

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>ADN :</b>	acide désoxyribonucléique
<b>ADNr :</b>	acide désoxyribonucléique ribosomal
<b>ATP :</b>	adénosine triphosphate
<b>BET :</b>	bromure d'éthidium
<b>CRGE :</b>	capacité de rétention gravimétrique en eau
<b>CTAB :</b>	cetyl trimetyl ammonium bromide
<b>DGGE :</b>	denaturing gradient gel electrophoresis
<b>EDTA :</b>	ethylene diamine-tetraacetic acid
<b>eq :</b>	équivalent
<b>G :</b>	giga ( $10^9$ )
<b>GES :</b>	gaz à effet de serre
<b>GIEC :</b>	groupe intergouvernemental sur l'évolution du climat
<b>HPLC :</b>	high-performance liquid chromatography
<b>MO :</b>	matière organique
<b>MOD :</b>	matière organique dissoute
<b>MS :</b>	matière sèche
<b>n :</b>	nombre de répétitions
<b>pb :</b>	paire de bases
<b>PCR :</b>	polymerase chain reaction
<b>PEG :</b>	polyéthylène glycol
<b>RDNA :</b>	réduction dissimilative du nitrate en ammonium
<b>RFLP :</b>	restriction fragment length polymorphism
<b>rpm :</b>	rotations par minute
<b>SPIR :</b>	spectroscopie proche infra-rouge (ou <b>NIRS</b> : near infra-red spectroscopy)
<b>T :</b>	tera ( $10^{12}$ )
<b>TBE :</b>	tris borate EDTA
<b>TE :</b>	tris EDTA
<b>TSB :</b>	tryptic soy broth
<b>Vol :</b>	volume

## **LISTE DES ILLUSTRATIONS**

### **Figures**

**Figure 1** : Les différentes étapes du cycle de l'azote.

**Figure 2** : Modèle de la relation entre la teneur en eau du sol et l'importance relative des flux d'azote gazeux issus de la nitrification et de dénitrification.

**Figure 3** : Flux théoriques de  $N_2O$  et de  $N_2$  sous paillis de résidus de récolte.

**Figure 4** : Hiérarchisation des paramètres influençant la MOD.

**Figure 5** : Stratégie générale d'échantillonnage pour les microcosmes de la série 1.

**Figure 6** : Stratégie d'échantillonnage pour les résidus des microcosmes de la série 2.

**Figure 7** : Cycle thermique pour l'amplification PCR du gène ADN<sub>r</sub> 16S marqueur de la communauté bactérienne totale.

**Figure 8** : Cycles thermiques pour l'amplification PCR des gènes marqueurs *nirK/nirS* et *nosZ* des communautés dénitrifiantes nitrite et oxyde nitreux réductase.

**Figure 9** : Evolution de la respiration du sol.

**Figure 10** : Evolution des teneurs du sol en carbone et azote totaux.

**Figure 11** : Plan principal de l'ACP réalisée sur les signatures spectrales proche infra-rouge du sol.

**Figure 12** : Evolution de la masse sèche des résidus végétaux.

**Figure 13** : Evolution des teneurs des résidus végétaux en carbone et azote totaux.

**Figure 14** : Plan principal de l'ACP réalisée sur les signatures spectrales proche infra-rouge des résidus végétaux.

**Figure 15** : Evolution des émissions potentielles de  $N_2O$  du sol et des résidus.

**Figure 16** : Evolution des émissions semi-potentielles de  $N_2O$  du sol enrichi en MOD issue des sols sous paillis en cours de minéralisation.

**Figure 17** : Analyse en composantes principales des empreintes DGGE-16S.

**Figure 18** : Structure génétique (empreinte DGGE-16S) de la communauté bactérienne totale.

**Figure 19** : Indices de diversité appliqués aux empreintes moléculaires DGGE-16S : nombre absolu de bandes, indice de Shannon et « équitabilité » de l'importance relative des bandes.

**Figure 20** : Structure génétique (empreinte DGGE-*nirK*) de la communauté bactérienne dénitrifiante nitrite réductase.

**Figure 21** : Indices de diversité appliqués aux empreintes moléculaires DGGE-*nirK* : nombre absolu de bandes, indice de Shannon et « équitabilité » de l'importance relative des bandes.

**Figure 22** : Analyse en composantes principales des empreintes DGGE-*nirK*.

**Figure 23** : Analyse en composantes principales des empreintes RFLP-*nosZ*.

**Figure 24** : Structure génétique (empreinte DGGE-*nosZ*) de la communauté bactérienne dénitrifiante oxyde nitreux réductase.

### **Tableaux**

**Tableau I** : Principales caractéristiques granulométriques et chimiques du sol.

**Tableau II** : Mélanges réactionnels PCR pour un échantillon et tailles attendues des amplifiats.

**Tableau III** : Evolution des émissions réelles de  $N_2O$  et de  $CO_2$  du sol.

**Tableau IV** : Evolution de la réduction potentielle d'un apport exogène de  $N_2O$  (0,3% théorique) par les résidus en cours de minéralisation.

### **Photo**

**Photo 1** : Microcosmes de la série 1.

## RESUME

L'usage des paillis de résidus de récolte présente des avantages agronomiques mais peut aussi stimuler les émissions d'oxyde nitreux ( $N_2O$ ). Le processus bactérien de la dénitrification est considéré comme source prépondérante de  $N_2O$  en conditions humides prolongées. Cependant, les relations qui s'établissent au cours de la minéralisation des résidus entre leur qualité biochimique et la dynamique des dénitrifiants sont peu connues.

Dans cette étude, l'influence de deux résidus de compositions biochimiques contrastées (maïs C/N=117, arachide C/N=17) sur la matière organique du sol, l'activité et la structure génétique de communautés dénitrifiantes clés a été étudiée avec un sol agricole issu du bassin arachidier. Les microcosmes, ayant reçu un apport initial de nitrate destiné à ne pas limiter la dénitrification, ont été incubés en conditions contrôlées durant cinq semaines, avec un échantillonnage hebdomadaire.

La composition de la matière organique du sol a été spécifiquement modifiée par les résidus d'arachide dès la première semaine par rapport aux témoins non amendés. L'effet des résidus de maïs a été moins net et, dans les deux cas, la qualité de cette matière organique n'a plus évolué au-delà du premier échantillonnage. Ces changements qualitatifs ont été accompagnés d'une augmentation simultanée des teneurs en carbone total. En revanche, les teneurs du sol en azote total ont diminué au cours de l'incubation et le type de paillis n'a pas eu d'effet sur ces teneurs carbone/azote. Dans ce contexte, le potentiel de dénitrification des sols a été spécifiquement stimulé tout au long de l'incubation par le type de résidus, sous les paillis de maïs en particulier. Il a été mis en évidence à ce niveau que la matière organique dissoute du sol sous paillis pouvait stimuler la dénitrification. La structure génétique des communautés dénitrifiantes "nitrite réductase" et "oxyde nitreux réductase" a été spécifiquement influencée par le type de résidus dès la première semaine. Néanmoins, ces communautés n'ont plus évolué au-delà de ce premier échantillonnage. Les impacts des résidus sur la qualité de la matière organique et la composition des communautés dénitrifiantes du sol ont été très hautement corrélés.

Ces résultats indiquent nettement que la diversité structurale et l'activité potentielle des communautés dénitrifiantes ainsi que la composition de la matière organique du sol sont fortement dépendantes de la qualité biochimique du paillis dès les premiers stades de minéralisation.

**Mots clés :** fertilisation organique, oxyde nitreux, dénitrification, communautés dénitrifiantes, matière organique dissoute.

## SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
1. LA DENITRIFICATION .....	5
1-1 Définition.....	5
1-2 La dénitrification dans le cycle de l'azote .....	7
1-3 Les étapes de la dénitrification .....	9
1-3-1 La réduction du nitrate en nitrite.....	9
1-3-2 La réduction du nitrite en oxyde nitrique.....	9
1-3-3 La réduction de l'oxyde nitrique en oxyde nitreux .....	9
1-3-4 La réduction de l'oxyde nitreux en diazote .....	10
1-4 Ecologie des dénitrifiants hétérotrophes .....	10
1-4-1 Les dénitrifiants hétérotrophes .....	10
1-4-2 Les facteurs régulateurs de la dénitrification.....	12
1-4-2-1 L'oxygène.....	12
1-4-2-2 Le carbone organique .....	13
1-4-2-3 Le nitrate et le nitrite.....	14
1-4-2-4 Les facteurs distaux.....	14
2. LA FERTILISATION : EFFET SUR LES EMISSIONS DES GES.....	16
2-1 Généralités sur les gaz à effet de serre .....	17
2-1-1 Le dioxyde de carbone ou gaz carbonique (CO <sub>2</sub> ).....	17
2-1-2 Le méthane (CH <sub>4</sub> ).....	18
2-1-3 L'oxyde nitreux (N <sub>2</sub> O) .....	18
2-2 Agriculture et gaz à effet de serre .....	19
2-3 Fertilisation organique et émissions de N <sub>2</sub> O .....	19
2-3-1 Généralités.....	19
2-3-2 Les résidus de récolte.....	20
2-3-2-1 Les résidus de récolte enfouis dans le sol .....	20
2-3-2-2 Les résidus de récolte appliqués en surface .....	21
2-3-2-3 La matière organique dissoute (MOD).....	23
MATERIEL ET METHODES.....	26
1. MATERIEL BIOLOGIQUE.....	27
1-1 Le sol .....	27
1-2 Les résidus de culture .....	28
2. DISPOSITIF EXPERIMENTAL .....	28
2-1 Mise en place du dispositif .....	28
2-2 Les méthodes d'échantillonnage.....	30
2-2-1 Echantillons gazeux.....	30
2-2-2 Echantillons de résidus.....	31
2-2-3 Echantillons de sol.....	31
3. ANALYSES CHIMIQUES ET MICROBIOLOGIQUES .....	32
3-1 Analyses chimiques sol et résidus.....	32
3-1-1 Perte de masse des résidus .....	32
3-1-2 Ratio C/N et spectres SPIR du sol et des résidus.....	32
3-2 Emissions réelles (in situ) de N <sub>2</sub> O et de CO <sub>2</sub> .....	33

3-3	Extraction de la fraction organique dissoute du sol .....	34
3-4	Potentiel et semi-potentiel de dénitrification .....	34
3-4-1	<i>Potentiel de dénitrification sur sol</i> .....	35
3-4-2	<i>Potentiel de dénitrification des résidus de récolte</i> .....	36
3-4-3	<i>Semi-potentiel de dénitrification avec la MOD du sol</i> .....	36
3-5	Analyses moléculaires .....	37
3-5-1	<i>Extraction des acides nucléiques du sol</i> .....	38
3-5-2	<i>Amplification des gènes marqueurs</i> .....	39
3-5-3	<i>Empreintes moléculaires de diversité structurale</i> .....	40
3-5-4	<i>Analyses statistiques</i> .....	42
RESULTATS .....		43
1.	REACTIVATION ET STABILISATION BIOLOGIQUE DU SOL .....	44
2.	ÉVOLUTION CHIMIQUE DU SOL ET DES RÉSIDUS DE RÉCOLTE .....	44
2-1	Le sol .....	44
2-1-1	<i>Dosage du carbone total et de l'azote total du sol</i> .....	44
2-1-2	<i>Evolution des caractéristiques biochimiques du sol</i> .....	46
2-2	Les résidus de récolte .....	47
2-2-1	<i>Perte de masse</i> .....	47
2-2-2	<i>Dosage du carbone total et de l'azote total des résidus</i> .....	48
2-2-3	<i>Evolution des caractéristiques biochimiques des résidus végétaux</i> .....	49
3.	EMISSIONS RÉELLES DE N <sub>2</sub> O ET DE CO <sub>2</sub> .....	50
4.	EMISSIONS POTENTIELLES DE N <sub>2</sub> O .....	52
4-1	Emissions potentielles de N <sub>2</sub> O du sol et des résidus.....	52
4-2	Réduction potentielle du N <sub>2</sub> O par les résidus végétaux .....	53
4-3	Emissions semi-potentielles de N <sub>2</sub> O du sol enrichi en MOD.....	54
5.	STRUCTURE GÉNÉTIQUE DES COMMUNAUTÉS BACTÉRIENNES .....	55
5-1	Structure génétique de la communauté bactérienne totale .....	55
5-2	Structure génétique des communautés dénitrifiantes .....	59
5-2-1	<i>La communauté nitrite réductase « nirK »</i> .....	59
5-2-2	<i>La communauté oxyde nitreux réductase « nosZ »</i> .....	62
DISCUSSION .....		65
1.	EFFET DES PAILLIS SUR LES EMISSIONS REELLES DE N <sub>2</sub> O .....	66
2.	EVOLUTION DE LA CHIMIE DU SOL ET DES RESIDUS .....	67
3.	EFFET DES PAILLIS SUR LES DENITRIFIANTS DU SOL .....	69
4.	ROLE FONCTIONNEL DE LA MATIERE ORGANIQUE DISSOUTE DU SOL DANS LA DENITRIFICATION .....	71
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....		73
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....		75
ANNEXES.....		85

# INTRODUCTION

---

Les experts du Groupe Intergouvernemental sur l'Evolution du Climat (GIEC, lauréats du prix Nobel de la Paix 2007) s'accordent sur une corrélation entre l'augmentation constante de la concentration atmosphérique des principaux gaz à effet de serre (dioxyde de carbone- $\text{CO}_2$ , méthane- $\text{CH}_4$ , oxyde nitreux- $\text{N}_2\text{O}$ ) depuis l'ère préindustrielle (1750), et l'augmentation de la température moyenne de la planète ( $+0,6^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  au cours des cent dernières années, GIEC, 2001, 2007a). Ce panel d'experts désigne l'augmentation de la teneur de ces gaz, le  $\text{CO}_2$  en particulier, comme responsable de l'intensification de l'effet de serre. Le quatrième rapport du GIEC stipule enfin que l'homme est le principal responsable de l'augmentation de ces teneurs via ses activités industrielles et agricoles.

L'oxyde nitreux est un puissant gaz à effet de serre participant à hauteur de 6% au réchauffement global. Sa concentration atmosphérique est passée de 270 à 319 ppb entre 1750 et 2005, soit une augmentation de plus de 18%. L'activité biologique des écosystèmes terrestres serait à l'origine de plus de la moitié des émissions totales de  $\text{N}_2\text{O}$  (10,2 Tg N- $\text{N}_2\text{O}$   $\text{an}^{-1}$  sur un total de 17,7 Tg, GIEC, 2007a), principalement via les processus bactériens de nitrification et de dénitrification. Les sols tropicaux en particulier représenteraient plus de 25% des sources totales de  $\text{N}_2\text{O}$  atmosphérique (Bouwman, 1998; GIEC, 2001) et plus de 60% des émissions liées aux sols seraient d'origine agricole, soit 6,3 Tg N- $\text{N}_2\text{O}$   $\text{an}^{-1}$  (Mosier *et al.*, 1998; Kroeze *et al.*, 1999), ce qui place ce type d'activité au premier rang des origines anthropiques de  $\text{N}_2\text{O}$ .

L'augmentation des émissions de  $\text{N}_2\text{O}$  par les sols agricoles est favorisée par les intrants azotés ainsi que par les modes d'usage des terres (labour, semis direct, irrigation, couvertures permanentes vives ou mortes etc.). Parmi ces pratiques agricoles, l'application en surface des résidus de récolte (paillis) peut aider à réduire l'érosion, à conserver l'humidité en réduisant l'évaporation, à contrôler le développement des adventices et peut aussi jouer un rôle de fumure organique. Cependant, l'application de résidus de récolte a souvent été corrélée à une augmentation des émissions de  $\text{N}_2\text{O}$  dont l'amplitude et la durée dépendent en partie de la qualité biochimique du résidu (Larson *et al.*, 1998; Seneviratne et van Holm, 1998; Flessa *et al.*, 2002; Millar et Baggs, 2004). Plus particulièrement, la décomposition du paillis induit une augmentation des activités microbiennes du sol sous-jacent, principalement via le transport matière organique dissoute (Gaillard *et al.*, 1999; Poll *et al.*, 2008). Cette fraction organique pourrait être impliquée dans la stimulation de la dénitrification et des émissions de  $\text{N}_2\text{O}$ . A ce jour, le rôle tenu par les communautés bactériennes dénitrifiantes, en termes de composition et d'activité, dans les rejets de  $\text{N}_2\text{O}$  associés aux paillis n'a pas été étudié.

Dans ce contexte, cette étude vise essentiellement à établir si des paillis de qualités biochimiques contrastées peuvent spécifiquement modifier la structure et l'activité dénitrifiante des communautés bactériennes nitrite et oxyde nitreux réductases impliquées respectivement dans la formation et la réduction de l'oxyde nitreux.

Le cadre logique des hypothèses retenues est le suivant :

- Le paillis de résidus favoriserait les émissions réelles et potentielles du sol en  $N_2O$ .
- La majeure partie des émissions induites par le paillis se localiserait en début de minéralisation des résidus de récolte.
- Le profil des émissions de  $N_2O$  serait corrélé à une variation de structure génétique des communautés bactériennes nitrite et oxyde nitreux réductases.
- L'amplitude de cette augmentation serait corrélée à la quantité et/ou à la qualité biochimique de la fraction organique dissoute du sol.
- Les résidus végétaux en décomposition pourraient eux-mêmes présenter une double activité source/puits de  $N_2O$ .

Le dispositif expérimental adopté dans cette étude consiste en une incubation de cinq semaines de microcosmes de sol agricole couvert d'un paillis de résidus végétaux ayant des propriétés biochimiques contrastées (arachide et maïs) afin de suivre et de comparer :

- (i) l'évolution des émissions réelles et potentielles de  $N_2O$ , ainsi que la structure génétique des communautés bactériennes nitrite et oxyde nitreux réductases du sol
- (ii) l'évolution de la qualité de la matière organique du sol et des résidus
- (iii) l'évolution qualitative et fonctionnelle de la matière organique dissoute du sol

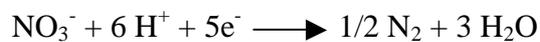
# **SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

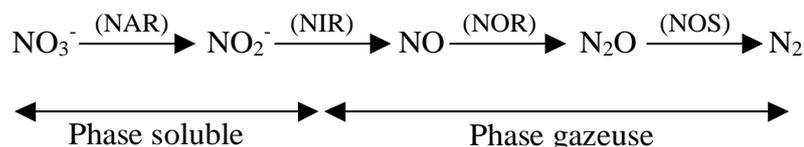
# 1. LA DENITRIFICATION

## 1-1 Définition

La dénitrification hétérotrophe est un processus respiratoire bactérien anaérobie par lequel les oxydes d'azote, nitrate et nitrite, sont réduits séquentiellement en diazote gazeux  $N_2$ , avec l'oxyde nitrique NO et l'oxyde nitreux  $N_2O$  comme intermédiaires métaboliques (Tiedje, 1988). C'est une respiration opportuniste, qui se déroule en présence de matière organique lorsque l'oxygène est absent ou que sa pression partielle est très faible. Le nitrate est le premier oxyde d'azote à être réduit après l'épuisement de l'oxygène suivant l'équation de la chaîne de réduction totale suivante :



La dénitrification est principalement assurée par des bactéries hétérotrophes anaérobies facultatives mais aussi par des bactéries autotrophes, phototrophes, diazotrophes, fixatrices symbiotiques de l'azote, nitrifiantes, ainsi que par des Archeae et certains champignons. La dénitrification liée aux hétérotrophes (anaérobie facultative) nécessite une source de carbone organique comme donneur d'électrons alors que la dénitrification liée aux autotrophes permet la réduction du  $NO_3^-$  en azote gazeux sans recours à une source organique externe. Ainsi, la dénitrification apparaît comme un trait polyphylétique qui se retrouve dans plus de 50 genres bactériens (distribution taxonomique étendue) (Zumft, 1997). La réduction du nitrate ( $NO_3^-$ ) en diazote ( $N_2$ ) par les dénitrifiants hétérotrophes implique quatre étapes qui sont catalysées par quatre métalloenzymes qui permettent la transformation de molécules de la phase soluble ( $NO_3^-$ ,  $NO_2^-$ ) en molécules de la phase gazeuse (NO,  $N_2O$ ,  $N_2$ ) selon la chaîne de réaction :



NAR : nitrate réductase

NOR : oxyde nitrique réductase

NIR : nitrite réductase

NOS : oxyde nitreux réductase

Toutefois, il existe dans l'environnement, d'autres processus biotiques et abiotiques opérant la

réduction du nitrate :

-*Réduction assimilative du nitrate* : ce processus se distingue des autres processus de réduction du nitrate par le fait que l'azote est incorporé dans la biomasse microbienne sous forme organique. C'est une fonction réalisable par un grand nombre de microorganismes, ainsi que par certains végétaux et algues. Dans ce cas, l'azote ne quitte pas le système. Cependant, les écosystèmes anoxiques renfermant des quantités significatives d'azote organique et d'ammonium ne sont pas favorables à sa réalisation (Rice et Tiedje, 1989).

-*Réduction dissimilative du nitrate en ammonium (RDNA)* : ce processus anaérobie aboutit à la production d'ammonium à partir du nitrate. La RDNA est réputée ne pas être très importante dans la plupart des sols. Néanmoins, son action peut être très significative dans les écosystèmes où le rapport carbone/accepteurs d'électrons est élevé, comme dans le rumen des bovins ou dans certains sédiments (Tiedje *et al.*, 1982). L'addition excessive dans le sol de C peut stimuler la RDNA, mais celle-ci ne devient pas pour autant le processus majeur de consommation du nitrate. La RDNA est assurée par un grand nombre de bactéries anaérobies strictes et facultatives (e.g. *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Vibrio*, *Citrobacter*, *Achromobacter*, *Bacillus...*), selon la séquence (gène principal *nrfa*) :



-*Chimio dénitrification* : c'est la production non biologique d'azote gazeux, sous certaines conditions environnementales (Tiedje, 1988). C'est une catalyse acide du nitrite qui peut être très significative dans les sols à pH inférieur à 5. Le produit majoritaire de cette réaction est le NO, mais le N<sub>2</sub>O et le N<sub>2</sub> ont été également notés. D'une manière générale, la chimio dénitrification n'est pas un processus majeur en milieu agricole. Mais, le salage sur sols acides gelés combiné aux cycles humectation-dessiccation peut rendre cette réaction significative, en particulier comme source de NO.

-*Dénitrification non-respiratoire* : ce processus est caractérisé par la production typique de N<sub>2</sub>O et non de N<sub>2</sub>, comme produit de la réduction des oxydes d'azote (Tiedje, 1988). Les mécanismes à l'origine de la production de ce N<sub>2</sub>O ne sont pas encore connus. De même, l'impact environnemental de la dénitrification non-respiratoire comme source de N<sub>2</sub>O n'a pas encore été estimé. Les organismes aptes à réaliser la dénitrification non-respiratoire recouvrent les bactéries nitrate-assimilatrices, les levures, les champignons filamenteux, les algues et probablement les microorganismes qui vivent en association avec les plantes et les animaux, puisque ces derniers peuvent émettre du N<sub>2</sub>O (Bleakley et Tiedje, 1982).

## 1-2 La dénitrification dans le cycle de l'azote

La dénitrification se positionne à la fin du cycle de l'azote dans la mesure où cette étape peut produire à partir des espèces réactives de l'azote trouvées dans la biosphère du  $N_2$  qui réalimente le réservoir minéral atmosphérique.

A l'origine de ce cycle se trouve l'azote moléculaire  $N_2$  qui n'est pas directement utilisable par les végétaux et les animaux. La conversion de  $N_2$ , en formes d'azote utilisables par ces derniers (formes actives de l'azote), nécessite de l'énergie pour briser la triple liaison covalente de  $N_2$ . Cette réaction est naturellement possible chez les bactéries fixatrices d'azote libres ou diazotrophes (ex. *Azospirillum*) et symbiotiques (ex. *Rhizobium*) fournissant annuellement à la biosphère 107 Tg N (Cleveland *et al.*, 1999), mais aussi au cours de procédés industriels (combustion des combustibles fossiles et la fabrication d'engrais azotés-procédé Haber-Bosh) fournissant à la biosphère 130 Tg N an<sup>-1</sup> (Galloway *et al.*, 2004), voire par la foudre dont l'apport annuel est estimé à 5,4 Tg N (Lelieveld et Dentener, 2000). Grâce à la fixation naturelle et industrielle de l'azote, ses formes actives (organiques ou minérales) peuvent circuler dans les réseaux trophiques et la biosphère.

Dans le sol, les formes organiques de l'azote subissent une minéralisation. L'ammonification est la dernière étape de ce processus aboutissant à la libération d'ammonium ( $NH_4^+$ ). Cette transformation est effectuée par un grand nombre de microorganismes. L'ammonium issu de la matière organique du sol peut alors être engagé dans un autre processus de transformation dénommé nitrification. Cette étape assure l'oxydation de l'ammonium en nitrate par les bactéries nitrifiantes autotrophes et hétérotrophes (Prosser, 1986). Cette oxydation se passe en deux étapes en présence d'oxygène, aucune bactérie capable de transformer directement l'ammonium en nitrate n'étant encore connue à ce jour. La première étape est la nitritation ou l'oxydation de l'ammonium en nitrite ( $NO_2^-$ ) assurée par les bactéries dites nitritantes telles que *Nitrosomonas*. Cette étape est catalysée par l'Ammonia Mono-Oxygénase (AMO) et l'HydroxylAmine Oxydoréductase (HAO). La seconde étape, ou nitratisation, est l'oxydation du nitrite en nitrate ( $NO_3^-$ ) réalisée par les bactéries dites nitratantes, telles que *Nitrobacter*, et catalysée par le Nitrite OxydoRéductase (NOR) :



### 1-3 Les étapes de la dénitrification

#### *1-3-1 La réduction du nitrate en nitrite*

La réduction du nitrate en nitrite est catalysée par la nitrate réductase. Il existe essentiellement deux types de nitrate réductase : une enzyme localisée au niveau la membrane plasmique et dont la sous-unité catalytique est codée par le gène *narG* et une nitrate réductase retrouvée au niveau du périplasma (gène *napA*). La nitrate réductase membranaire est induite en absence d'oxygène et en présence de nitrate ou de nitrite. La nitrate réductase périplasmique est une enzyme polyvalente impliquée dans la réduction aérobie des nitrates. Les deux formes de nitrate réductase peuvent être présentes séparément ou simultanément dans une même souche. Les gènes *narG* et *napA* ne sont pas spécifiques au processus de dénitrification, ils sont également rencontrés chez les bactéries qui réduisent le nitrate en ammonium, avec le nitrite comme intermédiaire métabolique (Philippot et Højberg 1999).

#### *1-3-2 La réduction du nitrite en oxyde nitrique*

Cette étape est sous le contrôle de la nitrite réductase. Il existe également deux types de nitrite réductase : une enzyme à cuivre, dont la sous-unité catalytique est codée par le gène *nirK* et une nitrite réductase à cytochrome  $cd_1$  (gène *nirS*). Cette étape est déterminante dans la dénitrification, puisqu'elle assure la réduction des oxyanions azotés aux espèces gazeuses de l'azote, permettant une sortie définitive de cet azote du système sol. Elle permet de distinguer les dénitrifiants *sensu stricto* des autres bactéries réductrices de nitrate. Généralement, une bactérie dénitrifiante ne possède qu'un seul des deux gènes de cette étape (*nirK* ou *nirS*), bien qu'ils soient fonctionnellement et physiologiquement équivalents (Philippot et Hallin, 2006).

#### *1-3-3 La réduction de l'oxyde nitrique en oxyde nitreux*

Le passage de l'oxyde nitrique à l'oxyde nitreux est l'étape la plus rapide de toute la chaîne de dénitrification (Averill et Tiedje, 1982), probablement en raison de la toxicité universelle de ce gaz. Il est sous la dépendance de l'oxyde nitrique réductase transmembranaire. Cette dernière est composée de deux sous-unités. La première sous-unité contient deux hèmes de type b et est codée par le gène *norB* (Zumft *et al.*, 1994). La deuxième sous-unité est codée par le gène *norC* et contient un hème de type c. La protéine mature accepte les électrons du cytochrome c et les transferts vers le cytochrome b (Zumft,

1993). Il existe une autre classe d'oxyde nitrique réductase, qui par contre ne possède pas de cytochrome c, mais utilise le quinol comme donneur d'électron, la quinol deshydrogénase étant codée par le gène *norZ* (Hendricks *et al.*, 2000).

#### *1-3-4 La réduction de l'oxyde nitreux en diazote*

La conversion de l'oxyde nitreux en diazote est la seule étape qui soit sous le contrôle d'un seul type d'enzyme, à savoir l'oxyde nitreux réductase. Cette enzyme est localisée au niveau de l'espace périplasmique des bactéries Gram négatives. Les bactéries Gram positives ne possèdent pas d'espace périplasmique. Cependant, l'oxyde nitreux réductase a été localisée chez *Bacillus subtilis*, une bactérie Gram positive, entre la membrane plasmique et la couche de peptidoglycane (Merchante *et al.*, 1995). La sous-unité catalytique de l'oxyde nitreux réductase est codée par le gène *nosZ* qui ne s'exprime qu'en présence d'oxyde nitreux et en absence complète d'oxygène. Ce gène est sensible aussi négativement aux pH acides. L'oxyde nitreux réductase est inhibée par l'acétylène (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>) à des pressions comprises entre 0,1 et 0,5 kPa (Klemmedtsson *et al.*, 1988). En d'autres termes, le C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> empêche la réduction de l'oxyde nitreux en diazote provoquant ainsi l'arrêt de la dénitrification au stade N<sub>2</sub>O. D'ailleurs, l'usage du C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> est adopté comme technique d'étude de l'activité dénitrifiante potentielle.

### 1-4 Ecologie des dénitrifiants hétérotrophes

#### *1-4-1 Les dénitrifiants hétérotrophes*

Les dénitrifiants hétérotrophes sont anaérobies facultatifs : ils possèdent la faculté de « respirer » le nitrate (ou les autres espèces azotées déjà décrites) lorsque l'oxygène devient limitant dans l'oxydation de la matière organique. Toutefois, une souche dénitrifiante ne possède pas nécessairement tous les systèmes enzymatiques de la chaîne de dénitrification, ses compétences pouvant être morcelées, partielles. Par ailleurs, deux souches d'une même espèce peuvent présenter des compétences très différentes. L'identification et la classification des dénitrifiants posent une contrainte méthodologique de taille, puisqu'elles ne peuvent être basées sur le seul critère de réduction du nitrate et qu'il est impossible d'assigner cette physiologie à un groupe taxonomique cohérent et restreint. Actuellement, trois critères majeurs permettent d'identifier les bactéries dénitrifiantes cultivables d'après Tiedje (1988) et Mahne et Tiedje (1995) :

- la réduction du NO<sub>3</sub><sup>-</sup> et du NO<sub>2</sub><sup>-</sup> en N<sub>2</sub>O et/ou en N<sub>2</sub> avec un taux de réduction d'au moins

80% de l'azote présent sous forme soluble en gaz

- la capacité d'utilisation de l'énergie de cette réduction pour la croissance
- la présence de l'une des deux nitrites réductases dissimilatives (nitrite réductase à cuivre ou nitrite réductase à cytochrome cd1).

L'isolement *in vitro* des dénitrifiants est très important dans la mesure où il permet d'acquérir plus d'informations sur l'écologie et surtout les bases physiologique et génétique des bactéries dénitrifiantes. L'optimisation de cette culture *in vitro* en vue d'accéder à la plus grande diversité possible d'isolats nécessite la connaissance de l'interaction d'un grand nombre de conditions de croissance. En effet, selon le type d'environnement échantillonné, les conditions optimales d'isolement de la fraction dénitrifiante cultivable varient. Ainsi, Heylen *et al.* (2006) ont comparé l'effet de soixante milieux de culture différents sur le niveau de diversité des isolats dénitrifiants obtenus à partir de boues résiduaires. Trois milieux de culture se sont révélés plus performants que les autres et ont permis d'atteindre une diversité supérieure à celle décrite dans les précédentes études sur les boues résiduaires. Bien qu'il existe un milieu de culture universel standard pour la culture des bactéries dénitrifiantes (milieu Tryptic Soy broth-TSB enrichi en  $\text{NO}_3^-$  à 10 mM, Tiedje, 1988), l'étude de la densité et de la diversité de la fraction dénitrifiante cultivable reste contrainte par la définition de conditions de croissance adaptées à chaque environnement.

Alors que 10 à 50% des bactéries cultivables totales du sol sont capables de réduire le nitrate, seulement 0,1 à 5% sont des dénitrifiants *sensu stricto* (Tiedje, 1988; Chèneby *et al.*, 2000). Cependant, cette quantification ne prend en compte que les bactéries cultivables, ce qui engendre une sous-estimation du nombre réel de dénitrifiants puisque la fraction cultivable ne représente que 0,1 à 5% des bactéries totales du sol (Torsvik *et al.*, 1990). Néanmoins, des proportions similaires ont été calculées dans des études moléculaires récentes par PCR quantitative (Gruntzig *et al.*, 2001; Henry *et al.*, 2004; Kandeler *et al.*, 2006). Celle-ci est basée sur une quantification directe des gènes dénitrifiants dans l'extrait d'ADN environnemental (Philippot et Hallin, 2006). A l'exception du gène *narG*, les autres gènes dénitrifiants sont très souvent présents en copie unique dans le génome bactérien des souches cultivées à ce jour, ce qui permet une corrélation directe entre la densité du gène ciblé par PCR quantitative et celle des dénitrifiants possédant ce gène.

Cette approche moléculaire directe, bien que largement restreinte aux bactéries à Gram négatif, a aussi permis d'approfondir les connaissances sur la composition des communautés de dénitrifiants. En effet, une large diversité intragénérique a été révélée grâce au clonage des produits de la PCR quantitative. Ainsi, de nombreuses bactéries non cultivées hébergeant un

gène dénitrifiant ont pu être affiliées aux  $\alpha$ -Protobactéries du genre *Azopirillum* (gène *nosZ*, Enwall *et al.*, 2005) et *Bradyrhizobium* (gène *nosZ*, Dambreville *et al.*, 2006), aux  $\beta$ -Protobactéries du genre *Achromobacter* (gène *nosZ*, Henry *et al.*, 2006) etc.

