pig slurry, the BMP we measured was very close to values in the literature. Several authors (Béline et al., 2010; Vedrenne et al., 2006) reported values of between 8 and $10 \text{ Nm}^3\text{CH}_4.\text{t}^{-1}$ or between 244 and $343 \text{ Nm}^3\text{CH}_4.\text{t}^{-1}\text{VS}$.

Anaerobic biodegradation was determined by anaerobic respirometry. Data for a pulse of seaweed substrate are presented in figure 1 in terms of the methane production rate observed for a 1l batch reactor. The pulse of substrate was injected at the beginning of the experiment ($t = 0$ day). After the seaweed was added, a peak of production resulting from an increase in the methane production rate was observed. This peak was directly linked to the degradation of the readily biodegradable fraction of organic matter for which hydrolysis is not rate-limiting (Girault et al., 2010). Two days after addition of the substrate, a decrease in the methane production rate was observed which then continued throughout the 13 days of the experiment. This decrease in the methane production rate can be directly linked to the digestion of a fraction of the organic matter that is not readily biodegraded and for which hydrolysis is strongly rate limiting. The numerical interpretation of these results in terms of fractionation of

total COD is presented in table 2. It was obtained by fitting the results of the model to the experimental data (figure 1).

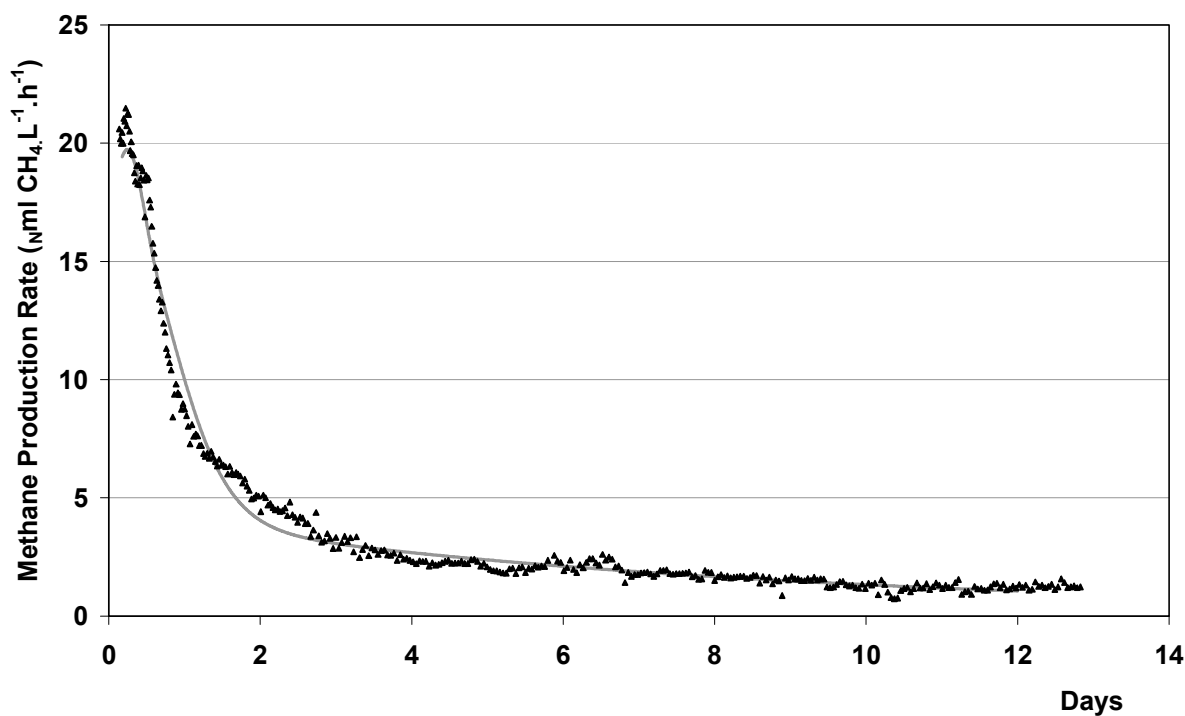


Figure 1

Rate of methane production obtained after a pulse of *Ulva sp.* (experimental versus modelled results).

Table 2
Kinetic fractionation of *Ulva sp.*

| | Fresh <i>Ulva sp.</i> content (g O ₂ .l ⁻¹) | (%) |
|---|---|------|
| Total COD | 140.5 | 100% |
| COD fraction for which hydrolysis step was not limiting | 24 | 17% |
| COD fraction for which hydrolysis step was limiting (associated with a hydrolysis constant of 0.12d ⁻¹) | 47 | 33% |
| Refractory fraction | 69.5 | 49% |

The total biodegradable COD fraction was about 50% of the total COD of which approximately 17% was degraded with no rate-limiting effect of the hydrolysis step. Anaerobic digestion of the other 33% was rate limited by the initial hydrolysis step. Hydrolysis was performed with a constant of 0.12 d^{-1} . It should be noted that this rate is the lowest reported in the literature to date (Girault et al., 2010). This different behaviour can be explained both by the chemical composition of *Ulva sp.* and by phenomena related to physical accessibility to the substrate.

Based on the BMP tests, the amount of COD convertible into methane during anaerobic biodegradation was estimated at 54 g COD.kg^{-1} of crude product for seaweed and 20 g COD.kg^{-1} for pig slurry representing respectively 38 and 50% of total COD. The fractionation observed in anaerobic respirometry showed that 50% of the total COD was biodegradable. Estimates of biodegradable organic matter using these two methods differed. This difference could be explained by the fact that BMP tests continued until biogas production ended. However, it is difficult to evaluate the exact time production ends particularly for substrates with a large poorly biodegradable fraction. With anaerobic respirometry, numerical interpretation allows the behaviour of very slowly biodegradable fractions to be predicted more accurately.

From a process point of view, our results suggest that in a real digester, the fraction of COD for which the hydrolysis is not limiting would be systematically degraded. However, the residence time in the reactor would have a significant impact on the proportion of COD for which the hydrolysis is limiting. Increasing HRT beyond 30 days would result in an increase in COD degradation. Finally, our experiments highlighted the fact that a large part of the organic matter of *Ulva sp.* is refractory to anaerobic biodegradation.

2. Reactor experiments

2.1 Organic load rate (OLR) applied to anaerobic digesters

Table 1 lists the physicochemical characteristics of influents and effluents collected from the three reactors. Samples were taken when the reactors reached steady state, at least 80 days after the beginning of the experiments, which corresponds to 2.5 times the HRT (33 ± 0.7 d). The total OLR applied to each reactor averaged $2.5 \text{ g.l}^{-1}.\text{d}^{-1}$ of total COD ($1.6 \text{ g VS.l}^{-1}.\text{d}^{-1}$) for R1 and R2 and around $1.2 \text{ g.l}^{-1}.\text{d}^{-1}$ for R3. Based on BMP results for the mixed substrates, the biodegradable organic load was $1.2 \text{ g COD.l}^{-1}.\text{d}^{-1}$ for R1 and R2 and $0.6 \text{ g COD.l}^{-1}.\text{d}^{-1}$ for R3. The addition of the seaweed to the R1 and R2 substrates was limited by the TS content of the mixture (12%). With a high TS content, infinitely mixed conditions in the reactors were difficult to maintain. Above 10% TS content, mixing is not efficient and transferring liquid by pumping becomes difficult (Moletta, 2008). Moreover, the high mineral content (principally sand from harvested seaweeds) which accumulated in the reactor reduced the working volume and the hydraulic residence time.

2.2 Performance of the reactors

The performance of anaerobic digesters was evaluated by several parameters after hydraulic stabilisation (table 3).

