



**UNIVERSITE DE BOURGOGNE
UFR DES SCIENCES DE LA TERRE**

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BOURGOGNE

Discipline : **SCIENCES DE LA TERRE**

présentée et soutenue publiquement
par

FRANCIS GARRIDO

le 08 décembre 2000

**Les mécanismes de production d'oxydes d'azote gazeux
(N₂O et NO) par les sols en conditions aérées**

Composition du jury :

Francis ANDREUX	(Professeur, Université de Bourgogne, Dijon)	Examineur
Oswald VAN CLEEMPUT	(Professeur, Université de Ghent, Belgique)	Rapporteur
Pierre CELLIER	(Directeur de recherche, INRA, Grignon)	Rapporteur
Bernard NICOLARDOT	(Directeur de recherche, INRA, Reims)	Examineur
Olivier THEOBALD	(Ingénieur, ADEME, Angers)	Examineur
Jean-Claude GERMON	(Directeur de recherche, INRA, Dijon)	Examineur
Catherine HENAULT	(Chargée de recherche, INRA, Dijon)	Examineur

Thèse co-financée par :



REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Microbiologie des Sols de l'INRA-CMSE de Dijon dirigé par Monsieur Catroux. Il a été co-financé par l'ADEME et le Conseil Régional de Bourgogne.

J'adresse mes remerciements à Monsieur Andreux, directeur de cette thèse, pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail.

J'adresse mes remerciements à Monsieur Germon, co-directeur de cette thèse, pour m'avoir accueilli dans son équipe de recherches à plusieurs reprises au cours de ma formation. Je lui suis également reconnaissant pour son aide scientifique, technique et pour la confiance qu'il a su m'accorder tout au long de ce travail.

J'exprime tout particulièrement ma reconnaissance à Catherine Hénault pour m'avoir confié ces recherches et pour avoir accepté de les diriger. Je remercie Catherine pour son encadrement, ses conseils, sa grande disponibilité et son aide précieuse qui m'ont permis de mener à terme ce travail dans les meilleures conditions possibles.

Je remercie Messieurs Van Cleemput et Cellier pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse et d'avoir consacré de leur temps pour juger ce travail.

Je remercie Messieurs Nicolardot et Théobald pour avoir accepté de faire partie du jury de cette thèse. Je les remercie, ainsi que Madame Patureau, pour avoir participé aux différents Comités de Pilotage de cette thèse et pour l'ensemble des discussions que nous avons eues.

J'adresse mes remerciements aux différentes personnes qui ont contribué aux choix et à la gestion des sites à partir desquels cette étude a été menée. Ils s'adressent à Monsieur Pierre Cellier, Madame Patricia Laville et leur équipe de l'INRA de Grignon, à Messieurs Bernard Nicoullaud, Ary Bruand et leur équipe de l'INRA d'Orléans, à Monsieur Lucas du CETIOM et à Monsieur Justes et son équipe de l'INRA de Reims.

Je remercie aussi Yves Couton et Christine Devroe pour avoir toujours accepté de m'aider quand il le fallait tout au long de ce travail.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance toute particulière à Sébastien Pérez qui a été d'une aide précieuse pour le bon déroulement de mes travaux expérimentaux.

Ma reconnaissance s'adresse également à Laurent Philippot et Dominique Chêneby pour leur aide scientifique et technique ainsi que pour leur soutien moral.

Mes remerciements s'adresse aussi à l'ensemble du personnel du Laboratoire de Microbiologie des Sols pour sa sympathique collaboration durant ce travail.

Merci à Sandrine et Jérôme, Séverine et Olivier, Denis et Laurence, Bruno et..., Laurent et Catherine, Clarisse et Stéphane, Sophie et Jacques, Sophie V., Manu et Myriam, Xavier et à tous ceux avec qui j'ai partagé de très longues soirées et de très grands moments de détente tout au long de ces années d'études. Merci aussi aux « Copains d'Abord », mes amis musiciens.

Enfin, je remercie ma famille pour m'avoir permis d'arriver jusque là. Et, un grand merci à Annick pour son aide précieuse, son grand réconfort moral et pour m'avoir supporté dans ces derniers moments relativement agités.

Titre : Les mécanismes de production d'oxydes d'azote gazeux (N₂O et NO) par les sols en conditions aérées

Résumé

Le protoxyde d'azote (N₂O) contribue à l'effet de serre et à la dégradation de l'ozone stratosphérique ; l'oxyde nitrique (NO) est impliqué dans la production d'ozone troposphérique et les dépôts acides. Les sols, et plus particulièrement les sols cultivés, sont une source importante de ces émissions. La production de N₂O résulte essentiellement de deux processus microbiens : la dénitrification qui est considérée comme la principale source de N₂O dans les sols et la nitrification dont l'implication dans les émissions de N₂O n'est pas encore réellement quantifiée. Concernant les émissions de NO par les sols, très peu de données quantitatives et qualitatives sont disponibles actuellement.

Au cours de ce travail, nous avons mis en évidence que les émissions de N₂O et de NO peuvent se produire à partir d'un rendosol, d'un calcisol, d'un néoluvisol et de deux luvisols fortement enrichis en ammonium et placés en conditions d'aérobiose. L'utilisation de la technique d'inhibition sélective par l'acétylène, qui a été préalablement calibrée, a permis de montrer que, dans ces conditions expérimentales, la nitrification est le seul processus impliqué dans la production de NO et le principal mécanisme dans la production de N₂O. Une dénitrification aérobie qui produit N₂O a été observée sur un des luvisols. La part d'azote nitrifié émis sous forme N₂O et NO a été respectivement estimée entre 0.03 et 1 % et entre 0 et 2.5 % en fonction du sol étudié et de son état hydrique.

Title : Mechanisms of gaseous nitrogen oxide production (N₂O and NO) by soils in aerobic conditions

Abstract

Nitrous oxide (N₂O) and nitric oxide (NO) are gases involved in the greenhouse effect, in the ozone chemistry of high and low atmospheres and in acid deposits. Soils, particularly cultivated ones, are the main source of these emissions. The N₂O production is due to microbial processes: denitrification is considered as the major source of soil N₂O and nitrification is thought to be a minor source of N₂O although its implication has not yet been quantified. Very few quantitative and qualitative data concerning NO emissions by soils are available at the present time.

Our works show that N₂O and NO can be produced by a rendosol, a calcisol, a neoluvisol and 2 luvisols in aerobic conditions. Use of the selective inhibition with acetylene technique, calibrated under our experimental conditions, showed that nitrification was the only process involved in NO production and the main process involved in N₂O production. One of the luvisols was observed to produce N₂O by aerobic denitrification. The estimated proportion of nitrified nitrogen produced as N₂O and NO was between 0.02 and 1 % and between 0 and 2.5 % respectively depending on the soil in question and its hydric status.