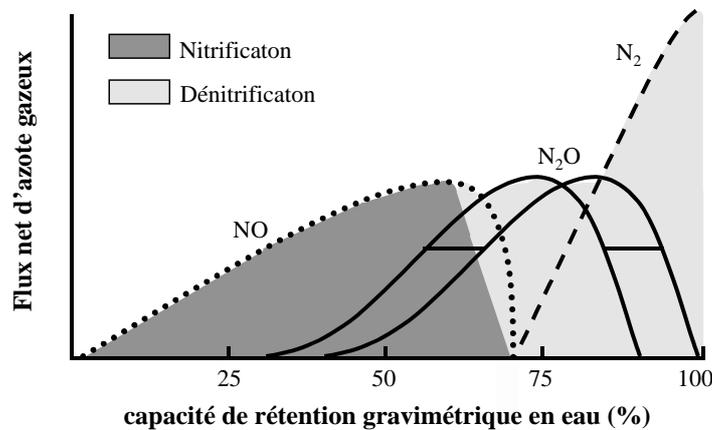
#### *1-4-2 Les facteurs régulateurs de la dénitrification*

Les dénitrifiants sont ubiquistes, ils sont rencontrés dans les sols (agricoles, forestiers), les sédiments, l'eau (douce, de mer), certains produits alimentaires, le rumen de bovins... Le maintien dans le sol des communautés dénitrifiantes n'est vraisemblablement pas dû à leur seule propriété dénitrifiante, étant donné que la dénitrification y est sporadique. Aussi, le développement de ces communautés est davantage lié à leur compétitivité d'hétérotrophes pour le carbone en condition aérobie. Cependant, l'aptitude à respirer des espèces minérales azotées en l'absence d'oxygène peut leur conférer occasionnellement un avantage sélectif dans l'utilisation de la matière organique. Divers paramètres environnementaux peuvent influencer sur l'amplitude de la dénitrification et le ratio  $N_2O/N_2$ . Ils sont généralement classés en paramètres proximaux (oxygène, nitrate et carbone) et en paramètres distaux (pH, température, pesticides, etc.) :

##### *1-4-2-1 L'oxygène*

C'est le facteur de régulation le plus important de la dénitrification. En effet, les complexes enzymatiques des différentes étapes de la dénitrification sont inhibés par des pressions partielles en  $O_2$  plus ou moins fortes, l'oxyde nitreux réductase étant l'enzyme la plus sensible. L'oxygène peut aussi inhiber la synthèse de la plupart des enzymes impliquées dans la dénitrification (Tiedje, 1988; Philippot, 2002). Donc, ce phénomène n'a lieu qu'en absence d'oxygène ou lorsque celui-ci est présent en très faible quantité (Khalil *et al.*, 2004). De plus, les bactéries dénitrifiantes respirent préférentiellement l'oxygène que le nitrate du fait d'un meilleur rendement énergétique (Tiedje, 1988). Lorsque le nitrate est disponible et que la concentration en oxygène devient inférieure à 5%, la dénitrification deviendrait le principal processus respiratoire dans le sol (Hochstein *et al.*, 1984). La quantité d'oxygène dans le sol est étroitement liée à son niveau d'humidité. Une forte corrélation a d'ailleurs été observée entre l'activité dénitrifiante et la teneur en eau des sols (Grundman et Rolston, 1987). L'effet de la teneur en eau d'un sol sur l'aération peut être exprimé par sa capacité de rétention gravimétrique en eau (CRGE) qui n'est autre que la part de porosité occupée par l'eau. La dénitrification est le processus dominant dans l'émission d'azote gazeux lorsque la CRGE atteint un seuil situé généralement entre 60 et 65% (Veldkamp *et al.*, 1998). En deçà

de ce seuil, la nitrification devient le mécanisme majoritaire (**Figure 2**).



**Figure 2** : Modèle de la relation entre la teneur en eau du sol et l'importance relative des flux d'azote gazeux issus de la nitrification et de dénitrification (d'après, Bouwman, 1998).

Aussi, le niveau d'oxygénation du sol influe sur les origines microbiennes du N<sub>2</sub>O. Le N<sub>2</sub>O peut donc être produit au cours de la nitrification dans des sols à faible taux de saturation en eau. Dans ce cas, l'émission de N<sub>2</sub>O se fait selon la voie de la décomposition de l'hydroxylamine (NH<sub>2</sub>OH) ou par la voie nitrification/dénitrification lorsque l'oxydation du NH<sub>4</sub><sup>+</sup> en NO<sub>2</sub><sup>-</sup> se poursuit par la réduction du NO<sub>2</sub><sup>-</sup> en N<sub>2</sub>O puis en N<sub>2</sub> (Wrage *et al.*, 2001). A un niveau de microaérobie donné, l'amplitude de la dénitrification et le ratio N<sub>2</sub>O/N<sub>2</sub> vont donc probablement dépendre de la diversité des dénitrifiants présents, c'est-à-dire de la gamme de tolérance à l'oxygène des complexes enzymatiques et des systèmes d'induction de leur synthèse comme démontré sur souches par les travaux de Cavigelli et Robertson (2000, 2001).

#### 1-4-2-2 Le carbone organique

Après l'aération du sol, la disponibilité en substrat organique est le principal facteur de régulation de l'activité dénitrifiante en tant que source d'électrons permettant la réduction des oxydes d'azote (Tiedje, 1988). Ainsi, selon Germon *et al.* (1983), la cinétique de dénitrification dans le sol en conditions favorables suit celle de la minéralisation du carbone. D'autre part, la matière organique (MO) peut indirectement intervenir sur la régulation de la dénitrification, par l'augmentation de l'activité respiratoire microbienne (diminution locale de la teneur en O<sub>2</sub> du sol). Les composés organiques les moins récalcitrants, comme les glucides simples, favoriseraient davantage la dénitrification que des composés plus complexes tels que la cellulose (Murray *et al.*, 2004). La qualité et la quantité de la matière organique dissoute

dans le sol (MOD, voir 2-3-2-3) semblent aussi pouvoir moduler le potentiel de dénitrification (Katz *et al.*, 1985; Brye *et al.*, 2001).

Au-delà de la diversité et de la quantité des entrées de MO dans le sol (fertilisation, type de couvert végétal), plusieurs paramètres peuvent probablement moduler l'effet de la MO sur la dénitrification en jouant sur sa disponibilité : texture et humidité du sol (composition MOD et sa circulation), travail du sol (protection/fragmentation des agrégats et mise en contact avec la microflore).

#### *1-4-2-3 Le nitrate et le nitrite*

Nitrate et nitrite représentent les deux formes ioniques de l'azote dans la chaîne de dénitrification. Dans les sols agricoles, ils proviennent en grande partie des engrais azotés synthétiques (ex. ammonitrate), de la MO animale (fumier, urine, etc.) et végétale (résidus, racines), notamment via les processus bactériens de l'ammonification et de la nitrification. Il est reconnu que la fertilisation azotée augmente l'activité dénitrifiante dans les sols agricoles ainsi que les émissions de N<sub>2</sub>O (Mulvaney *et al.*, 1997; Skiba and Smith, 2000). Cependant, en fonction de la texture du sol, l'ion nitrate peut être facilement lessivé de la couche arable. Par ailleurs, sa disponibilité est aussi dépendante du prélèvement par les racines lors de la nutrition minérale (De Angeli *et al.*, 2006).

#### *1-4-2-4 Les facteurs distaux*

Les facteurs de régulation de la dénitrification cités ci-dessus sont directement impliqués dans les mécanismes biochimiques de la dénitrification (donneurs/accepteurs d'électrons, inhibition de la biosynthèse des enzymes et de leur activité). Pour cette raison, ils portent le nom de paramètres proximaux. Il existe d'autres paramètres pouvant influencer directement sur les activités biologiques des dénitrifiants et/ou sur l'importance relative et la distribution des paramètres proximaux (oxygène, nitrate et carbone), ceux-là sont dénommés paramètres distaux. En effet, les systèmes enzymatiques de la dénitrification présentent, comme tout autre système, un optimum de pH et de température. Selon, Knowles (1982) les températures optimales pour la dénitrification, au niveau des sols nus et des boues activées, se situent entre 10°C et 35°C. Cependant, la dénitrification peut survenir sur une large gamme de températures. Une baisse de température entraîne une diminution notable de la dénitrification, celle-ci reste néanmoins mesurable même pour des températures de 0 à 5°C (Smid et Beauchamp, 1976). Alors, qu'un taux maximal de dénitrification est obtenu pour des

températures de 60 à 67°C, au-delà de ce maximum de température, la dénitrification décroît (Keeney *et al.*, 1979).

Le pH du sol agit sur la dénitrification, mais également sur la distribution de ses produits finaux. En effet, l'acidité favorise les ratios  $N_2O/N_2$  élevés (Simek et Cooper, 2002) c'est-à-dire le dégagement de  $N_2O$ . Il a aussi été démontré que les émissions totales de gaz ( $N_2O$ ,  $NO$  et  $N_2$ ) dans l'atmosphère étaient moindres en sol acide qu'en sol neutre ou légèrement alcalin (Simek et Hopkins, 1999; Simek et Cooper, 2002). La dénitrification se produit préférentiellement à des pH compris entre 7 et 8 (Knowles, 1982).

Les pesticides influent également sur la dénitrification en inhibant celle-ci. Il semble que les fongicides aient un effet négatif sur la dénitrification plus important que les herbicides (Pell *et al.*, 1998; Philippot *et al.*, 2007). D'autres polluants, comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques, et les métaux lourds inhibent aussi la dénitrification (Roy et Greer, 2000; Sicilano *et al.*, 2000; Holtan-Hartwig *et al.*, 2002). Certains métaux lourds comme l'arsenic, le cadmium, le chrome, le cuivre, le plomb, l'argent et le zinc ont tous montré un effet négatif vis-à-vis de l'activité de dénitrification dans les sols (Johansson *et al.*, 1998; Sakadevan *et al.*, 1999; Holtan-Hartwig *et al.*, 2002). L'oxyde nitreux réductase étant l'enzyme la plus sensible (Firestone *et al.*, 1980), les ratios  $N_2O/N_2$  élevés sont favorisés en présence de ces substances.

Les plantes cultivées peuvent également influencer la dynamique de dénitrification. L'effet de la rhizosphère sur la dénitrification est antagoniste. D'une part, les racines créent des conditions favorables à son déroulement par la libération d'exsudats et d'autres rhizodépôts qui constituent une source de donneurs d'électrons permanente. Sous l'effet de la double respiration racinaire et microbienne (accentuée par la décomposition des rhizodépôts), la concentration du sol en oxygène peut localement diminuer, créant ainsi des sites anoxiques. Mais la rhizosphère entre aussi en compétition avec les dénitrifiants via la nutrition hydro-minérale du végétal qui appauvrit le sol environnant en nitrate. Les mécanismes racinaires de cette nutrition minérale peuvent aussi altérer le pH du sol rhizosphérique. Ces variations sont principalement dues aux flux d'ions hydrogénocarbonates ( $HCO_3^-$ ) et aux protons ( $H^+$ ), dont la libération entraîne respectivement la diminution et l'augmentation de l'acidité du milieu (Lemanceau et Heulin, 1998; Gregory et Hinsinger, 1999). L'effet rhizosphère est donc complexe dans la mesure où il perturbe simultanément différents régulateurs basiques de l'activité dénitrifiante. Cet effet est d'autant plus complexe que les racines en cours de croissance progressent au travers de couches de sol hébergeant des communautés bactériennes différentes, et que les zones de production de rhizodépôts ne sont pas distribuées

équitablement le long des racines. Ainsi, l'effet rhizosphère sur la dénitrification apparaît éminemment dépendant du type de sol, de plante et de son stade de développement, il est donc difficilement généralisable (Bakken, 1988; Svensson *et al.*, 1991; Rengel *et al.*, 1998; Philippot *et al.*, 2007).

## 2. LA FERTILISATION : EFFET SUR LES EMISSIONS DES GES

L'accroissement de la population mondiale, au cours du siècle dernier, a orienté l'agriculture vers davantage d'intensification. Celle-ci aboutit souvent à la disparition de pratiques conservatives, telles que : la jachère ou la culture de variétés locales, au profit de modes d'usage épuisant rapidement les capacités naturelles du sol à soutenir une production primaire suffisante (tassement du sol par les engins agricoles, monocultures pluriannuelles avec notamment variétés à forte demande nutritionnelle, labour systématique). Dès lors, la croissance constante de la productivité agricole a reposé sur des entrées massives d'engrais minéraux synthétiques, rapidement mobilisables par les cultures, ainsi que sur des techniques de travail du sol facilitant la standardisation de la production mais altérant sa structure, notamment via la diminution de sa teneur en carbone organique (labour). Or, la MO joue un rôle fondamental dans le fonctionnement global du sol. Elle se lie aux particules minérales et ainsi conditionne l'apparition des classes d'agrégats qui confèrent au sol sa structure et sa résistance physique à l'érosion mais aussi sa capacité à retenir l'eau et les nutriments, à créer une multitude de microhabitats hébergeant les groupes biotiques majeurs dans le fonctionnement biologique du sol, en particulier à l'échelle des cycles biogéochimiques (Dommergues et Mangenot, 1970; Janssen, 1986; Dutartre *et al.*, 1993). Ces méthodes, seules ou combinées à la réduction des espaces naturels au profit des surfaces cultivables, ont également eu pour conséquence l'augmentation des teneurs atmosphériques de gaz à effet de serre via les émissions d'azote et le déstockage du carbone du sol (Mosier, 1998).

En agriculture, la principale entrée naturelle de matière organique dans le sol est de nature végétale et s'élabore au travers des flux de rhizodépôts et de la nécromasse racinaire. Les pratiques de fertilisation organique constituent des apports ponctuels supplémentaires par valorisation des résidus de culture eux-mêmes (enfouis ou en litière) ou par épandage de compost, de fumiers, de lisiers, de boues résiduaire, etc. Cependant, l'usage de ces intrants organiques initialement destinés à l'entretien de la structure du sol et de sa fertilité favorise aussi les émissions de N<sub>2</sub>O au niveau de ces agroécosystèmes (GIEC, 2007b).

## 2-1 Généralités sur les gaz à effet de serre

Les rayons du soleil qui atteignent la Terre réchauffent sa surface et près de la moitié de ce rayonnement est absorbée par le sol. Puis, une partie de la chaleur emmagasinée dans le sol est renvoyée sous forme de rayonnement infra-rouge vers l'espace, mais une partie se trouve piégée par une couche de gaz située dans la basse atmosphère (troposphère). Le piégeage de cette chaleur contribue à réchauffer la Terre davantage. Ce phénomène naturel est dénommé « effet de serre » et les gaz impliqués sont dits « à effet de serre » ou GES (vapeur d'eau, dioxyde de carbone, méthane, oxyde nitreux pour les plus importants). L'origine de ces gaz est en majeure partie naturelle, mais la proportion liée à l'activité humaine ne cesse de s'accroître depuis le début de l'ère industrielle (vers 1750). Plus d'une quarantaine de GES ont été recensés par le GIEC. Cependant, trois participent à hauteur de 88% au réchauffement climatique. Il s'agit du CO<sub>2</sub>, du CH<sub>4</sub> et du N<sub>2</sub>O dont l'augmentation des teneurs est à relier aux activités anthropiques. L'importance d'un gaz à effet de serre est fonction de sa concentration atmosphérique, de la durée de son séjour dans l'atmosphère (durée de vie atmosphérique) et de son potentiel de réchauffement global (PRG). Ce dernier vaut 1 pour le dioxyde de carbone qui sert de référence arbitraire. Le pouvoir de réchauffement global d'un gaz se définit comme le forçage radiatif (c'est-à-dire la puissance radiative que le gaz à effet de serre renvoie vers le sol), cumulé sur une durée de 100 ans. Par exemple : le PRG du N<sub>2</sub>O est de 300, ce qui signifie que 1 kg de N<sub>2</sub>O émis dans l'atmosphère produira le même effet, sur un siècle, que 300 kg de CO<sub>2</sub>.

### *2-1-1 Le dioxyde de carbone ou gaz carbonique (CO<sub>2</sub>)*

Le CO<sub>2</sub> conditionne 70% du réchauffement actuel et il explique 90% de l'augmentation de cette variable ces 10 dernières années. La concentration atmosphérique du dioxyde de carbone est partie d'une valeur préindustrielle d'environ 280 ppm pour atteindre 379 ppm en 2005 (soit 0,0379%) (GIEC, 2007a). Le flux de CO<sub>2</sub> des écosystèmes terrestres vers l'atmosphère est d'environ 120 Gt C-CO<sub>2</sub> an<sup>-1</sup> sur un stock total de carbone dans l'atmosphère de plus de 750 Gt C-CO<sub>2</sub> (GIEC, 2007a). Les dernières études ont montré que le renouvellement du CO<sub>2</sub> dans l'atmosphère est compartimenté. Aussi, environ 50% d'un apport de CO<sub>2</sub> dans l'atmosphère sera soustrait au bout de 30 ans, et 30% supplémentaires au bout de quelques siècles avec le reliquat de 20% destiné à rester dans le réservoir atmosphérique pour plusieurs millénaires (GIEC, 2007a).

Les principales sources anthropiques de CO<sub>2</sub> sont la production industrielle, le transport terrestre et maritime, le raffinage et la consommation des combustibles fossiles (86%), le déboisement tropical et la combustion de biomasses (12%), et d'autres sources diverses (2%). A titre d'exemple, la combustion des énergies fossiles et la déforestation génèrent respectivement plus de 7 Gt C an<sup>-1</sup> et 0,6-2,5 Gt C an<sup>-1</sup> (GIEC, 2007b).

#### 2-1-2 Le méthane (CH<sub>4</sub>)

Le CH<sub>4</sub> est responsable de 14% de l'intensification de l'effet de serre. La concentration atmosphérique du CH<sub>4</sub> en 2005 (1774 ppb) (GIEC, 2007a) dépasse de loin les variations naturelles estimées pour les 650 000 dernières années (de 320 à 790 ppb). Le CH<sub>4</sub> a un potentiel de réchauffement global 23 fois plus élevé que celui du CO<sub>2</sub>, mais sa durée de vie atmosphérique n'est que de 12 ans (GIEC, 1995). Le CH<sub>4</sub> est à 40% d'origine naturelle (terres inondées, termites) et à 60% d'origine anthropique (énergie fossile, riziculture, ruminants d'élevage, combustion biomasse).

#### 2-1-3 L'oxyde nitreux (N<sub>2</sub>O)

Les émissions totales de N<sub>2</sub>O toutes origines confondues sont estimées à 17,7 Tg N an<sup>-1</sup> (WMO, 2006), soit 4,7 GtCO<sub>2</sub>-eq en 2005 (GIEC, 2007a). Ce gaz azoté est impliqué dans la destruction de l'ozone stratosphérique O<sub>3</sub> (Tabazadeh *et al.*, 2000), gaz indispensable à l'interception d'une partie des radiations ultraviolet et donc au contrôle des températures. En effet, en pénétrant dans la stratosphère, le N<sub>2</sub>O subit une photodissociation, conduisant à la formation d'oxyde nitrique NO (Dickinson et Cicerone, 1986; Waibel *et al.*, 1999). Ce dernier se lie alors à l'oxygène atomique O, issu lui-même de la photodissociation de l'ozone à ces altitudes, pour aboutir à la formation de NO<sub>x</sub> favorisant ainsi la réduction de la couche d'ozone. De plus, le N<sub>2</sub>O est responsable de 6% de l'effet de serre actuel. Il a un potentiel de réchauffement global environ 300 fois plus élevé que le CO<sub>2</sub> et sa durée de vie atmosphérique est de 120 ans (GIEC, 1995). La concentration atmosphérique mondiale de N<sub>2</sub>O s'est élevée d'une valeur préindustrielle de 270 ppb pour atteindre 319 ppb en 2005 (GIEC, 2007a). Cette concentration augmente d'environ +0,3% par an (Nevison et Holland, 1997), soit +0,8 (±0,2) ppb an<sup>-1</sup> (GIEC, 2001). Le N<sub>2</sub>O représente 0,85% du flux annuel d'azote total (1200 Tg N) dans le sol (Galloway, 1998).

Le N<sub>2</sub>O d'origine anthropique provient des activités agricoles (en particulier l'utilisation combinée des engrais minéraux et organiques), de la combustion de la biomasse, des produits chimiques comme l'acide nitrique, des stations d'épuration et de l'industrie du

nylon. Aussi, la hausse des émissions de N<sub>2</sub>O initiée à la fin du 19<sup>ème</sup> siècle, est essentiellement attribuée aux activités anthropiques, notamment au mode d'usage des terres et aux changements des pratiques agricoles (Kroeze *et al.*, 1999). Que ce soit dans les sols et/ou les eaux, la principale origine biologique du N<sub>2</sub>O est liée aux activités bactériennes de nitrification/dénitrification.

## 2-2 Agriculture et gaz à effet de serre

L'agriculture au sens large (cultures de rente, sylviculture, élevage) participe pour 35% à l'augmentation des GES (FAO, 2003). Cependant, l'agriculture mondiale est considérée comme globalement peu émettrice de CO<sub>2</sub> au regard des autres sources anthropiques de ce gaz (moins de 1% avec 40 MtCO<sub>2</sub>-eq, GIEC, 2007b). En 2005, le CH<sub>4</sub> d'origine agricole a contribué à hauteur de 47% aux émissions anthropiques totales de ce gaz, avec 3.3 GtCO<sub>2</sub>-eq contre 58-60% pour le N<sub>2</sub>O d'origine agricole (4.7 GtCO<sub>2</sub>-eq) (GIEC, 2007b). Le N<sub>2</sub>O agricole issu du sol a représenté cette même année 38% des GES non-CO<sub>2</sub> issus des activités agricoles. D'ici 2030, ces émissions agricoles de N<sub>2</sub>O augmenteraient de 35 à 60% en raison du recours croissant aux engrais synthétiques et aux fumiers d'élevage.

## 2-3 Fertilisation organique et émissions de N<sub>2</sub>O

### *2-3-1 Généralités*

La fertilisation organique influe sur l'activité dénitrifiante des sols agricoles. En effet, l'apport de matière organique peut modifier les paramètres proximaux et distaux régulant l'activité des dénitrifiants.

Généralement, les intrants organiques favorisent plus la dénitrification que les intrants minéraux (Enwall *et al.*, 2005; Dambreville *et al.*, 2006; Ding *et al.*, 2007; Philippot *et al.*, 2007). La stimulation de la dénitrification par les intrants organiques est probablement due à l'apport supplémentaire de carbone organique rapidement métabolisable (Christensen, 1985). De plus, l'azote contenu dans les intrants organiques constitue une source potentielle d'ammonium et de nitrate. Le type de l'engrais organique influe sur le taux de dénitrification ainsi que sur le ratio N<sub>2</sub>O/N<sub>2</sub>. Ainsi, la stimulation des émissions de N<sub>2</sub>O était plus importante suite à l'apport de fumier de volaille par rapport aux fumiers bovins ou porcins (Dong *et al.*, 2005). De même, Akiyama *et al.* (2004) ont montré que les émissions provenant de sols fertilisés avec des boues résiduaires ou du fumier de volaille étaient plus élevées que celles

provenant de sols fertilisés avec du fumier de ferme ou des résidus végétaux compostés. Des fertilisants organiques de natures distinctes contiennent non seulement des teneurs en azote et en carbone différentes mais aussi des teneurs variables en MO rapidement minéralisable qui peuvent conditionner la dynamique de libération de C et de N et donc la stimulation des microorganismes dénitrifiants. Ainsi, la quantité d'azote perdue par dénitrification est deux fois plus importante avec un apport de fumier de ferme qu'avec du purin, bien que les teneurs en azote aient été trois fois plus élevées dans le dernier cas (Mogge *et al.*, 1999). Par ailleurs, certaines MO peuvent contenir des polluants, comme les métaux lourds qui sont souvent rencontrés dans les boues résiduaire et qui peuvent réduire l'intensité de la dénitrification.

### 2-3-2 Les résidus de récolte

#### 2-3-2-1 Les résidus de récolte enfouis dans le sol

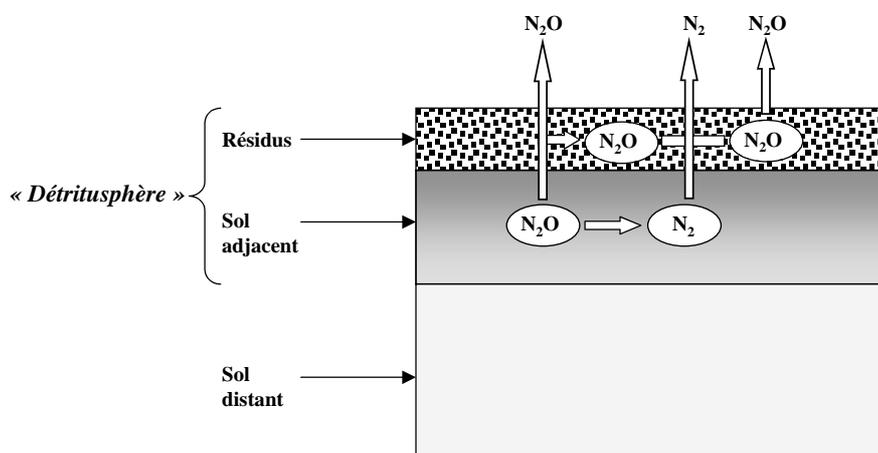
La matière organique apportée au sol se décompose probablement plus rapidement quand elle est incorporée au sol, comme c'est le cas dans les systèmes labourés, suite à un meilleur contact avec le sol, ses microorganismes et ses ressources minérales (Balesdent *et al.*, 2000). Aussi, l'incorporation de résidus de récolte favorise généralement les émissions de CO<sub>2</sub> et de N<sub>2</sub>O (Flessa et Beese, 1995). L'ampleur de ces émissions induites est fonction de la quantité et de la qualité des résidus incorporés (Reinertsen *et al.*, 1984; Baggs *et al.*, 2000, 2001; Millar *et al.*, 2004). En effet, la minéralisation des résidus de récolte, et donc les émissions de N<sub>2</sub>O, peuvent dépendre du ratio C/N des résidus (DeCatanzaro et Beauchamp 1985; Aulakh *et al.*, 1991; Kaiser *et al.*, 1998; Baggs *et al.*, 2000). Les émissions les plus élevées ont été mesurées après ajout de résidus riches en azote, que ce soit en laboratoire ou au champ. Huang *et al.* (2004) ont ainsi montré que les émissions cumulées de N<sub>2</sub>O étaient inversement proportionnelles aux C/N de cinq résidus végétaux. En particulier, l'incorporation de résidus de canne à sucre contenant 4 g N kg<sup>-1</sup> (résidu le plus pauvre en N) et de colza contenant 65 g N kg<sup>-1</sup> (résidu le plus riche en N) entraînait une augmentation respectivement de 1,7% et de 3,0% des émissions de N<sub>2</sub>O par rapport au sol non amendé. De même, de nombreuses espèces de Brassicaceae (choux de Bruxelles, brocoli, moutarde, C/N <20) ont provoqué une perte significative d'azote sous forme de N<sub>2</sub>O (de 0,13 à 14,6 % de l'azote des résidus) comparée aux résidus de graminées (blé, maïs, orge, C/N >60) (Velthof *et al.*, 2002). Cependant, en conditions non limitantes en nitrate, le seul ratio C/N du résidu ne suffit pas à définir l'évolution du C dans le sol. D'où l'importance de prendre en compte d'autres paramètres biochimiques descriptifs des résidus dans l'étude des processus de minéralisation du carbone

et de l'azote (McKenney *et al.*, 1995; Trinsoutrot *et al.*, 2008). D'autres composantes des résidus végétaux pourraient aussi influencer le niveau des émissions. En effet, Millar et Baggs (2004) ont montré que les rejets de N<sub>2</sub>O, après incorporation de résidus *Sesbania sesban*, *Macroptilium atropurpureum*, *Calliandra calothyrsus* et *Crotalaria grahamiana*, étaient négativement corrélés à leurs teneurs en lignine ( $r=-0,92$  ;  $P<0,05$ ) et en polyphénols ( $r=-0,94$  ;  $P<0,05$ ) des résidus. Par ailleurs, la minéralisation des résidus enfouis et les émissions de N<sub>2</sub>O peuvent être affectées par les intrants minéraux et le niveau d'humidité du sol (Hao *et al.*, 2001; Velthof *et al.*, 2002). En effet, il a été montré que l'application de résidus de seigle et de blé d'hiver augmentait les émissions de N<sub>2</sub>O respectivement de 338 et de 1318 g N-N<sub>2</sub>O ha<sup>-1</sup> en présence d'ammonitrate (200 kg N ha<sup>-1</sup>) par rapport à l'absence de fertilisant minéral (Sarkodie-Addo *et al.*, 2003). De même, Aulack *et al.* (1991) ont montré que des résidus (vesce, soja, maïs et blé) enrichis à hauteur de 77% en <sup>15</sup>N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> affichaient des pertes d'azote par dénitrification négligeables quand l'eau occupait uniquement 60% du réseau poral. A 90% de saturation, les pertes par dénitrification représentaient de 87 à 127% de la teneur initiale du sol en nitrate. En revanche, Cai *et al.* (2001) ont montré avec des résidus de paille de blé et un apport d'urée marqué <sup>15</sup>N (130 mg N kg<sup>-1</sup> sol) que les émissions de N<sub>2</sub>O étaient négligeables quand le sol était continuellement saturé en eau, et maximales à 70% de la CRGE (1,29-2,23% de l'azote marqué introduit). Aussi la texture du sol, par son action indirecte sur le niveau de rétention en eau, peut jouer un rôle important quoique non prévisible dans l'ampleur des émissions d'oxyde nitreux.

#### 2-3-2-2 Les résidus de récolte appliqués en surface

L'application en surface des résidus de récolte (paillis) peut aider à réduire l'érosion, conserver l'humidité en réduisant l'évaporation, contrôler le développement des mauvaises herbes et peut aussi éventuellement jouer un rôle fertilisant (Larson *et al.*, 1998; Flessa *et al.*, 2002). Aussi, par rapport aux résidus incorporés dans le sol, la décomposition est généralement plus lente au niveau des résidus appliqués en surface, probablement en raison d'une moindre quantité de résidus en contact avec le sol et d'un stress environnemental plus important (e.g. amplitudes thermique et hydrique plus élevées). Généralement, les résidus appliqués en surface peuvent aussi favoriser les rejets de N<sub>2</sub>O. En effet, Larsson *et al.* (1998) ont trouvé que les émissions de N<sub>2</sub>O augmentaient avec l'application en surface de divers résidus prairiaux riches en azote (2,1 et 4,3% N) mais demeuraient insensibles à l'application de résidus pauvres en azote (1,2% N). Les émissions ont alors représenté 0,1% de l'azote apporté sous forme de résidus pour les paillis pauvres en N, et 1% pour les paillis riches en N.

Cependant, il a été montré que l'application en surface de résidus végétaux (feuilles d'*Acacia mangium* et de *Gliricidia sepium*, paille de riz) sur un sol tropical humide ( $0,78 \text{ ml cm}^{-3}$ ) enrichi en azote sous forme d'urée ( $4 \text{ mg N g}^{-1} \text{ sol}$ ) pouvait supprimer les émissions de  $\text{N}_2\text{O}$  par rapport au sol sans résidus (Seneviratne et Van Holm, 1998). Aussi, les rejets de  $\text{N}_2\text{O}$  peuvent ne pas être stimulés sous des conditions considérées comme optimales pour la dénitrification. Ce résultat pourrait s'expliquer soit par une inhibition du processus bactérien, soit au contraire par sa stimulation complète avec émission de  $\text{N}_2$ , notamment au niveau des résidus eux-mêmes. En effet, ces derniers pourraient héberger une communauté dénitrifiante capable de produire et/ou de réduire le  $\text{N}_2\text{O}$ . Il a ainsi été démontré que la microflore indigène présente dans les résidus végétaux conditionnait à la fois le taux de décomposition du matériel végétal appliqué et la dénitrification de l'azote du paillis (Flessa *et al.*, 2002). Il est alors possible dans le cas des paillis de complexifier les flux théoriques de  $\text{N}_2\text{O}$  en intégrant l'activité dénitrifiante des résidus de surface. Le  $\text{N}_2\text{O}$  produit dans le sol peut être directement libéré dans l'atmosphère ou réduit en  $\text{N}_2$  au niveau du sol et/ou éventuellement au niveau du paillis. Le  $\text{N}_2\text{O}$  peut aussi provenir directement des résidus végétaux, être libéré dans l'atmosphère ou réduit en  $\text{N}_2$  au sein même des résidus (**Figure 3**).



**Figure 3** : Flux théoriques de  $\text{N}_2\text{O}$  et de  $\text{N}_2$  sous paillis de résidus de récolte

La texture du sol a également été identifiée comme un important facteur de modulation des émissions de  $\text{N}_2\text{O}$  relatif aux paillis. En effet, il a été démontré que l'application de paillis de graminées avec ajout de nitrate augmentait les émissions de 0,3% si ceux-ci étaient apportés sur un sol à texture fine, et de 0,2% sur sable quartzeux (Flessa *et al.*, 2002).

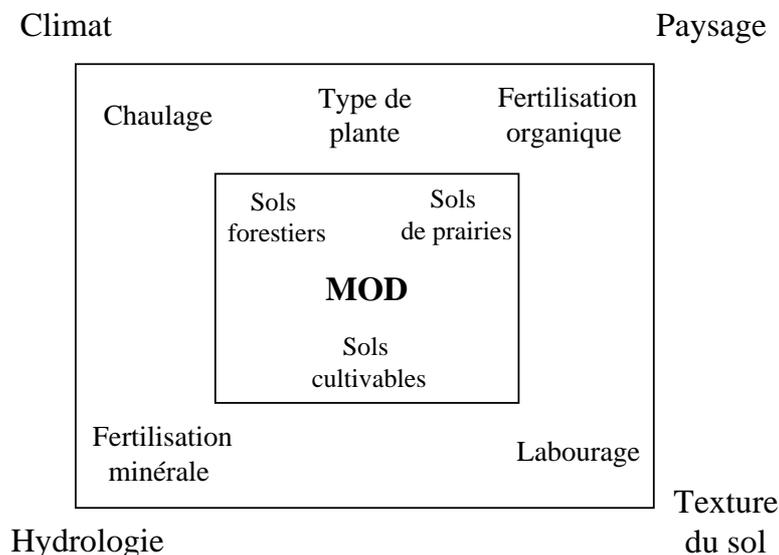
Le paillis entraîne des modifications biochimiques au niveau du sol. En effet, un

double gradient chimique et microbien s'établit dans le sol adjacent au paillis, caractérisé par des teneurs en MO et des activités enzymatiques croissantes à mesure que la distance au paillis diminue. Cette zone restreinte du sol sous l'influence directe du paillis, d'une épaisseur inférieure à 5 mm, est dénommée détritosphère et constitue un « *hotspot* » d'activités microbiennes (Ladd *et al.*, 1995; Gupta et Ponge, 1998; Gaillard *et al.*, 1999; Kandeler *et al.*, 1999; Poll *et al.*, 2008). Le paillis en décomposition exerce donc une influence à distance sur l'activité des microorganismes du sol sous-jacent via le transfert de MO (essentiellement sous forme dissoute et probablement microparticulaire) qui peut y être minéralisée (Aita *et al.*, 1997; Angers *et al.*, 1997). Ce transfert de C s'opère majoritairement par transport passif dans la solution du sol mais aussi dans certains cas via les hyphes de champignons saprophytes. En effet, lors de l'incubation de pailles de blé, une double translocation fongique de C et de N a été mise en évidence entre le sol et le résidu de surface via le réseau mycélien, le sol s'enrichissant alors en C issu du résidu et ce dernier en N issu du sol (Frey *et al.*, 2000; Frey *et al.*, 2003).