Table 3
Operating conditions and reactor performances

| Reactors | Hydraulic residence time | Organic load (COD) | Biodegradable organic load (COD) | Anaerobic biodegradability yield | Apparent anaerobic biodegradability yield | Real anaerobic biodegradability yield |
|----------|--------------------------|--|--|----------------------------------|---|---------------------------------------|
| | d^{-1} | $\text{g O}_2.\text{l}^{-1}.\text{l}^{-1}$ | $\text{g O}_2.\text{l}^{-1}.\text{l}^{-1}$ | % | % | % |
| R1 | 32.2 | 2.61 | 1.19 | 33.9 | 37.3 | 82.0 |
| R2 | 33.3 | 2.52 | 1.15 | 32.1 | 34.3 | 75.5 |
| R3 | 33.5 | 1.20 | 0.62 | 46.0 | 42.0 | 80.5 |

The anaerobic biodegradability yield (ABY) was 32-33% in reactors operating with green seaweed and 46% in reactor R3. These results show that only 1/3 of incoming organic matter was degraded, which is in agreement with the results obtained with BMP tests and anaerobic respirometry. Despite the long hydraulic residence time applied, most of the organic matter fed into the reactors ended up in the digestates (table 3). In the literature, equivalent reactor experiments were performed with substrates similar to the mixture used in this study (*Ulva sp.* dried or ground plus animal effluent) and VS reductions ranged between 39% and 63% (Briand and Morand, 1997; Rigonistern et al., 1990).

The methane production recorded at hydraulic equilibrium allowed calculation of AABY and RABY (table 3). AABY was 34% in R2 and 42% in R3. These yields are close to ABY and reflect the fact that organic matter is mainly transformed into methane. RABY were much higher and ranged between 75 and 80%. The highest yield was obtained in R1 and the lowest in R2. These yields represent methane recoveries between those of BMP and the reactor experiment and validated results in the technical literature stating that, in the best possible conditions, not more than 80% of the expected BMP can be recovered in a real reactor.

Characterisation of the VFAs can also be considered as a performance indicator for anaerobic digesters. Accumulation of acetic, propionic or butyric acid is an indicator of a possible disruption of the digestion process (Sosnowski et al., 2008). In our experiments, fatty acids were observed in both influents and effluents. Total VFA concentration in effluents ranged between 2.5 and 3.2 g l^{-1} for R1 and R2 respectively and was close to 0.1 for R3 (table 1). Reactors fed with seaweed thus contained high levels of VFAs that were not toxic for methane producers as long as the buffer capacity was sufficient to maintain the system (table 1).

2.3 Carbon, nitrogen (N) and sulphur balances

Carbon, N and S balances were performed for each reactor. Elemental analysis was used to estimate the C content of influents, while the C content of effluents was the sum of biogas C content (C-CH₄ and C-CO₂) and elemental analysis of digested matter. Carbon recoveries between reactor input and output ranged between 80% and 103% with an average of 95% (table 4). Influent C in each reactor was thus fully recovered. The proportion of C emitted as CH₄ was low and ranged between 15% and 20% of influent C. In accordance with ABY, a large proportion of the input carbon was thus recovered in the digestates.

A similar approach was used for the N balance (table 4).

Table 4
Carbon, nitrogen and sulphur balances

| Reactors | Carbon balance | Nitrogen balance | Sulphur balance |
|----------|----------------|------------------|-----------------|
| | % | % | % |
| R1 | 102.8 | 104.0 | 75.8 |
| R2 | 100.9 | 99.2 | 62.6 |
| R3 | 79.7 | 98.1 | 102.2 |

Nitrogen mass balances ranged between 98% and 104% with an average of 100%. The influent nitrogen load in the reactors was fully recovered in the digestates. Potential losses in gaseous form, including ammonia volatilisation, were negligible. Interestingly, the ammonium concentrations were higher in all the digestates than in the influents (table 1), particularly in reactors fed with green seaweed whose ammonium content is twice as high. These results demonstrate that part of the organic nitrogen contained in seaweed is mineralised during the process.

The S balance in all reactors was also assessed (table 3). This balance was based on elemental analysis of total S in all influents as well as in digestates, in addition to the S content of the biogas, which was quantified but limited to the speciation of H₂S. S recoveries were less than those of carbon and nitrogen, especially in reactors fed with green seaweed, whereas the S balance was better in R3, which was fed with only pig slurry (102%). There are several possible explanations for this lack of S in the balance. Firstly, S emission in the biogas may not be limited to H₂S and other S-containing gaseous forms are possible emitted in the biogas but were not taken into account in our balance. These include dimethyl sulphide, carbon disulphide, mercaptans, etc. Secondly, total S determination may have been biased by the high TDS content (table 1), which could have volatilised during the drying procedure before elemental analysis.

2.4 Methane production yields and potential inhibitions

The average methane concentrations in the biogas were respectively 53, 53, and 52% in R1, R2, and R3. Coupled with biogas production, the specific methane yield for *Ulva sp.* was calculated by subtracting the methane produced by pig slurry only (R3). In R1, the specific methane yield from seaweed was $128 \text{ Nm}^3\text{CH}_4\cdot\text{t}^{-1}$ COD or $126 \text{ Nm}^3\text{CH}_4\cdot\text{t}^{-1}$ VS. This yield is at the lower end of the values reported in the literature (Briand and Morand, 1997). For completely stirred digesters, the methane yields published by these authors ranged between 182 and $203 \text{ Nm}^3\text{CH}_4\cdot\text{t}^{-1}$ VS either with green seaweeds as the only substrate or for seaweed-manure mixes. Methane yield reached a maximum production rate of $347 \text{ Nm}^3\text{CH}_4\cdot\text{t}^{-1}$ VS in Rigonistern et al., (1990), with *Ulva Sp.* as the only substrate. These higher methane yields may be due to the various pre-treatments used in those experiments which improved biodegradability.

In our study, green seaweed was collected fresh from beaches. We did not use any pre-treatment technique, in order to comply with a scenario in which seaweeds would be treated in a fairly straightforward process, without storage or time consuming pre-treatments. Only a centrifugation step was added in order to mimic water leaching during transportation from collection site to the treatment plant.

The methane yields measured in our reactor experiments were compared with those measured during BMP tests and 80% of the BMP yield was recovered in reactors. These results suggest that there was no co-digestion synergy between seaweed and manure. Our second conclusion is that no strong inhibition occurred despite the presence of high concentrations of salt (close to 6 g l^{-1} of chloride), sulphides (close to 0.5 g S.l^{-1}) and ammonium (2.8 g N.l^{-1}) (table1). High concentrations of sodium and chloride are traditionally considered to be inhibitors of anaerobic treatment (Rinzema et al., 1988). Indeed, sodium concentrations above 10 g.l^{-1} strongly inhibit methanogenesis (Kugelman and McCarty, 1965). However, Omil et al., (1996) could not demonstrate a clear toxic effect of salt during pilot plant treatment of anaerobic effluents from a fish processing plant. Moreover, these authors showed that adaptation of the bacterial flora involved in the process was possible, and that the efficiency of such a process was highly dependent on the strategy implemented for the adaptation of the biomass to high salinity rates. These results are in agreement with others reported in the literature, especially those dealing with anaerobic digestion in halophilic environments.

Concerning dissolved sulphides, high concentrations are often described in the literature as potent inhibitors of methanogenesis. Under anaerobic conditions, sulphates are consumed by

sulphate reducers to produce hydrogen sulphide (Elferink et al., 1994). In addition to this form of production, hydrogen sulphide can also result from anaerobic reduction of sulphur-containing amino acids (Mackie et al., 1998). In anaerobic processes, the toxicity of H₂S, or more precisely dissolved H₂S (H₂S_d), occurs directly through inhibition of micro-organisms present in the process (Chen et al., 2008). Despite the high variability of data in the literature, our literature review revealed that the H₂S_d concentration that inhibits 50% of the methanogenesis activity is 200 mgS.l⁻¹ at pH 7 and 50 mgS.l⁻¹ at pH 8 (Koster et al., 1986; Visser et al., 1993). Our data in table 1 show that the H₂S_d concentration in R1 was about 99 mgS.l⁻¹ for a pH value of 7.6. This concentration should result in significant inhibition of methane production. However, measurements made in R1 did not reveal any inhibitory effect but suggest that the sludge acclimatised to this significant amount of H₂S_d. Similar results were published by Rigonistern et al., (1990). These authors studied the feasibility of anaerobic digestion of *Ulva sp.* in a continuous stirred reactor. In their study, high concentrations of dissolved sulphide were measured (180-350 mg S.l⁻¹) without noticeable alteration of biogas production.