Discipline: Sciences de la Terre

Mots clés: protoxyde d'azote - oxyde nitrique – nitrification – dénitrification aérobie – sols – acétylène – faibles potentiels hydriques

Francis GARRIDO

Laboratoire de Microbiologie des Sols
INRA – CMSE
17, rue Sully
BP 86510
21065 Dijon Cedex

Université de Bourgogne
UFR Sciences de la Terre
6, Bd Gabriel
21000 Dijon

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE 1	
Synthèse bibliographique	4
1. Introduction.....	4
2. La pollution atmosphérique.....	5
2.1 L'ATMOSPHÈRE: STRUCTURE ET COMPOSITION CHIMIQUE DE L'ATMOSPHÈRE	5
2.1.1 <i>Structure verticale de l'atmosphère.....</i>	5
2.1.2 <i>Composition chimique de la troposphère</i>	6
2.2 DÉFINITION DES PRINCIPALES POLLUTIONS ATMOSPHÉRIQUES	7
2.2.1 <i>Les dépôts acides.....</i>	7
2.2.2 <i>L'effet de serre.....</i>	7
2.2.3 <i>L'ozone en basse atmosphère</i>	8
2.3 RÔLE DES GAZ TRACES DANS LA CHIMIE DE L'ATMOSPHÈRE	8
2.3.1 <i>Effet radiatif des gaz traces</i>	9
2.3.2 <i>Rôle des oxydes d'azote sur la chimie de l'atmosphère.....</i>	9
3. Sources et puits des oxydes d'azote (N₂O et NO)	11
3.1 N ₂ O.....	11
3.2 NO _x	12
4. Processus majeurs impliqués dans la production et la consommation de N₂O et NO dans les sols.....	13
4.1 LA DÉNITRIFICATION	13
4.1.1 <i>Définition.....</i>	13
4.1.2 <i>Les micro-organismes dénitrifiants</i>	14
4.1.3 <i>Les enzymes de la dénitrification.....</i>	15
4.1.4 <i>Les gènes de la dénitrification.....</i>	17
4.1.5 <i>Les émissions de NO et de N₂O au cours de la dénitrification dans les sols</i>	18
4.2 LA NITRIFICATION	19
4.2.1 <i>Définition.....</i>	19
4.2.2 <i>Les micro-organismes nitrifiants</i>	22
4.2.3 <i>Les enzymes de la nitrification.....</i>	23
4.2.4 <i>Les gènes de la nitrification.....</i>	27
4.2.5 <i>Les hypothèses de formation de N₂O et de NO liées à la nitrification.....</i>	29
4.3 LES AUTRES MÉCANISMES BIOLOGIQUES.....	31
5. la regulation des émissions de N₂O et de NO dans les sols	32
5.1 LE CONTENU EN EAU DU SOL ET L'AÉRATION DU SOL.....	33
5.2 LA DISPONIBILITÉ EN AZOTE.....	34
5.3 LA DISPONIBILITÉ EN CARBONE ET MATIÈRE ORGANIQUE	34
5.4 LE pH	35
5.5 LA TEMPÉRATURE	35
5.6 LES PRATIQUES CULTURALES.....	36
6. Méthodes de mesure et d'études des émissions de N₂O.....	38
6.1 MÉTHODES DE MESURES DES ÉMISSIONS DE N ₂ O ET DE NO	38
6.1.1 <i>Dispositifs expérimentaux permettant de mesurer les émissions de N₂O et de NO</i>	38
6.1.2 <i>Dosage des gaz émis.....</i>	38
6.2 ETUDES DES SOURCES D'ÉMISSIONS DE N ₂ O ET DE NO	39
6.2.1 <i>Inhibition sélective des mécanismes sources</i>	39
6.2.2 <i>Suivi des activités de nitrification et dénitrification</i>	41
7. Quantification et modélisation des émissions	42
7.1 ESTIMATIONS DES ÉMISSIONS DE N ₂ O À L'ÉCHELLE DE LA PARCELLE CULTIVÉE ET/OU RÉGIONALE	42
7.2 ESTIMATIONS DES ÉMISSIONS DE N ₂ O PAR LES SOLS À L'ÉCHELLE D'UN PAYS.....	43

7.3	ESTIMATIONS DES ÉMISSIONS DE N ₂ O PAR LES SOLS À L'ÉCHELLE PLANÉTAIRE	44
7.4	LES MODÈLES D'ÉMISSIONS DE NO PAR LES SOLS :	45
8.	Conclusion	45
	Références bibliographiques	47

CHAPITRE 2

Inhibitory capacities of acetylene on nitrification in two agricultural soils	62
<small>(Soil Biology and Biochemistry, Octobre 2000, 32, 1799-1802)</small>	

Abstract.....	62
Short communication.....	63
References.....	68

CHAPITRE 3

N₂O and NO emissions by agricultural soils with low hydric potentials	70
<small>(Soil Biology and Biochemistry, article soumis en octobre 2000)</small>	

Abstract.....	70
Introduction.....	71
Materials and methods	72
Results	76
Discussion.....	87
References.....	94

CHAPITRE 4

Contribution de processus chimiques à la production de N₂O par les sols à faibles potentiels hydriques	99
--	-----------

Introduction.....	99
Matériels et méthodes.....	101
Résultats et discussion	103
Références.....	114

CHAPITRE 5

Discussion générale	117
----------------------------------	------------

1. La démarche expérimentale.....	117
2. Les émissions de N₂O et de NO par les sols en conditions aérées.....	119

3. Implication de la nitrification dans la production de N₂O et de NO par les sols ...	119
4. Extrapolation de nos résultats à l'échelle de la parcelle.....	120
CONCLUSION	123
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES DU MANUSCRIT	125