#### 2-3-2-3 La matière organique dissoute (MOD)

La MOD est physiquement définie comme étant la part de la matière organique présente dans la solution du sol pouvant passer au travers d'un filtre dont la taille des pores est comprise entre 0,4 et 0,6  $\mu\text{m}$  (Zsolnay, 1996; Chantigny, 2003). Tandis que des substances de faible poids moléculaire, telles que les acides organiques, les sucres, les acides aminés, peuvent être identifiés dans la MOD (Herbert et Bertsch, 1995), il est techniquement impossible de définir la composition chimique complète de cette dernière. L'extraction exhaustive de la MOD telle qu'elle se présente dans un échantillon de sol à un instant donné reste aussi très délicate. La MOD se distribue dans tout le réseau poral, notamment au sein des micropores au niveau des microagrégats. L'accès à ce sous-compartiment nécessite une rupture mécanique des agrégats concernés qui peut altérer la composition de la MOD en libérant des composés organiques dissoutes jusque-là sans contact avec la solution du sol (e.g. déprotection physique de la MO, rupture de cellules microbiennes). De même, les extractions sont réalisées par agitation du sol dans l'eau ou une solution saline qui dilue la MOD et peut aussi altérer sa composition (Zsolnay, 1996; Tipping, 1998). De plus, la filtration peut influencer sur le rendement d'extraction suite à l'adsorption de certains composés dissoutes sur le filtre, voire déformer par cavitation la structure tertiaire de certains composés organiques et modifier ainsi leurs éventuelles propriétés chimiques. Aussi, il n'existe pas de méthode de référence d'extraction de la MOD (Herbert et Bertsch, 1995). Le recours à l'eau comme solution d'extraction, aux

dilutions modérées du sol, aux temps d'agitation courts et à une absence de chauffage permettent néanmoins de ne pas trop s'éloigner de la MOD originelle (Jones et Willett, 2006). La composition de la MOD est en équilibre dynamique avec la MO totale du sol et reflète donc sa composition (Zoltnay, 1996). Bien que cette fraction dissoute ne représente qu'une faible portion de la MO totale du sol (moins de 1%), son turnover est considéré comme très rapide (Chantigny, 2003). Les sources principales de la MOD sont la litière, les rhizodépôts, l'humus, les enzymes et la biomasse microbiennes (Burford et Bremner, 1975; Davidson *et al.*, 1987; Kalbitz *et al.*, 2000; Chantigny, 2003). En effet, la MOD du sol est essentiellement alimentée par les produits issus de l'altération physique et chimique de la litière, au cours de sa décomposition et de la formation des matières humiques solubles. La croissance de la racine et les rhizodépôts (Edwards et Harris, 1977; Vogt *et al.*, 1983) ainsi que la nécromasse et les métabolites microbiens (Williams et Edwards, 1993) sont considérés comme des sources complémentaires. L'état de la MOD dépend fortement du couvert végétal puisque celui-ci gouverne la composition de la litière qui est la principale source de matière organique au niveau des écosystèmes (Chantigny, 2003), il dépend également des pratiques de gestion du sol, du climat, de la nature du sol (**Figure 4**).



**Figure 4** : Hiérarchisation des paramètres influençant la MOD. Le niveau d'influence du facteur est d'autant plus important que celui-ci est proche du centre (d'après Chantigny, 2003).

La MOD entre dans le déroulement de plusieurs processus fondamentaux du sol. En effet, elle constitue en premier lieu l'un des principaux facteurs contrôlant la pédogenèse (Dawson *et al.*, 1978; Petersen, 1976). Elle contribue aussi au transport des métaux lourds et des polluants

organiques (Kalbitz *et al.*, 1997; Römken et Dolfing, 1998) et participe à la circulation et à la mise en disponibilité des nutriments. De plus, il est reconnu que la MOD constitue le principal substrat riche en carbone disponible pour les microorganismes (Wardle, 1992; Neff et Asner, 2001; Smolander et Kitunen, 2002 ; Cleveland *et al.*, 2004). Ainsi, la MOD peut influencer l'activité des microorganismes du sol. Plus particulièrement, la corrélation entre disponibilité de la MOD et émissions de N<sub>2</sub>O a déjà été évoquée (Murray *et al.*, 2004). Sur ce point, il a été mis en évidence que la MOD constitue une source d'électrons pour les dénitrifiants hétérotrophes. En effet, Katz *et al.* (1985) ont enregistré une stimulation de la dénitrification au niveau d'un sol pauvre en MO, lorsque celui-ci reçoit de la MOD provenant de sols très riches en MO. Plus récemment, Brye *et al.* (2001) ont signalé que les quantités de MOD lessivées à partir d'un agroécosystème prairial permettaient la dénitrification de près de 25% du NO<sub>3</sub><sup>-</sup> perdu par lessivage. Le rôle de la concentration et de la composition de la MOD dans son impact sur la dénitrification est probable. A ce titre, la localisation de la MOD dans le réseau poral (micropores vs macropores) gouverne en partie sa composition et donc *a priori* ses fonctionnalités par rapport à la dénitrification.

# MATERIEL ET METHODES

---

## 1. MATERIEL BIOLOGIQUE

### 1-1 Le sol

Le sol agricole utilisé dans cette expérimentation provient du sud du bassin arachidier sénégalais. Le site est localisé à Thyssé Kaymor (13°45' N, 15° 40' W). Le climat de cette zone est de type soudano-sahélien. Les précipitations annuelles (de juin à octobre) varient de 600 à 700 mm et la température moyenne annuelle est de 28°C. Il s'agit d'une région à vocation agricole pluviale : les cultures dominantes sont l'arachide et le mil (90% des superficies emblavées) ; le maïs, le coton et le niébé représentant les autres cultures de rente (FAO, IPNIS).

Ce sol est de type ferrugineux tropical lessivé (Maignien, 1965), à texture sablo-limoneuse, pauvre en argile et en matière organique. L'échantillonnage a concerné la couche arable 0-10 cm. Le sol a été séché à l'air libre puis tamisé à 2 mm. Les principales caractéristiques du sol sont présentées dans le **Tableau I**.

**Tableau I** : Principales caractéristiques granulométriques et chimiques du sol

Paramètres	Granulométrie (%)			C	N	C/N	pH eau	CEC meq g <sup>-1</sup>
	Argiles	Limons	Sables	(%)				
Composition	10,4	34,3	55,3	0,74	0,07	10,57	5,8	5,4

La capacité de rétention gravimétrique en eau (CRGE) du sol a été déterminée comme suite. Un échantillon de 50 g de sol est placé dans un récipient cylindrique (diamètre 3 cm) dont la base percée de quelques trous permet l'écoulement de l'eau par gravité. Le sol est ensuite humecté par capillarité en plaçant la base du cylindre au contact de l'eau. Lorsque la surface de la colonne de sol devient humide, celui-ci est alors saturé par une couche d'eau. Le dispositif est laissé à saturation pendant la nuit, puis mis à égoutter. Lorsque l'eau ne s'écoule plus du cylindre par effet de la gravité, le sol est considéré être à 100% de sa CRGE. La quantité d'eau contenue dans le sol à 100% de sa CRGE est déterminée par la différence entre la masse de sol humide et la masse de sol sec. Celle-ci est de 0,3 ml g<sup>-1</sup> sol. Dès lors, il devient possible d'extrapoler le volume d'eau à apporter à une quantité donnée de sol sec pour l'humidifier à la CRGE désirée.

## 1-2 Les résidus de culture

Les résidus végétaux ont été choisis, parmi les espèces cultivées dans le bassin arachidier, sur la base de ratios C/N contrastés afin d'étudier l'influence de la richesse initiale des résidus en composés azotés totaux sur la dynamique des émissions de N<sub>2</sub>O et des dénitrifiants. La comparaison de leurs signatures spectrales en proche infra-rouge (voir paragraphe 3-1-2) a confirmé des compositions biochimiques distinctes. L'analyse classique van Soest n'est pas disponible.

-*Zea mays* L. (maïs), famille des Poaceae, C/N=117 (0,4% N et 47,05% C)

-*Arachis hypogaea* L. (arachide), famille des Fabaceae, C/N=17 (2,48% N et 42,60% C)

Seules les parties aériennes (tiges et feuilles confondues) ont été utilisées (séchage à 65°C, broyage à 2 mm).

## 2. DISPOSITIF EXPERIMENTAL

Le sol des microcosmes a été maintenu à une teneur en eau élevée et a reçu un apport initial en nitrate en quantité non limitante afin (i) de favoriser l'émergence et le maintien du processus de dénitrification, (ii) d'étudier le seul effet de la qualité de la matière organique.

### 2-1 Mise en place du dispositif

Les expérimentations ont été entièrement menées en laboratoire (étuve) afin d'éliminer les perturbations environnementales inhérentes à un site naturel, en fixant constantes la température et l'humidité des microcosmes.

Deux séries de microcosmes (25g de sol pour 2g de résidus végétaux équivalent à une restitution de 1 t ha<sup>-1</sup>) ont été mises en place pour tous les traitements (n=4) : paillis de résidus de maïs, paillis de résidus d'arachide, témoin sans résidus. Les microcosmes de la série n°1 se présentent sous la forme de flacons en verre (120 ml, 5 cm de diamètre) qui peuvent être hermétiquement fermés pour les prélèvements gazeux. Le sol y occupe une hauteur de 1,3 cm, ce qui détermine une atmosphère résiduelle de 102 ml. Ils sont utilisés pour le suivi des teneurs en N<sub>2</sub>O et CO<sub>2</sub>, du statut chimique et microbiologique des résidus et du sol (**Photo 1**). Les microcosmes de la série n°2 sont constitués de gobelets plastiques de même diamètre que les flacons en verre de la série n°1. Ils sont exclusivement destinés à l'étude de l'activité source/puits de N<sub>2</sub>O des résidus.



**Photo 1** : Microcosmes de la série 1. De gauche à droite : sol témoin, sol sous paillis d'arachide et sol sous paillis de maïs.

Le sol de tous les microcosmes a été pré-incubé 4 semaines à 40% de sa CRGE sans apport minéral ou organique afin de permettre la reprise de son activité biologique et la stabilisation de son activité respiratoire avant l'apport des résidus de culture. Afin de s'assurer de cette stabilisation, 10 microcosmes de la série 1 ont été choisis au hasard et la teneur en  $\text{CO}_2$  de leur atmosphère a été mesurée tous les jours durant cette période.

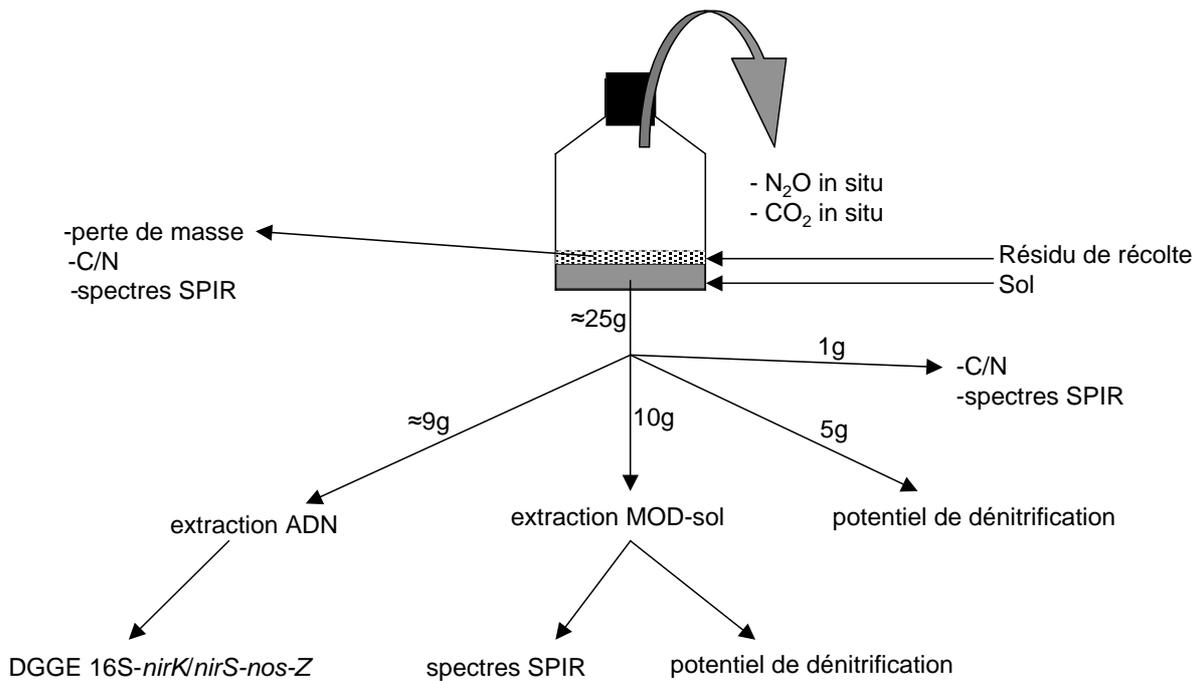
Au terme de cette première phase, quatre microcosmes de la série 1 ont été retirés du dispositif afin de préciser, avant application des traitements, le niveau initial des différents paramètres suivis pour l'atmosphère, le sol et les résidus. Dans la suite du rapport, «  $T_0$  » désigne cette étape de caractérisation du système dans son état initial. Le sol des microcosmes restant a ensuite reçu un fertilisant minéral azoté (18 mg  $\text{KNO}_3$  / microcosme, soit 0,25 mg  $\text{N-KNO}_3 \text{ g}^{-1}$  sol) de sorte que le nitrate ne puisse pas être facteur limitant de la dénitrification. L'humidité du sol a été portée par la même occasion à 70% de sa CRGE. La quasi-saturation du réseau poral favorise l'apparition des conditions d'anoxie nécessaire à la dénitrification.

Les résidus de récolte broyés (2 g) ont ensuite été disposés à la surface du sol puis humidifiés en raison de  $3 \text{ ml g}^{-1}$  de résidu. Cette humidification a été calculée afin d'éviter que les résidus secs n'absorbent une partie de l'eau contenue dans le sol. Tous les microcosmes ont alors été pesés afin de déterminer leur poids de référence correspondant au niveau d'humidité à  $T_0$  qui a été maintenue constante au cours de l'incubation à raison de trois ajustements hebdomadaires. Les différences de masse, liées à l'évaporation, étaient compensées par un arrosage à l'eau distillée, apportée par pipette à la surface du paillis ou du sol témoin.

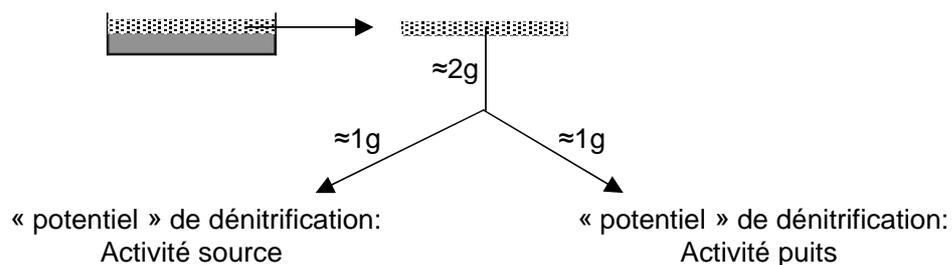
Les microcosmes des deux séries ont alors été incubés à l'obscurité et à température constante ( $28^\circ\text{C}$ ) sur une période de cinq semaines.

## 2-2 Les méthodes d'échantillonnage

À l'issue du T<sub>0</sub>, un échantillonnage destructif par semaine a été réalisé sur quatre microcosmes des deux séries d'incubation. Les **figures 5** et **6** résument la procédure d'échantillonnage pour les deux séries ainsi que la destination analytique de chaque aliquot de sol et de résidus. Pour la série 1, la chronologie d'échantillonnage était : 1) gaz, 2) résidus, 3) sol.



**Figure 5 :** Stratégie générale d'échantillonnage pour les microcosmes de la série 1



**Figure 6 :** Stratégie d'échantillonnage pour les résidus des microcosmes de la série 2

### 2-2-1 Echantillons gazeux

Avant chaque prélèvement, l'atmosphère des flacons de la série 1 a été renouvelée avec l'air ambiant à l'aide d'une seringue 50 mL. Les flacons ont alors été hermétiquement fermés pendant 3 heures. Leur teneur initiale en CO<sub>2</sub> (CO<sub>2</sub> *in situ* à T<sub>0</sub>) a été déterminée en

temps réel par prélèvement et analyse directs au niveau du microchromatographe (voir 3-2). Un échantillon de 4 ml de l'air ambiant a par ailleurs été injecté en surpression dans un tube à vide stérile de 3 ml (Labco, Buckinghamshire, UK) scellé à la cire rouge en attente du dosage  $N_2O$  ( $N_2O$  *in situ* à  $T_0$ ). Les flacons ont alors été remis en incubation à l'étuve pendant 3h. Les prélèvements gazeux ont ensuite été réalisés à l'aide d'une seringue 10 ml, après homogénéisation de l'atmosphère du flacon par 3 séries d'aspiration/injection. Un volume de 4 ml a été injecté en surpression dans un tube Labco<sup>®</sup> scellé à la cire rouge en attente du dosage  $N_2O$  ( $N_2O$  *in situ* à T-3 heures). Enfin, l'atmosphère des flacons a de nouveau été analysée en temps réel pour sa teneur en  $CO_2$  ( $CO_2$  *in situ* à T-3 heures). Ainsi, il a été possible d'évaluer l'émission nette de  $N_2O$  et de  $CO_2$  sur trois heures et de calculer la quantité de  $CO_2$  émise par unité de  $N_2O$  émis. Ces rejets gazeux sont la résultante de l'activité microbienne du sol et des résidus, sans distinction possible entre ces deux sources physiques.

#### *2-2-2 Echantillons de résidus*

Suite à l'échantillonnage gazeux, les paillis de résidus ont été retirés à la pince et pesés pour détermination de leur poids frais. Pour chaque microcosme, un aliquot humide a été pesé puis séché à 65°C afin de déterminer sa teneur en eau. Le reliquat des résidus humides a été utilisé pour les différentes analyses : perte de masse, C/N et spectres SPIR pour la série 1, activité source/puits de  $N_2O$  pour la série 2.

#### *2-2-3 Echantillons de sol*

Après échantillonnage des résidus, le sol des microcosmes de la série 1 a été transféré dans une boîte de Pétri pour une homogénéisation à la spatule avant d'être aliquoté pour les différents volets analytiques. Pour chaque microcosme, un aliquot humide de sol a aussi été pesé puis séché à 65°C afin de déterminer sa teneur en eau. Les sols de la série 2 n'ont pas été utilisés.

### 3. ANALYSES CHIMIQUES ET MICROBIOLOGIQUES

#### 3-1 Analyses chimiques sol et résidus

##### *3-1-1 Perte de masse des résidus*

L'évolution du niveau de décomposition des résidus de récolte a été observée en suivant la diminution progressive de leur masse sèche initiale (2 g) par évaluation des masses sèches résiduelles.

##### *3-1-2 Ratio C/N et spectres SPIR du sol et des résidus*

Les deux types d'échantillons ont été analysés pour leur teneur en C et en N. A cette fin, ils ont été broyés secs dans un mortier en porcelaine. Les échantillons de sol ont été finalement tamisés à 2  $\mu\text{m}$ . Les teneurs en C et N des broyats ont alors été déterminées par combustion sèche à l'aide d'un auto-analyseur élémentaire CHN EA1112 (ThermoFinnigan Series) par les services du laboratoire LAMA (Laboratoire des Moyens Analytiques) certifié ISO9001 : 2000 (US imago-IRD, Dakar). Les résultats ont été exprimés en pourcentage de C et de N.

Les échantillons de sol (40 à 60 mg) et de résidus végétaux (4 à 5 mg) sont à nouveau séchés durant une nuit : les sols sont étalés à l'air libre tandis que les résidus végétaux sont mis à l'étuve (environ 65°C) puis laissés à température ambiante 1 heure dans un dessiccateur à silicagel. Après une pesée de précision (Sartorius ME 210P), les échantillons sont analysés avec le CHN où la combustion des matières organiques est assurée par un brûleur atteignant une température de 900°C, accentuée par l'utilisation de nacelles en étain, qui permet de réaliser une combustion « Flash » à 1800°C. Cette combustion permet d'obtenir du carbone et de l'azote. Ces deux composés passent ensuite dans un catalyseur d'oxydation chauffé à 900°C où le carbone et l'azote sont transformés respectivement en gaz carbonique (CO<sub>2</sub>) et oxyde d'azote NO<sub>x</sub>. Puis, ces gaz sont transférés dans une colonne de réduction chauffée à 750°C dans laquelle l'azote va être réduit en azote moléculaire (N<sub>2</sub>). Le CO<sub>2</sub> et le N<sub>2</sub> ainsi formés se dirigent vers une colonne d'absorption d'eau pour éliminer toute trace d'humidité. Ils sont ensuite séparés dans une colonne de chromatographie en phase gazeuse utilisant l'hélium comme gaz vecteur (le HeN50 pour éviter d'avoir des résidus pouvant interférer avec l'oxydation du carbone) et basée sur la notion de coefficient de partage (temps de rétention de deux éléments différent). Un détecteur de conductibilité thermique permet alors de déterminer

la quantité de carbone et d'azote présent dans les échantillons, grâce au logiciel EAGER 300 FLASH EA 1112.

Les sols et les résidus ont aussi été caractérisés par analyse de leur spectre de réflectance de la lumière en proche infra-rouge (NIRS : *near infra-red spectroscopy* ; SPIR *spectroscopie proche infra-rouge*) afin de suivre la modification de la qualité de la matière organique des échantillons en cours d'incubation. Le rayonnement proche infra-rouge (700-2500 nm) est absorbé par les différentes liaisons chimiques covalentes, telles que C-H, C-C, C = C, N-H et O-H, caractéristiques de la matière organique (Ludwig et Khanna, 2001). La composition chimique de la MO de la litière (ou du sol) détermine la nature et le nombre des liaisons covalentes présentes et, par conséquent, la longueur d'onde et la quantité de rayonnement proche infra-rouge qui est absorbée (Foley *et al.*, 1998). Cela signifie que le SPIR d'un échantillon est un reflet qualitatif de la composition chimique de l'échantillon (Shenk *et al.*, 1992). Tout changement significatif dans la composition chimique de la matière organique se ressent sur l'évolution de sa signature spectrale. Avec l'utilisation que nous en avons faite, cette technique ne fournit pas d'information sur la composition biochimique *sensu stricto* des échantillons. L'intérêt réside dans la comparaison qualitative des spectres par analyses multivariées permettant de conclure sur leur similitude ou leur divergence, éléments considérés comme relatifs à leur évolution biochimique.

Ces mesures ont été effectuées à l'UR 179-IRD (Montpellier, France) par Didier Brunet sur la base des reliquats de sols et de résidus broyés issus des analyses C/N (Brunet *et al.*, 2007). Cette technique a également été appliquée sur les fractions organiques dissoutes (MOD) des sols (mesure de la transfectance sur une lame liquide de 0,1 mm d'épaisseur). Les spectres bruts de réflectance/transfectance ont été déterminés dans la zone de longueur d'onde proche infra-rouge 1100-2500 nm avec le spectrophotomètre Foss NIRSystems 5000 (Sylver Spring, MD, USA). Les données ont été acquises par le logiciel WinISI III-V1.50<sup>e</sup> (Foss NIRSystems/Tecator Infracsoft International, LLC, Sylver Spring, MD, USA). Les spectres bruts ont été réduits en ne considérant que les valeurs mesurées moyennes tous les 10 nm, soit des spectres ne portant plus que sur 140 points de mesure. Les spectres ont alors été mathématiquement transformés selon Brunet *et al.* (2007).

### 3-2 Emissions réelles (*in situ*) de N<sub>2</sub>O et de CO<sub>2</sub>

La teneur des échantillons gazeux (voir 2-2-1) en CO<sub>2</sub> a été déterminée avec le microchromatographe à phase gazeuse de type SRA (Analytical Instruments, MTI P200,

Microsensor Technology Inc., Fremont, CA, USA) équipé d'un détecteur de conductibilité thermique. Les données ont été acquises par le logiciel MTI analytical Instruments EZChrom 200 data system. La teneur *in situ* en N<sub>2</sub>O de l'atmosphère des microcosmes de la série 1 a été déterminée dans l'UR 179-IRD (Montpellier, France) par Joele Louri par chromatographie à phase gazeuse avec détecteur à capture d'électrons (CP-3800 Varian, Les Ulis, France). Les données ont été acquises avec le logiciel Station Star 5.52 (Varian). La sensibilité de la détection du N<sub>2</sub>O par capture d'électrons est largement supérieure à celle par conductivité thermique, ce qui permet d'établir la teneur en N<sub>2</sub>O de l'air ambiant (autour de 0,7 ppm) qui serait nulle avec le deuxième système de détection. Les résultats ont été exprimés en µg C-CO<sub>2</sub> ou µg N-N<sub>2</sub>O g<sup>-1</sup> sol sec h<sup>-1</sup> incubation.

### 3-3 Extraction de la fraction organique dissoute du sol

Il existe de nombreux procédés d'extraction de la matière organique dissoute qui peuvent tous en modifier les caractéristiques physico-chimiques (Zoltnay, 2003). Ici, l'extraction a été pratiquée sous des conditions modérées à l'eau, à température ambiante, sans sel, avec une filtration finale stérilisante à 0,2 µm afin d'extraire une fraction organique la plus proche de celle du sol, hormis sa nécessaire dilution (Jones et Willett, 2006). Une suspension de 10 g eq sol sec combinés à 25 ml d'eau déminéralisée et stérilisée par autoclave a été agitée pendant 1h à 100 rpm sur une table d'agitation horizontale. La suspension a ensuite été centrifugée (8,000 × g, 4°C, 10 min). Le surnageant a été collecté, stérilisé par filtration à 0,2 µm (Sartorius, Göttingen, Allemagne). Le filtrat a été conservé à -20°C avant analyse par la technique SPIR et utilisation pour la mesure du semi-potentiel de dénitrification.

### 3-4 Potentiel et semi-potentiel de dénitrification

Le potentiel de dénitrification consiste à caractériser sur une période déterminée l'aptitude du pool enzymatique dénitrifiant d'un échantillon biologique à réduire le nitrate en N<sub>2</sub>O en présence d'acétylène (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>) sous des conditions optimales de dénitrification, c'est à dire en anoxie totale et en présence de quantités non limitantes de nitrate et de carbone organique introduites par une solution nutritive (Lensi *et al.*, 1995). L'acétylène est utilisé pour inhiber l'activité de l'enzyme oxyde nitreux réductase, empêchant ainsi la réduction du N<sub>2</sub>O en N<sub>2</sub>. Le semi-potentiel consiste aussi à mesurer la production de N<sub>2</sub>O mais en n'instaurant pas de conditions non limitantes, soit pour le carbone organique, soit pour le

nitrate afin de mesurer l'aptitude de la matière organique ou du nitrate endogène à l'échantillon à soutenir la production de  $N_2O$ .

#### *3-4-1 Potentiel de dénitrification sur sol*

La solution nutritive utilisée pour le sol permettait d'introduire 0,25 mg N- $KNO_3$  par g de sol ainsi que 0,1 mg C- $C_6H_{12}O_6$  (glucose) et 0,1 mg de C- $C_4H_6O_4$  (acide succinique) par g de sol, soit 0,2 mg  $C_{org}/g$  sol, ces deux molécules organiques étant facilement assimilables par les bactéries. Cette solution a été dégazée pendant 45 minutes dans une cloche hermétique soumise à un vide partiel afin de diminuer sa teneur en oxygène dissous.

Immédiatement après échantillonnage d'un microcosme de la série 1, un aliquot de sol (5 g eq sec) a été introduit dans un flacon en verre de 60 ml, préalablement stérilisé par autoclave. Afin d'instaurer des conditions d'anoxie dans le flacon, ce dernier a été hermétiquement fermé puis un vide partiel a été obtenu par aspiration de l'air du flacon pendant 1 min via une seringue reliée à une pompe à vide. Le vide partiel du flacon a ensuite été remplacé par circulation d'un flux d'hélium (He) durant 30 sec. L'hélium, biologiquement inerte, n'influe pas sur l'activité des enzymes de la dénitrification. L'atmosphère d'hélium a ensuite été enrichie à hauteur de 10% (vol/vol) par l'acétylène ( $C_2H_2$ ). Enfin, 5 ml de l'atmosphère « hélium-acétylène » ont été soustraits du flacon et remplacés par 5 ml de la solution nutritive dégazée (ratio sol/solution 1:1), par le moyen d'une seringue connectée à un filtre 0,2  $\mu m$  afin d'éviter l'introduction de microorganismes extérieurs. L'ajout de cette solution nutritive constitue le temps  $T_0$  de la mesure de dégagement de  $N_2O$ . Les flacons ont alors été mis sous agitation (130 rpm) à température ambiante (25°C). Les mesures ont été effectuées au bout de 22 h d'incubation avec le microchromatographe à détecteur par conductibilité thermique. Cette durée d'incubation a été déterminée suite à des mesures préalables en cinétique. Au cours de cette phase préparatoire, des mesures ont été réalisées toutes les 3 heures. Le tracé des émissions de  $N_2O$  en fonction du temps a permis alors d'identifier la zone linéaire de dégagement de  $N_2O$ , ainsi que la période au-delà de laquelle cette relation n'est plus linéaire. Cette deuxième zone a été exclue de l'interprétation car elle correspond à une prolifération bactérienne dans la suspension de sol et ne permet donc pas de caractériser le potentiel de dénitrification des communautés bactériennes initialement présentes dans l'échantillon. Les résultats bruts (% de  $N_2O$  de l'atmosphère du flacon) ont été finalement exprimés en  $\mu g$  N- $N_2O$   $g^{-1}$  sol  $sec$   $h^{-1}$  d'incubation.

### *3-4-2 Potentiel de dénitrification des résidus de récolte*

Cette phase concerne uniquement les résidus de récolte de la série n°2. Ceux-ci ont été homogénéisés à la spatule dans une boîte de Pétri avant d'être aliquotés pour les différentes analyses. Une partie a été réservée pour la détermination du niveau d'humectation.

#### *- Dégagement brut de N<sub>2</sub>O par les résidus*

Immédiatement après échantillonnage des résidus de surface des microcosmes de série 2, un aliquot humide d'environ 1g eq sec a été introduit dans un flacon sérum de 60 ml préalablement stérilisé. Ce flacon a alors suivi les différentes étapes décrites ci-dessus pour le sol, à la différence du volume de solution nutritive ajusté ici à 1 ml. Les mesures des teneurs en N<sub>2</sub>O ont été également effectuées au bout de 22 h d'incubation avec le même microchromatographe à détecteur par conductibilité thermique. Après correction du poids humide de résidus en poids sec, les résultats ont été exprimés en  $\mu\text{g N-N}_2\text{O g}^{-1}$  résidu sec h<sup>-1</sup> d'incubation.

#### *- Activité puits de N<sub>2</sub>O des résidus*

Le but de cette mesure est de déterminer dans quelle proportion la microflore des résidus est capable de réduire le N<sub>2</sub>O en N<sub>2</sub>. De la même manière que pour l'activité source, environ 1g eq sec de résidus a subi un procédé similaire uniquement pour l'obtention de l'anoxie et l'ajout de solution nutritive dégazée. Mais contrairement à l'activité source, l'atmosphère d'hélium n'a pas été enrichie par de l'acétylène afin de ne pas inhiber l'oxyde nitreux réductase responsable de la réduction du N<sub>2</sub>O en N<sub>2</sub>. Par ailleurs, cette atmosphère a été enrichie par 0,3% de N<sub>2</sub>O pur (vol/vol) et la solution nutritive ne contenait pas de nitrate afin de ne pas favoriser l'éventuelle émission de N<sub>2</sub>O par le résidu. Avant l'incubation, une première mesure de la teneur en N<sub>2</sub>O a été effectuée pour caractériser la quantité exacte de N<sub>2</sub>O présent initialement dans l'atmosphère du flacon. Une deuxième mesure a été réalisée après 22 h d'incubation. Quatre flacons témoin stériles ne contenant qu'une atmosphère d'hélium enrichie à 0,3% en N<sub>2</sub>O ont été incubés et analysés en parallèle afin de vérifier l'absence de fuite du dispositif. Les résultats ont été exprimés en % de N<sub>2</sub>O initial réduit en N<sub>2</sub> à l'issue de l'incubation.

### *3-4-3 Semi-potentiel de dénitrification avec la MOD du sol*

Le but de cette mesure est de déterminer dans quelles proportions la matière organique dissoute extraite du sol au cours de la cinétique de minéralisation des paillis et des

microcosmes non amendés peut conduire à l'émission de  $N_2O$ , en conditions non limitantes en nitrate et en anoxie.