Chen et al., (2008) showed that anaerobic digestion is also sensitive to high levels of ammonium and especially to high concentrations of free ammonia. In our experiments, the free ammonia concentrations measured in the digestates were 68 mgN.l⁻¹ for R1 but did not disrupt methanogenesis. This result is consistent with already published results (Omil et al., 1996).

In R2, the specific methane yield measured (110 N³CH₄.t⁻¹COD) was lower than in R. The addition of a sulfate-reduction inhibitor to R2 could have had a negative impact on methane production. Inhibition of methanogenesis by molybdate has already been reported in the literature, especially by Isa and Anderson, (2005). These authors showed that molybdate not only inhibits sulfate-reducing microorganisms, but also partly hinders methanogenic flora. These authors consider molybdate to be even more toxic for the micro-organisms involved in methanogenesis (bactericidal effect) than for sulfate-reducers (bacteriostatic effect) and cause a drop in process efficiency. In our trials, the negative impact of molybdate appeared to be lower.

2.5 Hydrogen sulphide production and control

The hydrogen sulphide concentrations in the biogas generated in reactors R1, R2 and R3 are shown in figures 2, 3 and 4 respectively. The addition of seaweed had a serious impact on the

H₂S content of the biogas. At HRT equilibrium, the average H₂S concentration in the biogas was 34,500, 16,300 and 2,100 ppm, in respectively R1, R2 and R3. In R1, 39% of total influent S was converted into H₂S gas and recovered in the biogas, whereas 15% and 7% were found in the digestates as dissolved sulphide and sulphate, respectively. Sulphates fed to the reactor were not recovered in the effluent and were probably biologically transformed by sulphate-reducing bacteria into sulphides by dissimilatory reduction and then partially transferred to the biogas phase. Consumption of SO₄²⁻ alone was not sufficient to explain all the H₂S produced in the biogas and in the digestate. Other S-containing substrates were thus consumed including part of the ulvan originally present.

The fate of sulphur and the production of H₂S during anaerobic digestion of green seaweeds is not well documented. Briand and Morand, (1997) mentioned that levels of H₂S measured in the biogas produced during anaerobic digestion of *Ulva sp.* alone or mixed with manure was about 10 000 to 20 000 ppm. Rigonistern et al., (1990) published similar results. Depending on the loads applied, the concentrations of hydrogen sulphide in the biogas ranged between 5 000 and 10 000 ppm without sulphur balance.

High concentrations of H₂S are highly problematic for the further use of biogas. The biogas produced in farm-based plants is mainly used to produce electricity and heat (Diaz et al., 2010). Among the undesirable substances present in the biogas, hydrogen sulphide is by far the most problematic because of its toxicity, its corrosive action on the equipment and the fact that its combustion leads to the production of sulphur dioxide (Cirne et al., 2008). Co-generation engines are very sensitive to hydrogen sulphide. The maximum concentration of H₂S specified by co-generator manufacturers is around 150 mg.m⁻³ (close to 100 ppm). The use of biogas from agricultural digesters is thus only possible after treatment and prior processing. One effective treatment, which is widely used in farm biogas plants, is biological desulphurisation. This technique is based on the introduction of a limited volume of air into the gasometer. Hydrogen sulphide is then oxidised into elementary sulphur or sulphate by the oxygen contained in the air thanks to specific sulpho-oxidizing microorganisms like *Thiomicrospira sp.* or *Thiobacillus sp.* (Cirne et al., 2008; Diaz et al., 2010). The air and the hydrogen sulfide in the gasometer have to be properly mixed. If too much air is introduced, the gas mixture becomes explosive. Furthermore, dilution of the biogas is not desirable because it leads to problems of combustibility. Cirne et al. (2008) stated in their literature review that treatment with biocatalysis depends on the residence time of biogas in the gasometer as well as on its initial H₂S concentration. Based on reaction stoichiometry, Diaz et al., (2010) considered that 1 mole of H₂S reacts with 0.5 mole of di-oxygen. With a high H₂S

content in the biogas (1% v/v), the considerable dilution of biogas required was not suitable for further combustion in an engine. However, these authors managed the biological process with a mixture of pure oxygen and air, thereby decreasing the H₂S content in the biogas to 120 and 350 mg.m⁻³. Even with these recent improvements in biological desulphurisation, H₂S concentrations as high as the ones measured in our experiments still cannot be purified by biocatalysis. Other treatments, such as basic traps, metal straw, will be needed (Cirne et al., 2008).

Consequently, reactor R2 was designed with the aim of limiting the production of hydrogen sulphide to 2% of the biogas content. The method chosen was a one-off addition of a specific inhibitor of biological sulphate reduction: potassium molybdate. Figure 3 shows the monitoring of H₂S concentrations in the biogas in R2. After each molybdate injection, the H₂S concentration dropped to below 5,000 ppm. However, after a few days, H₂S production started again and rose above the 2% threshold, thus requiring a new addition of inhibitor (day 40). The time between each addition of the inhibitor had to be reduced from 30 days to 2 days at the end of the experiment. Molybdate thus appeared to be efficient for partial inactivation of the dissimilatory reduction pathway but the sulphate reducer's biomass adapted too fast to be a good tool to control hydrogen sulphide production over long periods.

Figure 4 shows the concentrations of hydrogen sulphide found in the reactor that was fed with manure only. These concentrations are much lower than those found in the biogas produced by R1 and R2. Sulphate content was very low in the manure: 10 mgS-SO₄²⁻.l⁻¹. Alone, this small amount cannot explain the overall production of H₂S. The main source of production is not the sulphate-reducing pathway but the anaerobic reduction of sulphur-containing amino acids in undigested proteins (Mackie et al., 1998).

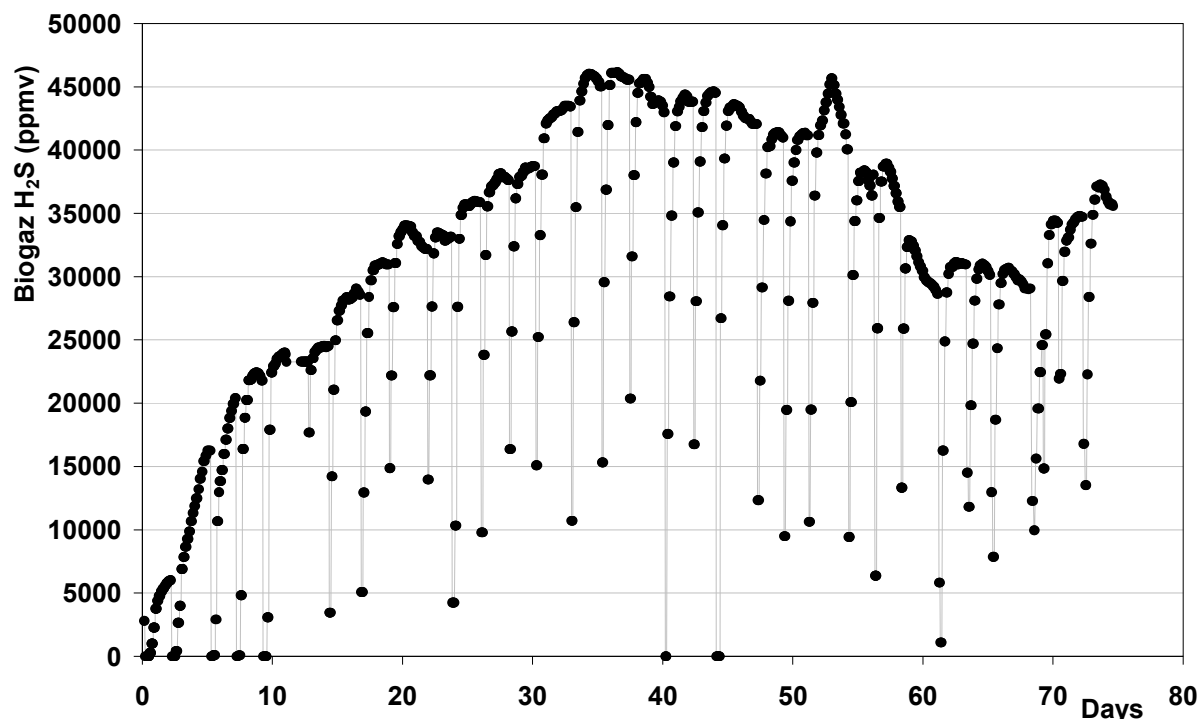


Figure 2:
Concentration of H₂S in biogas produced by R1

CONCLUSION

The organic matter content of harvested seaweed was poorly biodegraded. Moreover, seaweed collected had a high mineral content which limited its potential as a co-substrate for anaerobic digestion. The production of hydrogen sulphide by *Ulva* seaweed as a co-substrate was very high. The biogas produced contained up to 3.5% H₂S, making it unsuitable for energy recovery without specific treatment. Control of the production of hydrogen sulphide does not appear to be feasible by specific inhibition of sulphate-reducing flora. Finally, introduction of nitrogen by seaweed in the effluent management chain is also problematic for agronomical valorisation especially in areas with structural surplus.