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1

Fig. 1 : Profil de l'évolution des températures et des pressions dans l'atmosphère terrestre.....	5
Fig. 2 : Evolution de la pression atmosphérique dans l'atmosphère terrestre. Mesures réalisées le 20 novembre 1985 par une sonde LIDAR positionnée dans un avion de la NASA à 2790m d'altitude (Schlesinger, 1991).	6
Fig. 3 : Bilan énergétique moyen de la Terre	8
Fig. 4 : Spectre d'absorption des infrarouges pour différents gaz (Arya, 1988).....	9
Fig. 5 : Représentation schématique des différentes sous-unités de la nitrate réductase membranaire NAR A ou Nar GHI d'E. Coli (Philippot et Hojberg, 1999).....	16
Fig. 6 : Le transfert des électrons au cours de la nitrification chez <i>Nitrosomonas europaea</i> (Wehrfritz et al., 1993).....	21
Fig. 7 : Cycle catalytique de la tyrosinase adapté au cas de l'AMO.....	24
Fig. 8 : Représentation schématique de l'organisation structurale tridimensionnelle de l'HAO: a et b sont deux modèles possibles de l'arrangement des sous-unités (Hoppert et al., 1995).	25
Fig. 9 : Organisation des gènes <i>amo</i> codant pour l'AMO chez <i>Nitrosomonas europaea</i> et <i>Nitrospira Sp NpAV</i>	27
Fig. 10 : Structure du gène codant pour l'HAO.....	28
Fig. 11 : Schématisation de l'opéron <i>nor</i> purifié chez <i>Nitrobacter hamburgensis</i> X14.	28
Fig. 12 : Représentation schématique des différentes hypothèses d'émissions de N ₂ O par nitrification d'après Bremner et Blackmer (1981).....	29
Fig. 13 : Représentation schématique des hypothèses de formation de N ₂ O et de NO au cours de la nitrification (Conrad, 1990).....	30
Fig. 14 : Hypothèses de formation de N ₂ O et NO au cours de la nitrification (Parton et al., 1996).....	30
Fig. 15 : Hypothèse de formation de NO et de N ₂ O à partir de la réduction des ions nitrites (NO ₂ ⁻) avec l'hydrazine (N ₂ H ₄) comme donneur d'électrons.	31
Fig. 16 : Corrélation entre les quantités d'azote minéralisé et les pertes en N ₂ O mesurées en laboratoire sur 10 sols de forêts de savane tropicale (Matson and Vitousek, 1987).....	31
Fig. 17 : Les facteurs de contrôle de la dénitrification dans les sols (Robertson, 1989).....	32
Fig. 18 : Les facteurs de contrôle de la nitrification dans les sols (Robertson, 1989)	32
Fig. 19 : Relations entre la part de la porosité du sol occupée par l'eau (PPOE), la nitrification, la respiration et la dénitrification (Linn et Doran, 1984).....	33
Fig. 20 : Régression linéaire entre les flux de NO et 1/T (Williams et al., 1987)	36
Fig. 21 : Emissions de N ₂ O en fonction des apports d'azote dans différentes expérimentations sur une année (sols non organiques, en cultures ou en prairies fauchées, recevant au plus 500 kg N ha ⁻¹ an ⁻¹) d'après Bouwman, 1996 in Germon et al 1999.	37

Fig. 22 : Résultats théoriques possibles des émissions de N ₂ O que l'on peut obtenir après traitement à l'acétylène.....	40
--	----

CHAPITRE 2

Fig. 1 : Hydric characterisation of the rendosol and the luvisol	63
Fig. 2 : Relationship between nitrification rates (Ni) and soil hydric potential (Ψ).....	65

CHAPITRE 3

Fig. 1 : Hydric characterisation of the soils.....	73
Fig. 2: Relationship between the N ₂ O emission rate and the soil hydric potential	77
Fig. 3: Relationship between the NO emission rate (NO) and the soil hydric potential (Ψ).....	79
Fig. 4: Relationship between the nitrification rate and the soil hydric potential	80
Fig. 5 : N ₂ O emissions of soil samples incubated at different soil hydric potentials in aerobiosis with nitrate and 10kPa of acetylene.....	82
Fig. 6: NO emissions by soil samples of hypercalcareous rendosol (Ψ= -4.21 MPa), redoxic luvisol A (Ψ= -0.84 MPa), redoxic luvisol B (Ψ= -0.17 MPa), pachic calcisol (Ψ= -2.32 MPa) and neoluvisol (Ψ= -2.56 MPa) after 48 hours of incubation in aerobiosis with ammonium and acetylene (0, 100 and 10000 Pa).....	84
Fig. 7: Relationship between the N ₂ O emission rate and the nitrification rate	86
Fig. 8: Relationship between the N ₂ O emission rate and the nitrification rate for the 3 soils from the Paris Basin for nitrification rates lower than 20 mg N kg ⁻¹ d ⁻¹	85
Fig. 9: Relationship between the NO emission rate (NO) and the nitrification rate (Ni)	88

CHAPITRE 4

Fig. 1: Production de CO ₂ par le rendosol (-3.00 MPa) enrichi en nitrites et incubé en conditions aérées et stériles en absence et en présence d'acétylène (100 Pa et 10 kPa)	105
Fig. 2: Production de CO ₂ par le rendosol après 9 jours d'incubation en conditions stériles après un apport d'eau.....	107
Fig. 3 : Emissions de N ₂ O par le rendosol et le luvisol incubés en conditions aérées stériles et non stériles avec apport d'ammonium, de nitrates ou de nitrites+nitrates en présence de différentes pressions partielles d'acétylène	108

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 1

Tab. 1 : Composition chimique de la troposphère (Schlesinger, 1991).....	6
Tab. 2 : Estimation des principales sources, des principaux puits et de l'accumulation atmosphérique de protoxyde d'azote à l'échelle planétaire en Tg (10 ⁶ t) d'azote par an (IPCC, 1995 in Germon et al., 1999).....	12
Tab. 3 : Estimation des principales sources et des principaux puits de NO _x à l'échelle planétaire en Tg (10 ⁶ t) d'azote par an (Logan, 1983).	13
Tab. 4 : Principaux genres de bactéries comprenant des espèces dénitrifiantes (Tiedje, 1988)	14
Tab. 5 : Liste des principaux nitrifiants autotrophes présents dans le sol (Schmidt and Belser, 1982; Bock et al., 1990)	23
Tab. 6 : Les différents substrats de l'AMO.	24
Tab. 7 : Les caractéristiques des différentes sous unités de la NOR chez <i>Nitrobacter hamburgensis</i> , <i>Nitrobacter winogradskyi</i> et <i>Nitrospira moscoviensis</i>	27
Tab. 8 : Proportion de l'azote épandu émis sous forme de N ₂ O en fonction de la forme de fertilisant apporté (d'après Bouwman, 1996).	37
Tab. 9 : Principaux modèles d'émission de N ₂ O recensés dans la littérature (d'après Renault, 1999).	42

CHAPITRE 2

Tab. 1 : Inhibition of nitrification by different acetylene partial pressures at low water potentials (Ψ) in the rendosol and in the luvisol	64
Tab. 2 : Nitrification vs. Hydric potentials at different acetylene partial pressures in the rendosol and the luvisol	65
Tab. 3 : Inhibiting effect of acetylene on nitrification in different soil types	66

CHAPITRE 3

Tab. 1 : N ₂ O emission rates and nitrification rates versus hydric potentials at different acetylene partial pressures in the five studied soils	83
Tab. 2 : Estimated percentage of nitrified nitrogen emitted as N ₂ O and NO in the five studied soils at different soil hydric potentials	93
Tab. 3 : Molar ratios of N-NO to N-N ₂ O emitted in laboratory and field studies	93

CHAPITRE 4

Tab. 1: Evolution des pools d'ammonium et de N_2O après 9 jours d'incubations réalisées en conditions stériles sur le rendosol (-3.00 MPa) 104

Tab. 2 : Evolution des pools d'azote minéral dans les échantillons de rendosol et de luvisol ayant incubés avec un apport de nitrates ou de nitrites+nitrates avec différentes pressions partielles en acétylène en conditions stériles ou non stériles 106