Un dispositif très proche de celui employé pour le potentiel de dénitrification sur le sol a été utilisé (voir 3-4-1). Des flacons sérum de 60 ml préalablement stérilisés ont reçu 5 g de sol sec. Le sol a ensuite été pré-incubé 15 jours à 40% de sa CRGE, afin de permettre la reprise de son activité biologique et la stabilisation de son activité respiratoire, sur la base des données obtenues pour la même mesure lors de la mise en place des microcosmes des séries 1 et 2 (voir section Résultats, **Figure 10**). Au terme de cette période, les flacons ont été hermétiquement fermés et ont suivi l'ensemble des étapes décrites au niveau du potentiel de dénitrification sur le sol, à cette différence près que la solution nutritive glucose-succinate a été remplacée ici par 5ml de MOD, issue du sol de tous les microcosmes de la série 1 au cours des cinq semaines. Ainsi, à quatre microcosmes issus de l'un des cinq stades de prélèvement de la série 1 (paillis ou témoin) ont correspondu quatre flacons de semi-potential alimentés par la MOD extraite du sol de ces mêmes microcosmes. Avant introduction dans les flacons sérum, ces extraits de MOD ont tous été enrichis en nitrate ( $50 \mu\text{l}$  de  $KNO_3$  concentré à  $0,72 \text{ mg ml}^{-1}$ ), permettant d'introduire  $0,25 \text{ mg N-KNO}_3 \text{ g}^{-1} \text{ sol}$ . Les mesures des teneurs en  $N_2O$  ont été effectuées au bout de 36 h d'incubation avec le micro chromatographe à détecteur par conductibilité thermique. Les résultats sont exprimés en  $N-N_2O \text{ g}^{-1} \text{ sol sec h}^{-1}$  d'incubation.

### 3-5 Analyses moléculaires

En raison de contraintes budgétaires, trois répétitions sur quatre ont été aléatoirement choisies pour l'analyse de la diversité structurale des communautés bactériennes totales et dénitrifiantes du sol. Ce choix était permis étant donné que la mesure des principales activités biologiques était très répétable d'un réplicat à l'autre (émission de  $CO_2$ , potentiel de dénitrification), de même que les teneurs du sol en C et N. La diversité de la communauté bactérienne totale a été étudiée par la technique PCR-DGGE (Polymerase Chain Reaction - Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) appliquée au gène ribosomal 16S (DGGE-16S pour la suite). Les communautés nitrite réductase et oxyde nitreux réductase ont été caractérisées respectivement par DGGE-*nirK/nirS* et par la technique PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism) appliquée au gène *nosZ* (RFLP-*nosZ* pour la suite).

### 3-5-1 Extraction des acides nucléiques du sol

Le principe de l'extraction de l'ADN total du sol repose sur une lyse physique des cellules directement dans la matrice du sol, suivie d'une élimination partielle des principaux contaminants (protéines, polysaccharides, acides humiques). Ce premier extrait d'ADN est alors concentré puis purifié une deuxième fois par l'usage d'un kit commercial. La méthode utilisée ici a été initialement développée par Porteous *et al.* (1997) et modifiée par Assigbetse *et al.* (2005) (voir **Annexe 1** pour la préparation des réactifs). Pour un échantillon de sol donné, deux extractions indépendantes ont été réalisées puis les deux extraits ont été poolés. Un échantillon de 0,5 g de sol est mis en présence de 0,5 g de billes de zirconium stériles (diamètre 0,1-0,75 mm) et de 1 ml de tampon de lyse (NaCl 0,25M ; EDTA 0,1M ; pH 8). Deux passages alternés, agitateur « bead-beater » / bain marie (65°C), assurent la dispersion physique et l'éclatement des cellules. Ensuite, une centrifugation (13,000 × g, 15 min, 4°C) permet de séparer la phase aqueuse (contenant entre autre les acides nucléiques en solution) de la phase solide (sol et débris). Cette phase aqueuse est alors récupérée par pipettage (600 µl) et les acides nucléiques précipités à l'acétate de potassium 5M (+ 75 µl) et au polyéthylène glycol 8000 40% (+ 250 µl) pendant 2h à -20°C. Après centrifugation (13,000 × g, 15 min, 4°C), le culot est incubé à 65°C en présence d'une solution de CTAB 2% (1,4M NaCl ; 0,1M EDTA ; CTAB 2%) (+ 600 µl) jusqu'à sa dissolution complète. La purification se poursuit par agitation modérée en présence de chloroforme (+ 600 µl), suivie d'une centrifugation (13,000 × g, 10 min, température ambiante). La phase aqueuse supérieure est ensuite mélangée avec de l'isopropanol (+ 600 µl) à -20°C pour au moins 15 minutes afin de précipiter les acides nucléiques. Après centrifugation du mélange (13,000 × g, 15 min, 4°C) et élimination du surnageant, le culot est lavé par de l'acétate d'ammonium 2,5M (+ 450 µl) et de l'éthanol 95° (+ 1 ml) à -20°C pour au moins 15 minutes. Suite à une nouvelle centrifugation, le culot est lavé à l'éthanol 70°. Enfin, le culot d'acides nucléiques est séché dans une cloche à vide partiel, et dissous avec de l'eau ultra-pure stérile (+ 50 µl). Les deux réplicats d'un même échantillon de sol sont alors poolés. L'extrait brut obtenu à la fin de l'extraction est purifié à l'aide du kit commercial Wizard<sup>®</sup> DNA Clean-Up System (Promega, Charbonnières, France) (**Annexe 2**). La concentration des extraits en ADN est ensuite déterminée par électrophorèse en gel d'agarose 2% (TBE 1×, 100 V, 45 min), en ayant recours à une gamme étalon (dilution sérielle 1/2 d'ADN de thymus de veau de 400 à 12 ng/10 µl) (**Annexe 3**). Après migration, le gel est coloré au bromure d'éthidium (1 mg l<sup>-1</sup>) pendant 30 minutes, rincé à l'eau déminéralisée pendant 15 minutes et enfin photographié sur table UV avec le logiciel Bio-Capt (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, France). L'image

obtenue est analysée par le logiciel TL120 TotalLab (Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, UK). L'ADN est conservé à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'à utilisation pour les amplifications PCR.

### 3-5-2 Amplification des gènes marqueurs

L'amplification par PCR est une technique permettant d'obtenir rapidement, sur la base d'un extrait initial d'ADN, des millions de copies d'un fragment cible d'ADN par recours à des amorces spécifiques, encadrant la région à amplifier, et à l'activité de l'ADN polymérase.

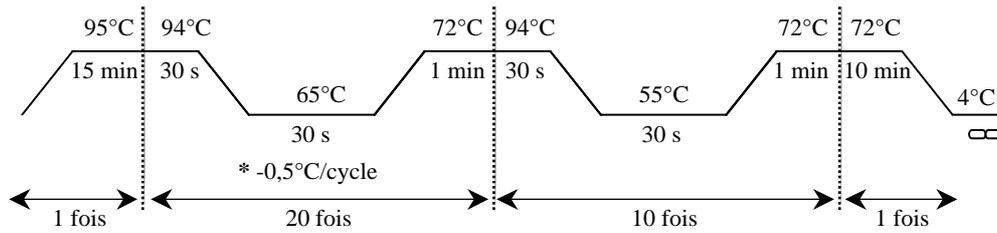
Toutes les réactions de PCR ont été réalisées à l'aide du thermocycleur GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 9700 (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Les gènes marqueurs concernés sont : l'ADNr 16S pour l'étude de la communauté bactérienne totale (amorces EUB338f et UNIV518r, Ovreas *et al.*, 1997), *nirK*, *nirS* et *nosZ* pour les gènes fonctionnels de la dénitrification (amorces F1aCu/R3Cu, cd3aF/R3cd et nosZf/nosZr respectivement, Throbäck *et al.*, 2004). Les amorces EUB338f, R3Cu et R3cd comportent en position 5' un GC-clamp permettant de discriminer les amplifiats selon leur GC% par électrophorèse sur gel polyacrylamide à gradient dénaturant chimique (DGGE) (voir **Annexe 4** pour la séquence des amorces). Profil thermique et mélange réactionnel (**Tableau II**) différent en fonction du gène ciblé.

**Tableau II** : Mélanges réactionnels PCR pour un échantillon et tailles attendues des amplifiats.

Gènes	ADN (ng)	HotStarTaq <sup>®</sup> (mix réactif) ( $\mu\text{l}$ )	Amorces ( $\mu\text{M}$ )	BSA (albumine sérum de bœuf) ( $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$ )	Eau ultra-pure stérile ( $\mu\text{l}$ )	Taille amplifiat par rapport à taille gène (pb)
16S	2,5	12,5	0,5	-	7,5	220 / 1500
<i>nirK</i>	0,25	12,5	1	600	4	505 / 1131
<i>nirS</i>	0,1-5	12,5	1	1000	2,5	458 / 1683
<i>nosZ</i>	2,5	12,5	1	600	3	700 / 1905

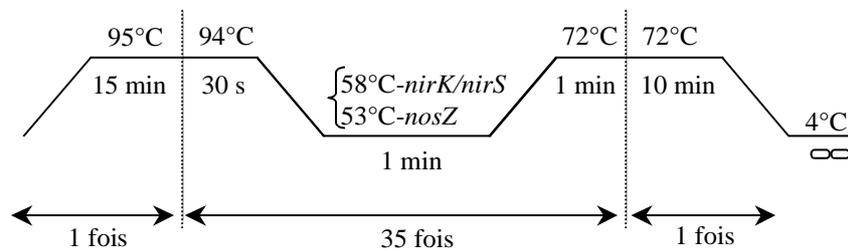
Tous les cycles thermiques comportent comme phase initiale une dénaturation à  $95^{\circ}\text{C}$  de 15 min afin d'activer l'ADN polymérase du mix HotStarTaq<sup>®</sup> (HotStarTaq<sup>®</sup> Master Mix Kit, Qiagen, Courtaboeuf, France) (**Annexe 5**)

Le gène ADNr 16S a été amplifié avec le cycle thermique « touchdown » suivant (**Figure 7**) :



**Figure 7** : Cycle thermique pour l'amplification PCR du gène ADNr 16S marqueur de la communauté bactérienne totale.

Les gènes fonctionnels de la dénitrification ont été amplifiés avec les cycles thermiques suivants (**Figure 8**) :



**Figure 8** : Cycles thermiques pour l'amplification PCR des gènes marqueurs *nirK/nirS* et *nosZ* des communautés dénitrifiantes nitrite et oxyde nitreux réductase.

Pour un extrait d'ADN donné, chacun des gènes a été amplifié en double et les duplicats ont été poolés. La spécificité de la taille des amplifiats, et la présence éventuelle de co-amplifiats aspécifiques, ont été contrôlées sur gel d'agarose 2% en présence d'un marqueur de poids moléculaire (Sambrook *et al.*, 1989) (**Annexe 6**) selon la même méthode de coloration de l'ADN spécifiée pour la quantification des extraits purifiés d'ADN.

### 3-5-3 Empreintes moléculaires de diversité structurale

La structure génétique des communautés bactériennes totales et nitrite réductase (gènes *nirK* et *nirS*) a été étudiée par DGGE (**Annexe 8**) selon un même protocole, tandis que la structure génétique de la communauté oxyde nitreux réductase (gène *nosZ*) a été étudiée par RFLP.

Seuls les amplifiats *nirK* ont été purifiés avec MinElute™ PCR purification Kit (Qiagen) avant le dépôt DGGE (**Annexe 7**). Les gels DGGE étaient constitués de polyacrylamide à 8% (acrylamide-bisacrylamide 40%-37.5:1, Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France), TAE

1× (**Annexe 9**). et comportaient un gradient dénaturant de formamide et d'urée de 45 à 70% (**Annexe 10**). La migration a été réalisée dans un tampon TAE 1× avec l'Ingeny phorU system (Ingeny International, Goes, The Netherlands) à 60°C et 50 mA-100 V pendant 17 h.

Afin de révéler le polymorphisme de longueur des fragments de restriction (technique RFLP) (Philippot et Hallin, 2006), les amplifiats *nosZ* de longueur spécifique (700 pb) ont été préalablement excisés à partir de gel agarose 2% révélés au BET et purifiés par Wizard® SV Gel Clean-Up System (Proméga) (**Annexe 11**). Les amplifiats *nosZ* spécifiques ainsi purifiés ont ensuite été quantifiés sur gel agarose (2%) à l'aide d'une gamme étalon de thymus de veau (**Annexe 3**). Environ 100 ng de purifiats *nosZ* ont alors été digérés par l'enzyme de restriction *AluI* (+ 10 U) dans un mélange réactionnel total de 20 µl contenant 2 µl de tampon d'incubation 10× et 10 mg/ml de BSA (Proméga). Le mélange réactionnel a été incubé à 37°C pendant 2 h et la réaction enzymatique stoppée par congélation. Le dépôt de 2µl du produit de la digestion sur agarose 2% en présence d'un marqueur de taille a permis de vérifier la digestion effective des amplifiats. La migration des produits de la digestion a été réalisée sur gel acrylamide 6% (acrylamide-bisacrylamide 40%, 29:1, Sigma-Aldrich), à température ambiante avec le dispositif Dcode™ system (Biorad, California, USA) dans un tampon TBE 0,5× (**Annexe 12**), à 17 mA-90 V pendant 7 h avec un marqueur de poids moléculaire régulier de 50 pb (Proméga).

La révélation des profils moléculaires DGGE et RFLP a été opérée par coloration des gels au SYBR® Green I (0,5×) (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) dilué dans l'eau distillée, à température ambiante durant 20 min, suivie d'un bain de rinçage à l'eau distillée de 10 min. La numérisation des gels a été obtenue avec le logiciel Bio-Capt (Vilber Lourmat). Les profils DGGE et RFLP ont ensuite été codés avec le logiciel TL120 TotalLab (Nonlinear Dynamics) en termes de présence-absence des bandes pour les gels RFLP, et de présence-absence avec intensité relative des bandes dans le cas des gels DGGE (l'intensité relative d'une bande étant calculée comme son intensité absolue divisée par l'intensité totale de sa piste d'origine, elle-même égale à la somme des intensités absolues des bandes de la piste).

L'indice de Shannon a été utilisé pour exprimer la diversité bactérienne à partir des empreintes moléculaires DGGE et a été calculé sur la base des intensités relatives des bandes selon :

$$H = -\sum p_i \ln p_i, i \text{ variant de } 1 \text{ à } n$$

$n$  représente le nombre total de bandes dans une piste et  $p_i$  l'intensité relative de la  $i^{\text{ème}}$  bande de la même piste.  $H$  est ici lié au nombre absolu de bandes ( $S$ , nombre total de bandes par piste) et à l'équitabilité de leur importance relative ( $E$ ) selon :  $H = E \ln(S)$ .

#### *3-5-4 Analyses statistiques*

Les données quantitatives (teneurs C/N, taux d'émissions gazeuses) ont été comparées par le test de Fisher PLSD à 5% (superANOVA, Abacus Concepts, Berkeley, CA).

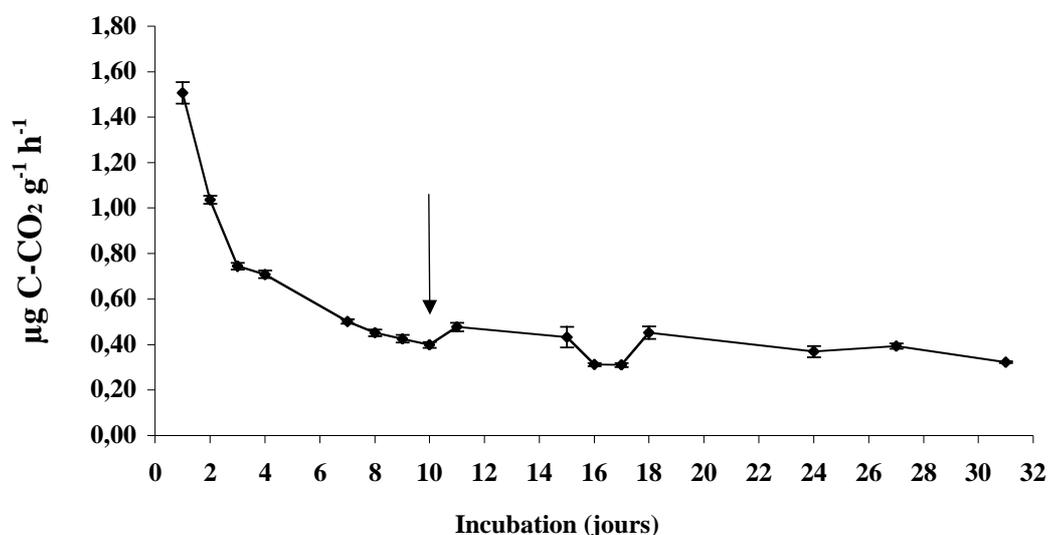
La comparaison des spectres proche infra-rouge et des empreintes moléculaires a été conduite par analyse en composantes principales (ACP) avec le logiciel ADE-4 (Thioulouse et *al.*, 1997) sur la base de données centrées (matrice de covariance). La solution graphique choisie pour la représentation du plan principal des ACP repose sur le rattachement des points constitutifs d'un nuage (réplicats d'un traitement à une date donnée) à son barycentre.

Des analyses de co-inertie ont été réalisées par Jean Thioulouse (UMR 5558 CNRS-UCBL1, Lyon, France) entre les profils moléculaires associés aux communautés dénitrifiantes et les spectres proche infra-rouge du sol correspondant aux mêmes échantillons ( $n=3$ ) avec le logiciel ADE4.

# RESULTATS

---

## 1. REACTIVATION ET STABILISATION BIOLOGIQUE DU SOL



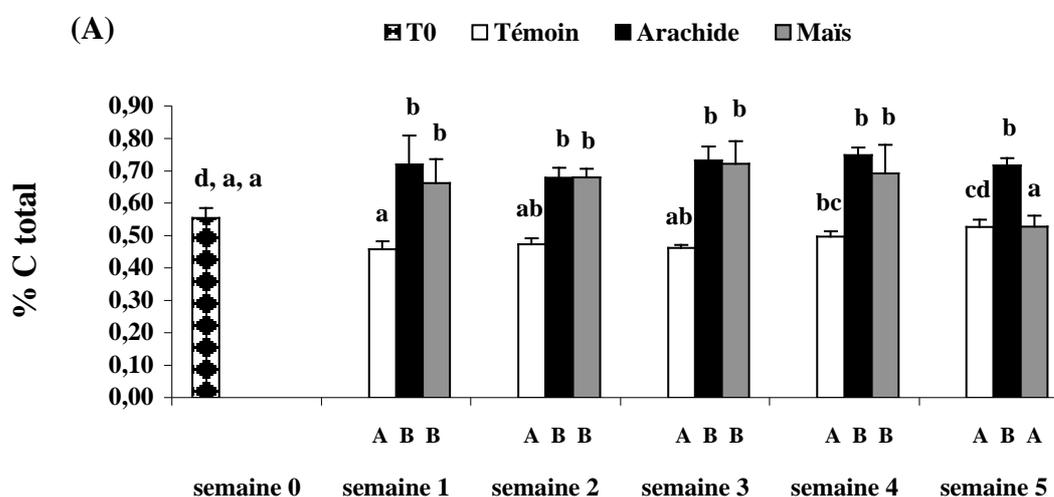
**Figure 9** : Evolution de la respiration du sol (incubations de 4 heures) sur une période de 31 jours après réhumectation du sol sec à 40% de sa capacité de rétention gravimétrique maximale (moyenne et écart-type, n=10).

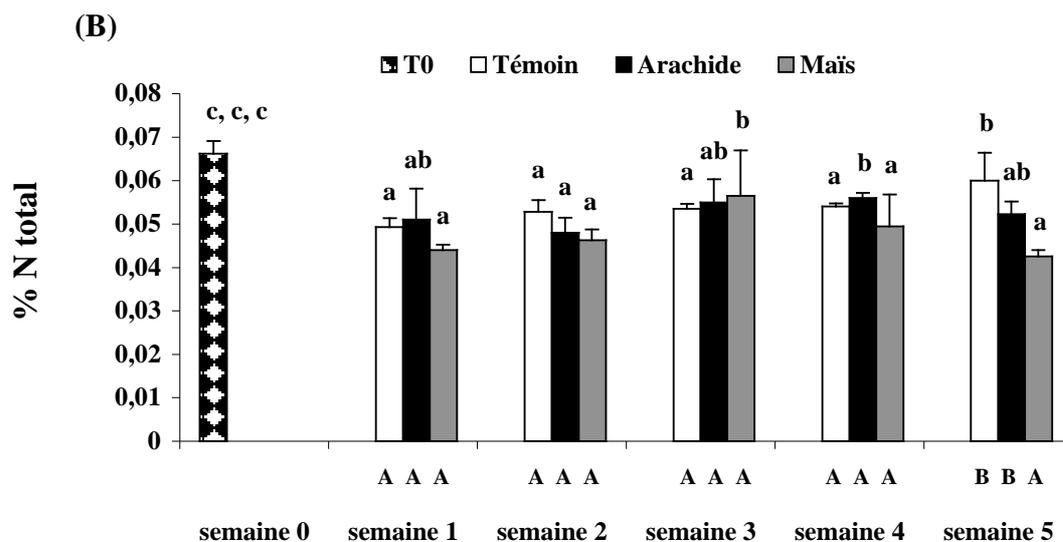
La respiration du sol diminue fortement au cours des trois premiers jours d'incubation (**Figure 9**). Cette diminution se poursuit, mais à un rythme moins élevé, jusqu'au dixième jour d'incubation (flèche). Au-delà, la respiration se stabilise autour d'une valeur moyenne de 0,4 µg C-CO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.

## 2. EVOLUTION CHIMIQUE DU SOL ET DES RESIDUS DE RECOLTE

### 2-1 Le sol

#### 2-1-1 Dosage du carbone total et de l'azote total du sol



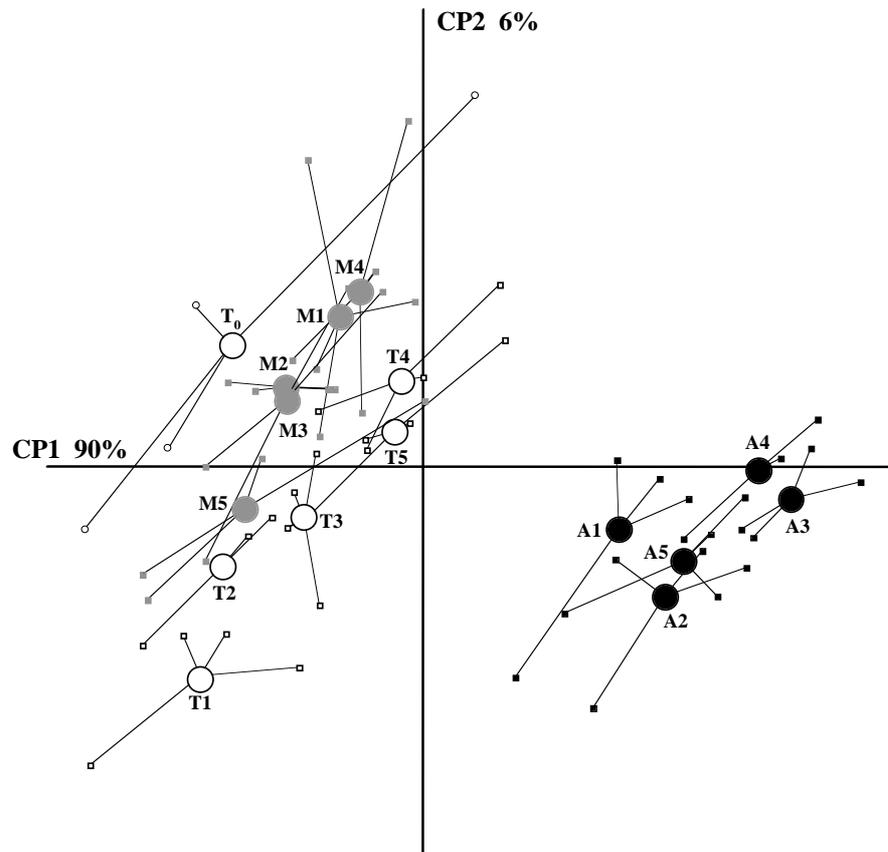


**Figure 10 :** Evolution des teneurs du sol en (A) carbone et (B) azote totaux (moyenne et écart-type, n=4).

T0 : avant traitement ou semaine 0 (sol après les quatre semaines de pré-incubation et enrichi en nitrate), Témoin : sol non amendé, Arachide : sol amendé avec des résidus d'arachide, Maïs : sol amendé avec des résidus de maïs. Les lettres capitales en dessous des colonnes indiquent des différences significatives ( $P < 0,05$ ) entre traitements à une date donnée. Les lettres minuscules au-dessus des colonnes indiquent des différences significatives ( $P < 0,05$ ) entre différents stades d'échantillonnages d'un même traitement. Les lettres minuscules, séparées par une virgule, au-dessus de la colonne semaine 0, sont relatives à la comparaison temporelle intra-traitement (témoin, arachide, maïs, respectivement de la gauche vers la droite).

Comparées au sol initial et au témoin, les teneurs en carbone des deux types de sols amendés sont significativement augmentées dès la première semaine d'incubation (de 0,55 à 0,72% pour l'arachide et de 0,55 à 0,66% pour le maïs), sans évolution ultérieure notable, à l'exception d'une baisse observée à la semaine 5 sous résidus de maïs (**Figure 10A**). Par ailleurs, le sol est enrichi en C de manière similaire entre les deux types d'amendement (sauf semaine 5), soit une absence d'effet du type de résidu sur ce paramètre. A l'inverse, les teneurs en azote des sols amendés, ainsi que des sols témoins, diminuent significativement dès la première semaine d'incubation (**Figure 10B**). Les teneurs les plus élevées ont été enregistrées à la cinquième, troisième et quatrième semaine d'incubation, respectivement pour les modalités témoin, maïs et arachide. En dehors de ces pics, les teneurs sont stables au cours du temps. La qualité des résidus n'induit pas de différence significative entre traitements, à l'exception à nouveau du traitement maïs en semaine 5 (valeur la plus basse). De même, le ratio C/N est stable au cours du temps pour tous les modalités (non montré).

## 2-1-2 Evolution des caractéristiques biochimiques du sol



**Figure 11** : Plan principal de l'ACP réalisée sur les signatures spectrales proche infra-rouge du sol (n=4). Les cercles sont les barycentres des quatre répétitions pour un traitement donné et une date d'échantillonnage donnée. T<sub>0</sub> : sol après les quatre semaines de pré-incubation et enrichi en nitrate, T : sol témoin, A : sol sous résidus d'arachide, M : sol sous résidus de maïs, 1 à 5 : semaine 1 à semaine 5.

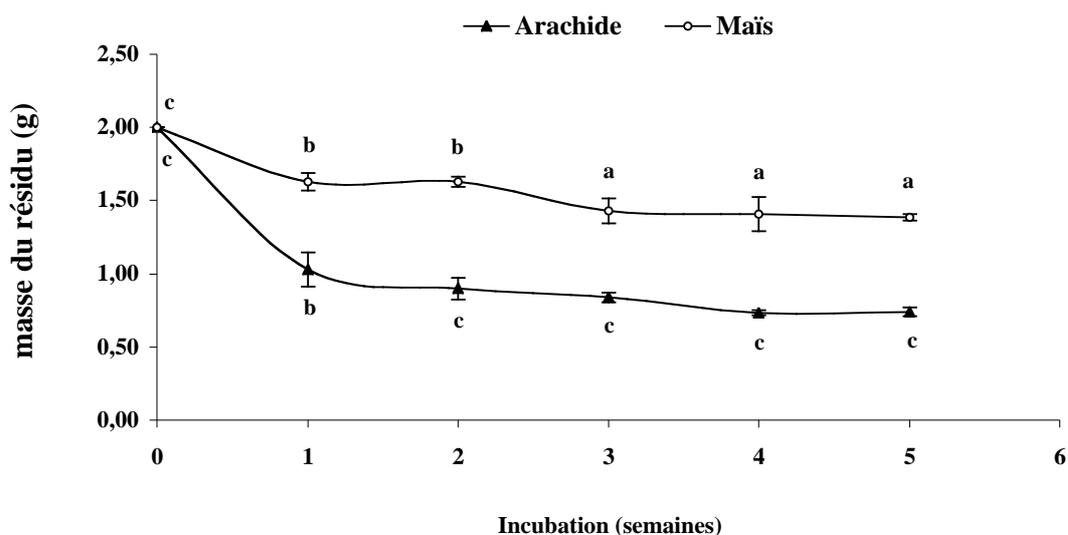
L'analyse en composantes principales des spectres proche infra-rouge des sols révèle en premier lieu une forte absorption de l'inertie totale sur la première composante (90%), ce qui confère à ce jeu de données un caractère quasi-univarié et en facilite l'interprétation par projection des points sur cette composante (**Figure 11**). Il apparaît aussi une forte variabilité entre répétitions pour tous les traitements, à toutes les dates (y compris le sol dans son état initial), comme indiqué par l'éparpillement manifeste des points autour de leur barycentre. Dans ce contexte, deux groupes de points se séparent suivant la première composante : d'un côté la modalité arachide et de l'autre les modalités maïs et témoin. Cette situation traduit l'existence d'une forte évolution du type de matière organique présente dans les sols sous résidus d'arachide par rapport aux autres traitements. Les résidus de maïs apparaissent donc sans effet notable sur l'évolution de la qualité du pool organique du sol. Par ailleurs, il n'est pas possible d'identifier une évolution progressive et « linéaire » des signatures spectrales au

fil du temps quel que soit le traitement. Toutefois, les plus grands écarts temporels observables concernent la semaine 1 et la semaine 4, la semaine 1 et la semaine 3, la semaine 5 et la semaine 4, respectivement pour le témoin, l'arachide et le maïs.

**Ainsi, l'essentiel des modifications chimiques du sol se déroule au cours de la première semaine d'incubation : tandis que les teneurs en C ont été augmentées suite à la mise en place des paillis, les sols ont été simultanément appauvris en azote. Ces modifications quantitatives sont indépendantes du type de résidu employé. Si les sols sous paillis présentent les mêmes teneurs en C, la diversité de leurs composés organiques diffère largement. Bien que plus riches en C, les sols sous paillis de maïs n'offrent « curieusement » que très peu de différences qualitatives avec les sols témoins. Il n'y a, au-delà de la première semaine, aucune évolution temporelle marquée sur l'ensemble de ces paramètres.**

## 2-2 Les résidus de récolte

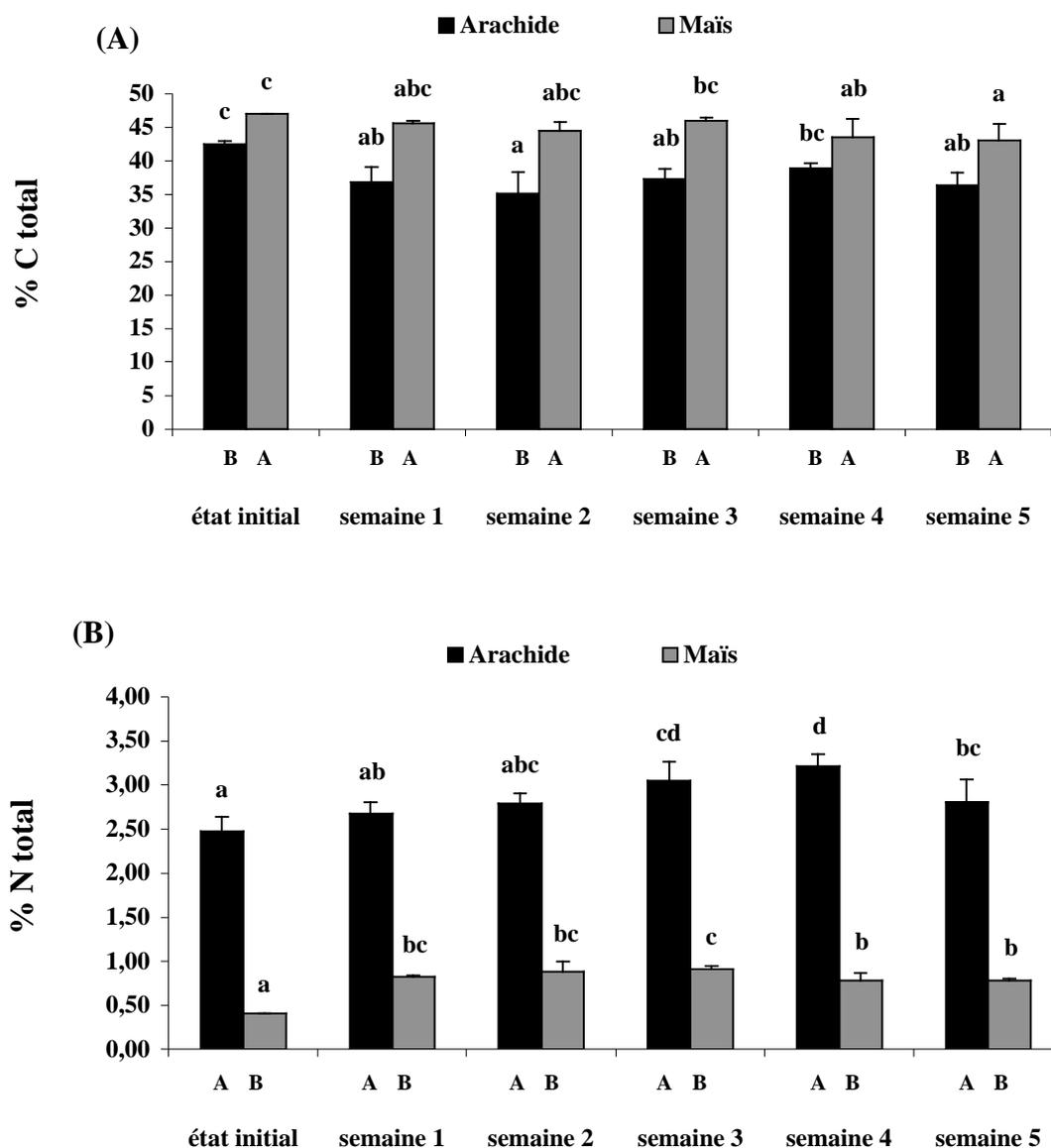
### 2-2-1 Perte de masse



**Figure 12 :** Evolution de la masse sèche des résidus végétaux (moyenne et écart-type, n=4). Différentes lettres minuscules sur une courbe donnée indiquent des différences significatives ( $P < 0,05$ ) entre stades d'échantillonnage du paillis correspondant.

La perte de masse la plus forte survient durant la première semaine pour les deux types de résidus (**Figure 12**). Au-delà, l'amplitude des diminutions est plus faible. L'ampleur de cette perte est spécifique à chaque résidu. Le paillis d'arachide a perdu 48 et 62% de sa masse initiale, respectivement à la semaine 1 et à l'issue de l'incubation, contre 18 et 30% pour le maïs, soit une perte de masse deux fois plus importante pour les résidus d'arachide par rapport au maïs.