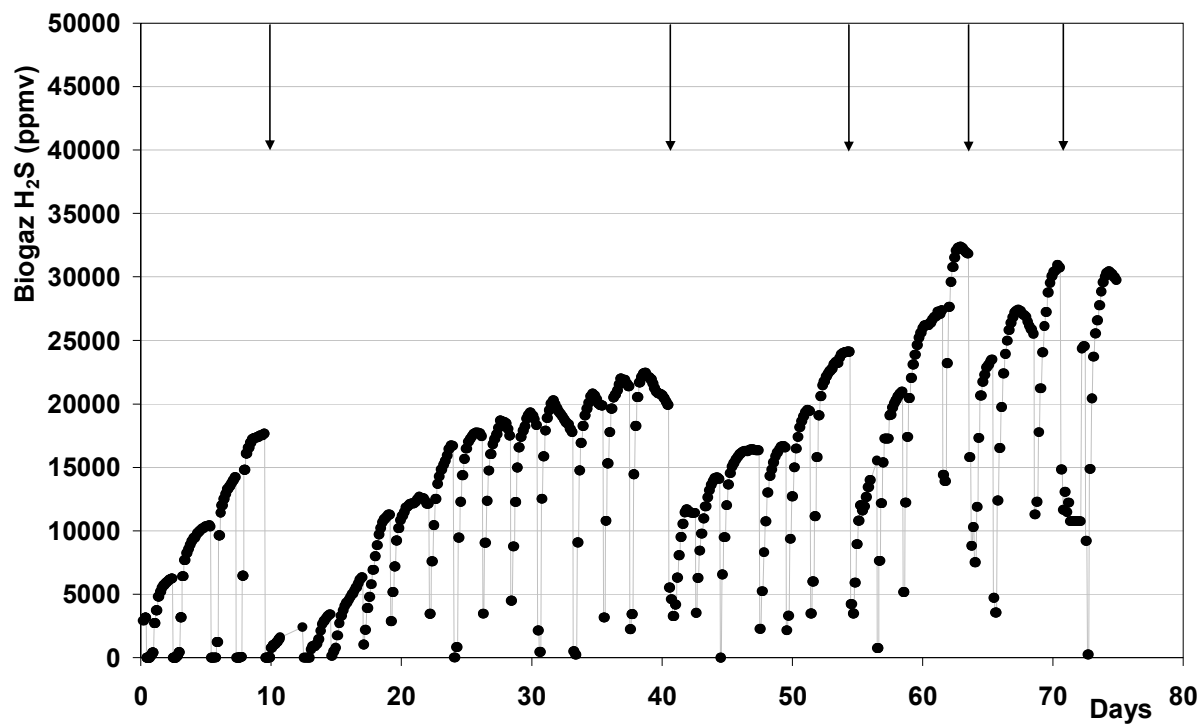


Figure 3

Concentration of H₂S in biogas produced by R2 (arrows show when molybdate was added)

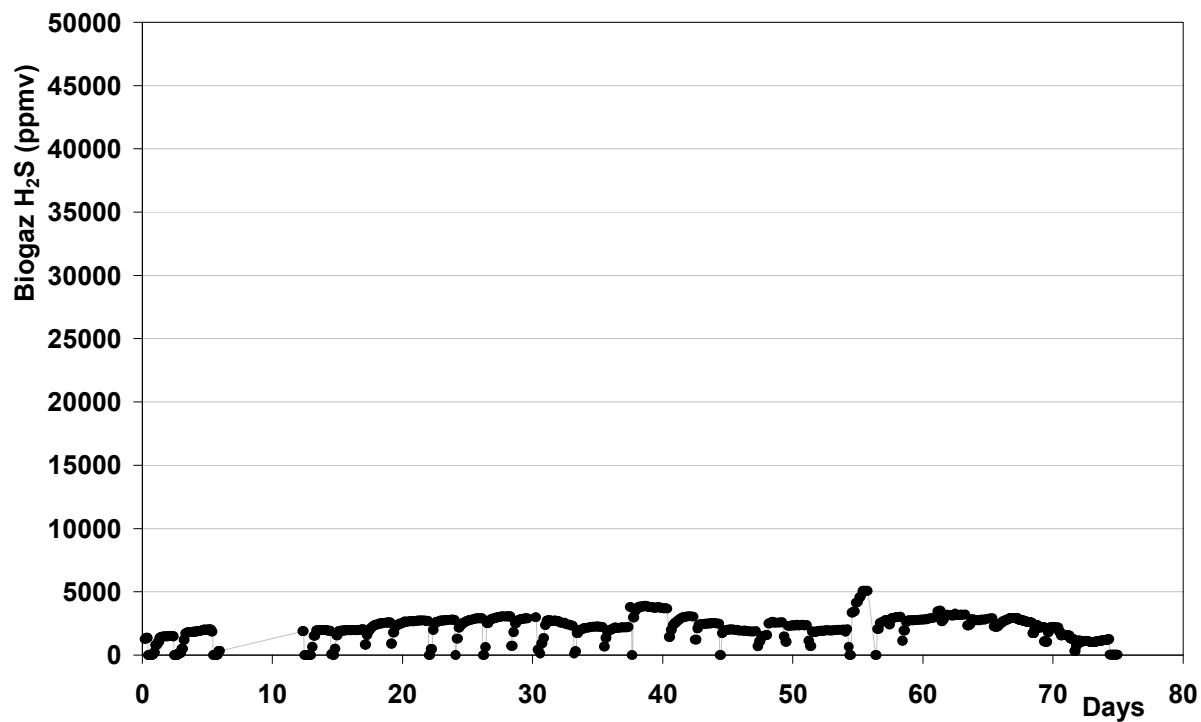


Figure 4:

Concentration of H₂S from biogas produced by R3

REFERENCES

- APHA. 1998 Standards methods for the Examination of Water and Wastewater. 20th ed. American Public Health Assoc., Washington, DC.
- Angelidaki, I., Ellegaard, L., Ahring, B.K. 1997. Modelling anaerobic codigestion of manure with olive oil mill effluent. *Water Science and Technology*, 36(6-7), 263-270.
- Batstone, D.J., Keller, J., Angelidaki, I., Kalyuzhnyi, S.V., Pavlostathis, S.G., Rozzi, A., Sanders, W.T.M., Siegrist, H., Vavilin, V.A. 2000. *ADMI - Anaerobic Digestion Model N°1*. IWA Publishing, London.
- Béline, F., Dabert, P., Peu, P., Girault, R. 2010. La méthanisation des effluents d'élevage en France et en Europe : principe, état des lieux et perspectives. *Fourrages*, 203, 155-161.
- Briand, X., Morand, P. 1997. Anaerobic digestion of *Ulva sp.* 1. Relationship between *Ulva* composition and methanisation. *Journal of Applied Phycology*, 9(6), 511-524.
- Bruhn, A., Dahl, J., Nielsen, H.B., Nikolaisen, L., Rasmussen, M.B., Markager, S., Olesen, B., Arias, C., Jensen, P.D. 2011. Bioenergy potential of *Ulva lactuca*: Biomass yield, Charlier, R.H., Morand, P., Finkl, C.W., Thys, A. 2007. Green tides on the Brittany coasts. *Environmental Research, Engineering and Management*(3), 52-59.
- Chen, Y., Cheng, J.J., Creamer, K.S. 2008. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresource Technology*, 99(10), 4044-4064.
- Cirne, D.G., van der Zee, F.P., Fernandez-Polanco, M., Fernandez-Polanco, F. 2008. Control of sulphide during anaerobic treatment of S-containing wastewaters by adding limited amounts of oxygen or nitrate. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 7(2), 93-105.
- Diaz, I., Lopes, A.C., Perez, S.I., Fdz-Polanco, M. 2010. Performance evaluation of oxygen, air and nitrate for the microaerobic removal of hydrogen sulphide in biogas from sludge digestion. *Bioresource Technology*, 101(20), 7724-7730.
- Elferink, S., Visser, A., Pol, L.W.H., Stams, A.J.M. 1994. Sulfate Reduction in Methanogenic Bioreactors. *Fems Microbiology Reviews*, 15(2-3), 119-136.
- Girault, R., Steyer, J.-P., Zaher, U., Sadowski, A.-G., Nopens, I., Béline, F., Zak, A., Kujawski, O., Holm, N.C., Rönner-Holm, S.G.E. 2010. Influent fractionation and parameter calibration for ADM1: Lab-scale and full-scale experiments. *Wastewater treatment modelling seminar*, Mont-Saint-Anne, Quebec, Canada. IWA/WEF.
- Habig, C., Debusk, T.A., Ryther, J.H. 1984. The Effect of Nitrogen-Content on Methane Production by the Marine-Algae *Gracilaria-Tikvahiae* and *Ulva Sp.* *Biomass*, 4(4), 239-251.
- Isa, M.H., Anderson, G.K. 2005. Molybdate inhibition of sulphate reduction in two-phase anaerobic digestion. *Process Biochemistry*, 40(6), 2079-2089.
- Koster, I.W., Rinzema, A., De Vegt, A.L., Lettinga, G. 1986. Sulfide inhibition of the methanogenic activity of granular sludge at various pH-levels. *Water Research*, 20(12), 1561-1567.
- Kugelman, I.J., McCarty, P.L. 1965. Cation toxicity and stimulation in anaerobic waste treatment. *Journal of Water Pollution Control Federation*, 31(1), 97-116.
- Lahaye, M., Cimadevilla, E.A.C., Kuhlenkamp, R., Quemener, B., Lognone, V., Dion, P. 1999. Chemical composition and C-13 NMR spectroscopic characterisation of ulvans from *Ulva* (*Ulva*les, Chlorophyta). *Journal of Applied Phycology*, 11(1), 1-7.
- Lahaye, M., Robic, A. 2007. Structure and functional properties of Ulvan, a polysaccharide from green seaweeds. *Biomacromolecules*, 8(6), 1765-1774.

- Lucas, T., Le Ray, D., Peu, P., Wagner, M., Picard, S. 2007. A new method for continuous assessment of CO₂ released from dough baked in ventilated ovens. *Journal of Food Engineering*, 81(1), 1-11.
- 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(5), 1331-1342.
- Massé, D., Gilbert, Y., Savoie, P., Bélanger, G., Parent, G., Babineau, D. 2010. Methane yield from switchgrass harvested at different stages of development in Eastern Canada. *Bioresource Technology*, 101(24), 9536-9541.
- Moletta, R. 2008. *La Méthanisation. Tech et Doc ed.* Lavoisier, Paris.
- Morand, P., Briand, X., Charlier, R.H. 2006. Anaerobic digestion of *Ulva sp* 3. liquefaction juices extraction by pressing and a technico-economic budget. *Journal of Applied Phycology*, 18(6), 741-755.
- Omil, F., Mendez, R., Lema, J.M. 1996. Anaerobic treatment of seafood processing waste waters in an industrial anaerobic pilot plant. *Water Sa*, 22(2), 173-181.
- Percival, E., McDowell, R.H. 1967. *Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides.* Academica Press, London and New York.
- Peu, P., Beline, F., Martinez, J. 2004. Volatile fatty acids analysis from pig slurry using high-performance liquid chromatography. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 84(13), 1017-1022.
- Rigonistern, S., Rismondo, R., Szpyrkowicz, L., Ziliograndi, F., Vigato, P.A. 1990. Anaerobic-Digestion of Nitrophilic Algal Biomass from the Venice Lagoon. *Biomass*, 23(3), 179-199.
- Rinzema, A., Vanlier, J., Lettinga, G. 1988. Sodium Inhibition of Acetoclastic Methanogens in Granular Sludge from a Uasb Reactor. *Enzyme and Microbial Technology*, 10(1), 24-32.
- Robic, A., Sassi, J.F., Dion, P., Lerat, Y., Lahaye, M. 2009. Seasonal Variability of Physicochemical and Rheological Properties of Ulvan in Two *Ulva* Species (Chlorophyta) from the Brittany Coast. *Journal of Phycology*, 45(4), 962-973.
- Sosnowski, P., Klepacz-Smolka, A., Kaczorek, K., Ledakowicz, S. 2008. Kinetic investigations of methane co-fermentation of sewage sludge and organic fraction of municipal solid wastes. *Bioresource Technology*, 99(13), 5731-5737.
- Ubuka, T., Abe, T., Kajikawa, R., Morino, K. 2001. Determination of hydrogen sulfide and acid-labile sulfur in animal tissues by gas chromatography and ion chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 757(1), 31-37.
- Van Alstyne, K.L., Puglisi, M.P. 2007. DMSP in marine macroalgae and macroinvertebrates: Distribution, function, and ecological impacts. *Aquatic Sciences*, 69(3), 394-402.
- Vedrenne, F., Beline, F., Bernet, N. 2006. Behaviour of the organic matter and related methane production during anaerobic degradation of stored slurries. *DIAS Report, Plant Production*(123), 217-220.
- Vedrenne, F., Beline, F., Dabert, P., Bernet, N. 2008. The effect of incubation conditions on the laboratory measurement of the methane producing capacity of livestock measurement wastes. *Bioresource Technology*, 99, 146-155.
- Visser, A., Nozhevnikova, A.N., Lettinga, G. 1993. Sulphide inhibition of methanogenic activity at various pH levels at 55°C. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 57(1), 9-13.

Chapitre 6 : Conclusions et perspectives

Une des principales problématiques environnementales des élevages porcins concerne les émissions gazeuses. Ainsi de nombreux travaux ont été consacrés aux émissions de NH₃, CO₂, N₂O et CH₄ dans les bâtiments d'élevage ainsi qu'au cours du stockage et de l'épandage du lisier. Cependant, un autre gaz, l'hydrogène sulfuré, présent dans l'air ambiant des bâtiments d'élevage et dans les fosses de stockage, est particulièrement préoccupant. Il est en effet dangereux pour la santé des éleveurs, il participe aux mauvaises odeurs et il peut entraver le bon fonctionnement des processus biologiques intervenant dans la transformation du lisier. Ainsi, au regard des données bibliographiques, deux postes clés de la gestion des effluents sont particulièrement concernés par ce gaz : le stockage en fosse et la méthanisation du lisier en présence de co-substrats. Le danger est alors associé à la toxicité du gaz et à sa participation aux mauvaises odeurs (stockage en fosse) ou à la corrosion des équipements de valorisation énergétique (méthanisation). Toutefois, la production d'hydrogène sulfuré n'est pas limitée à ces deux postes et concerne l'ensemble de la filière de l'élevage porcine. Il est donc essentiel, dans un premier temps, de bien comprendre l'origine de ce gaz ainsi que les facteurs qui influencent sa formation afin de maîtriser sa production.

Dans ce contexte, le Cemagref de Rennes et l'Ademe ont élaboré un projet de recherche intitulé "La méthanisation des effluents d'élevage et la production d'hydrogène sulfuré" qui se focalisait initialement sur les digesteurs anaérobies à la ferme et qui s'est élargie, par la suite, à l'ensemble de la filière de gestion du lisier de porc. Ce travail de thèse, initié fin 2007, s'inscrit dans ce projet.