CHAPITRE 5

Tab. 1 : Estimations des flux de N_2O produits par nitrification. Le tableau contient les flux minimum et maximum journaliers ($g N ha^{-1} j^{-1}$) et les émissions totales estimées sur la période d'étude, novembre 98 à juin 99 ($g N-N_2O ha^{-1}$).. 122

**INTRODUCTION
GENERALE**

INTRODUCTION GENERALE

Une politique de production agricole intensive a été développée au lendemain de la seconde guerre mondiale pour satisfaire les besoins alimentaires du pays. Cette volonté de produire plus a ensuite fait place à une volonté de produire mieux dans le but de concilier les objectifs de productivité de l'agriculture avec ceux de qualité des produits et de respect de l'environnement. L'apport de fertilisants, de régulateurs de croissance, d'insecticides, d'herbicides et de fongicides au niveau d'une parcelle modifie les cycles biogéochimiques de certains éléments du sol et rompt divers équilibres environnementaux. Des répercussions peuvent avoir lieu à trois niveaux : le sol, l'eau et l'atmosphère. La perturbation des processus microbiologiques du sol liée à l'excédent d'intrants conduit au dysfonctionnement des cycles essentiels du carbone et de l'azote. Les répercussions que l'on peut observer actuellement sont les pollutions nitriques des nappes souterraines, l'acidification des sols, l'accumulation d'éléments indésirables comme les métaux lourds ou encore l'augmentation de gaz à effet de serre dans l'atmosphère. Cette dernière perturbation qui correspond à un changement de la composition chimique de l'air atmosphérique conduit à la modification du climat.

Après la prise de conscience des risques de changements climatiques qui peuvent résulter de l'accroissement des émissions de gaz à effet de serre d'origine anthropique, les Nations Unies ont adopté en 1992 une Convention Cadre sur les Changements Climatiques qui a été mise en application en 1994. Cette convention a pour but « de stabiliser les concentrations de gaz à effet de serre dans l'atmosphère à un niveau qui empêche toute perturbation anthropique dangereuse du système climatique ». Afin de répondre à ces objectifs, la France comme l'ensemble des pays industrialisés s'est engagée en 1997 au cours de la Conférence de Kyoto à ce que les moyennes d'émissions de ces gaz sur la période 2008-2012 soient ramenées à 95% du niveau des émissions de 1990. Mais, compte tenu de l'évolution des besoins de productivité et des équilibres mondiaux, et sur la base de comparaison de ces deux périodes, les pays de l'Union Européenne devront réduire leurs émissions de 8%, les Etats Unis de 7%, le Canada et le Japon de 6% (Riedacker, 1999).

Les principaux gaz naturellement présents dans l'atmosphère qui participent à l'effet de serre sont la vapeur d'eau (H_2O), le dioxyde de carbone (CO_2), le méthane (CH_4) et le protoxyde d'azote (N_2O). Des composés considérés comme des constituants mineurs de l'atmosphère tels que les oxydes nitriques ($NO_x = NO + NO_2$) qui ne sont pas des gaz à effet de serre, sont

cependant impliqués dans l'effet de serre par le biais de l'ozone troposphérique dont ils sont les précurseurs.

La transformation de l'azote dans les sols est la principale source d'émissions de N_2O et de NO_x . En effet, les pertes d'azote vers l'atmosphère ont été estimées en 1995 à 16 ± 4 Tg et selon l'IPCC, 65% des émissions de N_2O et entre 20 et 40% des émissions de NO_x sont issues du sol et notamment des sols cultivés. Le rôle du sol apparaît donc prépondérant mais les estimations sont fournies avec une très forte incertitude. Afin d'être en accord avec les engagements pris lors de la Conférence de Kyoto, il est essentiel de maîtriser voire diminuer ces émissions. Pour cela, il est nécessaire d'avoir une évaluation plus précise des différentes sources liées au sol et de connaître l'effet des facteurs du milieu, plus particulièrement ceux liés aux pratiques agricoles sur lesquelles il est possible d'intervenir (Germon et al., 1999).

La production de N_2O et de NO_x par les sols est essentiellement d'origine microbienne et résulte principalement de la dénitrification et de la nitrification. La dénitrification a été longtemps considérée comme le principal mécanisme, voire même le seul, producteur de N_2O . Peu de travaux ont été effectués dans des conditions défavorables à la dénitrification. Il existe donc un certain manque de connaissances sur l'importance et sur la régulation des émissions de N_2O dans ces conditions et sur l'implication de la nitrification dans la production de ce gaz par les sols. Toutefois, des mesures réalisées *in situ* par le Laboratoire de Microbiologie des Sols de l'INRA de Dijon sur deux sols cultivés du Nord Est de la France, ont montré la présence d'émissions de N_2O alors que les sols se trouvaient dans des conditions de faible humidité considérées comme non favorables aux processus de dénitrification et aux émissions de N_2O . Suite à ces travaux, les objectifs de notre travail ont été d'évaluer l'importance des émissions de N_2O dans ces conditions, de déterminer l'origine de ces émissions et de définir la contribution de la nitrification dans ces émissions. L'ensemble du travail a également porté sur les émissions de NO par les sols car actuellement ce composé n'est pas pris en considération dans les bilans environnementaux essentiellement à cause du manque de connaissances sur l'importance et la régulation de ces émissions par les sols.

Ce mémoire présente l'ensemble des résultats obtenus lors de cette étude, et il est structuré en cinq parties. Dans une première partie, une synthèse bibliographique a été réalisée. Un bilan des connaissances du fonctionnement de la nitrification y a particulièrement été approfondi et constitue l'originalité de ce travail. Dans une seconde partie, nous avons calibré dans nos

conditions expérimentales la technique d'inhibition sélective de la nitrification par l'acétylène, méthode utilisée pour identifier l'origine biologique des émissions de N_2O dans les sols (Klemetsson *et al.*, 1988). Au cours d'une troisième partie, nous avons étudié les potentialités de différents sols à émettre N_2O et NO en conditions aérées, défini l'origine de ces émissions en utilisant la technique par l'acétylène et évalué la contribution de la nitrification dans ces émissions. Pour conduire ce travail, la démarche expérimentale a consisté à se placer dans des conditions d'incubations favorables à l'activité nitrifiante et défavorable à l'activité dénitrifiante. Pour cela, les études ont été réalisées sur des agrégats de sol de petite taille (1 mm) fortement enrichi en ammonium. La faible taille des agrégats favorise la diffusion de l'oxygène inter et intra agrégat et limite la formation de microsites anaérobies dans les échantillons de sol. Dans une quatrième partie, nous avons étudié la contribution de processus chimiques à la production de N_2O par les sols en conditions aérées. L'objectif de cette partie a été de rechercher l'origine biologique et/ou chimique de la formation de N_2O par les sols en conditions de très faible teneur en eau. Au cours de ce travail, nous avons travaillé sur des échantillons de sol stérilisés et enrichis en azote minéral (NO_3^- et/ou NO_2^-). L'ensemble de ce travail de thèse est ensuite discuté dans une cinquième partie dans laquelle nous avons repositionné nos résultats dans un contexte d'étude plus large.