## 2-2-2 Dosage du carbone total et de l'azote total des résidus

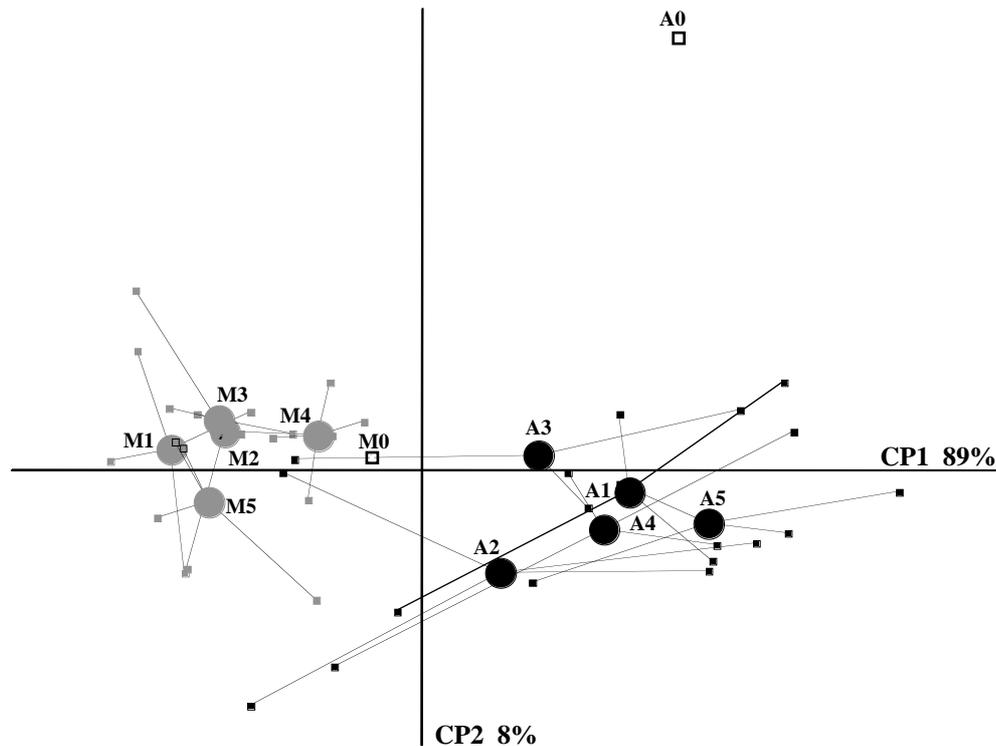


**Figure 13 :** Evolution des teneurs des résidus végétaux en (A) carbone et (B) azote totaux (moyenne et écart-type, n=4). Les lettres capitales en dessous des colonnes indiquent des différences significatives ( $P<0,05$ ) entre traitements à une date donnée. Les lettres minuscules au-dessus des colonnes indiquent des différences significatives ( $P<0,05$ ) entre différents stades d'échantillonnage d'un même traitement.

Comparativement aux valeurs avant incubation, les teneurs en C des résidus d'arachide ont diminué significativement dès la semaine 1 (de 42,6 à 36,8% en moyenne) et sont restées globalement stables le reste de l'incubation (**Figure 13A**). Pour les résidus de maïs en revanche, cette diminution significative n'est mesurable qu'à la quatrième semaine de l'incubation (de 47,0 à 45,7% en moyenne). Inversement, les teneurs en N (**Figure 13B**) des résidus ont connu une augmentation constante tout au long de l'incubation dès la première semaine : de 2,47 à 2,67% en moyenne pour l'arachide et de 0,40 à 0,83% pour le maïs. Les

plus fortes teneurs en azote sont enregistrées à la semaine 4 et à la semaine 3, respectivement pour l'arachide et le maïs. Toutefois, le rapport C/N n'évolue pas au cours du temps (non montré).

### 2-2-3 Evolution des caractéristiques biochimiques des résidus végétaux



**Figure 14** : Plan principal de l'ACP réalisée sur les signatures spectrales proche infra-rouge des résidus végétaux (n=4). Les cercles sont les barycentres des quatre répétitions pour un traitement donné et une date d'échantillonnage donnée. A0-M0 : résidus d'arachide et de maïs avant incubation, A : résidus d'arachide, M : résidus de maïs, 1 à 5 : semaine 1 à semaine 5.

L'analyse en composantes principales des spectres proche infra-rouge des résidus en cours de décomposition révèle une forte absorption de l'inertie totale sur la première composante (89%), comme précédemment constaté avec le sol (**Figure 14**). Deux groupes de points sont discriminés le long de la première composante, renvoyant aux deux types de paillis et dénotant ainsi le maintien de fortes différences de composition entre les résidus d'arachide et de maïs au cours de leur minéralisation. Les résidus d'arachide ont connu la plus forte évolution par comparaison avec leur état initial (A0). Cependant, aucune évolution nette de la qualité biochimique n'a été décelée entre les différents stades d'échantillonnage des deux types de résidus, en raison d'une variabilité forte et constante. Toutefois, les plus grands

écarts de signatures spectrales des paillis concernent les semaines 2 et 5, et les semaines 1 et 4, respectivement pour l'arachide et le maïs.

**En somme, l'essentiel de la perte de masse des résidus survient au cours de la première semaine d'incubation. Cette évolution coïncide avec une diminution simultanée de la teneur en C des résidus uniquement avec les paillis d'arachide. Dans les deux cas, les teneurs en azote des résidus augmentent régulièrement à partir de la première semaine, sans altération notable des rapports C/N. La composition des résidus, vue sous l'angle de la signature spectrale proche infra-rouge, est très variable à chacun des stades ce qui limite toute identification d'évolution temporelle. Cependant, les différences qualitatives entre résidus d'arachide et de maïs se prolongent au cours de leur minéralisation.**

## N.B.

Malencontreusement, la mesure des teneurs C/N de la MOD des sols n'a pas été réalisée suite à la nécessité d'une mise au point méthodologique par les services techniques de l'US Imago (IRD, Dakar). Cette mise au point n'a pu être achevée à temps.

L'analyse SPIR de la MOD a bien été effectuée mais en raison d'un contre-temps lié aux mesures de semi-potential de dénitrification recourant à ces mêmes extraits de MOD, l'envoi sur l'IRD Montpellier s'est fait en deux lots distincts, à deux dates différentes (pour chaque traitement : n=2 à chaque envoi). L'analyse des spectres par ACP a clairement révélé que les données obtenues pour un même traitement étaient totalement dépendantes de la date d'envoi, ce qui rend ces résultats inexploitable. Une évolution chimique ou une dégradation des extraits est très probablement survenue au cours du deuxième envoi (chaîne du froid rompue).

## 3. EMISSIONS REELLES DE N<sub>2</sub>O ET DE CO<sub>2</sub>

**Tableau III :** Evolution des émissions réelles de N<sub>2</sub>O et de CO<sub>2</sub> du sol. T : témoin (sol non amendé), A : sol amendé avec des résidus d'arachide, M : sol amendé avec des résidus de maïs. Les lettres capitales indiquent des différences significatives ( $P < 0,05$ ) entre traitements à une date donnée. Les lettres minuscules indiquent des différences significatives ( $P < 0,05$ ) entre différents stades d'échantillonnage d'un même traitement.

	semaine 0	semaine 1	semaine 2	semaine 3	semaine 4	semaine 5
<b>Emissions de N<sub>2</sub>O<sup>1</sup></b>						
T	6,97 (3,81) b	1,99 (5,56) B, a	5,66 (2,94) A, a	27,61 (21,70) A, a	0,33 (1,47) A, a	1,02 (4,52) A, a
A	6,97 (3,81) a	14,43 (2,21) A, a	7,39 (2,31) A, a	3,61 (2,34) A, a	0,18 (1,60) A, a	21,73 (28,39) A, a
M	6,97 (3,81) a	4003,37 (2000,00) A, a	412,51 (100,00) A, a	97,38 (20,45) A, a	94,05 (38,42) A, a	198,51 (100,00) A, a
<b>Emissions de CO<sub>2</sub><sup>2</sup></b>						
T	0,09 (0,01) a	0,15 (0,01) A, a	0,28 (0,05) A, a	0,16 (0,01) A, a	0,26 (0,07) A, a	0,11 (0,01) A, a
A	0,09 (0,01) a	6,35 (0,81) C, c	3,91 (0,61) C, c	2,74 (0,28) B, c	1,52 (0,14) B, b	1,66 (0,30) B, b
M	0,09 (0,01) a	2,40 (0,29) B, b	2,56 (0,07) B, b	4,53 (0,59) C, c	3,64 (0,56) C, c	3,36 (0,14) C, cb

<sup>1</sup> les émissions de N<sub>2</sub>O sont exprimées en µg N-N<sub>2</sub>O g<sup>-1</sup> sol h<sup>-1</sup>

<sup>2</sup> les émissions de CO<sub>2</sub> sont exprimées en µg C-CO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> sol h<sup>-1</sup>

L'analyse des mesures du N<sub>2</sub>O *in situ* a révélé une forte variabilité pour tous les traitements et dates d'échantillonnage (**Tableau III**). Hormis la semaine 1, aucune stimulation significative des émissions d'oxyde nitreux par les paillis n'a pu être mise en

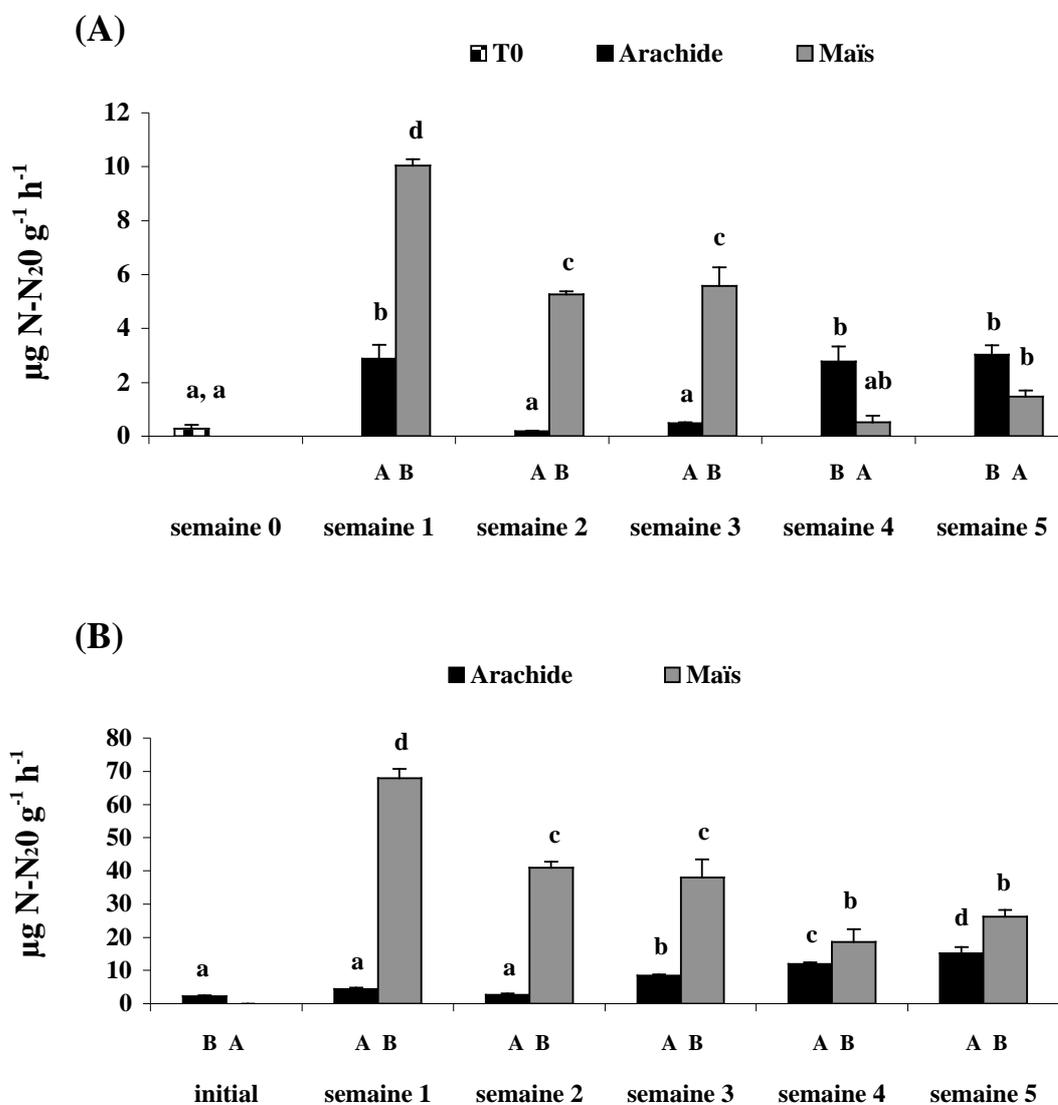
évidence. Le taux moyen d'émission le plus élevé était de  $4 \text{ ng N-N}_2\text{O g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  dans le cas du traitement maïs en semaine 1. En termes de tendance néanmoins, les rejets de  $\text{N}_2\text{O}$  étaient systématiquement plus élevés en présence de résidus de maïs, ces derniers diminuant rapidement en cours d'incubation. Aucune évolution temporelle significative n'a pu être décrite dans tous les cas.

Contrairement aux émissions de  $\text{N}_2\text{O}$ , les émissions de  $\text{CO}_2$  ont été caractérisées par une très bonne reproductibilité intra-traitement (**Tableau III**). La respiration des microcosmes témoin est restée constante tout au long de l'incubation et significativement inférieure à celle des sols sous résidus ( $< 0,3 \text{ } \mu\text{g C-CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ sol h}^{-1}$ ). Les taux d'émission de  $\text{CO}_2$  du traitement arachide étaient significativement plus hauts que ceux du traitement maïs jusqu'à la semaine 2. A partir de la semaine 3, les activités respiratoires les plus élevées ont été associées au traitement maïs. Durant toute l'incubation, les rejets de  $\text{CO}_2$  ont constamment diminué dans le cas du traitement arachide. Avec les résidus de maïs, les émissions sont restées stables durant les deux premières semaines d'incubation (environ  $2,5 \text{ } \mu\text{g C-CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ sol h}^{-1}$ ), avant de connaître une augmentation à la troisième semaine (environ  $4,5 \text{ } \mu\text{g C-CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ sol h}^{-1}$ ).

**Les émissions *in situ* de  $\text{N}_2\text{O}$  ont été caractérisées par une très forte variabilité intra-traitement. Il n'a donc pas été possible de mettre en évidence une stimulation des rejets d'oxyde nitreux sous l'effet des paillis de résidus de culture. En revanche, le profil respiratoire des microcosmes a été caractérisé tout au long de l'incubation par une stimulation générale des rejets de  $\text{CO}_2$  liée à l'apport de résidus. L'ampleur de cette stimulation était dépendante du type de résidu et de son stade de minéralisation.**

#### 4. EMISSIONS POTENTIELLES DE N<sub>2</sub>O

##### 4-1 Emissions potentielles de N<sub>2</sub>O du sol et des résidus



**Figure 15 :** Evolution des émissions potentielles de N<sub>2</sub>O (A) du sol et (B) des résidus (moyenne et écart-type, n=4). Les lettres capitales en dessous des colonnes indiquent des différences significatives ( $P < 0,05$ ) entre traitements à une date donnée. Les lettres minuscules au-dessus des colonnes indiquent des différences significatives ( $P < 0,05$ ) entre différents stades d'échantillonnage d'un même traitement. Les lettres minuscules, séparées par une virgule, au-dessus de la colonne initial, sont relatives à la comparaison temporelle intra-traitement (arachide, maïs, respectivement de la gauche vers la droite).

L'apport de résidus de récolte a fortement stimulé le potentiel de dénitrification du sol (**Figure 15A**). Les émissions potentielles liées aux microcosmes témoin n'étaient pas détectables et ont donc été considérées comme nulles, à l'exception du sol dans son état initial ( $0,29 \mu\text{g N-N}_2\text{O g}^{-1} \text{h}^{-1}$ ). L'ampleur de cette stimulation est apparue fonction du type de résidu

et du stade de décomposition, les résidus de maïs étant associés aux plus fortes augmentations durant les trois premières semaines (e.g.  $10 \mu\text{g N-N}_2\text{O g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  en semaine 1). De plus, les rejets de  $\text{N}_2\text{O}$  ont graduellement diminué dans le cas du sol sous maïs, tandis que le profil des émissions potentielles était irrégulier dans le cas du traitement arachide.

Les résidus eux-mêmes ont démontré une forte potentialité à émettre du  $\text{N}_2\text{O}$ , le profil des émissions étant résidu spécifique tout au long de l'incubation (**Figure 15B**). En effet, les émissions potentielles sous maïs ont été systématiquement plus importantes que celles sous arachide. De plus, l'évolution temporelle des émissions est inverse : croissante sous arachide (de 2,7 à  $15,1 \mu\text{g N-N}_2\text{O g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) et décroissante sous maïs (de 68,0 à  $18,5 \mu\text{g N-N}_2\text{O g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) au cours de la minéralisation. Les potentiels de dénitrification des résidus sont aussi apparus très nettement supérieurs à ceux du sol. Par exemple, la plus forte valeur d'émission pour les résidus a été enregistrée dans le cas du maïs ( $70 \mu\text{g N-N}_2\text{O g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ), avec pour l'échantillon de sol correspondant une valeur dix fois moindre ( $10 \mu\text{g N-N}_2\text{O g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ).

#### 4-2 Réduction potentielle du $\text{N}_2\text{O}$ par les résidus végétaux

**Tableau IV** : Evolution de la réduction potentielle d'un apport exogène de  $\text{N}_2\text{O}$  (0,3% théorique) par les résidus en cours de minéralisation.

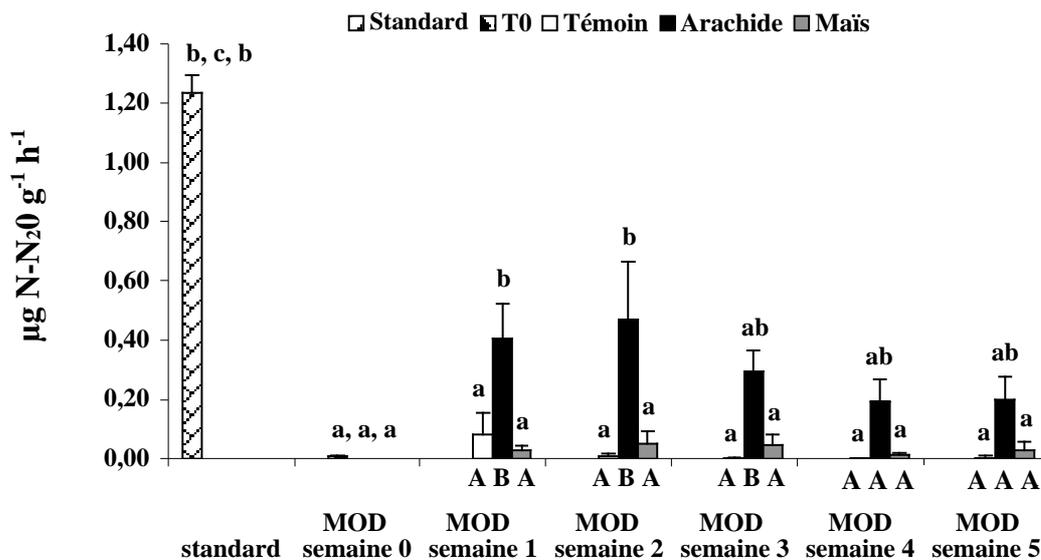
La concentration du  $\text{N}_2\text{O}$  dans l'atmosphère du flacon est exprimée en  $\mu\text{g N-N}_2\text{O}$  total (moyenne et écart-type,  $n=4$ ). Pour un résidu donné à un stade donné, des lettres différentes indiquent une évolution significative ( $P<0,05$ ) de la teneur de l'atmosphère en  $\text{N}_2\text{O}$  entre le début et la fin de l'incubation. nd : non déterminé.

	état initial	semaine 1	semaine 2	semaine 3	semaine 4	semaine 5
<b>arachide</b>						
T=0	154,00 (1,49) a	nd (nd)	99,61 (7,48) b	99,86 (11,95) b	188,72 (29,34) b	148,84 (30,36) b
T=22h	214,00 (9,27) b	nd (nd)	0,00 (0,00) a	0,00 (0,00) a	0,00 (0,00) a	0,00 (0,00) a
<b>maïs</b>						
T=0	156,42 (5,81) a	nd (nd)	93,75 (5,52) b	96,77 (16,02) a	168,27 (6,48) a	137,50 (22,51) a
T=22h	151,42 (6,21) a	nd (nd)	0,00 (0,00) a	292,19 (160,22) b	266,58 (133,48) a	449,45 (60,40) b

Suite à des problèmes techniques non élucidés, le taux initial théorique de  $\text{N}_2\text{O}$  exogène (0,3%, équivalent à  $206 \mu\text{g N-N}_2\text{O}$  par flacon) n'a pas été constant entre tous les échantillons. Aussi, les valeurs à T0 indiquent la concentration réelle mesurée au départ de l'incubation (**Tableau IV**). En dépit de cette inégalité, ces résultats témoignent d'une forte capacité des résidus d'arachide en décomposition à réduire le  $\text{N}_2\text{O}$ , contrairement aux résidus de maïs. En effet, l'intégralité du  $\text{N}_2\text{O}$  introduit dans l'atmosphère des flacons « arachide » a été consommée à l'issue des 22 h d'incubation, et ceci pour toutes les dates de prélèvement.

Cependant, les résidus initiaux d'arachide (avant établissement des paillis) soutiennent une production nette de N<sub>2</sub>O. Contrairement à l'arachide, les résidus de maïs sont émetteurs de N<sub>2</sub>O sur les trois dernières semaines d'incubation. Toutefois, à l'état initial, ces résidus ne produisent ni ne réduisent l'oxyde nitreux.

#### 4-3 Emissions semi-potentielles de N<sub>2</sub>O du sol enrichi en MOD



**Figure 16 :** Evolution des émissions semi-potentielles de N<sub>2</sub>O du sol enrichi en MOD issue des sols sous paillis en cours de minéralisation (moyenne et écart-type, n=4). Pour un stade donné de prélèvement de la MOD, différentes lettres capitales en dessous des colonnes indiquent une différence significative ( $P < 0,05$ ) entre traitements (origine de la MOD). Pour une origine donnée de la MOD (e.g. sol sous arachide), différentes lettres minuscules au-dessus des colonnes indiquent une différence significative ( $P < 0,05$ ) entre stades d'échantillonnage de la MOD. Les lettres minuscules séparées par une virgule, au-dessus des colonnes T<sub>0</sub> et standard, sont à relier à la comparaison temporelle au sein de chaque traitement, respectivement de la gauche vers la droite avec le témoin, l'arachide et le maïs.

La potentialité du sol à émettre du N<sub>2</sub>O a été significativement stimulée uniquement avec les apports de MOD issue des sols sous résidus d'arachide, sur les trois premières semaines d'échantillonnage (**Figure 16**). Cependant, les mesures montrent une variabilité assez élevée et il n'y a pas de différence significative entre les différentes dates d'échantillonnage (entre 0,47 et 0,19  $\mu\text{g N-N}_2\text{O g}^{-1} \text{h}^{-1}$ ). Les émissions de N<sub>2</sub>O des sols enrichis avec de la MOD provenant des sols témoins (les plus pauvres en carbone total) ont pu être décelées. Elles sont faibles et similaires à celles des sols enrichis en MOD issue de sol sous résidus de maïs à tous les stades. Les émissions liées à ces deux traitements ne connaissent pas d'évolution temporelle. Toutefois, les rejets de N<sub>2</sub>O des sols enrichis avec la

solution nutritive standard (glucose et succinate) sont significativement plus élevés ( $1,23 \mu\text{g N-N}_2\text{O g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) que ceux des sols enrichis avec les extraits de MOD, quelle que soit leur origine.

**La potentialité du sol à émettre du  $\text{N}_2\text{O}$  a été significativement et spécifiquement stimulée par le type de paillis, sous maïs en particulier. Les deux types de résidus eux-mêmes ont présenté une augmentation significative et spécifique de leur potentiel de dénitrification (maïs en particulier), largement supérieure à celle observée avec le sol. Avec ces deux types d'échantillon, l'ampleur de l'augmentation était dépendante du stade de minéralisation. Les résidus d'arachide ont par ailleurs été caractérisés par une forte potentialité à réduire l'oxyde nitreux à tous les stades. Enfin, la MOD contenue dans les sols sous paillis d'arachide a significativement stimulé la dénitrification potentielle d'un sol enrichi par cette MOD, par comparaison avec les extraits de MOD issus de sol sous maïs ou témoin. Cependant, les niveaux des rejets de  $\text{N}_2\text{O}$  sont restés significativement inférieurs à ceux obtenus en conditions non limitantes en carbone organique.**

## 5. STRUCTURE GENETIQUE DES COMMUNAUTES BACTERIENNES

### 5-1 Structure génétique de la communauté bactérienne totale

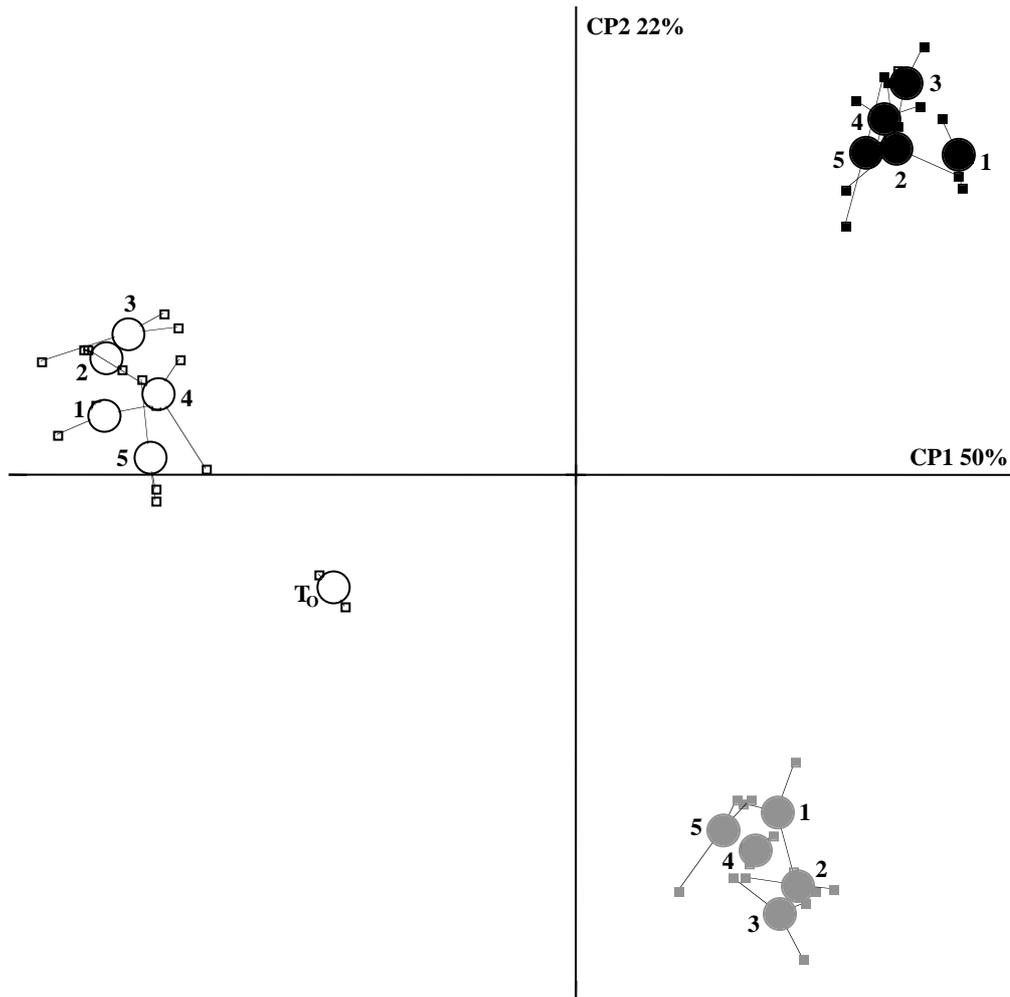
La **Figure 18** présente les profils DGGE représentatifs de la diversité des fragments d'ADN ribosomal 16S amplifiés pour les différents traitements (T0, témoin, arachide et maïs) sur les cinq semaines d'incubation.

L'analyse de l'indice de diversité Shannon appliqué à ces empreintes moléculaires (**Figure 19**) montre que la diversité de communauté totale a été significativement augmentée par l'apport des paillis dès la première semaine. Cette stimulation a reposé sur une augmentation à la fois du nombre absolu de bandes et de « l'équitabilité » de leur importance relative. Cependant, la qualité du paillis n'a spécifiquement influencé que le nombre absolu de bandes à partir de la deuxième semaine, avec les valeurs les plus fortes obtenues sous résidus d'arachide. Aucune évolution temporelle des indices n'a été relevée.

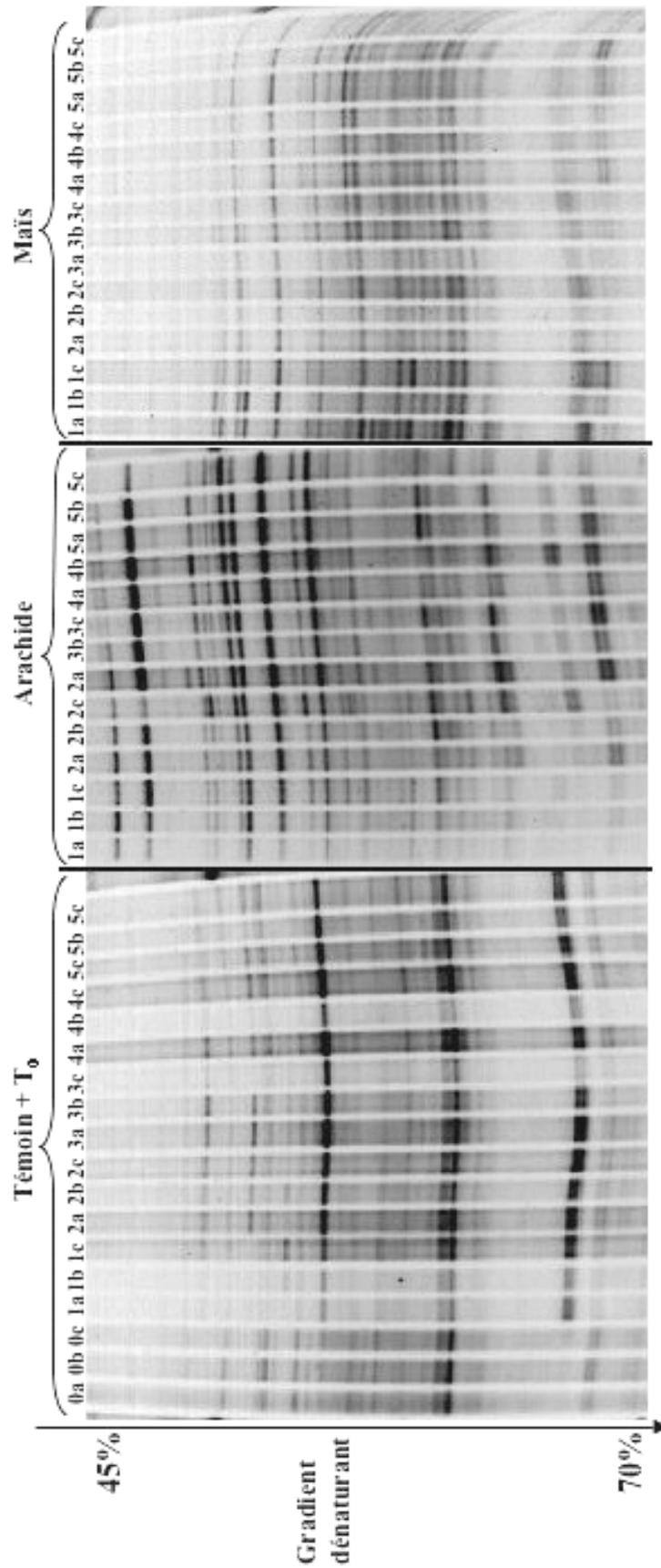
L'analyse en composantes principales (**Figure 17**) des empreintes génétiques permet de distinguer essentiellement quatre groupes de points, selon la première composante principale (environ 50% de l'inertie totale), renvoyant aux trois traitements (témoin, maïs et arachide) ainsi qu'au sol dans son état initial. L'apport des résidus végétaux sous forme de paillis a donc spécifiquement orienté l'évolution de la structure génétique de la communauté bactérienne totale du sol sous-jacent. Dans aucun des cas, il n'est possible de distinguer des groupements de points relatifs aux cinq stades d'échantillonnage, soit une remarquable

stabilité temporelle de la structure de la communauté bactérienne totale au-delà de la première semaine.