Historiquement, les études consacrées aux pollutions atmosphériques générées par la gestion des effluents d'élevage étaient focalisées sur la caractérisation des molécules responsables des nuisances olfactives ou ayant un impact environnemental tel que l'acidification des sols ou la participation à l'effet de serre. Après cette étape nécessaire à l'identification des pollutions couplée à la détermination des flux gazeux générés, les travaux de recherche se sont situés plus en amont, en considérant que les pollutions atmosphériques étaient la conséquence du choix des intrants dans le système d'élevage et notamment des aliments fournis aux animaux. Cette démarche scientifique, qui consiste à optimiser les stratégies alimentaires à des fins environnementales, nécessite de prendre en compte non seulement l'impact sur les effluents mais aussi les effets sur les animaux. Elle a d'abord été explorée pour réduire les émissions d'ammoniac. Il a ainsi été mis en évidence une relation directe entre le taux d'incorporation de protéines dans les rations alimentaires et les niveaux d'excrétion d'azote ammoniacal par les

animaux et *a posteriori* les émissions d'ammoniac engendrées par le stockage et l'épandage du lisier. Ces travaux montrent que la stratégie alimentaire doit tendre vers l'optimum de la demande physiologique de l'animal sans l'excéder afin de minimiser les pertes ammoniacales lors du stockage et de l'épandage du lisier.

Nos travaux s'appuient sur une démarche similaire. Nous avons ainsi émis l'hypothèse que l'hydrogène sulfuré retrouvé au cours du stockage en fosse est lié à la qualité des aliments donnés aux animaux.

La caractérisation des ingrédients utilisés pour formuler les rations a mis en évidence que leur teneur en soufre diffère selon les matières premières. Certains constituants sont fortement contaminés par un résiduel de soufre inorganique tels que les sous-produits issus des industries de l'amidonnerie ou des sucreries (pulpes, gluten feed...), de la production d'agro-carburant (drèches) et de l'agro-industrie (drèches, tourteaux, pulpes). Un ratio N:S défini au cours de cette analyse, a permis un classement des matières premières. Celles dont le ratio N:S est élevé (>13) correspondent à des matières premières ayant une concentration en soufre protéique élevé et à l'inverse celles dont le ratio N:S est bas (<10) possèdent une concentration en soufre inorganique élevée. A la suite de cette analyse, deux études *in-vivo* ont été réalisées avec des régimes aux ratios N:S contrastés afin de mieux comprendre le comportement du soufre contenu dans les aliments après ingestion par des animaux. Les résultats de ces expérimentations montrent que le soufre ingéré est absorbé de façon équivalente quel que soit le régime testé, puis est excrété majoritairement sous forme de sulfates par la voie urinaire. En moyenne, la quantité de soufre retenue par les porcs en engraissement est de 1,1 g S.kg⁻¹.J⁻¹ quel que soit le ratio appliqué. En conséquence, les régimes aux ratios N:S les plus faibles sont ceux qui sont à l'origine de l'excrétion maximale de sulfates.

Les résultats de ces expériences mettent donc en évidence un lien direct entre la qualité des aliments donnés aux animaux et leurs excréctions soufrées. Il convient de souligner que les expérimentations ont été réalisées sur un seul stade physiologique de l'animal correspondant à des porcs en engraissement qui est le stade le plus consommateur d'aliment de la filière. Les données obtenues pourraient donc être complétées par l'étude d'autres stades physiologiques.

Dans une étude récente², les auteurs ont démontré que les porcs en phase d'engraissement supportent une nourriture riche en sulfates sans que celle-ci ne soit préjudiciable à leur croissance. Cependant à de très hauts niveaux d'incorporation (12 g.kg⁻¹), les sulfates sont

² Kerr B.J. et al., (2011) **Journal of Animal Science** 89:426-437

responsables de nécroses et d'inflammation des intestins. Cette forte tolérance des animaux à l'ingestion de soufre inorganique tel que les sulfates permet d'élaborer des aliments avec des matières premières riches en soufre inorganique (faible ratio N:S) qui sont très souvent des co-produits de l'industrie. En effet l'emploi des drèches et des tourteaux issus des industries des agro-carburants et de l'agro-alimentaire tend à se généraliser (Agreste, 2011) pour des raisons de disponibilité de ces matières premières et pour des raisons économiques (figure 1).

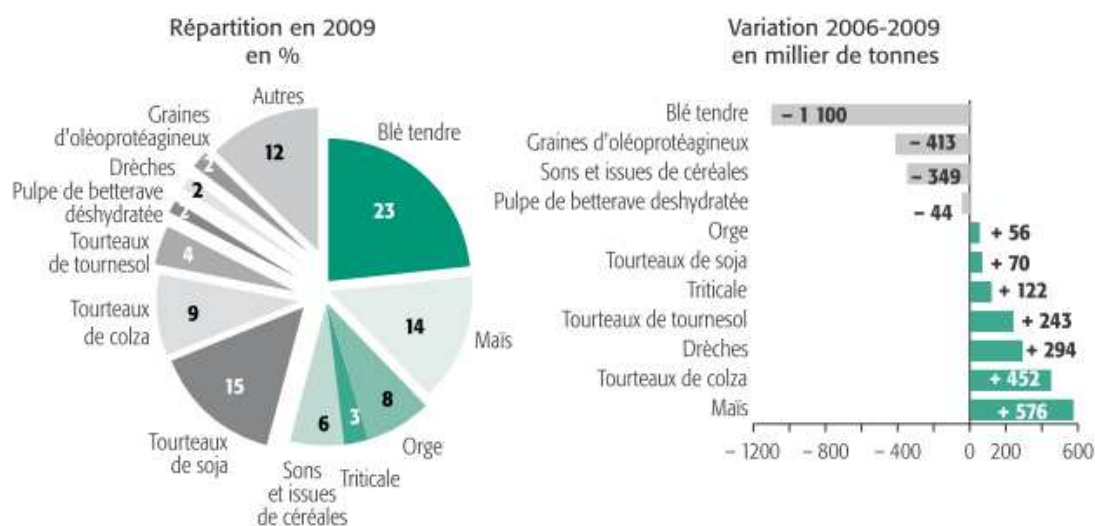


Figure 1

Matières premières utilisées pour la fabrication d'aliments composés pour animaux de ferme (source : Agreste, 2011³).

En conclusion, le soufre contenu dans les rations alimentaires est nécessaire car il participe à la croissance des animaux. Cependant l'incorporation de soufre minéral dans les rations doit être raisonnée afin d'éviter tout problème de croissance, ce qui permet en outre de limiter l'excrétion de sulfates par les animaux.

Les deux premiers chapitres de cette thèse sont consacrés au devenir des sulfates dans le mélange formé par les urines et les fèces ainsi qu'aux micro-organismes impliqués dans les réactions de transformation du soufre. Les principaux résultats issus de ces expérimentations démontrent que le lisier stocké en condition anaérobie est un milieu dans lequel les sulfates sont réduits en sulfure par réduction dissimilatrice. Cette réduction est réalisée par un

³ Agreste. (2011) **Agreste Primeur** 258.

ensemble de micro-organismes sulfato-réducteurs dont le développement dépend des conditions initiales du milieu. Les essais que nous avons menés en microcosmes ont montré que les sulfates présents initialement dans le lisier (1 gS.l^{-1}) sont transformés en 17 jours en sulfures qui deviennent une des principales formes du soufre dans le lisier. Ils sont alors partiellement transférés vers la phase gazeuse sous la forme d'hydrogène sulfuré.

Ainsi, l'ajout de soufre dans la ration alimentaire, même s'il n'a pas d'effet sur les animaux, augmente la concentration en sulfates dans les excréments et conduit à la production d'hydrogène sulfuré. L'origine des ingrédients utilisés et la formulation des aliments impactent donc la production d'hydrogène sulfuré au cours du stockage du lisier. Dans un souci de développement durable, il conviendrait de travailler encore plus en amont dans les filières au niveau des modes de production/transformation des ingrédients utilisés pour les rations alimentaires.

Nos travaux ont permis de définir le ratio N:S des ingrédients et des régimes alimentaires comme un indicateur de prédiction des risques liés à la production d'hydrogène sulfuré. Les principaux ingrédients recensés ayant un faible ratio N:S correspondent à des matières premières issues des transformations industrielles qui emploient de l'acide sulfurique indispensable aux procédés de fabrication des produits tels que le bioéthanol, l'amidon ou le sucre. Les sulfates de l'acide se retrouvent alors dans les sous-produits (drèches, tourteaux ...).