Les chapitres 2 et 3 sont présentés sous forme d'article et sont rédigés en anglais. L'étude présentée dans le chapitre 4 n'a pas atteint à ce jour un développement suffisant pour faire l'objet d'une publication.

CHAPITRE 1

Synthèse bibliographique

1. INTRODUCTION

Le protoxyde d'azote (N_2O) et l'oxyde nitrique (NO) sont des constituants mineurs naturels de l'atmosphère qui interviennent à la fois dans la chimie de l'ozone, dans les phénomènes de pluies acides, dans l'effet de serre et dans les changements climatiques. Une augmentation des concentrations atmosphériques de N_2O et de NO a été mesurée au cours des dernières décennies. Les sols seraient la source de 65 % des émissions de N_2O selon l'IPCC, dont un tiers proviendrait des sols cultivés, et de 20 à 40 % des émissions de NO_x selon les auteurs.

L'objectif de cette première partie est de positionner mon travail dans la thématique générale de recherches concernant les gaz à effet de serre d'origines agricoles. Pour cela, nous avons établi un bilan de connaissances sur les deux gaz qui font l'objet de notre étude, N_2O et NO. Après une présentation de la structure et la composition de l'atmosphère, nous rappellerons les différentes propriétés physiques et chimiques de ces composés gazeux afin de définir leur rôle et leur contribution dans les phénomènes de pollutions atmosphériques. Les principales sources et les principaux puits de N_2O et de NO seront ensuite analysés afin de démontrer que les sols sont une des sources importantes de ces émissions gazeuses. La dénitrification et la nitrification qui sont considérées comme les principaux mécanismes de production et de consommation de N_2O et de NO dans les sols seront présentées sous des aspects biochimiques, microbiologiques et génétiques. Une partie de cette synthèse est également consacrée à la régulation des émissions de N_2O et de NO dans les sols. Les principaux facteurs de régulation présentés sont la teneur en eau et l'aération du sol, la disponibilité en azote, le pH, la disponibilité en carbone et en matière organique ainsi que la température. Une partie sur les méthodes de mesures des gaz et sur les techniques utilisées pour l'étude des sources des émissions de N_2O et de NO par les sols sera également présentée. Enfin, un dernier paragraphe aura pour objet de rappeler les différents modèles d'émission de N_2O et de NO par les sols disponibles dans la littérature.

2. LA POLLUTION ATMOSPHERIQUE

2.1 L'atmosphère: structure et composition chimique de l'atmosphère

2.1.1 Structure verticale de l'atmosphère

La nomenclature de la structure verticale de l'atmosphère, recommandée par l'Union Internationale de Géodésie et de Géophysique à Helsinki en 1960 et par le Comité exécutif de l'Organisation météorologique mondiale de 1962 est basée sur la répartition de la pression et de la température avec l'altitude, ce qui permet de distinguer différentes couches dans l'atmosphère (fig. 1).

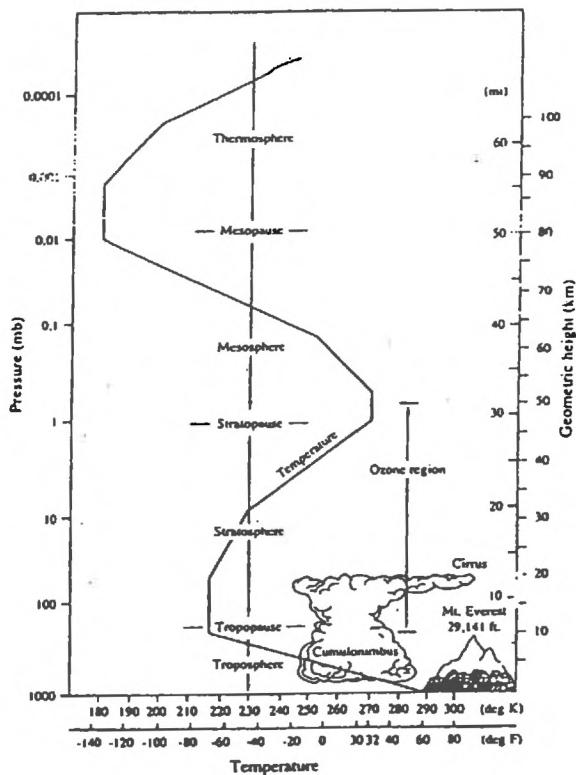


Fig. 1: Profil de l'évolution des températures et des pressions dans l'atmosphère terrestre (Schlesinger, 1991)

La couche la plus basse constitue la troposphère ; la température y décroît en moyenne jusqu'à un niveau appelé tropopause situé vers 10 km aux pôles et 16 km sous les tropiques, à partir duquel elle demeure constante, ou décroît très faiblement. Au delà de la tropopause s'étend la stratosphère, région où la température tout d'abord peu variable jusque vers 25-30 km augmente ensuite jusqu'à 50 km (stratopause). Ces deux premières couches sont le lieu d'échanges entre la Terre et l'atmosphère, échanges qui conditionnent la vie sur terre. Au delà de la stratopause s'étend la mésosphère, couche où la température décroît jusqu'à un minimum situé vers 80 km et correspondant à la mésopause.

Au delà de 80 km s'étend la thermosphère, dans laquelle la température croît constamment. Elle atteint 855 K à 200 km et 1000 K à 750 km. De 750 km à 2000 km se situe l'exosphère et au delà se prolonge la magnétosphère ou protosphère. Pour l'ensemble de ces couches la pression atmosphérique P diminue avec l'altitude H (Fig.2) selon la loi : $\log P = -0.06 H$, avec P exprimée en atmosphères et H en kilomètres (Schlesinger, 1991).

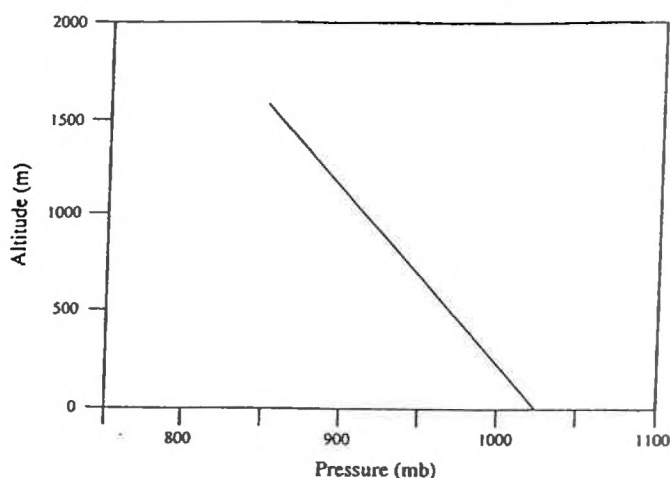


Fig. 2 : Evolution de la pression atmosphérique dans l'atmosphère terrestre. Mesures réalisées le 20 novembre 1985 par une sonde LIDAR positionnée dans un avion de la NASA à 2790 m d'altitude (Schlesinger, 1991).