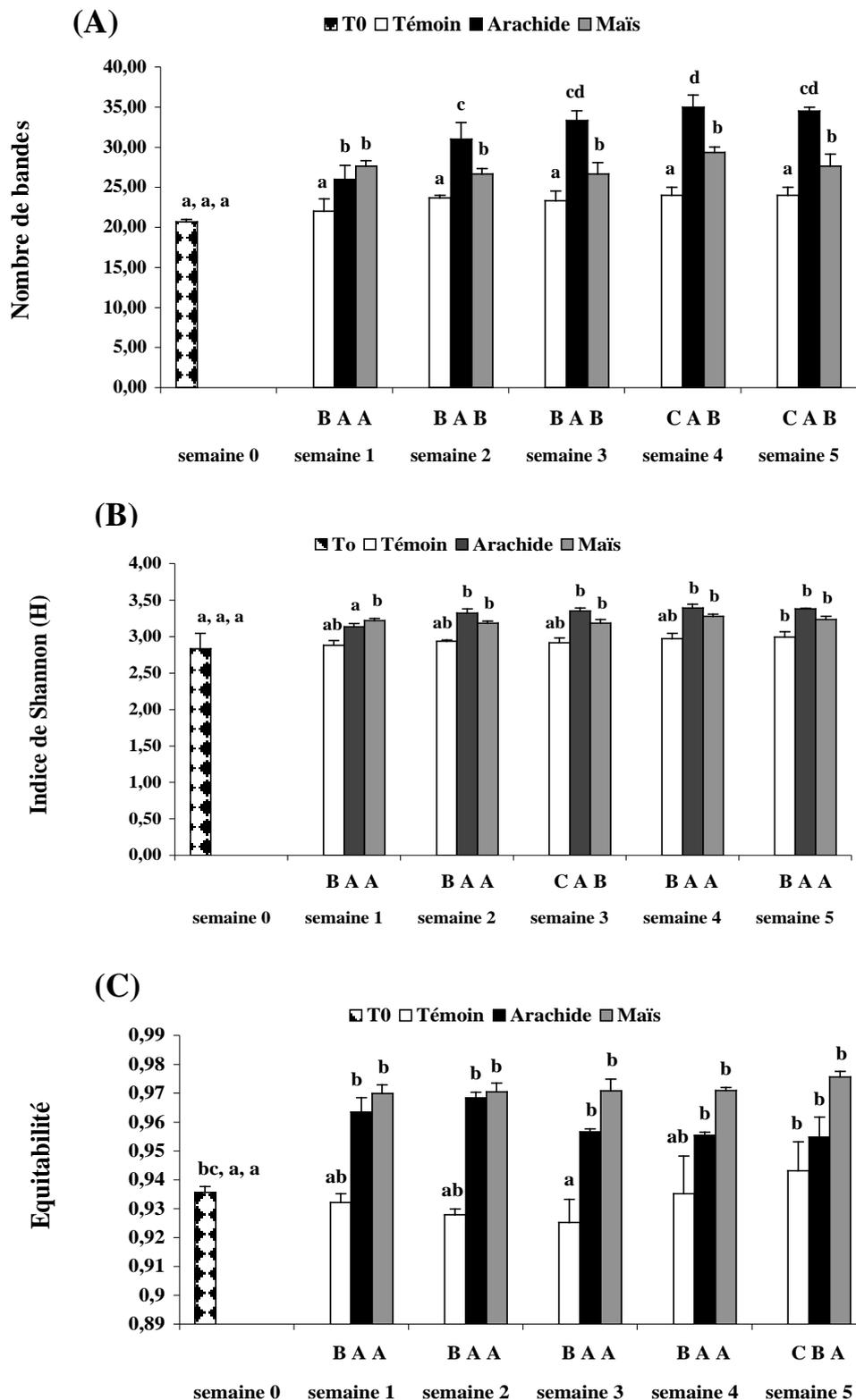
**La structure génétique de la communauté bactérienne totale du sol a été spécifiquement influencée par le type de résidus dès la première semaine d'incubation mais sans évolution ultérieure.**



**Figure 17** : Analyse en composantes principales des empreintes DGGE-16S (n=3). Les cercles sont les barycentres des trois répétitions pour un traitement donné à un stade de prélèvement donné.  $T_0$  : état initial, cercle noir : traitement arachide, cercle gris : traitement maïs ; 1 à 5 : semaine 1 à semaine 5.



**Figure 18** : Structure génétique (empreinte DGGE-16S) de la communauté bactérienne totale. a, b et c : répétitions, 0 : état initial, 1 à 5 : semaine 1 à semaine 5.



**Figure 19** : Indices de diversité appliqués aux empreintes moléculaires DGGE-16S : (A) nombre absolu de bandes, (B) indice de Shannon et (C) « équitabilité » de l'importance relative des bandes (moyenne et écart-type,  $n=4$ ). Les lettres capitales en dessous des colonnes indiquent des différences significatives ( $P<0,05$ ) entre traitements à une date donnée. Les lettres minuscules au-dessus des colonnes indiquent des différences significatives ( $P<0,05$ ) entre différents stades d'échantillonnage d'un même traitement. Les lettres minuscules, séparées par une virgule, au-dessus de la colonne semaine 0, sont relatives à la comparaison temporelle intra-traitement (témoin, arachide, maïs, respectivement de la gauche vers la droite).

## 5-2 Structure génétique des communautés dénitrifiantes

Le gène *nirS* n'a pas pu être amplifié, en dépit de diverses mises au point complémentaires, au nombre desquelles on peut noter : l'augmentation des quantités d'ADN total, de la concentration des amorces et de la BSA ainsi que la diminution de la température d'hybridation. L'étude de la communauté *nirS* n'a donc pas été possible. Une situation similaire a été rencontrée avec l'amplification du gène *nirK* dans le seul cas des sols témoin.

### *5-2-1 La communauté nitrite réductase « nirK »*

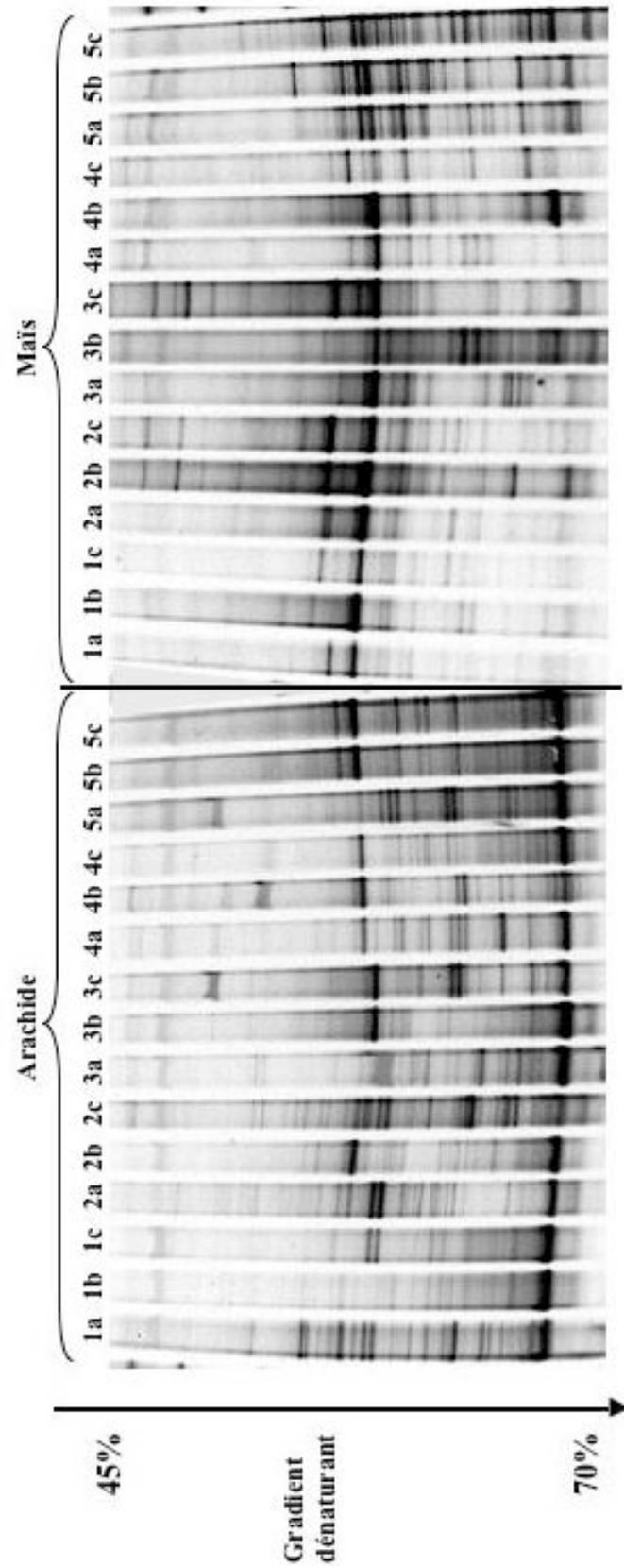
Une analyse visuelle rapide des gels DGGE-*nirK* (**Figure 20**) indique une très forte variabilité entre réplicats d'un même traitement à tous les stades d'échantillonnage.

L'analyse de l'indice de diversité de Shannon (**Figure 21**) indique qu'il n'est sensible au type de résidus qu'au niveau de la semaine 3 et 5, avec des valeurs supérieures sous résidus de maïs. Le nombre absolu de bandes répond de façon identique. A nouveau, aucun profil temporel remarquable n'est identifié.

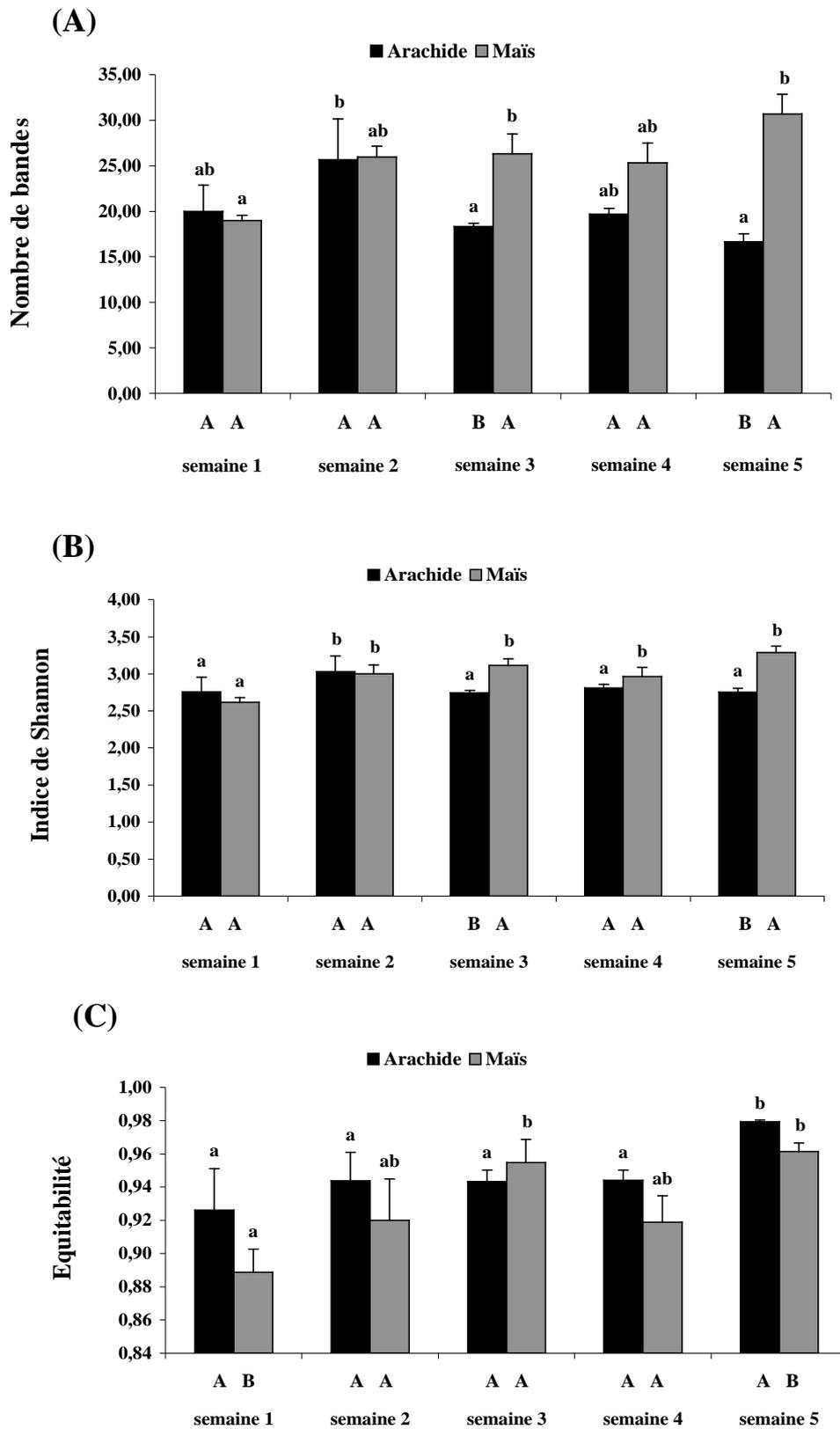
L'analyse en composantes principales (**Figure 22**) de ces empreintes moléculaires permet de distinguer essentiellement deux groupes de points, qui se distinguent selon la première composante (37% de l'inertie), renvoyant aux deux types de paillis. Cette ségrégation indique que la structure génétique de la communauté nitrite réductase « *nirK* » a été particulièrement influencée, sur toute la durée de l'incubation, par le type de résidus en décomposition. Cependant, l'éparpillement des points révèle l'existence de la forte variabilité intra-traitement déjà mentionnée. Aussi, aucune dynamique temporelle particulière des structures génétiques n'a pu être décrite.

L'analyse de co-inertie entre les signatures spectrales du sol et les empreintes moléculaires DGGE-*nirK* correspondantes indique une corrélation très hautement significative ( $P < 0,0001$ ) entre les effets du type de paillis sur ces deux paramètres.

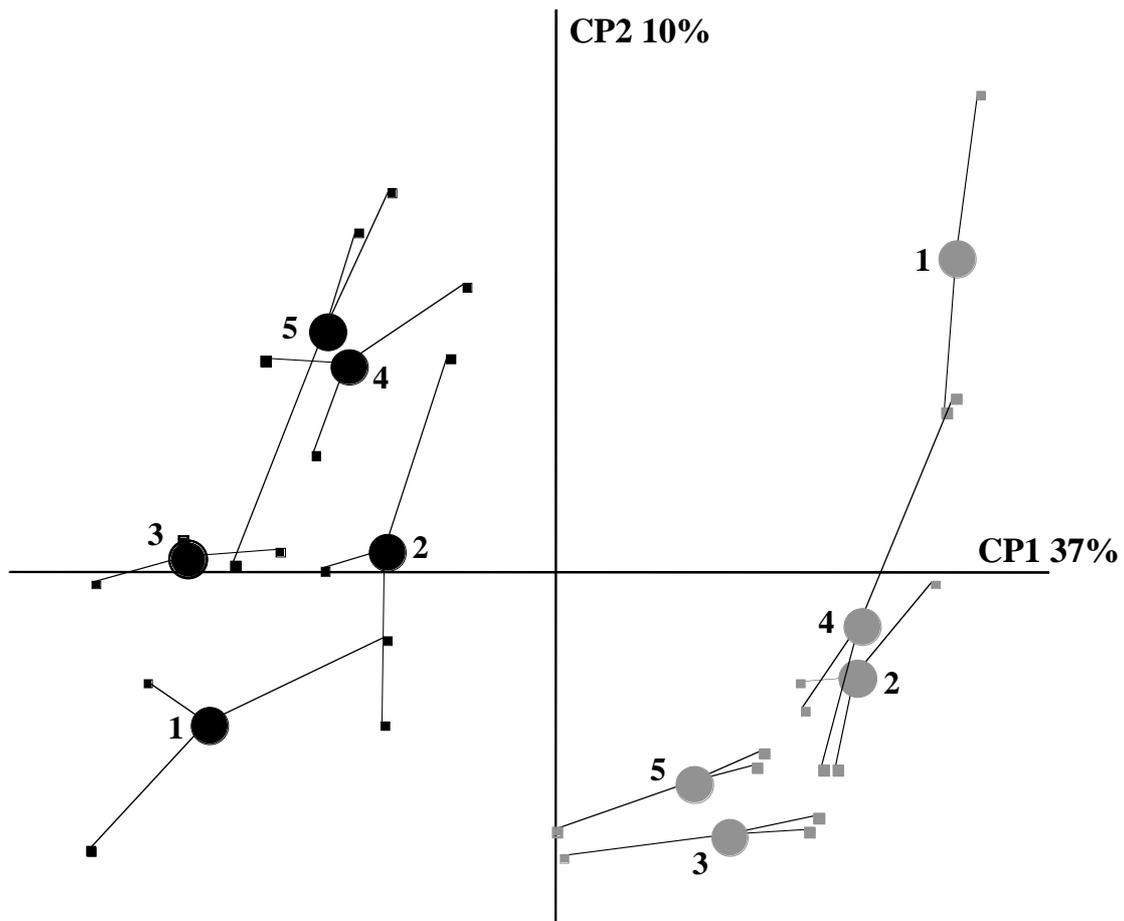
**La structure génétique de la communauté nitrite réductase « *nirK* » a été spécifiquement influencée par le type de résidu malgré une forte variabilité intra-traitement. Par ailleurs, cet effet est statistiquement corrélé à celui enregistré sur les signatures spectrales du sol. En revanche, le stade de décomposition des résidus n'a pas eu d'effet spécifique sur cette communauté dénitrifiante.**



**Figure 20** : Structure génétique (empreinte DGGE-*nirK*) de la communauté bactérienne dénitrifiante nitrite réductase. a, b et c : répétitions, 1 à 5: semaine 1 à semaine 5.



**Figure 21** : Indices de diversité appliqués aux empreintes moléculaires DGGE-*nirK* : (A) nombre absolu de bandes, (B) indice de Shannon et (C) « équitabilité » de l'importance relative des bandes (moyenne et écart-type, n=4). Les lettres capitales en dessous des colonnes indiquent des différences significatives ( $P < 0,05$ ) entre traitements à une date donnée. Les lettres minuscules au-dessus des colonnes indiquent des différences significatives ( $P < 0,05$ ) entre différents stades d'échantillonnage d'un même traitement.



**Figure 22 :** Analyse en composantes principales des empreintes DGGE-*nirK* (n=3). Les cercles sont les barycentres des trois répétitions pour un traitement donné à un stade de prélèvement donné. Cercle noir: traitement arachide, cercle gris: traitement maïs ; 1 à 5: semaine 1 à semaine 5.

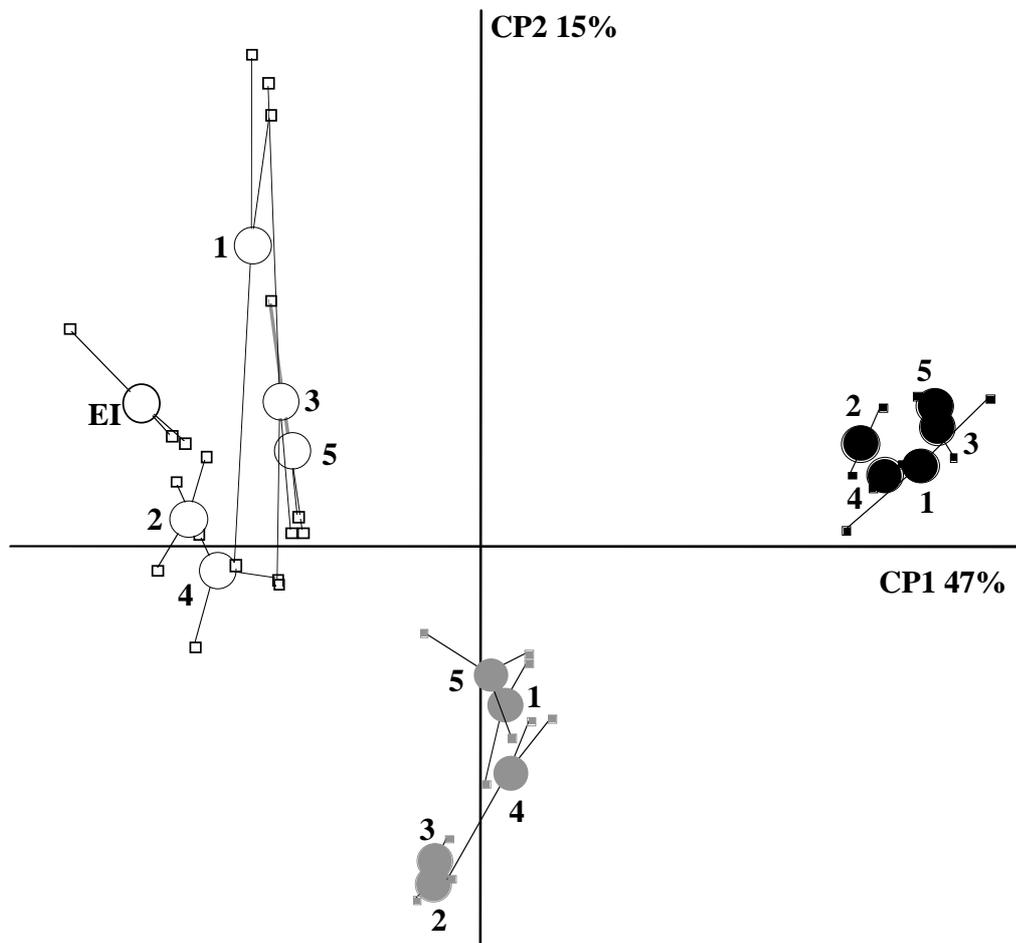
#### 5-2-2 La communauté oxyde nitreux réductase «*nosZ*»

L'analyse visuelle des gels RFLP-*nosZ* (**Figure 24**) permet de noter une nette différence dans la distribution des tailles de fragments de restriction entre les quatre modalités (état initial, témoin, arachide et maïs). L'analyse en composantes principales (**Figure 23**) de ces profils RFLP-*nosZ* permet de distinguer essentiellement trois groupes de points, selon la première composante (47% de l'inertie). De la droite vers la gauche : le témoin et le T<sub>0</sub> (d'ailleurs ce dernier se dégage légèrement du groupe des témoins et pourrait être considéré comme un groupe à part entière), le maïs et enfin l'arachide. La discrimination de ces groupes montre que la structure génétique de la communauté oxyde nitreux réductase a été particulièrement influencée par l'apport et le type de résidus, la plus forte évolution ayant été enregistrée avec les résidus d'arachide. Ce plan principal indique aussi que la variabilité des empreintes moléculaires a été systématiquement réduite dans les sols amendés par rapport aux sols témoin. Néanmoins, aucune dynamique temporelle particulière des structures génétiques

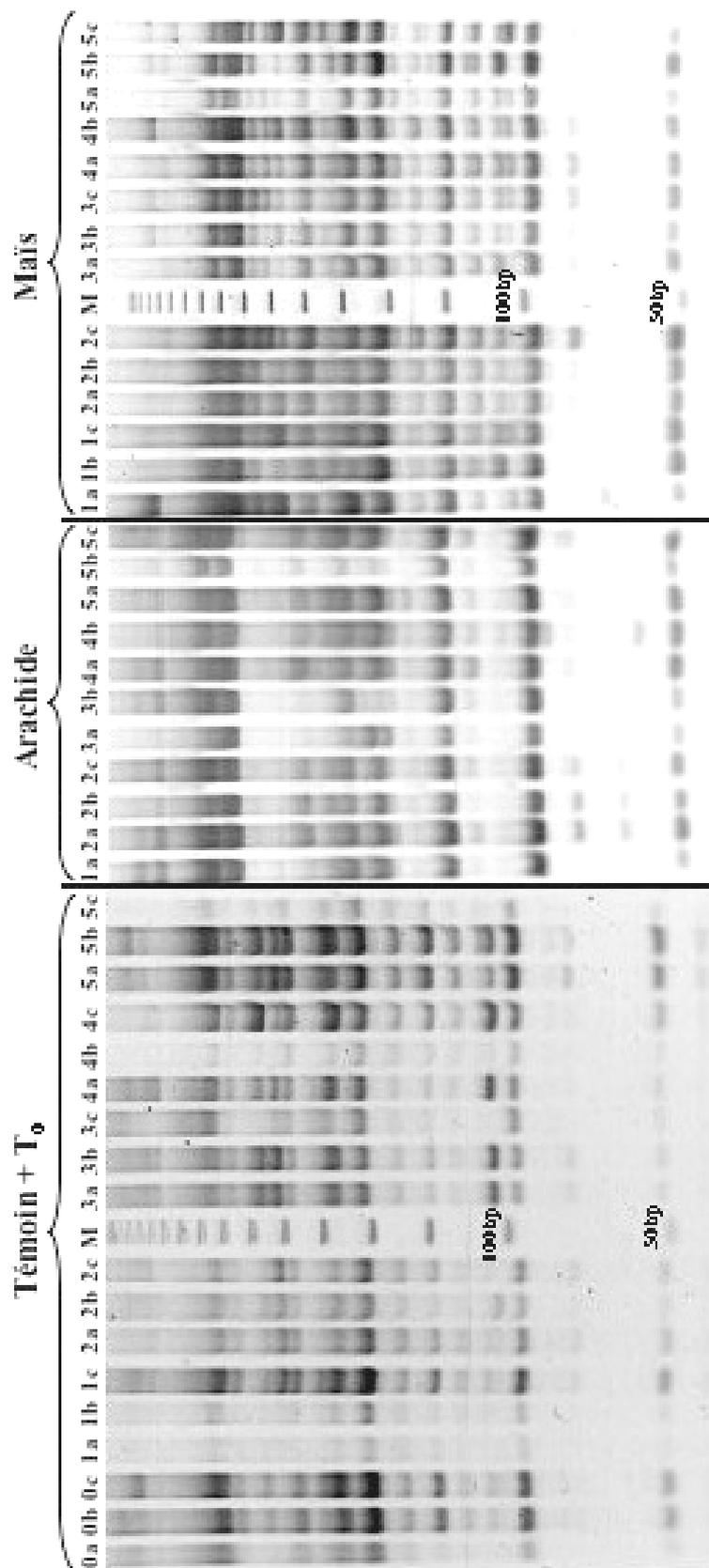
n'a pu être mise en évidence.

L'analyse de co-inertie entre les signatures spectrales du sol et les empreintes moléculaires RFLP-*nosZ* correspondantes indique une corrélation très hautement significative ( $P < 0,0001$ ) entre les effets du type de paillis sur ces deux paramètres.

**La composition de la communauté oxyde nitreux réductase a été spécifiquement modifiée par l'apport de résidus mais à nouveau sans lien avec l'état d'avancement de leur décomposition. Par ailleurs, la variabilité des empreintes moléculaires a été réduite en présence des résidus.**



**Figure 23** : Analyse en composantes principales des empreintes RFLP-*nosZ* ( $n=3$ ). Les cercles sont les barycentres des trois répétitions pour un traitement donné à un stade de prélèvement donné. EI : état initial, cercle blanc: témoin, cercle noir: traitement arachide, cercle gris: traitement maïs ; 1 à 5: semaine 1 à semaine 5.



**Figure 24 :** Structure génétique (empreinte RFLP-*nosZ*) de la communauté bactérienne dénitrifiante oxyde nitreux réductase. a, b et c : répétitions, 0: état initial, 1 à 5: semaine 1 à semaine 5.

# DISCUSSION

---

Les travaux menés pour ce mémoire s'inscrivent dans le cadre d'une meilleure compréhension du déterminisme joué par la qualité biochimique de la matière organique végétale dans les émissions agricoles d'oxyde nitreux via le processus de dénitrification. L'hypothèse générale était que la variation de la qualité biochimique des paillis au cours de leur minéralisation pouvait induire une modification de la diversité structurale et de l'activité de communautés dénitrifiantes clé du sol. Dans ce contexte, le rôle fonctionnel joué par la matière organique dissoute du sol dans les émissions potentielles d'oxyde nitreux a aussi été questionné.

## 1. EFFET DES PAILLIS SUR LES EMISSIONS REELLES DE N<sub>2</sub>O

Les émissions *in situ* de N<sub>2</sub>O se sont révélées hyper-variables, quels que soient le type de paillis et la date d'échantillonnage et en dépit de conditions extrêmement favorables à la dénitrification (carbone organique et nitrate non limitants, anoxie liée à un taux d'humidité très élevé). Aussi, il n'y a pas eu de stimulation significative des rejets N<sub>2</sub>O liée à la mise en place des paillis, à l'exception de la première semaine avec les résidus de maïs. Ce résultat s'oppose aux données dominantes de la littérature sur l'impact des paillis dans les rejets agricoles de N<sub>2</sub>O. En effet, plusieurs études ont montré que la fertilisation des sols par les résidus végétaux stimulait les émissions de N<sub>2</sub>O (Aulakh *et al.*, 1991; Kaiser *et al.*, 1998; Baggs *et al.*, 2000; Flessa *et al.*, 2002), d'autant plus que les résidus sont riches en azote (Kaiser *et al.*, 1998; Larsson *et al.*, 1998; Baggs *et al.*, 2000).

Ce constat contraste aussi avec la très bonne reproductibilité des potentiels de dénitrification des sols et des résidus. Cette variabilité des émissions réelles ne peut donc pas provenir d'une variabilité de la taille et de la diversité du pool enzymatique dénitrifiant, étant donné que l'activité réelle est l'expression d'une partie de l'activité potentielle. Il est alors envisageable que cette variabilité tire son origine d'un facteur environnemental ayant modulé de manière incontrôlée entre réplicats l'expression de ce potentiel dénitrifiant. Cette variabilité ne peut pas non plus être liée à une mauvaise gestion des microcosmes, comme le laissent supposer les très faibles niveaux de variation enregistrées sur d'autres paramètres tels que les teneurs C/N ou les émissions *in situ* de CO<sub>2</sub>. Dans ce contexte, il est utile d'interroger l'activité dénitrifiante des résidus eux-mêmes. Il est possible que l'activité dénitrifiante *in situ* des résidus ait été versatile d'un réplicat à l'autre, tant dans l'émission que dans la réduction du N<sub>2</sub>O en raison de conditions moins tamponnées que dans le sol. En effet, le paillis est

physiquement à l'interface sol-air et à ce titre il connaît une alternance de conditions oxygènes/anoxiques fréquente liée à l'évaporation et aux arrosages périodiques. Une dernière raison complémentaire pourrait être liée à la forte variabilité qualitative du pool organique des sols et des résidus (cf. signatures spectrales proche infra-rouge). Il est en effet apparu que l'évolution de la qualité organique de ces échantillons était très hétérogène, d'un réplikat à l'autre notamment. Cette disparité intra-traitement dans la composition des ressources organiques a très bien pu participer à la modulation des activités dénitrifiantes *in situ*, tant dans le sol que dans les résidus eux-mêmes, ce phénomène hypothétique ayant pu être gommé lors des mesures de potentiels par apport en excès de glucose et de succinate.

En somme, contrairement à nos attentes, les paillis de résidus n'ont pas stimulé les émissions réelles de N<sub>2</sub>O.

## 2. EVOLUTION DE LA CHIMIE DU SOL ET DES RESIDUS

Les résidus apportés sous forme de paillis ont rapidement évolué au cours de l'incubation et ont modifié la chimie du sol, tant en termes de teneurs C/N qu'en termes de qualité biochimique. L'amplitude maximale de ces modifications a été atteinte dès la première semaine d'incubation, sans évolution ultérieure notable, à l'exception de l'azote dans les résidus.

L'augmentation des teneurs du sol en C provient de la minéralisation des résidus (diffusion/convexion de MOD et de particules de matière organique). Cet enrichissement est à mettre en parallèle avec la perte de masse des résidus dont la majeure partie survient essentiellement lors de la première semaine d'incubation, ce qui coïncide avec l'augmentation maximale des teneurs du sol en C. Cependant, il apparaît sur ce point une incohérence entre les résidus d'arachide et de maïs. En effet, les teneurs du sol en carbone sont similaires entre les deux traitements tandis que la perte de masse des paillis arachide est deux fois plus importante que celle du maïs. Cette différence pourrait être liée à l'activité respiratoire du sol, significativement plus élevée sous arachide lors des deux premières semaines : l'excès relatif de C dû à la perte de masse supérieure des résidus arachide aurait pu être exporté du sol sous forme de CO<sub>2</sub>, conduisant à des teneurs C du sol similaires entre microcosmes arachide et maïs. Mais au-delà de la semaine 2, c'est la respiration du sol sous maïs qui devient plus élevée, avec un maintien de teneurs du sol en C similaires. Ce nouveau « décrochage »

pourrait être lié à la deuxième phase de perte de masse des résidus, initiée au cours de la semaine 3 pour l'arachide et la semaine 2 pour le maïs. « L'excédent » de C-CO<sub>2</sub> perdu par les microcosmes maïs (comparativement aux microcosmes arachide) se trouverait contrebalancé par la deuxième phase de perte de masse des résidus arachide ayant une respiration moindre, conduisant ainsi à des teneurs C du sol très proches entre les deux traitements. Etant donnée l'anoxie supposée très forte du sol, une sortie supplémentaire de carbone sous forme de CH<sub>4</sub> (archées méthanogènes) reste envisageable.

Cette augmentation très rapide et stabilisée des teneurs du sol en carbone total, similaire entre les deux types de résidus, s'accompagne dans les deux cas d'une très forte variabilité des signatures spectrales, qualifiant la diversité de composition de la matière organique du sol. Ce résultat pourrait signifier que, pour un résidu donné à un stade donné, les processus microbiens de minéralisation engendreraient des composés de dégradation de la matière végétale intermédiaires dont la nature et/ou les proportions relatives varieraient fortement d'un réplikat à l'autre. Cette minéralisation « anarchique » supposée des résidus ne pourrait pas être corrélée à la diversité structurale de la communauté bactérienne totale du sol (DGGE-16S) dont la variabilité intra-traitement est restreinte. La résultante de la minéralisation (émission de CO<sub>2</sub>) connaît aussi une très bonne répétabilité entre réplikats indiquant qu'il n'y a pas de différence d'intensité de la minéralisation entre répétitions de microcosme. Aussi, les causes d'une telle variation des signatures spectrales du sol sont difficilement identifiables sur la base des éléments dont nous disposons. La technique SPIR est peut-être trop précise (échelle des liaisons atomiques) pour mettre en évidence des différences nettes entre stades de décomposition très proches et peu avancés au regard d'une minéralisation naturelle. A noter qu'un phénomène similaire concerne les résidus, ce qui indique que cette versatilité qualitative de la composante organique du sol serait en premier lieu alimentée par les activités microbiennes hébergées par les résidus. Les activités des microorganismes du sol prolongeraient alors cette disparité de composition en métabolisant plus avant les substrats organiques issus des pailles.