Au regard de ces données, une possibilité de réduction des concentrations en sulfates dans les ingrédients serait de substituer l'acide sulfurique par de l'acide chlorhydrique. Par ailleurs, il serait intéressant de développer un modèle permettant de prédire les concentrations en hydrogène sulfuré dans les espaces confinés et ventilés que constituent les bâtiments d'élevage. Les suivis cinétiques de consommation des sulfates et de production de sulfures réalisés au cours de nos essais peuvent être utilisés comme point de départ pour modéliser la production d'hydrogène sulfuré en considérant la pré-fosse comme un réacteur sans vidange où seuls les excréta constitueraient le substrat. Ce modèle permettrait de déterminer les périodes correspondant aux maximums d'émission d'hydrogène sulfuré. Il pourrait permettre également d'estimer, l'exposition à l'hydrogène sulfuré du personnel présent dans les bâtiments sachant que le code du travail impose une valeur limite d'exposition pour les travailleurs de 5 ppm sur 8 heures de travail. Dans un deuxième temps, des mesures directes sur certains élevages devraient être réalisées pour valider le modèle.

Nous avons complété l'étude cinétique de la transformation des sulfates par une caractérisation de la diversité et de l'abondance des bactéries sulfato-réductrices présentes dans le lisier. Les micro-organismes sulfato-réducteurs dont la concentration dans le lisier représente 0,2 % du nombre de bactéries totales apparaissent comme une population sous-dominante de cet écosystème malgré leur rôle fondamental dans la transformation du soufre. Leur diversité est réduite à huit phylotypes indépendamment des concentrations en sulfates et en acides gras volatils testés. Deux familles, les *Desulfobulbacea* et les *Desulfobacteriaceae* dominent l'écosystème en présence de sulfates.

Dans un souci de représentativité de l'analyse et souhaitant nous affranchir des difficultés de la culture des micro-organismes, la recherche des bactéries sulfato-réductrices a été réalisée par l'analyse du gène *dsrAB*, spécifique de ce groupe bactérien. Néanmoins cette étude est fondée sur le suivi de l'ADN. Cette molécule qui est le support de l'information génétique des micro-organismes, reflète la présence de ces derniers dans l'écosystème sans pour autant donner une information sur leur activité, excepté lorsque les micro-organismes sont en croissance. Notre étude pourrait être complétée par la quantification de l'ARNm correspondant qui est présent uniquement chez les bactéries ayant une activité métabolique. Cette quantification permettrait d'estimer les conditions de l'environnement qui stimulent ou inhibent l'activité des bactéries sulfato-réductrices dans le lisier.

Il existe actuellement très peu de données sur les communautés sulfato-réductrices des lisiers de porcs. Seuls Cook et al. (2008) et Spence et al. (2008)⁴ qui ont également utilisé des techniques de biologie moléculaire, ont étudié les bactéries sulfato-réductrices dans le lisier. Il est intéressant de noter que deux des trois familles de bactéries sulfato-réductrices que nous avons mises en évidence dans les lisiers ont également été retrouvées par ces deux équipes. Cependant, il reste encore à comparer les séquences des gènes *dsrAB* identifiés par nos trois études. Si ces séquences s'avéraient très proches, et restaient éloignées des espèces connues, il serait alors intéressant d'isoler et cultiver les micro-organismes correspondant afin de mieux étudier leur métabolisme. Cette étude approfondie donnerait quelques pistes de réflexion sur (i) l'implication des micro-organismes sulfato-réducteurs dans l'ensemble du réseau trophique que constitue le lisier, (ii) la mise au point d'outils comme les inhibiteurs qui pourraient cibler cette communauté pour maîtriser la production d'hydrogène sulfuré.

⁴Cook K.L. et al., (2008) *Anaerobe* 14:172-180.

Spence C. et al., (2008) *Journal of Applied Microbiology* 105:2143-2152.

Le deuxième aspect de nos travaux, qui constitue les deux derniers chapitres de cette thèse, est focalisé sur la production d'hydrogène sulfuré dans les méthaniseurs agricoles qui utilisent des co-substrats plus ou moins riches en soufre. La caractérisation du soufre des co-substrats potentiellement utilisables en digestion anaérobie est peu documentée. Seules des données partielles existent et concernent principalement les boues de station d'épuration d'eau urbaine ou les effluents ayant une typologie particulière tels que les effluents de papèterie. Pour les unités de digestion agricole, le biogaz est classiquement traité par désulfuration biocatalytique avant son utilisation. Afin de respecter les règles de dimensionnement de cette étape de traitement, il nous paraissait important de déterminer un indicateur correspondant à un potentiel maximum de production d'hydrogène sulfuré engendré par l'utilisation des effluents et des co-substrats. Pour estimer cet indicateur, que nous avons nommé "potentiel sulfurogène", deux approches étaient envisageables :

- réaliser des tests systématiques sur les effluents et les co-substrats au cours de la digestion anaérobie afin de quantifier l' H_2S dans le biogaz ;
- caractériser chimiquement les effluents et les co-substrats et coupler cette caractérisation à une déduction mathématique du potentiel de production.

C'est cette dernière approche, moins fastidieuse que la première, que nous avons retenue afin d'augmenter le nombre d'échantillons testés.

Le potentiel maximum de production d'hydrogène sulfuré a été déterminé sur 37 échantillons constitués d'effluents agricoles et de co-substrats provenant de différents secteurs agro-alimentaires et agricoles. Pour 73 % des échantillons analysés, ce potentiel était faible et était compris entre 0,1 et 1 % de la concentration en biogaz. Les co-substrats pour lesquels le potentiel était supérieur à 2% correspondaient à des effluents agricoles, des boues de stations d'épuration et certains déchets comme les algues marines et les soies de porcs. A partir de ces données nous avons établi un modèle prédictif permettant de relier deux caractéristiques chimiques des échantillons (carbone total et soufre total) à leur potentiel sulfurogène. Ce modèle nous a permis de définir un ratio maximum (C/S : 40) pour lequel la production d' H_2S respecte le dimensionnement du procédé de désulfuration installé dans les méthaniseurs agricoles.

L'estimation du potentiel sulfurogène permet de mieux appréhender le contrôle et la conduite des digesteurs, notamment les mélanges de substrats et leurs synergies éventuelles. Evalué au moment du dimensionnement des installations, il peut aussi conduire à la mise en place de traitements spécifiques en adéquation avec le biogaz à traiter. Des travaux supplémentaires doivent cependant être envisagés, notamment sur le comportement du soufre contenu dans les

co-substrats en condition anaérobie. En effet notre modèle est basé sur l'analyse du soufre total, un paramètre global, il devra donc être complété par des validations expérimentales avec des co-substrats riches en soufre et possédant des formes chimiques soufrées différentes (sulfates, soufre organique etc.).

Dans le cinquième chapitre de cette thèse nous avons réalisé une étude expérimentale sur les algues vertes d'échouage qui représentent un co-substrat à fort potentiel sulfurogène. La méthanisation des algues vertes a fait l'objet de travaux scientifiques publiés dans les années 1990. La plupart de ces études, souvent conduites en batch, ont montré que ces algues ont un faible potentiel méthanogène mais aucune information n'est donnée sur la concentration en hydrogène sulfuré du biogaz produit lors de la digestion anaérobie. La pression politique et sociétale actuelle pour l'élimination et la valorisation des algues vertes en Bretagne, associée au développement de la méthanisation à la ferme, ont conduit à un regain d'intérêt pour la méthanisation des algues seules ou en co-substrat avec du lisier de porcs.

Les travaux réalisés dans cette thèse ont donc eu trois objectifs : (i) l'évaluation de la possibilité d'utiliser les algues vertes en co-digestion avec du lisier de porcs, (ii) la validation du potentiel sulfurogène décrit dans le chapitre précédent et (iii), l'évaluation d'un inhibiteur spécifique de la sulfato-réduction. La valeur du ratio C/S du mélange constitué d'algues vertes et de lisier était égale à 13, permettant de prédire une concentration d'H₂S dans le biogaz proche de 2%.