2.1.2 Composition chimique de la troposphère

La troposphère constitue l'atmosphère terrestre proprement dite. Le tableau n°1 en présente les différents constituants. Elle est formée d'une fine couche de gaz constituée à l'état sec de trois composés majeurs (azote, 78 % ; oxygène, 21 % et argon, 1 %) et de gaz traces (dioxyde de carbone, 315 ppm ; méthane, 1.5 ppm ; protoxyde d'azote, 0.300 ppm ; autres oxydes d'azote, 0.001ppm et dioxyde de soufre, 0.2 ppb). La vapeur d'eau représente environ de 1 à 4 % de l'atmosphère en volume.

Constituant	Formule chimique	Poids moléculaire	pourcentage du volume d'air sec	Masse totale (g)
Atmosphère totale				$5.136 \cdot 10^{21}$
Vapeur d'eau	H ₂ O	18.01534	variable	$0.017 \cdot 10^{21}$
Air sec		28.9644	100	$5.119 \cdot 10^{21}$
Azote	N ₂	28.0134	78.084	$3.866 \cdot 10^{21}$
Oxygène	O ₂	31.9988	20.948	$1.185 \cdot 10^{21}$
Argon	Ar	39.9480	0.934	$6.59 \cdot 10^{19}$
Dioxyde de carbone	CO ₂	44.0099	0.0315	$2.45 \cdot 10^{18}$
Néon	Ne	20.1830	$1.818 \cdot 10^{-3}$	$6.48 \cdot 10^{16}$
Hélium	He	4.0026	$5.24 \cdot 10^{-4}$	$3.71 \cdot 10^{15}$
Méthane	CH ₄	16.0430	$1.5 \cdot 10^{-4}$	$4.3 \cdot 10^{15}$
Hydrogène	H	2.0159	$5 \cdot 10^{-5}$	$1.8 \cdot 10^{14}$
Oxyde nitreux	N ₂ O	44.0128	$3 \cdot 10^{-5}$	2.310^{15}
Monoxyde de carbone	CO	28.0106	$1.2 \cdot 10^{-5}$	$5.9 \cdot 10^{14}$
Ammoniaque	NH ₃	17.0306	$1 \cdot 10^{-6}$	$3 \cdot 10^{13}$
Dioxyde d'azote	NO ₂	46.0055	$1 \cdot 10^{-7}$	$8.1 \cdot 10^{12}$
Dioxyde de soufre	SO ₂	64.0630	$2 \cdot 10^{-8}$	$2.3 \cdot 10^{12}$
Sulfure d'hydrogène	H ₂ S	34.080	$2 \cdot 10^{-8}$	$1.2 \cdot 10^{12}$
Ozone	O ₃	47.9982	variable	$3.3 \cdot 10^{15}$

Tab. 1 : Composition chimique de la troposphère (Schlesinger, 1991)

2.2 Définition des principales pollutions atmosphériques

2.2.1 Les dépôts acides

Les dépôts acides correspondent principalement à l'entraînement de l'atmosphère vers la surface de la Terre d'acide nitrique (HNO_3) et d'acide sulfurique (H_2SO_4) soit par les pluies acides (ces deux composés sont alors dissous dans les gouttes d'eau), soit par dépôts secs, c'est-à-dire par simple contact entre les gaz et le sol ou par l'intermédiaire de particules solides. Les acides nitrique et sulfurique sont formés à partir des oxydes d'azote et du dioxyde de soufre principalement issus de la combustion des carburants fossiles qui se combinent à des radicaux hydroxyl ($\text{OH}\cdot$). Après leur formation, ils retombent généralement assez rapidement. Les dépôts acides sont donc des phénomènes plutôt régionaux. Ils sont impliqués dans l'acidification des lacs, dans le dépérissement des forêts et dans la dégradation des équipements extérieurs.

2.2.2 L'effet de serre

L'effet de serre a été défini pour la première fois avec précision par Arrhénius, il y a plus d'un siècle. Depuis, il a été étudié et décrit par de nombreux auteurs.

Le rayonnement provenant du soleil (qui rayonne comme un corps noir à 5700 K) atteint la terre avec une intensité moyenne de 240 Wm^{-2} . Il est composé de radiations de faibles longueurs d'onde (Fig.3). La Terre qui présente une température moyenne d'environ 300 K entretient avec le soleil un équilibre radiatif dans lequel un premier effet de serre « naturel » intervient de façon importante. La totalité de l'énergie solaire reçue dans l'ultraviolet, le visible et le proche infrarouge (0.2 à 4 μm) est réémise vers l'espace sous forme d'infrarouges dits thermiques (autour d'une longueur d'onde de 12 μm) avec une intensité de 240 Wm^{-2} . Alors que l'atmosphère est quasi transparente au rayonnement solaire direct, une part importante du rayonnement infrarouge réémis par le sol est absorbé par certains constituants atmosphériques mineurs (les gaz traces). Ce rayonnement ainsi piégé réchauffe la basse atmosphère : c'est l'effet de serre dans lequel la vapeur d'eau contribuerait pour plus de 60 %. Cet effet est loin d'être négligeable. En l'absence de nuages et des gaz traces la température moyenne de la terre serait d'environ 33°C inférieure à sa valeur actuelle, imposant un climat très différent et difficilement viable. Un changement dans l'intensité du rayonnement du soleil ou des réémissions infrarouges de la Terre ainsi qu'un changement des capacités de l'atmosphère à absorber le rayonnement infra-rouge constituent un forçage

radiatif. Par exemple, un doublement de la teneur en CO_2 atmosphérique entraînerait un forçage radiatif de 4 W m^{-2} . Pour respecter l'équilibre énergétique, la température de la Terre devrait augmenter de quelques degrés pour maintenir l'intensité du rayonnement de sortie à 240 W m^{-2}