Les reliquats des résidus en cours de décomposition ont été caractérisés par un appauvrissement différé de leur teneur en carbone : les teneurs diminuent dès la première semaine avec les résidus d'arachide, tandis que les résidus de maïs s'appauvrissent uniquement à partir de la quatrième semaine. Associé à une moindre perte de masse des résidus maïs, ce résultat pourrait signifier que les résidus de maïs sont plus difficilement dégradables, en raison probablement d'une richesse supérieure en composés récalcitrants tels que ceux des parois et des fibres. A noter que cette moindre biodégradabilité n'est pas le gage

d'une moindre émission de  $N_2O$ , étant donné qu'en tendance les microcosmes « maïs » ont systématiquement supporté les rejets de  $N_2O$  les plus forts, notamment en début de cinétique où leur appauvrissement en C est le plus faible. En parallèle à cet appauvrissement en C, les deux types de résidus se sont graduellement enrichis en azote, au moins jusqu'à la troisième semaine. L'azote provenait nécessairement du sol, soit par capillarité, soit par translocation fongique. En effet, des études ont montré qu'au cours de l'incubation de résidus végétaux une translocation fongique de C et de N pouvait s'opérer entre le sol et le résidu de surface via le mycélium : le sol s'enrichit alors en C issu du résidu et ce dernier en N issu du sol (Frey *et al.*, 2000; Frey *et al.*, 2003). Cette translocation via les hyphes fongiques a aussi pu participer à l'enrichissement du sol en C. Les teneurs du sol en azote ont diminué dès la première semaine et ont connu des fluctuations parfois significatives. Mais il est très délicat à ce niveau de vouloir strictement corrélérer l'évolution du pool azoté du sol avec celui des résidus en raison de pertes gazeuses principalement sous forme  $NO$ ,  $N_2O$ ,  $N_2$ . En effet, les mesures  $N_2O$  *in situ* ont indiqué la forte variabilité de ce rejet, ce qui laisse présager d'une variabilité de même ampleur avec d'autres gaz azotés. De façon surprenante, les microcosmes témoin ont également été appauvris en azote dès la première semaine, ce qui laisse croire que la dénitrification s'y est produite rapidement sur la base du reliquat de carbone autochtone subsistant à l'issue de la pré-incubation. Eventuellement, il pourrait s'agir d'une volatilisation sous forme ammoniacale. Mais cette dernière voie ne saurait être une source importante de perte d'azote, puisque le sol de notre expérimentation était initialement à pH acide (5,8) et que la volatilisation ammoniacale est optimale à pH alcalin (8,5) (He *et al.*, 1999).

Comme attendu, la mise en place des résidus végétaux a occasionné des changements quantitatifs et qualitatifs dans la chimie du sol. Ces changements ont été plus importants, du moins d'un point de vue quantitatif, en début de minéralisation des pailles.

### 3. EFFET DES PAILLIS SUR LES DENITRIFIANTS DU SOL

Les communautés dénitrifiantes étudiées se sont montrées particulièrement sensibles à l'apport des pailles ainsi qu'à leur composition contrastée, tant sur le plan de leur activité potentielle que de leur diversité structurale. En effet, la potentialité du sol à émettre du  $N_2O$  a été significativement et spécifiquement stimulée par le type de paille, sous maïs en

particulier, et l'ampleur des émissions potentielles était dépendante du stade de minéralisation des paillis. La structure génétique des communautés dénitrifiantes « *nirK* » et « *nosZ* » a également été spécifiquement influencée par le type de résidu, malgré une forte variabilité intra-traitement pour la communauté « *nirK* ». En revanche, le stade de décomposition n'a pas eu d'effet spécifique sur ces deux communautés dénitrifiantes, indiquant ainsi un manque manifeste de corrélation entre la composition de la communauté nitrite réductase et son activité potentielle, fréquemment décrit dans la littérature (e.g. Enwall *et al.*, 2005). L'influence des paillis sur la diversité structurale des communautés dénitrifiantes était prévisible. En effet, de nombreuses études indiquent que les apports de MO modifient la composition de la communauté bactérienne totale du sol (Nakamura *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2003; Aneja *et al.*, 2004; McMahon *et al.*, 2005 ; Ha *et al.*, 2008). Or, les dénitrifiants sont largement représentés au travers du règne bactérien ce qui rend donc très probable un effet de la MO à leur niveau. A l'échelle des dénitrifiants, cet impact de la MO a déjà été observé. Les études ont le plus souvent porté sur l'effet de la fertilisation à long terme (Philippot *et al.*, 2007) avec apport de MO sous forme de fumier de bétail, de boues résiduaires (Enwall *et al.*, 2005) ou de fumier composté de porc (Dambreville *et al.*, 2006) sur l'évolution structurale des communautés nitrate (gène *narG*) et oxyde nitreux (gène *nosZ*) réductase. Dans notre cas, l'absence d'effet temporel associé à la décomposition de la MO des paillis sur l'évolution des communautés « *nirK* » et « *nosZ* » pourrait venir d'un pas de temps trop court entre les échantillonnages par rapport à celui observé dans ces études. Ce constat est aussi à mettre en parallèle avec ceux déjà établis pour les spectres SPIR. Plus précisément, les analyses de co-inertie réalisées entre les signatures spectrales du sol d'une part et les empreintes moléculaires DGGE-*nirK* et RFLP-*nosZ* d'autre part, ont mis en évidence une corrélation significative entre les deux types de données multivariées, soit que la diversité structurale de ces communautés dénitrifiantes est contrainte par la composition du pool de MO du sol. Mais *a priori* ce dernier n'apparaît pas corrélé avec l'évolution du potentiel de dénitrification du sol qui manifeste quant à lui une évolution temporelle très nette contrairement aux signatures spectrales (et aux empreintes moléculaires).

Au-delà de cet aspect structural, il est très probable qu'il y ait eu une stimulation rapide et conjointe des densités de dénitrifiants. En effet, les taux d'amplification PCR des fragments de gènes *nirK* et *nosZ* (appréciés approximativement par l'intensité des signaux sur gels agarose) ont été fortement accentués dès la première semaine, ce qui peut traduire une

augmentation de la richesse relative des extraits d'ADN total du sol en gènes *nirK* et *nosZ*. Ce constat ne concerne pas le gène *nirS* dont les taux d'amplification ont souvent été nuls, voire très faibles. Ce résultat appelle deux interprétations possibles : (i) les amorces *nirS* actuellement disponibles ne sont pas encore suffisamment performantes en terme d'exhaustivité comme déjà supposé par certains auteurs (Sharma *et al.*, 2005), (ii) les bactéries dénitrifiantes ayant une nitrite réductase à cytochrome cd1 n'ont pas été favorisées par l'instauration des paillis et ont été maintenues à des densités inférieures à notre seuil de détection.

En conclusion, nous pouvons dire que notre hypothèse, sur une probable corrélation entre les émissions potentielles de N<sub>2</sub>O et la variation de structure génétique de la communauté bactérienne nitrite réductase, n'a pas été vérifiée. De plus, la mise en évidence d'une forte activité potentielle dénitrifiante des résidus eux-mêmes rend hasardeuse toute étude de corrélation entre le profil des émissions réelles de N<sub>2</sub>O et l'évolution des structures génétiques des communautés bactériennes nitrite et oxyde nitreux réductases du sol.

#### 4. ROLE FONCTIONNEL DE LA MATIERE ORGANIQUE DISSOUE DU SOL DANS LA DENITRIFICATION

La MOD issue des sols, en particulier ceux couverts d'un paillis d'arachide, s'est avérée capable d'entretenir un potentiel de dénitrification. Ce résultat est à mettre en parallèle avec la littérature qui indique que la MOD provient essentiellement de la litière et de l'humus (Kalbitz *et al.*, 2000; Chantigny, 2003) et constitue la principale source de substrat carboné rapidement métabolisable par les microorganismes du sol (Wardle, 1992; Neff et Asner, 2001; Cleveland *et al.*, 2004). Aussi, l'effet de la MOD sur la dénitrification a déjà été relaté dans la littérature (Burford et Bremner, 1975; Zsolnay et Steindl, 1991; McCarty et Bremner, 1993; Jandl et Sollins, 1997; Brye *et al.*, 2001). En particulier, Katz *et al.* (1985) ont démontré la capacité de la MOD de sols riches en MO à stimuler la dénitrification de sols pauvres en MO. Ce résultat peut aussi être rapproché de certaines études de la dénitrification liées à l'influence de la rhizosphère où l'apport de rhizodépôts, largement constitués de composés organiques dissoutes, influence l'activité et/ou la composition des communautés dénitrifiantes (Philippot

*et al.*, 2002; Mounier *et al.*, 2004 ; Chèneby *et al.*, 2004; Deiglmayr *et al.*, 2004; Bremer *et al.*, 2007). Ce résultat impliquerait par ailleurs que dans un sol filtrant, comme le sol expérimental étudié ici, la dénitrification est susceptible de se produire dans des couches plus profondes du sol où le nitrate et la MOD peuvent être facilement présents suite à leur lessivage.

La qualité biochimique du résidu est apparue très importante dans l'ampleur de cet effet, étant donné que ce sont les résidus d'arachide qui sont à l'origine de la MOD qui a soutenu les émissions potentielles les plus élevées. Cependant, cet effet qualité est difficilement séparable d'un effet quantité simultanée (c'est-à-dire la concentration en C et N de la MOD). En effet, les résidus d'arachide ont manifesté une plus grande biodégradabilité (appauvrissement en C du paillis et perte de masse plus rapide qu'avec le maïs). On peut donc supposer que les extraits de MOD des sols sous arachide étaient plus concentrés que ceux sous maïs (ce qui aurait pu être confirmé par les dosages C/N), entraînant un potentiel de dénitrification plus important. De plus, la stimulation la plus forte du potentiel de dénitrification par la MOD des sols a été enregistrée lors des trois premières semaines qui correspondent très probablement à une disponibilité maximale en composés organiques simples et directement métabolisables (glucides, acides aminés et organiques).

Outre la confirmation que la MOD d'un sol sous paillis peut stimuler dénitrification, cette étude nous a permis de préciser deux paramètres: (i) l'amplitude de l'augmentation des émissions potentielles de N<sub>2</sub>O est corrélée au type de résidus et à son stade de décomposition, (ii) cette stimulation potentielle est transitoire et précoce en raison d'une disponibilité plus forte en substances organiques dissoutes facilement métabolisables en début de minéralisation.

# CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

---

Les travaux menés dans cette étude ont permis de souligner l'influence des résidus végétaux appliqués en surface sur l'activité et la structure des communautés dénitrifiantes nitrite réductase et oxyde nitreux réductase du sol. Ainsi, la potentialité du sol à émettre du  $N_2O$  a été significativement et spécifiquement stimulée par le type de paillis, sous maïs en particulier. En présence de quantités non limitantes en nitrate, la richesse en azote des résidus n'est pas apparue comme un critère déterminant dans l'ampleur de cette stimulation. La composition des deux communautés dénitrifiantes modèles a aussi été significativement et spécifiquement modifiée suite à l'apport de ces résidus végétaux, de même que celle de la communauté bactérienne totale. Cependant, aucune relation particulière n'a pu être mise en évidence au cours de l'incubation entre l'évolution de (i) la qualité de la matière organique de sols, (ii) le potentiel de dénitrification et (iii) la structure de la communauté nitrite réductase.

Cette étude a aussi permis de s'interroger sur le rôle fonctionnel joué par la matière organique dissoute du sol dans les émissions de  $N_2O$ . Il a ainsi été montré que cette matière organique pouvait significativement stimuler les émissions potentielles d'oxyde nitreux, notamment lors de la phase précoce de décomposition des paillis.

Ces travaux suggèrent enfin qu'il serait nécessaire de prendre également en compte dans les systèmes agricoles à couverture permanente l'activité dénitrifiante des paillis eux-mêmes, dès lors qu'il s'agirait de raisonner cette pratique en rapport avec son impact sur les émissions d'oxyde nitreux.

Ces résultats soulignent l'importance de coupler la fertilisation organique à la fertilisation azotée minérale dans l'étude de l'écologie des dénitrifiants en milieu agricole, la richesse en azote des résidus ne pouvant pas en soi être déterminante dans la stimulation du potentiel dénitrifiant du sol. Ils appellent également des approches complémentaires sur (i) d'éventuels effets additifs ou rémanents des paillis permanents sur cette communauté fonctionnelle du cycle de l'azote, (ii) l'influence combinée des paillis permanents et du couvert végétal via sa nutrition azotée et son apport de carbone sous forme de rhizodépôts.

# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Aita C, Recous S, Angers DA (1997) Short-term kinetics of residual wheat straw C and N under field conditions: characterization by  $^{13}\text{C}$   $^{15}\text{N}$  tracing and soil particle size fractionation. *European Journal of Soil Science* 48 : 283-294.
- Akiyama H, McTaggart IP, Ball BC, Scott A (2004).  $\text{N}_2\text{O}$ , NO, and  $\text{NH}_3$  emissions from soil after the application of organic fertilizers, urea, and water. *Water Air Soil Pollution* 156 : 113–119.
- Aneja MK, Sharma S, Munch JC, Schloter M (2004) RNA fingerprinting—a new method to screen for differences in plant litter degrading microbial communities. *Journal of Microbiological Methods* 59 : 223–231.
- Angers DA, Recous S, Aita C (1997) Fate of carbon and nitrogen in water-stable aggregates during decomposition of  $^{13}\text{C}$   $^{15}\text{N}$ -labelled wheat straw in situ. *European Journal of Soil Science* 48 : 295-300.
- Assigbetse K, Gueye M, Thioulouse J, Duponnois R (2005) Ectomycorrhizal fungus are not root-growth dependent. *Microbial Ecology* 50 : 350-359.
- Aulakh MS, Doran JW, Walters DT, Mosier AR, Francis DD (1991) Crop residue type and placement effects on denitrification and mineralisation. *Soil Science Society of America Journal* 55 : 1020-1025.
- Averill BA, Tiedje JM (1982) The chemical mechanism of microbial denitrification -- a hypothesis. *FEBS Letters* 138 : 8-12.
- Baggs EM, Millar N, Ndufa JK, Cadisch G (2001) Effect of residue quality on  $\text{N}_2\text{O}$  emissions from tropical soils. In: Rees RM, Ball BC, Campbell CD, Watson CA (Eds.), *Sustainable Management of Soil Organic Matter*, CAB International, Wallingford, pp. 120-125.
- Baggs EM, Rees RM, Smith KA, Vinten AJA (2000) Nitrous oxide emission from soils after incorporating crop residues. *Soil Use & Management* 16 : 82-87.
- Bakken LR (1988) Denitrification under different cultivated plants: Effects of soil moisture tension, nitrate concentration, and photosynthetic activity. *Biology and Fertility of Soils* 6 : 271-278.
- Balesdent J, Chenu C, Balabane M (2000) Relationship of soil organic matter dynamics to physical protection and tillage. *Soil and Tillage Research* 53 : 215-230.
- Bleakley BH, Tiedje JM (1982) Nitrous oxide production by organisms other than nitrifiers or denitrifiers. *Applied and Environmental Microbiology* 44 : 1342-1348.
- Bouwman AF (1998) Nitrogen oxides and tropical agriculture. *Nature* 392 : 866-867.
- Bremer C, Braker G, Matthies D, Reuter A, Engels C, Conrad R (2007) Impact of plant functional group, plant species, and sampling time on the composition of *nirK*-Type denitrifier communities in soil. *Applied Environmental Microbiology* 73 : 6876-6884.
- Brunet D, Barthès B, Chotte JL, Feller C (2007) Determination of carbon and nitrogen contents in Alfisols, Oxisols and Ultisols from Africa and Brazil using NIRS analysis: effects of sample grinding and set heterogeneity. *Geoderma* 139 : 106-117.
- Brye KR, Norman JM, Bundy LG, Gower ST (2001) Nitrogen and carbon leaching in agroecosystems and their role in denitrification potential. *Journal of Environmental Quality* 30 : 58-70.
- Burford JR, Bremner JM (1975) Relationships between the denitrification capacities of soils and total water soluble and readily decomposable soil organic matter. *Soil Biology & Biochemistry* 7 : 389-394.
- Cai Z, Laughlin RJ, Stevens RJ (2001) Nitrous oxide and dinitrogen emissions from soil under different water regime and straw amendment. *Chemosphere* 42 : 113-121.
- Cavigelli MA, Robertson GP (2001) Role of denitrifier diversity in rates of nitrous oxide consumption in a terrestrial ecosystem. *Soil Biology & Biochemistry* 33 : 297-310.

- Cavigelli MA, Robertson GP (2000) The functional significance of denitrifier community composition in a terrestrial ecosystem. *Ecology* 81:1402-1414.
- Cellier P, Germon JC, Herault C, Gernermon S (1997) Les émissions d'ammoniaque (NH<sub>3</sub>) et d'oxydes d'azotes (NO et N<sub>2</sub>O) par les sols cultivés : mécanismes de production et quantification des flux. Maîtrise de l'azote dans les agrosystèmes. Reims (France). INRA (ed.). Les colloques 23 : 19-20.
- Chantigny HM (2003) Dissolved and water-extractable organic matter in soils: a review on the influence of land use and management practices. *Geoderma* 113 : 357-380.
- Chèneby D, Perez S, Devroe S, Hallet S, Couton Y, Bizouard F (2004) Denitrifying bacteria in bulk and maize-rhizospheric soil: diversity and N<sub>2</sub>O-reducing abilities. *Canadian Journal of Microbiology* 50 : 469-474.
- Chèneby D, Philippot L, Hartmann A, Hénault C, Germon JC (2000) 16S rDNA analysis for characterization of denitrifying bacteria isolated from three agricultural soils. *FEMS Microbiology Ecology* 34 : 121-128.
- Christensen S, Groffman P, Mosier A, Zak DR (1990) Rhizosphere denitrification; a minor process bt indicator of decomposition activity. *Denitrification in soil and sediment*. Revsbech NP, Sorensen J. New York, Plenum Press.
- Cleveland CC, Neff JC, Townsend AR, Hood E (2004) Composition, dynamics, and fate of leached dissolved organic matter in terrestrial ecosystems: results from a decomposition experiment. *Ecosystems* 7 : 275-285.
- Cleveland CC, Townsend AR, Schimel DS, Fisher H, Howarth RW, Hedin LO, Perakis SS, Latty EF, Von Fischer JC, Elseroad A, Wasson MF (1999) Global patterns of terrestrial biological nitrogen (N<sub>2</sub>) fixation in natural ecosystems. *Global Biogeochemical Cycles* 13 : 623-645.
- Dambreville C, Hallet S, Nguyen C, Morvan T, Germon JC, Philippot L (2006) Structure and activity of the denitrifying community in a maize-cropped field fertilized with composted pig manure or ammonium nitrate. *FEMS Microbiology Ecology* 56 : 119-131.
- Davidson EA, Galloway LF, Strand MK (1987) Assessing available carbon: Comparison of techniques across selected forest soils. *Commun. Soil Science and Plant Analysis* 18 : 45-64.
- Dawson HJ, Ugolini FC, Hrutfiord BF, Zachara. J (1978) Role of soluble organics in the soil processes of a podzol, Central Cascades, Washington. *Soil Science* 126 : 290-296.
- De Angeli A, Monachello D, Ephritikhine G, Frachisse JM, Thomine S, Gambale F, Barbier-Brygoo H (2006) The nitrate/proton antiporter AtCLCa mediates nitrate accumulation in plant vacuoles. *Nature* 442 : 939-942.
- DeCatanzaro JB, Beauchamp EG (1985) The effect of some carbon substrates on denitrification rates and carbon utilization in soil. *Biology and Fertility of Soils* 1 : 183-87.
- Deiglmayr K, Philippot H, Hartwig U, Kandeler E (2004) Structure and activity of the nitrate-reducing community in the rhizosphere of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* under long-term elevated pCO<sub>2</sub>. *FEMS Microbiology Ecology* 49 : 445-454.
- Dickinson RE, Cicerone RJ (1986) Future global warming from atmospheric trace gases. *Nature* 319 : 109-115.
- Ding W, Meng L, Cai Z, Han F (2007) Effects of long-term amendment of organic manure and nitrogen fertilizer on nitrous oxide emission in a sandy loam soil. *Journal of Environmental Science* 19 : 185-193.
- Dommergues YR, Mangenot F (1970) *Ecologie microbienne du sol*. Masson & Cie, Paris, 796 p.
- Dong YH, Ouyang Z, Liu SL (2005) Nitrogen transformation in maize soil after application of different organic manures. *Journal of Environmental Science China* 17 : 340-343.
- Dutratre P, Bartoli F, Andreux F, Portal JM (1993) Influence of content and nature of organic matter on the structure of some sandy soils from West Africa. *Geoderma* 56 : 459-478.

- Edwards NT, Harris WF (1977) Carbon cycling in a mixed deciduous forest floor. *Ecology* 58 : 431-437.
- Enwall K, Philippot L, Hallin, S (2005) Activity and composition of the denitrifying bacterial community respond differently to long-term fertilization. *Applied Environmental Microbiology* 71 : 8335-8343.
- FAO (2003) Estimations des émissions gazeuses de NH<sub>3</sub>, NO et N<sub>2</sub>O par les terres agricoles à l'échelle du monde. Rome, 122p.
- FAO, IPNIS . <http://www.fao.org/ag/agl/agll/ipnis/countrydata.asp?CountryID=SEN>.
- Firestone MK, Firestone RB, Tiedje JM (1980) Nitrous oxide from soil denitrification: factors controlling its biological production, *Science* 208 : 749-751.
- Flessa H, Potthoff M, Lofffield N (2002) Greenhouse estimates of CO<sub>2</sub> and N<sub>2</sub>O emissions following surface application of grass mulch : importance of indigenous microflora of mulch. *Soil Biology & Biochemistry* 34 : 875-879.
- Flessa H, Beese F (1995) Effect of sugarbeet residues on soil redox potential and nitrous oxide emission. *Soil Science Society of America Journal* 59 :1044-051.
- Foley WJ, McIlwee A, Lawler I, Aragonés L, Woolnough AP, Berding N (1998) Ecological applications of near infra-red reflectance spectroscopy—a tool for rapid, cost-effective prediction of the composition of plant and animal tissues and aspects of animal performance. *Oecologia* 116 : 293-305.
- Frey SD, Six J, Elliott ET (2003) Reciprocal transfer of carbon and nitrogen by decomposer at the soil–litter interface. *Soil Biology & Biochemistry* 35 : 1001-1004
- Frey SD, Elliott ET, Paustian K, Peterson GA (2000) Fungal translocation as a mechanism for soil nitrogen inputs to surface residue decomposition in a no-tillage agroecosystem. *Soil Biology & Biochemistry* 32 : 689-698.
- Gaillard V, Chenu C, Recous S, Richard G (1999) Carbon, nitrogen and microbial gradients induced by plant residues decomposing in soil. *European Journal of Soil Science* 50 : 567-578.
- Galloway JN, Dentener FJ, Capone DG, Boyer EW, Howarth RW, Seitzinger SP, Asner GP, Cleveland PA, Green EA, Holland DM, Karl AF, Michaels JH, Porter AR, Townsend CC, Vorosmarty CJ (2004) Nitrogen cycles: past, present, and future. *Biogeochemistry* 70 : 153-226.
- Galloway JN (1998) The global nitrogen cycle: changes and consequences. *Environmental Pollution* 102 : 15-24.
- Germon JC, Pinochet X, Catroux G (1983) Relation between the kinetics of potential activity of denitrification and soil carbon. *Third International Symposium on Microbial Ecology, East Lansing, Michigan*, 16 p.
- GIEC (2007a) Denman KL, Brasseur G, Chidthaisong A et al. (2007) Couplings Between Changes in the Climate System and Biogeochemistry. In: *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Solomon S., Qin D, Manning M, Chen Z, Marquis M, Averyt KB, Tignor M, Miller HL (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA. pp 501-568.
- GIEC (2007b) Smith P, Martino D, Cai Z et al. (2007) Agriculture. In *Climate Change 2007: Mitigation. Contribution of Working Group III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Metz B, Davidson OR, Bosch PR, Dave R, Meyer LA (eds)], Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA. pp 499-532.
- GIEC (2001) *Climate Change 2001: The Scientific Basis. Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge, 892 p.
- GIEC (1995) Radiative forcing of climate change and an evaluation of the GIEC IS92 emission scenarios. In: Houghton JT (ed) *Climate change (1994)*. Published for the GIEC. Cambridge University Press, Cambridge, 337 p.
- Gregory PJ, Hinsinger P (1999) New approaches to studying chemical and physical changes in the rhizosphere: an overview. *Plant and Soil* 211 : 1-9.

- Grundmann GL, Rolston DE (1987) A water function approximation to degree of anaerobiosis associated with denitrification. *Soil Science* 144 : 437-441.
- Grüntzig V, Nold SC, Zhou J, Tiedje JM (2001) *Pseudomonas stutzeri* nitrate reductase gene abundance in environmental samples measured by real-time PCR. *Applied Environmental Microbiology* 67 : 760-768.
- Gupta VSSR, Ponge JF (1998) Regulation of microbial activity and organic matter dynamics by macro-organisms in the detritusphere. Proceedings of the World Congress of Soil Science, 20–26 August 1998, Montpellier, France, CDROM, CIRAD, Montpellier.
- Ha KV, Marschner P, Bünemann EK (2008) Dynamics of C, N, P and microbial community composition in particulate soil organic matter during residue decomposition. *Plant Soil* 303 : 253–264.
- Hao X, Chang C, Carefoot JM, Janzen HH, Ellert BH (2001) Nitrous oxide emissions from an irrigated soil as affected by fertilizer and straw management. *Nutrient Cycling in Agroecosystem* 60 : 1-8.
- He ZL, Alva AK, Calvert DV, Banks DJ (1999) Ammonia volatilization from different fertilizer sources and effects of temperature and soil pH. *Soil Science* 164 : 750-758.
- Hendricks J, Oubrie A, Castresana J, Urbani A, Gemeinhardt S, Saraste M (2000) Nitric oxide reductases in bacteria. *Biochimica et Biophysica ACTA* 1459 : 266-273.
- Henry S, Bru D, Stres B, Hallet S, Philippot L (2006) Quantitative detection of the *nosZ* gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of 16S rRNA, *narG*, *nirK*, and *nosZ* genes in soils. *Applied and Environmental Microbiology* 72 : 5181-5189.
- Henry S, Baudoin E, Lopez-Gutierrez JC, Martin-Laurent F, Brauman A, Philippot L (2004) Quantification of denitrifying bacteria in soils by *nirK* gene targeted real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods* 59 : 327-335.
- Herbert BE, Bertsch PM (1995) Characterization of dissolved and colloidal organic matter in soil solution: a review. In: McFee WW, Kelly JM (Eds.), *Carbon Forms and Functions in Forest Soils*. Soil Science Society of America, Madison, pp 63-88.
- Heylen K, Vanparys B, Wittebolle L, Verstraete W, Boon N, De Vos P (2006) Cultivation of denitrifying bacteria: optimization of isolation conditions and diversity study. *Applied and Environmental Microbiology* 72 : 2637-2643.
- Hochstein LJ, Betlach M, Kritikos G (1984) The effect of oxygen on denitrification during steady-state growth of *Paracoccus halodenitrifians*. *Archives of Microbiology* 137 : 74-78.
- Holtan-Hartwig L, Bechmann M, Höa TR, Linjordet R, Bakken LR (2002) Heavy metal tolerance of soil denitrifying communities : N<sub>2</sub>O dynamics. *Soil Biology & Biochemistry* 34 : 1181-1190.
- Huang Y, Zou J, Zheng X, Wang Y, Xu X (2004) Nitrous oxide emissions as influenced by amendment of plant residues with different C:N ratios. *Soil Biology & Biochemistry* 36 : 973-981.
- Jandl R, Sollins P (1997) Water extractable soil carbon in relation to the belowground carbon cycle. *Biology and Fertility of Soils* 25 : 196-201.
- Janssen BH (1986) *Organische stof en bodemvruchtbaarheid (Organic matter and soil fertility)*. Lecture notes (in Dutch), Department of Soil Fertility, Wageningen Agricultural University, Wageningen.
- Johansson M, Pell M, Stenström J (1998) Kinetics of substrate-induced respiration (SIR) and denitrification: Applications to a soil amended with silver. *Ambio* 27 : 40-44.
- Jones DL, Willett VB (2006) Experimental evaluation of methods to quantify dissolved organic nitrogen (DON) and dissolved organic carbon (DOC) in soil, *Soil Biology & Biochemistry* 38 : 991-999.

- Kaiser EA, Hohrs K, Kücke M, Schnug E, Heinemeyer O, Munch JC (1998) Nitrous oxide release from arable soil: importance of N-fertilization, crops and temporal variation. *Soil Biology & Biochemistry* 30 : 1553-1563.
- Kalbitz K, Solinger S, Park JH, Michalzik B, Matzner E (2000) Controls on the dynamics of dissolved organic matter in soils: a review. *Soil Science* 165 : 277-304.
- Kalbitz K, Popp P, Geyer W, Hanschmann G (1997) [beta]-HCH mobilization in polluted wetland soils as influenced by dissolved organic matter. *Science of the Total Environment* 204 : 37-48.
- Kandeler E, Luxhøi J, Tschierko D, Magid (1999) Xylanase, invertase and protease at the soil–litter interface of a loamy sand. *Soil Biology & Biochemistry* 31 : 1171-1179.
- Kandeler E, Deiglmayr K, Tschierko D, Bru D, Philippot L (2006) Abundance of *narG*, *nirS*, *nirK*, and *nosZ* genes of denitrifying bacteria during primary successions of a glacier foreland. *Applied and Environmental Microbiology* 72 : 5957-5962.
- Katz R, Hagin J, Kurtz L (1985) Participation of soluble and oxidizable soil organic compounds in denitrification. *Biology and Fertility of Soils* 1 : 209-213.
- Keeney DR, Fillery IR, Marx GP (1979) Effect of temperature on the gaseous nitrogen products of denitrification in a silt loam soil. *Soil Science Society of America* 43 : 1124-1128.
- Khalil K, Mary B, Renault P (2004) Nitrous oxide production by nitrification and denitrification in soil aggregates as affected by O<sub>2</sub> concentration. *Soil Biology & Biochemistry* 36 : 687-699.
- Klemedtsson L, Svensson BH, Rosswall T (1988) A method of selective inhibition to distinguish between nitrification and denitrification as sources of nitrous oxide in soil. *Biology and Fertility of Soils* 6 : 112-119.
- Knowles R (1982) Denitrification. *Microbiological Reviews* 46 : 43-70.
- Kroeze C, Mosier AR, Bouwman L (1999) Closing the global N<sub>2</sub>O budget: a retrospective analysis 1500-1994. *Global Biogeochemical Cycles* 13 : 1-8.
- Ladd JN, Amato M, Grace PR, Van Veen JA, (1995) Simulation of <sup>14</sup>C turnover through the microbial biomass in soils incubated with <sup>14</sup>C labelled-plant residues. *Soil Biology & Biochemistry* 27 : 777-783.
- Larsson L, Ferm M, Kasimir-Klemedtsson A, Klemedtsson L (1998) Ammonia and nitrous oxide emissions from grass and alfalfa mulches. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 51 : 41-46.
- Le Mer J, Roger P (2001) Production, oxidation, emission and consumption of methane by soils: a review. *European Journal of Soil Biology* 37 : 25-50.
- Lelieveld J, Dentener F (2000) What controls tropospheric ozone? *Journal of Geophysical Research* 105 : 3531-3551.
- Lemanceau P, Heulin T (1998) La rhizosphère. Sol interface, profile. P. Stengel and S. Gelin. Paris, INRA.
- Lensi R, Clays-Josserand A, Jocteur Monrozier L (1995) Denitrifiers and denitrifying activity in size fractions of a mollisol under permanent pasture or continuous cultivation. *Soil Biology and Biochemistry* 27 : 61-69.
- Ludwig B, Khanna PK (2001) Use of near infra-red spectroscopy to determine inorganic and organic carbon fractions in soil and litter. In: Lal R, Kimble JM, Follett RF, Stewart BA (eds) *Assessment methods for soil carbon*. CRC/Lewis Publishers, Boca Raton, FL, pp 361-370.
- Maignien R (1965) Carte pédologique du Sénégal. Notice explicative en 1/1000000. ORSTOM, Dakar, Senegal.
- Mahne I, Tiedje JM (1995) Criteria and methodology for identifying respiratory denitrifiers. *Applied Environmental Microbiology* 61 : 1110-1115.

- McCarty GW, Bremner JM (1993) Factors affecting the availability of organic carbon for denitrification of nitrate in subsoils. *Biology and Fertility of Soils* 15 : 132-136.
- McKenney DJ, Wang SW, Drury CF, Findlay WI (1995) Denitrification, immobilization, and mineralization in nitrate limited and nonlimited residue-amended Soil. *Soil Science Society of America Journal* 59 : 118-124.
- McMahon SK, Williams MA, Bottomley PJ, Myrold DD (2005) Dynamics of microbial communities during decomposition of <sup>13</sup>C labeled ryegrass fractions in Soil. *Soil Science Society of America Journal* 69 : 1238-1247.
- Merchante R, Pooley HM, Karamata D (1995) A periplasm in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 177 : 6176-6183
- Millar N, Baggs EM (2004) Chemical composition, or quality, of agroforestry residues influences N<sub>2</sub>O emissions after their addition to soil. *Soil Biology & Biochemistry* 36 : 935-943.
- Millar N, Ndufa JK, Cadisch G, Baggs EM, (2004) Nitrous oxide emissions following incorporation of improved-fallow residues in the humid tropics. *Global Biogeochemical Cycles* 18, GB1032, doi: 10.1029/2003B002114.
- Mogge B, Kaiser EA, Munch JC (1999) Nitrous oxide emissions and denitrification N-losses from agricultural soils in the Bornhöved Lake region: Influence of organic fertilizers and land-use. *Soil Biology & Biochemistry* 31 :1245-1252.
- Mosier A, Kroeze C, Nevison C, Oenema O, Seitzinger S, van Cleemput O (1998) Closing the global N<sub>2</sub>O budget : nitrous oxide emissions through the agricultural nitrogen cycle. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 52 : 225-248.
- Mounier E, Hallet S, Chèneby D, Benizri E, Gruet Y, Nguyen C, Piutti S, Robin C, Slezack-Deschaumes S, Martin-Laurent F, Germon JC, Philippot L (2004) Influence of maize mucilage on the diversity and activity of the denitrifying community. *Environmental Microbiology* 6 : 301–312.
- Mulvaney RL, Khan SA, Mulvaney CS (1997) Nitrogen fertilizers promote denitrification. *Biology and Fertility of Soils* 24 : 211-220.
- Murray PJ, Hatch DJ, Dixon ER, Stevens RJ, Laughlin RJ, Jarvis SC (2004) Denitrification potential in a grassland subsoil: effect of carbon substrates. *Soil Biology & Biochemistry* 36 : 545-547.
- Nakamura A, Tun CC, Asakawa S, Kimura M (2003) Microbial community responsible for the decomposition of rice straw in a paddy field: estimation by phospholipid fatty acid analysis *Biology and Fertility of Soils* 38 : 288-295.
- Neff JC, Asner GP (2001) Dissolved organic carbon in terrestrial ecosystems: synthesis and a model. *Ecosystems* 4 : 29-48.
- Nevison C, Holland E (1997) A reexamination of the impact of anthropogenically fixed nitrogen on atmospheric N<sub>2</sub>O and the stratospheric O<sub>3</sub> layer. *Journal of Geophysical Research* 102 : 25519-25536.
- Ovreas L, Forney L, DAAE, FL, Torsvik V (1997) Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments codind for 16S rRNA. *Applied Environmental Microbiology* 63 : 3367-3373.
- Pell MB, Stenberg B, Torstensson L (1998) Potential denitrification and nitrification tests for evaluation of pesticide effects in soil. *Ambio* 27 : 24-28.
- Petersen L (1976) Podzols and podzolization. DSR Forlag, Kopenhagen 293 p.
- Philippot L, Hallin S, Schloter M (2007) Ecology of Denitrifying Prokaryotes in Agricultural Soil. *Advances in Agronomy* 96 : 249-305.
- Philippot L, Hallin S (2006) Molecular analyses of soil denitrifying bacteria. In *Molecular Techniques for Soil, Rhizosphere and Plant Microorganisms* (eds. Cooper and Rao) chap 9, pp 146-165.