Les principaux résultats de notre étude, réalisée sur trois réacteurs instrumentés, ont confirmé que le potentiel méthanogène des algues vertes est faible ($19\text{Nm}^3\cdot\text{t}^{-1}$) et que leur biodégradabilité anaérobie n'a pas dépassé 50% en condition anaérobie. Le fonctionnement des réacteurs à l'équilibre n'a été que faiblement impacté par la présence de sulfure et de sel. Par contre, la production d'hydrogène sulfuré mesurée à 3,5% du biogaz, s'est avérée plus élevée que celle prédite par le modèle. Enfin, nos résultats indiquent que l'ajout de molybdate, un inhibiteur connu pour être spécifique de la sulfato-réduction, ne permet pas de contrôler la production d'hydrogène sulfuré dans la mesure où nous avons observé une acclimatation de la biomasse du réacteur à l'inhibiteur.

Nos essais réalisés en réacteur, permettent donc de définir les limites de l'utilisation des algues vertes dans les procédé de digestion anaérobie vis à vis de la production d'hydrogène sulfuré.

En conclusion, ce travail a permis de dégager différents aspects techniques qui ont une implication directe sur la gestion des effluents d'élevages. Ainsi, deux ratios, N/S et C/S, ont été définis dans l'objectif de caractériser les aliments et les co-substrats en vue de leur potentialité à produire de l'hydrogène sulfuré. Il reste cependant des travaux de recherche à réaliser : la prédiction des concentrations en H₂S dans les ambiances closes telles que les bâtiments d'élevage en fonction des conduites d'élevage mises en place ainsi que la validation du modèle proposé. Concernant la méthanisation agricole, l'impact du soufre semble limité à quelques substrats aux caractéristiques particulières tels que les algues vertes. Cependant les enjeux, dans le contexte breton, justifieraient des compléments de recherche.

Liste des tableaux et figures

Chapitre 1

Figures :

- Figure 1. Répartition géographique de la production porcine en Europe
Figure 2. Les différents systèmes de gestion des lisiers de porcs
Figure 3. Etat des lieux du développement des installations de méthanisation agricole en France
Figure 4. Principales émissions de gaz polluants résultant des activités d'élevage
Figure 5. Proportions relatives des formes acido-basiques H_2S/HS^- et S^{2-} (en milieu aqueux)
Figure 6. Métabolisme de l'hydrogène sulfuré d'après Beauchamp et al., (1984)
Figure 7. Répartition sectorielle des intoxications aiguës recensées dans la littérature
Figure 8. Concentration en H_2S mesurée dans un bâtiment d'élevage pendant le brassage du lisier contenu dans une fosse profonde
Figure 9. Le cycle du soufre et les voies de production de l'hydrogène sulfuré
Figure 10. Principaux processus de dégradation de la matière organique en présence (en rouge) ou non de sulfates
Figure 11. Exemple de réactions fermentaires conduisant à la production d'AGV à partir du pyruvate
Figure 12. Exemple de réaction de Stickland à partir d'alanine et de glycine
Figure 13. Influence de la pression partielle en hydrogène sur l'enthalpie libre (G') pour les réactions d'acétogénèse (OPHA) du butyrate et du propionate
Figure 14. Compétition entre les bactéries sulfato-réductrices et les archaëa méthanogènes en fonction du rapport entre la charge organique et la concentration de sulfate

Tableaux :

- Tableau 14. Principales productions de produits animaux en Europe pour l'année 2009 (exprimées en Mt)
Tableau 2. Volumes de lisier produits ($L.animal^{-1}.j^{-1}$) en fonction du stade physiologique de l'animal, pour un élevage naisseur-engraisseur de 100 truies présentes
Tableau 3. Composition des lisiers porcins et bovins
Tableau 4. Principales caractéristiques de l'hydrogène sulfuré
Tableau 5. Cas d'expositions reportés dans la littérature
Tableau 6. Effets physiologiques en fonction des concentrations en H_2S
Tableau 7. Concentrations en hydrogène sulfuré mesurées dans les bâtiments d'élevage porcins, au dessus des fosses de stockage et lors de l'épandage du lisier de porcs
Tableau 8. Valeurs limites d'exposition professionnelle
Tableau 9. Principaux composés ayant un faible ODT présents dans l'air des bâtiments d'élevage
Tableau 10. Concentration en molécules odorantes retrouvées dans l'air extrait des bâtiments d'élevage
Tableau 11. Comparaison des constituants du gaz naturel et du biogaz

- Tableau 12. Systèmes de valorisation énergétique *versus* teneur en H₂S et contraintes liées à la technologie choisie
- Tableau 13. Concentrations en sulfures totaux inhibant 50 % de l'activité des micro-organismes (CI50)

Chapitre 2

Figures :

- Figure 1. Average total S content of feedstuffs commonly used in pig feed (Dry matter basis, minimum and maximum values are given for each group, n is the number of feedstuffs in each group)
- Figure 2. Feedstuffs N:S-SAA (grey) and N:S ratios (black). (Bars indicate standard deviations; n is the number of feedstuffs in each group)
- Figures 3a, b, c. Kinetics of sulfate consumption and total dissolved sulfide production during lab scale pig slurry storage experiment after sulphate (3.b; 3c) and VFA addition (3.a; 3.b; 3.c)

Tableaux :

- Table 1. Composition of the different diets and results of chemical analysis
- Table 2. Daily average sulfur balance in growing pigs fed diets with different in total S contents
- Table 3. Correlation coefficients between the different criteria

Chapitre 3

Figures :

- Figure 1. Arbre phylogénétique des micro-organismes sulfato-réducteurs obtenu avec les méthodes d'analyse du logiciel ARB (Ludwig *et al.*, 2004). Les séquences du gène *dsrA* des souches de références accompagnées de leur numéro d'accession ont été obtenues à partir de la base de données GenBank. Les séquences réalisées dans cette étude constituent les phylotypes DSR. Pour chaque phylotype, les données entre parenthèses indiquent le nombre de séquences obtenues à partir des lisiers Ti : lisier témoin initial, Tf : lisier témoin final, S : lisier avec ajout de sulfate seul et SF : lisier avec ajouts de sulfate et d'AGV. (La barre d'échelle indique le pourcentage de substitution nucléotidique).
- Figure 2. Distribution des phylotypes BSR observés dans les différents lisiers en % du total
- Figure 3. Analyse de la raréfaction des banques de clones obtenues avec les 4 lisiers, réalisée grâce au logiciel aRarefactwin 1.3.

Tableaux :

- Tableau 1. Equation reliant le cycle seuil (Ct) et le logarithme des concentrations des standards
- Tableau 2. Caractéristiques chimiques des lisiers testés
- Tableau 3. Caractéristiques microbiologiques des lisiers testés
- Tableau 4. Phylotypes et nombre de séquences BSR obtenus pour chacun des lisiers étudiés

Chapitre 4

Figures :

- Figure 1. Total sulphur versus protein content of different feedstock from: urban waste water treatment plant◇, agricultural resources◆, from agro-food facilities△, from municipal waste● (Solid line represents sulphur amino acid content for a typical protein and dotted line the 30% variation)
- Figure 2. Sulphidogenic potential (SP1) of feedstock as a function of the C:S ratios

Tableaux :

- Table 1. Origin of feedstocks
- Table 2. Feedstock characteristics and sulphidogenic potential

Chapitre 5

Figures :

- Figure 1. Rate of methane production obtained after a pulse of *Ulva sp.* (experimental versus modelled)
- Figure 2. Concentration of H₂S in biogas produced by R1(results).
- Figure 3. Concentration of H₂S in biogas produced by R2 (arrows show when molybdate was added)
- Figure 4. Concentration of H₂S from biogas produced by R3

Tableaux :

- Table 1: Physico-chemical characteristics of the influent and effluent of the four reactors at equilibrium
- Table 2. Kinetic fractionation of *Ulva sp.*
- Table 3. Operating conditions and reactor performances

Table 4. Carbon, nitrogen and sulphur balances

Chapitre 6

Figures :

Figure 1. Matières premières utilisées pour la fabrication d'aliments composés pour animaux de ferme