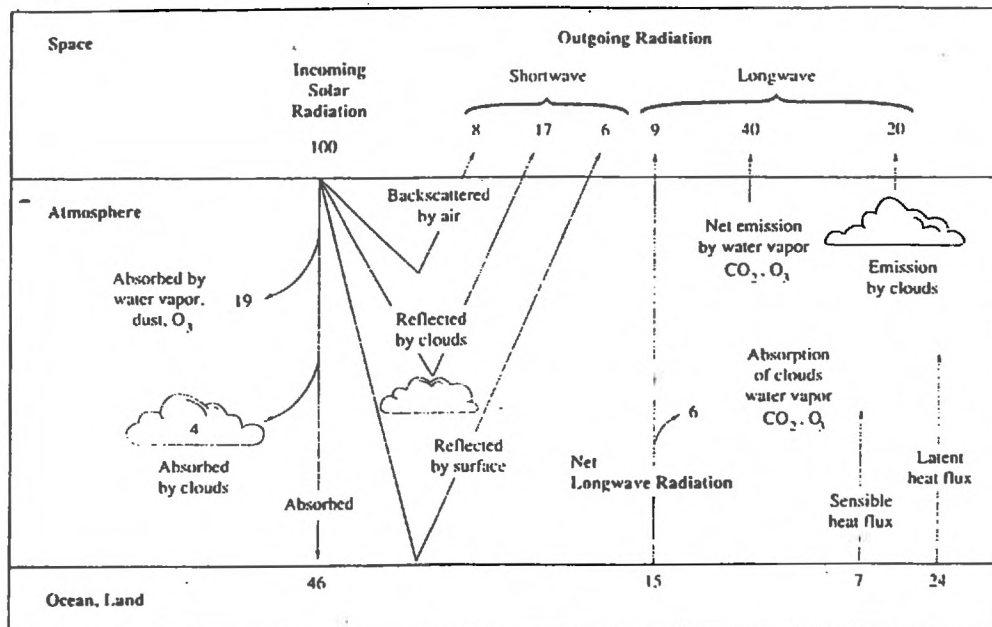


Fig. 3 : Bilan énergétique moyen de la Terre (Berger, 1992)

2.2.3 L'ozone en basse atmosphère

L'ozone ou trioxygène (O_3) est le composant le plus paradoxal de l'atmosphère terrestre. Ce gaz est à la fois indispensable et néfaste pour le maintien de la vie sur Terre. En effet, l'ozone situé dans la stratosphère filtre les rayonnements ultraviolets de longueur d'onde inférieure à 290 nm mortels pour la plupart des formes de vie, alors que l'ozone situé dans la troposphère agresse les espèces vivantes car il irrite les muqueuses et nécrose les tissus végétaux. Par conséquent, il est nécessaire de contrôler les processus impliqués dans la diminution de l'ozone stratosphérique et dans l'augmentation de l'ozone troposphérique, phénomènes qui ne cessent de s'accroître actuellement.

2.3 Rôle des gaz traces dans la chimie de l'atmosphère

Plusieurs caractéristiques des gaz traces sont à prendre en compte pour évaluer leur impact vis à vis de la pollution atmosphérique, dont leurs propriétés physico-chimiques (réactivité avec les autres composés atmosphériques, pouvoir d'absorption des rayonnements), leurs concentrations, leur temps de séjour et leur cinétique de dégradation dans l'atmosphère.

2.3.1 Effet radiatif des gaz traces

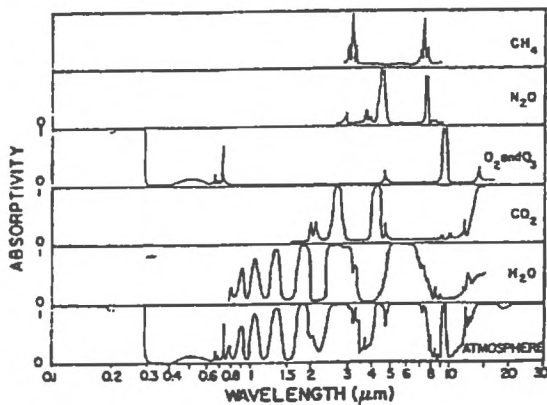


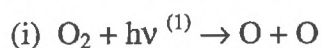
Fig. 4 : Spectre d'absorption des infrarouges pour différents gaz (Arya, 1988)

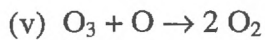
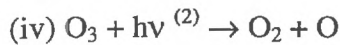
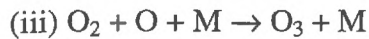
La majorité des constituants atmosphériques absorbent les radiations infrarouges émises par le sol. L'oxygène (O_2) l'ozone (O_3) et la vapeur d'eau (H_2O) sont les principaux constituants qui contribuent à l'effet de serre naturel. Mais les gaz traces atmosphériques qui absorbent ces infrarouges dans un spectre d'absorption en dehors de celui des principaux constituants ont également un impact dans le réchauffement global de l'atmosphère (Fig.4).

Selon le rapport de l'IPCC (1996), entre 50 à 60 % de l'effet de serre additionnel est dû au dioxyde de carbone. Sa longue durée de vie (de 50 à 200 ans), son augmentation annuelle (0.4 %) et sa capacité de piégeage des radiations infrarouges en font un acteur fondamental de l'accentuation de l'effet de serre. La seconde partie de l'effet de serre additionnel est due à d'autres gaz traces tels que le méthane (19 %), les CFC (17 %), l'ozone (8 %), le protoxyde d'azote (4 %) et la vapeur d'eau (2%) (Dunglas, 1993). Calculée sur une base molaire et sur une période de 100 ans, le méthane et le protoxyde d'azote ont respectivement une efficacité de piégeage des radiations infrarouges émises par la Terre 21 et 200 fois supérieure à celle du dioxyde de carbone.

2.3.2 Rôle des oxydes d'azote sur la chimie de l'atmosphère

Depuis plus d'un siècle nous savons que l'air pur et sec soumis à une décharge électrique produit de l'ozone par dissociation de l'oxygène. Dans l'atmosphère, le même phénomène apparaît sous l'effet du rayonnement ultraviolet solaire. Différentes réactions se succèdent : (i) la photodissociation de l'oxygène, (ii) la reformation possible de l'oxygène à haute altitude (70 km), (iii) la formation de l'ozone, (iv) la photodissociation de l'ozone et enfin (v) la réaction de l'ozone et du mono-oxygène (Williams et al., 1992) :

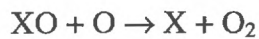
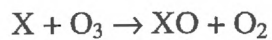




Avec (1) : $h\nu < 240 \text{ nm}$; (2) : $h\nu < 305 \text{ nm}$.

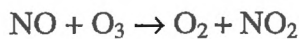
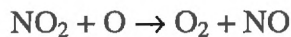
Dans ces équations, M correspond à la particule N_2 ou O_2 donnant lieu à une collision triple requise pour capter l'énergie de dissociation de la molécule formée. Le maximum de photodissociation de l'atmosphère apparaît dans la stratosphère et conduit à un maximum de l'ozone dans cette région vers 25 km d'altitude.

L'ozone peut être réduit par l'action d'un cycle catalytique du type suivant :



X désigne un atome ou une molécule comme l'hydrogène, le monoxyde d'azote, des radicaux hydroxyle ou perhydroxyle ou des atomes halogénés. L'élément chimique X est toujours restitué par la réaction de son oxyde avec l'atome d'oxygène. X est donc un catalyseur de la réaction de destruction de l'ozone et permet de réaliser un cycle permanent de cette destruction.