- Phillipot L (2002) Denitrifying genes in bacterial and archaeal genomes. *Biochemica et Biophysica Acta (BBA.)* 1577 : 355-376.
- Phillipot L, Piutti S, Martin-Laurent F, Hallet S, Germon JC (2002) Molecular analysis of the nitrate-reducing community from unplanted and maize-planted soil. *Applied Environment Microbiology* 68 : 6121-6128.
- Phillipot L, Højberg O (1999) Dissimilatory nitrate reductases in bacteria. *Biochemica et Biophysica Acta* 1446 : 1-23.
- Poll C, Marhan S, Ingwersen J, Kandeler E (2008) Dynamics of litter carbon turnover and microbial abundance in a rye detritusphere. *Soil Biology & Biochemistry (sous presse)*.
- Porteous LA, Seidler RJ, Watrud LS (1997) An improved method for purifying DNA from soil for polymerase chain reaction amplification and molecular ecology applications. *Molecular Ecology* 6 : 787-791.
- Prosser JI (1986) *Nitrification*. IRL PRESS, Oxford, 217 p.
- Reinertsen SA, Elliott LF, Cochran VL, Campbell GS (1984) Role of available carbon and nitrogen in determining the rate of wheat straw decomposition. *Soil Biology & Biochemistry* 16 : 59-64.
- Rengel Z, Ross G, Hirsch P (1998) Plant genotype and micronutrient status influence colonization of wheat roots by soil bacteria. *Journal of Plant Nutrition* 21 : 99-113.
- Recous S, Fresneau C, Faurie G, Mary B (1988) The fate of labelled <sup>15</sup>N urea and ammonium nitrate applied to a winter wheat crop. I. Nitrogen transformations in the soil. *Plant Soil* 112 : 205-214.
- Rice CW et Tiedje JM (1989) Regulation of nitrate assimilation by ammonium in soils and in isolated soil microorganisms. *Soil Biology & Biochemistry* 21 : 597-602.
- Römken PFAM, Dolfing J (1998) Effect of Ca on the solubility and molecular size distribution of DOC and Cu binding in soil solution samples. *Environmental Science & Technology* 32 : 363-369.
- Roy R, Greer CW (2000) Hexadecane mineralization and denitrification in two diesel fuel-contaminated soils. *FEMS Microbiological Ecology* 32 : 17-23.
- Sakadevan, K., Zeng, H., and Bavor, H. J. (1999). Impact of heavy-metals on denitrification in surface wetlands sediments receiving wastewater. *Water Science and Technology*. 40 : 349-355.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Sarkodie-Addo J, Lee HC, Baggs EM (2003) Nitrous oxide emissions after application of inorganic fertilizer and incorporation of green manure residues. *Soil Use and Management* 19 : 331-339.
- Seneviratne G, van Holm LHJ (1998) CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>O emissions from a wetted tropical upland soil following surface mulch application. *Soil Biology & Biochemistry* 30 : 1619-1622.
- Sharma S, Aneja MK, Mayer J, Munch JC, Schloter M (2005) Diversity of transcripts of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) in rhizospheres of grain legumes. *Applied Environmental Microbiology* 71 : 2001-2007.
- Shenk JS, Workman Jr JJ, Westerhaus MO (1992) Application of NIR spectroscopy to agricultural products. In: Burns DA, Ciurczak EW (eds) *Handbook of near-infrared analysis*. Marcel Dekker, New York, pp 383-431 Skjemstad JO (2006).
- Sicilano SD, Roy R, Greer CW (2000) Reduction in denitrification activity in field soils exposed to long-term contamination by 2,4,6-trinitrotoluene (TNT). *FEMS Microbiological Ecology* 32 : 61-68.
- Simek M, Cooper JE (2002) The influence of pH on denitrification: progress towards the understanding of this interaction over the last 50 years. *European Journal of Soil Science* 53 : 345-354.

- Simek M, Hopkins DW (1999) Regulation of potential denitrification by soil pH in long-term fertilized arable soils. *Biology and Fertility of Soils* 30 : 41-47.
- Skiba U, Smith KA (2000) The control of nitrous oxide emissions from agricultural and natural soils. *Chemosphere: Global Change Science* 2 : 379-386.
- Smid AE, Beauchamp EG (1976) Effects of temperature and organic matter on denitrification in soil. *Canadian Journal of Soil Science* 56 : 385-391.
- Smolander A, Kitunen V (2002) Soil microbial activities and characteristics of dissolved organic C and N in relation to tree species. *Soil Biology & Biochemistry* 34 : 651-660.
- Svensson BH, Klemedtsson L, Simkins S, Paustin K, Rosswall T (1991) Soil denitrification in three cropping systems characterized by differences in nitrogen and carbon supply. I. Rate-distribution frequencies, comparison between systems and seasonal N losses. *Plant Soil* 138 : 257-271.
- Tabazadeh A, Santee ML, Danilin MY, Pumphrey HC, Newman PA, Hamill PJ, Mergenthaler JL (2000) Quantifying denitrification and its effect on ozone recovery. *Science* 288 : 1407-1411.
- Tiedje JM (1988) Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. *Biology of anaerobic microorganisms*. A. J. B. a. S. Zehnder. New York, J. Wiley and Sons : 179-244.
- Tiedje JM, Sexstone AJ, Myrold DD, Robinson JA (1982) Denitrification : ecological niches, competition and survival. *Antonie van Leeuwenhoek* 48 : 569-583.
- Tipping E (1998) Modeling properties and behavior of dissolved organic matter in soils. *Mitteilungen der Deutschen Bodenkundlichen Gesellschaft* 87 : 237-252.
- Thioulouse J, Chessel D, Doledec S, Olivier JM (1997) ADE-4: a multivariate analysis and graphical display software. *Statistics Computing* 7 : 75-83.
- Throbäck IN, Enwall K, Jarvis A, Hallin S (2004) Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. *FEMS Microbiology Ecology* 49 : 401-417.
- Torsvik V, Salte K, Sørheim R, Goksøyr G (1990) Comparison of phenotypic diversity and DNA heterogeneity in a population of soil bacteria. *Applied Environmental Microbiology* 56 : 776-781.
- Trinsoutrot I, Recous S, Bentz B, Linères M, Chèneby D, Nicolardot B (2000) Biochemical quality of crop residues and carbon and nitrogen mineralization kinetics under nonlimiting nitrogen conditions. *Soil Science Society of America Journal* 64 : 918-926.
- Veldkamp E, Keller M, Nuñez M (1998) Effects of pasture management on N<sub>2</sub>O and NO emissions from soils in the humid tropics of Costa Rica. *Global Biogeochemical Cycles* 12 : 71-79.
- Velthof GL, Kuikman PJ, Oenema O (2002) Nitrous oxide emission from soils amended with crop residues. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 62 : 249-261.
- Vogt KA, Grier CC, Meier CE, Keyes MR (1983) Organic matter and nutrient dynamics in forest floors of young and mature *Abies amabilis* stands in western Washington, as affected by fine-root input. *Ecological Monographs* 53 : 139-157.
- Waibel AE, Peter T, Carslaw KS, Oelhaf H, Wetzell G, Crutzen PJ, Poschl U, Tsias A, Reimer E, Fisher H (1999) Arctic ozone loss due to denitrification. *Science* 283 : 2064-2069.
- Wardle DA (1992) A comparative assessment of the factors which influence microbial biomass carbon and nitrogen levels in soil. *Biological Reviews* 67 : 321-358.

- Wrage N, Velthof GL, Beusichem ML, Oenema O (2001) Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide. *Soil Biology & Biochemistry* 33 : 1723-1732.
- Williams BL, Edwards AC (1993) Processes influencing dissolved organic nitrogen, phosphorus and sulphur in soils. *Chemical Ecology* 8 : 203-215.
- Yang YJ, Dungan RS, Ibekwe AM, Valenzuela-Solano C, Crohn DM, Crowley DE (2003) Effect of organic mulches on soil bacterial communities one year after application. *Biology and Fertility of Soils* 38 : 273-281.
- Zsolnay A (2003) Dissolved organic matter: artefacts, definitions, and functions. *Geoderma* 113 : 187-209.
- Zsolnay A (1996) Dissolved humus in soil waters. In: Piccolo, A. (Ed.), *Humic Substances in Terrestrial Ecosystems*. Elsevier, Amsterdam, pp. 171– 224.
- Zsolnay A, Steindl H (1991) Geovariability and biodegradability of the water extractable organic material in an agricultural soil. *Soil Biology & Biochemistry* 23 : 1077-1082.
- Zumft WG (1997) Cell Biology and Molecular Basis of Denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61: 533-616.
- Zumft WG, Braun C, Cuypers H (1994) Nitric oxide reductase from *Pseudomonas stutzeri*. Primary structure and gene organization of a novel bacterial cytochrome bc complex. *European Journal of Biochemistry* 219 : 481-490.
- Zumft WG (1993) The biological role of nitric oxide in bacteria. *Archives of Microbiology* 160 : 253-264.

# ANNEXES

---

## ANNEXE 1 : PREPARATION DES SOLUTIONS D'EXTRACTION D'ADN

### **Tampon de lyse stérile : 0,25M NaCl ; 0,1M EDTA ; pH8**

Peser 1,461 g de NaCl (MM= 58,44) et ajouter 20 mL d'EDTA à 0,5M pH8 (ou peser 3,722 g d'EDTA et ajuster le pH à 8)

Compléter à 100 mL avec de l'eau déminéralisée

Filtrer à 0,2 µm et mettre à l'autoclave

Conserver à 4°C

### **CTAB 2% : 1,4M NaCl ; 0,1M EDTA ; 2% CTAB**

Peser 8,18 g de NaCl et 3,722 g d'EDTA, dissoudre

Compléter à 100 mL

Filtrer à 0,2 µm

Ajouter 2 g de CTAB

Mettre à l'autoclave

Conserver à température ambiante

### **PEG 8000 à 40%**

Peser 10 g de PEG 8000

Ajouter environ 10 mL d'eau très progressivement car le volume augmente quand le CTAB se dissout

Compléter à 25 mL

Mettre à l'autoclave

Conserver à 4°C

### **Acétate de potassium 5M**

Peser 49,07 g d'acétate de potassium, dissoudre

Compléter à 100 mL

Filtrer à 0,2 µm

Mettre à l'autoclave

Conserver à 4°C

### **Acétate d'ammonium 2,5M**

Peser 19,27 g d'acétate d'ammonium, dissoudre

Compléter à 100 mL

Filtrer à 0,2 µm

Mettre à l'autoclave

Conserver à 4°C

### **TE (Tris-EDTA) 1X**

Tris-HCl 10 mM

EDTA 1 mM

Ajuster à pH 8,5

Mettre à l'autoclave

Conserver à température ambiante

**EDTA:** Ethylene Diamine Tetra Acetic

**PEG:** PolyEthylene Glycol

**CTAB:** Cetyl Trimetyl Ammonium Bromide

**TE:** Tris EDTA

## ANNEXE 2 : PURIFICATION PAR KIT COMMERCIAL Wizard<sup>®</sup> DNA Clean-up (Proméga)

Il s'agit de purifier des extraits bruts d'ADN, selon la méthode suivante:

- 1- Bien resuspendre la résine en la préchauffant au bain marie à 50°C (refroidir à 30°C).
- 2- Mélanger 100 µl d'ADN avec 1 ml de résine.
- 3- Transférer rapidement la suspension dans une seringue de 2 ml.
- 4- Faire passer la suspension à travers la colonne Wizard au goutte à goutte (adsorption de l'ADN sur le filtre).
- 5- Laver le filtre de la colonne avec 2 ml d'isopropanol 80% (même principe que l'étape 4)
- 6- Placer la colonne sur un tube Eppendorf neuf puis centrifuger à 10,000 rpm pendant 2 min (séchage du filtre).
- 7- Placer la colonne sur un nouveau tube Eppendorf puis éluer l'ADN avec 50 µl d'eau ultra pure chauffée à 80°C.
- 8- Laisser reposer 1 min puis centrifuger à 10,000 rpm pendant 30 sec.
- 9- L'ADN purifié est contenu dans l'éluat.
- 10- Conserver à -20°C jusqu'à utilisation.

## ANNEXE 3 : QUANTIFICATION DE L'ADN

Il s'agit de connaître la concentration en ADN d'un échantillon afin de déterminer le volume à apporter à la PCR. Sur un gel d'agarose 1%, on fait migrer (100 V, 45 min) 5 µl d'échantillon d'ADN à doser et 10 µl pour chaque concentration de référence de la gamme étalon. Les concentrations de référence sont les suivantes :

G1 : 6,25 ng d'ADN de thymus de veau dans 10 µl

G1 : 12,5 ng d'ADN dans 10 µl

G2 : 25 ng d'ADN dans 10 µl

G3 : 50 ng d'ADN dans 10 µl

G4 : 100 ng d'ADN dans 10 µl

G5 : 200 ng d'ADN dans 10 µl

Après coloration du gel au BET (bromure d'éthidium), la concentration d'ADN est extrapolée à partir de l'intensité des bandes étalons (régression linéaire) déterminée à l'aide du logiciel TL120 TotalLab (Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, UK) sur la base d'une image numérisée du gel par le dispositif Bio-Capt (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, France).

## ANNEXE 4 : SEQUENCES DES AMORCES PCR

-gène *nirK*

F1aCu : 5' ATC ATG GT(C/G) CTG CCG CG 3'

R3Cu-GC clamp : 5' GGC GGC GCG CCG CCC GCC CCG CCC CCG TCG CCC GCC

TCG ATC AG(A/G) TTG TGG TT 3'

-gène *nirS*

cd3aF : 5' GT(C/G) AAC GT(C/G) AAG GA(A/G) AC(C/G) GG 3'

R3cd-GC clamp : 5' GGC GGC GCG CCG CCC GCC CCG CCC CCG TCG CCC

GA(C/G) TTC GG(A/G) TG(C/G) GTC TTG A 3'

- gène *nosZ*

*nosZf* : 5' CG(C/T) TGT TC(A/C) TCG ACA GCC AG 3'

*nosZr* : 5' CAT GTG CAG (A/C/G/T)GC (A/G)TG GCA GAA 3'

- gène ADNr 16S

UNIV518R (5' ATTACCGCGGCTGCTGG 3')

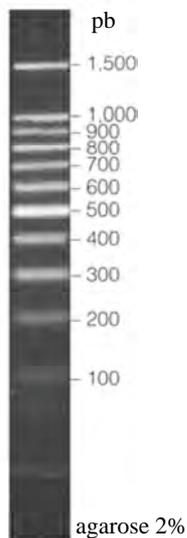
EUB338F-*GC clamp* : 5' CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGG  
GGCACGGGGGG ACTCCTACGGGAGGCAGCAG 3'

#### ANNEXE 5: COMPOSITION DU MIX REACTIF Hot-Star Taq® (Qiagen) POUR 25 µL DE VOLUME FINAL

HotStarTaq DNA polymerase	2.5 U
dNTP	200 µM
Tris-Hcl	10 mM, pH 9
KCl	50 mM
DTT	0,5 mM
EDTA	0,05 mM
Nonidet® P-40	0,5% (v/v)
Tween® 20	0,5% (v/v)
Glycerol (v/v)	50%
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
stabilizer	

#### ANNEXE 6 : MARQUEUR DE POIDS MOLECULAIRE (100 pb)

Le marqueur de poids moléculaire 100 pb est utilisé pour déterminer la taille d'ADN bicaténaire de 100 à 1500 pb. Préparé à partir d'un plasmide contenant des répétitions d'un fragment d'ADN de 100 pb, dilué à raison de 1ng µl<sup>-1</sup> ( 3 ng µl<sup>-1</sup> pour le fragment 500 pb) dans un tampon de 10mM Tris-Hcl (pH 7,5), 1mM EDTA. Ce marqueur consiste en 11 fragments bouts francs allant de 100 à 1500 pb espacés de 100 pb. La bande 500 pb est 3 fois plus intense que les autres bandes servant ainsi de référence.



## ANNEXE 7 : PURIFICATION DES AMPLIFIATS PCR PAR MinElute® purification Kit (Qiagen).

Il s'agit de la purification des produits PCR par kit commercial selon le procédé suivant :

- Le tampon PE doit être dilué avec de l'éthanol (96-100%) avant utilisation.
  - Toutes les centrifugations sont faites à  $10,000 \times g$ .
- 1- Ajouter 5 volumes de tampon PB pour 1 volume de la PCR et mélanger.
  - 2- Placer les colonnes MinElute dans les tubes de 2 ml livrés avec le kit.
  - 3- Afin de lier l'ADN, verser l'échantillon dans les colonnes MinElute et centrifuger pendant 1 min.
  - 4- Jeter le contenu du tube et remettre la colonne MinElute sur le tube.
  - 5- Laver le culot avec 750  $\mu$ l de tampon PE MinElute à la colonne et centrifuger pendant 1 min.
  - 6- Jeter le contenu du tube et remettre la colonne MinElute sur le tube. Centrifuger encore 1 min à la vitesse maximale.
  - 7- Placer la colonne MinElute dans un tube Eppendorf 1,5 ml propre.
  - 8- Pour éluer l'ADN, ajouter 17  $\mu$ l d'eau ultra-pure stérile au centre de la membrane, laisser reposer pendant 1 min, puis centrifuger pendant 1 min.
  - 9- Conserver à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## ANNEXE 8 : ELECTROPHORESE ACRYLAMIDE EN GRADIENT CHIMIQUE DENATURANT (DGGE)

- Mesurer 30 ml de « low » à l'éprouvette et le verser dans le tube Falcon « low »
- Mesurer 30 ml de « high » avec la même éprouvette et le verser dans le tube Falcon « high »
- Mettre 500  $\mu$ l de Bleu dans le « high » (c'est le low qui vient diluer le high)
- Mettre 60  $\mu$ l de TEMED dans chaque tube
- Vérifier que le robinet de la pompe à gradient est fermé
- Mettre 120  $\mu$ l d'APS dans le « low » (la polymérisation commence) et verser dans le compartiment de gauche
- Ouvrir légèrement le robinet pour faire partir la bulle créée suite au versement du low
- Mettre 120  $\mu$ l d'APS dans le « high » et verser dans le compartiment de droite
- Allumer la pompe et attendre que le ménisque du high soit légèrement sous celui du low puis lentement ouvrir le robinet de communication

### **Coulage du gel**

- Laisser couler quelques gouttes, arrêter la pompe, placer l'aiguille au milieu entre les 2 plaques et remettre la pompe en marche.
- Surveiller pendant que le gradient se forme (durée  $\pm 10$  min) pour prévenir les éventuelles fuites.
- Rincer les 2 tubes Falcon, laisser les autres solutions à portée de main dans la glace au cas où il y aurait un problème.

Une fois le gel coulé, chasser les bulles d'air en le soulevant puis en replaçant tout doucement le peigne.

Laisser polymériser une heure et demi

Rincer la pompe abondamment et la démonter.

### **Préparation des échantillons à déposer**

- Sortir les produits PCR (stockés à  $-20^{\circ}\text{C}$ )
  - Ajouter le bleu de charge spécial DGGE aux échantillons (10  $\mu\text{l}$  pour 23  $\mu\text{l}$ ), afin de les alourdir et de visualiser le front de migration.
- Conserver à  $4^{\circ}\text{C}$  avant de déposer.

### **Préparation de l'appareillage**

- Desserrer les vis de l'appareil.
- Pousser fort l'espaceur vers le bas pour libérer l'espace et laisser passer le tampon qui devra être en contact avec le gel.
- Resserrer doucement les vis sans écraser le gel
- Placer le support dans la cuve en l'inclinant pour chasser les bulles d'air sous le gel
- Placer l'électrode rouge à droite, la noire à gauche, mettre le bouton sur jaune « Low Voltage »
- Fixer le tuyau en silicone à la cuve
- Mettre le bouton rond de la pompe (sur le côté) sur la position « ouvert », attendre que la cuve se remplisse et le remettre sur « fermé »
- Vérifier que le niveau de tampon est à « INGENY phorU2 »
- Retirer le peigne tout doucement
- Rincer les puits avec la pipette (P100) afin d'éliminer les traces d'acrylamide (2 fois)
- Remettre les puits droits avec le cône de la pipette.

#### Dépôt des échantillons

- Centrer les échantillons au milieu du gel pour éviter au maximum les effets de bord, mélanger chaque échantillon avant de le déposer délicatement
- Déposer marqueurs de chaque côté et bleu de charge dans les puits des extrémités
- Placer le couvercle de la cuve, brancher les électrodes au générateur (position 3), mettre « meter selector » sur 3 et le bouton vert 3 sur 100 Volts.
- Mettre le boulon sur rouge « high voltage HV »
- Au bout de 10 à 15 minutes, mettre la pompe en route (molette de droite à descendre d'1/4 de tour).

### **Migration**

17 heures à 100 Volts.

### **Récupération du gel**

- Éteindre l'appareil, le générateur, débrancher les électrodes et le tuyau en silicone
- Sortir l'appareil en le vidant
- Dévisser et sortir les plaques en soulevant par l'espaceur, les placer dans le bac BET rempli d'eau
- Enlever la petite plaque, puis l'espaceur
- Couper le côté du gel où l'on a commencé à déposer (en haut à droite)
- Faire des mouvements de vague pour détacher le gel, puis enlever la grande plaque

### **Coloration**

- Placer très délicatement le gel dans le BET
- Laisser colorer 30 minutes sous agitation
- Sortir le gel, le mettre dans l'eau et laisser sous agitation pendant 10 min

### Prise de la photo du gel

- Sortir le gel et le placer sous la lampe UV
- Ouvrir le Logiciel BIOCAPT
- Mettre au point, cliquer sur « temps d'intégration » puis sur « arrêt acquisition » pour prendre la photo, annoter la photo, enregistrer et imprimer
- Jeter le gel, nettoyer tout le matériel, ranger.

### ANNEXE 9 : TAMPON TAE 50 X

Tris-base	242,2 g
Na <sub>2</sub> EDTA (pH 8)	18,51 g
Acide acétique glacial	57,1 ml
H <sub>2</sub> O	qsp 1 litre

### ANNEXE 10 : SOLUTIONS POUR GEL A 8% D'ACRYLAMIDE/BIS-ACRYLAMIDE 40%

Réactifs	Dénaturants	
Gradients	45%	70%
40% acrylamide	20 ml	20 ml
TAE 50 X (ml)	2 ml	2 ml
Formamide (ml)	18 ml	28 ml
Urée (g)	18,9 g	29,4 g
Glycérol	2%	2%
Qsp H <sub>2</sub> O	100 ml	

### ANNEXE 11 : EXTRACTION-PURIFICATION D'ADN SUR GEL AGAROSE (Wizard<sup>®</sup> SV Gel Clean-Up System, Proméga)

Sous une lampe UV, la bande d'ADN d'intérêt est découpée au scalpel, et introduite dans un tube eppendorf pesé au préalable. Le tube plein est pesé à nouveau, afin d'évaluer la quantité exacte de gel qu'il contient. La purification est ensuite effectuée grâce à un kit (Wizard<sup>®</sup> SV Gel Clean-Up System, Proméga).

- 1- Pour 100 mg de gel, ajouter 100µl de tampon QG.
- 2- Incuber 10 minutes au bain marie à 60°C.
- 3- Après dissolution complète du gel verser la mixture dans les colonnes et laisser reposer pendant 1 minute.
- 4- Puis centrifuger à 10000 rpm pendant 1 minute. Jeter le surnageant

5- Laver le culot daborb avec 700µl de tampon PE suivie d'une centrifugation de 1 minute à 10000 rpm, ensuite avec 500µl de tampon PE suivi d'une centrifugation de 5 minute à 10000 rpm, afin d'éliminer les sels contaminants..

6- Centrifiger sous vide 1 minute.

7- Pour éluer l'ADN, ajouter 17 µl d'EB au centre de la membrane de la colonne. Incuber 1 minute à température ambiante. Centrifuger 1 minute à 10000 rpm.

8- Recueillir le filtrat contenant l'ADN purifié dans un nouveau tube eppendorf.

#### ANNEXE 12: Tampon TBE (Tris-borate) 10 X

Tris-base	121 g
Na <sub>2</sub> EDTA, H <sub>2</sub> O	7,44 g
Acide borique	55 g
H <sub>2</sub> O	qsp 1 litre
Filtrer, mettre à l'autoclave	

**Potential and in situ emissions of N<sub>2</sub>O from a wet tropical soil covered by maize and peanut mulches**

Amadou Dieng<sup>1,2</sup>, Ezékiel Baudoin<sup>1,3</sup>, Joele Louri<sup>3</sup>, Samba Sylla<sup>2</sup>, Alain Brauman<sup>3</sup>

<sup>1</sup> IRD, Laboratory of Tropical Soils and Agroecosystems Microbial Ecology-UR179 SeqBio, BP 1386, Dakar, Senegal

<sup>2</sup> University Cheikh Anta Diop, Department of Plant Biology, Dakar, Senegal

<sup>3</sup> IRD, UR179 SeqBio, 2 place Viala, bâtiment 12, 34060 Montpellier cedex1, France

Organic fertilization is identified as one of the main agricultural contributors of nitrous oxide emissions from soil. Its effect largely depends on chemical quality and physical placement of organic inputs as well as soil types. In the present study, the influence of crop residue quality (maize C/N=117 ; peanut C/N=17) on potential and in situ emissions of N<sub>2</sub>O was investigated using microcosms and wet tropical soil (25 g) covered by mulches (2 g) for five weeks. Control was free of crop residue. A mineral nitrogen input (+0.25 mg N g<sup>-1</sup> soil) was performed for all treatments before incubation so that nitrate could not act as a limiting factor of denitrification. Soil and mulches were sampled separately once every week to follow dynamic of C/N content and potential denitrification (+C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>). Flask atmosphere was also sampled to determine the in situ emissions of N<sub>2</sub>O with extra samplings along the first week.

Maximum soil carbon increase (+24%) was reached within the first week for organic treatments without further evolution. On the contrary, soil nitrogen contents significantly decreased from week 1 for all treatments (-22%). Nevertheless, mulch quality had no specific effect on these parameters. Besides, maximum mulch carbon decrease was also reached within the first week especially with peanut (-13%), while a progressive increase of mulch nitrogen contents was observed nearly throughout incubation. Patterns of in situ N<sub>2</sub>O emissions were influenced by mulch type essentially within the first three days of incubation. Emissions abruptly increased during the first day with peanut values six times higher than that of maize. N<sub>2</sub>O release rapidly declined at day 2 for peanut but kept increasing for maize. Further in situ emissions were significantly higher than the control ones only with maize mulch but differences extent was weak. Potential denitrification levels of soil and mulch were markedly increased by comparison with unamended soil, especially with maize. This parameter was also influenced by mulch type as potential N<sub>2</sub>O releases related to maize were significantly higher than those of peanut nearly throughout incubation. Moreover, mulch contribution to potential N<sub>2</sub>O releases was far more important than soil one (soil values representing from 3 to 65% of mulch ones).

Overall, data indicate that the greatest changes in soil chemistry and in situ emissions of N<sub>2</sub>O occurred during the first days of incubation. While mulch quality had no specific impact on organic matter contents, it did influence potential and in situ emissions of N<sub>2</sub>O. The drastic increase of potential denitrification levels for maize mulch and associated soil was not mirrored by in situ emission pattern claiming for a possible reduction of N<sub>2</sub>O by maize mulch microorganisms. These data corroborate other studies indicating that more attention should be paid to mulch microbiological processes/communities when assessing contribution of this land use type to agricultural N<sub>2</sub>O emissions.

**Denitrifiers communities and soil organic matter quality  
as influenced by mulched crop residues**

Amadou Dieng<sup>1,2</sup>, Ezékiel Baudoin<sup>1,3</sup>, Didier Brunet<sup>3</sup>, Jean Thioulouse<sup>4</sup>, Alain Brauman<sup>3</sup>

<sup>1</sup> IRD, UR179 SeqBio, Laboratoire d'Ecologie Microbienne des Sols et Agrosystèmes Tropicaux, BP 1386, Dakar, Sénégal

<sup>2</sup> Université Cheikh Anta Diop, Département de Biologie Végétale, Dakar, Sénégal

<sup>3</sup> IRD, UR179 SeqBio, 2 place Viala, bâtiment 12, 34060 Montpellier cedex1, France

<sup>4</sup> UMR CNRS 5558, Laboratoire de Biométrie et de Biologie Evolutive, Université Lyon1, 43 boulevard du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne cedex, France

Mulches are often recognised to favour nitrous oxide releases during early stages of decomposition. However, little is known on the relationship between mulch decomposition, organic matter quality and denitrifiers community structures. In the present study, the influence of two decaying crop residues (maize C/N=117, peanut C/N=17) on soil organic matter pool and structural diversity of denitrifiers communities was investigated by using microcosms of a tropical soil covered by mulches along a five-week incubation. Microcosms were sampled every week but before incubation a mineral nitrogen input was performed for all treatments so that nitrate could not be a limiting factor of denitrification. Nitrite and nitrous oxide reductase community structures were characterized using DGGE for *nirK* and *nirS* gene markers and RFLP for *nosZ* gene marker. Qualitative evolution of soil organic matter was revealed by means of spectral signatures (NIRS, near infra-red spectroscopy).

*NirS* gene fragments could not be amplified with any treatments. *NirK* amplification rates were too low to generate DGGE fingerprints in the case of control soils. *NosZ* gene fragments could be amplified with any treatments. In this background, both types of mulched residues were associated to specific nitrite (*nirK*-DGGE) and nitrous oxide reductase community structures, as soon as the first sampling. This impact lasted over the time course of the experiment. However, these community structures were not characterized by a consistent temporal pattern across the five samplings. Maize and peanut mulches also sustained two distinct soil organic matter pools that only differed from a qualitative point of view (similar total C contents). Soil organic matter was less impacted under maize than under peanut residues. Again, no clear stage-specific patterns of spectral signatures could be evidenced along the incubation. Co-inertia analysis revealed that mulch type effect on molecular fingerprints was highly correlated to that on spectral signatures ( $P < 0.0001$ ).

Overall, data indicated that under favourable environmental conditions for denitrification, structural diversity of soil denitrifiers communities and soil organic matter pool were strongly dependent on crop residue type during early decay stages.

**TITRE DU MEMOIRE** : Influence de la qualité biochimique des paillis sur les émissions d'oxyde nitreux et la dynamique des dénitrifiants d'un sol agricole.

**NOM DU CANDIDAT** : Amadou Dieng

**NATURE DU MEMOIRE** : Diplôme d'Etudes Approfondies de Biologie Végétale

**JURY** :

Président : M. Kandoura NOBA, Maître de Conférences-UCAD

Membres : Mme. Yacine BADIANE NDOUR, Chargé de Recherche-ISRA  
M. Samba NDAO SYLLA, Maître de Conférences-UCAD  
M. Ezékiel BAUDOIN, Chargé de Recherche-IRD

Soutenu le 24 mai 2008

**RESUME**

L'usage des paillis de résidus de récolte présente des avantages agronomiques mais peut aussi stimuler les émissions d'oxyde nitreux (N<sub>2</sub>O). Le processus bactérien de la dénitrification est considéré comme source prépondérante de N<sub>2</sub>O en conditions humides prolongées. Cependant, les relations qui s'établissent au cours de la minéralisation des résidus entre leur qualité biochimique et la dynamique des dénitrifiants sont peu connues.

Dans cette étude, l'influence de deux résidus de compositions biochimiques contrastées (maïs C/N=117, arachide C/N=17) sur la matière organique du sol, l'activité et la structure génétique de communautés dénitrifiantes clés a été étudiée avec un sol agricole issu du bassin arachidier. Les microcosmes, ayant reçu un apport initial de nitrate destiné à ne pas limiter la dénitrification, ont été incubés en conditions contrôlées durant cinq semaines, avec un échantillonnage hebdomadaire.

La composition de la matière organique du sol a été spécifiquement modifiée par les résidus d'arachide dès la première semaine par rapport aux témoins non amendés. L'effet des résidus de maïs a été moins net et, dans les deux cas, la qualité de cette matière organique n'a plus évolué au-delà du premier échantillonnage. Ces changements qualitatifs ont été accompagnés d'une augmentation simultanée des teneurs en carbone total. En revanche, les teneurs du sol en azote total ont diminué au cours de l'incubation et le type de paillis n'a pas eu d'effet sur ces teneurs carbone/azote. Dans ce contexte, le potentiel de dénitrification des sols a été spécifiquement stimulé tout au long de l'incubation par le type de résidus, sous les paillis de maïs en particulier. Il a été mis en évidence à ce niveau que la matière organique dissoute du sol sous paillis pouvait stimuler la dénitrification. La structure génétique des communautés dénitrifiantes "nitrite réductase" et "oxyde nitreux réductase" a été spécifiquement influencée par le type de résidus dès la première semaine. Néanmoins, ces communautés n'ont plus évolué au-delà de ce premier échantillonnage. Les impacts des résidus sur la qualité de la matière organique et la composition des communautés dénitrifiantes du sol ont été très hautement corrélés.

Ces résultats indiquent nettement que la diversité structurale et l'activité potentielle des communautés dénitrifiantes ainsi que la composition de la matière organique du sol sont fortement dépendantes de la qualité biochimique du paillis dès les premiers stades de minéralisation.

**Mots clés** : fertilisation organique, oxyde nitreux, dénitrification, communautés dénitrifiantes, matière organique dissoute.