L'importance des oxydes d'azote (NO_x) se manifeste par le cycle catalytique entre le monoxyde NO et le dioxyde NO_2 :



70 % de la destruction de l'ozone seraient catalysés par ces oxydes d'azote. La concentration de NO et de NO_2 dans la stratosphère résulte soit de rejet direct dans l'atmosphère (avions, explosions nucléaires...) soit d'une production continue à partir du protoxyde d'azote (N_2O) selon la réaction suivante (Wingen and Finlayson-Pitts, 1998) :



Une des réactions de destruction des oxydes d'azote conduit à la formation d'acide nitrique (Williams et al., 1992) :



La molécule d'acide nitrique subit diverses réactions dont la photodissociation ; elle subsiste néanmoins et devient le composé oxygéné de l'azote le plus important dans la stratosphère. L'acide nitrique traverse la tropopause et passe dans la troposphère où il disparaît rapidement car il est soluble dans l'eau et participe ainsi au phénomène des pluies acides (Crutzen, 1979).

3. SOURCES ET PUIXS DES OXYDES D'AZOTE (N₂O ET NO)

Les oxydes d'azote présents dans l'atmosphère sont émis par des sources naturelles et des sources anthropogéniques. La quantité de chaque gaz dans l'atmosphère résulte de la différence entre les quantités produites (les sources) et les quantités consommées (les puits).

3.1 N₂O

D'après l'évolution de la composition de l'atmosphère, l'accumulation atmosphérique du protoxyde d'azote s'élève à environ 4 Tg N an⁻¹ (IPCC, 1995). L'évolution actuelle de la concentration en N₂O de l'atmosphère est estimée à 0.8 ppbv an⁻¹ soit 0.25 % par an.

L'IPCC a publié en 1995 l'état des connaissances des sources et des puits terrestres aquatiques et atmosphériques. Ces données demeurent relativement imprécises (Tab.2). La production annuelle de N₂O peut être estimée à 14.7 Tg N. Les estimations actuelles proposent que près de 65 % des émissions (soit 9.5 Tg N) sont issues du sol, dont 1/3 (3.5 Tg N an⁻¹) proviendrait des sols cultivés. Environ 20 % (3 Tg N an⁻¹) des émissions totales de N₂O proviennent des océans, 3 % (0.4 Tg N an⁻¹) seraient produits par les animaux et l'élevage, 3 % (0.5 Tg N an⁻¹) seraient émis au cours de brûlage de la biomasse et environ 9 % (1.3 Tg N an⁻¹) proviendraient des rejets industriels lors de la fabrication de produits chimiques tels que l'acide nitrique ou les engrais.

D'autres sources mineures sont également connues incluant les milieux d'eau douce, les eaux des zones littorales, la production et l'utilisation des explosifs, l'utilisation médicale et industrielle de N₂O, et son utilisation comme gaz propulseur pour les aérosols (Granli and Bockman, 1994 ; Bouwman, 1995).

Le principal puits de N₂O est sa destruction chimique dans la stratosphère (Tab2). Environ 12 Tg N-N₂O sont décomposés annuellement dans la stratosphère. Cependant d'autres puits dont l'importance n'a pas été évaluée pourraient exister. Par exemple, les sols et les systèmes aquatiques en conditions réductrices pourraient constituer des milieux consommateurs de ce gaz (Bouwman, 1995). Le N₂O peut également être absorbé par la végétation comme source d'azote ; ceci a été montré sur une culture de maïs (Grundman et al., 1993).

	Intervalle de l'estimation	Valeur vraisemblable
<i>Fonctions sources estimées</i>		
- Sources naturelles		
Océans	1-5	3
Sols tropicaux		
Forêts humides	2.2-3.7	3
Savanes sèches	0.5-2.0	1
Sols tempérés		
Forêts	0.1-2.0	1
Prairies	0.5-2.0	1
- Sources anthropiques		
Sols cultivés	1.8-5.3	3.5
Brûlage de la biomasse	0.2-1.0	0.5
Sources industrielles	0.7-1.8	1.3
Animaux d'élevages	0.2-0.5	0.4
<i>Total des sources estimées</i>	<i>10-17</i>	<i>14.7</i>
<i>Fonctions puits estimées</i>		
Absorption par les sols	?	?
Décomposition stratosphérique	9-16	12.3
<i>Total des puits estimés</i>	<i>9-16</i>	<i>12.3</i>
<i>Evaluation de l'accumulation atmosphérique</i>	<i>3.1-4.7</i>	<i>3.9</i>

Tab. 2 : Estimation des principales sources, des principaux puits et de l'accumulation atmosphérique de protoxyde d'azote à l'échelle planétaire en Tg (10^6 t) d'azote par an (IPCC, 1995 in Germon et al., 1999).

3.2 NO_x

Pour les émissions de NO_x, cinq sources naturelles ont été identifiées : les éclairs, les processus microbiens du sol, l'oxydation atmosphérique de NH₃, l'injection stratosphérique et les processus photolytiques à la surface des océans (Tab.3). Les émissions à l'échelle planétaire ont été estimées à 50 ± 25 Tg N an⁻¹ par Logan (1983) puis à 60 Tg N an⁻¹ par Conrad (1990) et Davidson (1991). D'après une synthèse de Davidson and Kinglerlee (1997), 5.4 Tg N-NO_x sont produits chaque année par les sols agricoles, ce qui correspond à environ 7 % de la quantité d'azote utilisé comme fertilisant à l'échelle de la planète.

Les principaux puits de NO_x sont les dépôts secs et humides qui correspondent respectivement à 16 et 27 Tg N an⁻¹ (Logan, 1983). Les dépôts se font essentiellement sous forme d'acide nitrique, et de nitrate particulaire, ce qui participe à la formation des pluies acides. L'adsorption de NO_x à la surface des plantes de la canopée pourrait également contribuer à la réduction des émissions de NO_x de 8 Tg N par an (Davidson et Kinglerlee, 1997).

	Intervalle de l'estimation	Valeur vraisemblable
<i>Fonctions sources estimées</i>		
- Sources naturelles		
Activités microbiennes du sol	4-16	8
Oxydation de NH ₃	1-10	?
Processus photolytique et biologique dans les océans		<1
Stratosphère		0.5
- Sources anthropiques		
combustibles fossiles	14-28	21
combustion de la biomasse	4-24	12
<i>Total des sources estimées</i>	25-99	48.4
<i>Fonctions puits estimés</i>		
Précipitations	12-42	27
Dépôts secs	12-22	16
<i>Total des puits estimés</i>	24-64	43

Tab. 3 : Estimation des principales sources et des principaux puits de NO_x à l'échelle planétaire en Tg (10⁶t) d'azote par an (Logan, 1983).

4. PROCESSUS MAJEURS IMPLIQUES DANS LA PRODUCTION ET LA CONSOMMATION DE N₂O ET NO DANS LES SOLS

Des processus biotiques et abiotiques sont impliqués dans la production de NO et de N₂O dans les sols. La dénitrification et la nitrification sont les principaux processus biologiques impliqués et sont réalisés, chacun, par des groupes fonctionnels spécifiques de la microflore du sol.

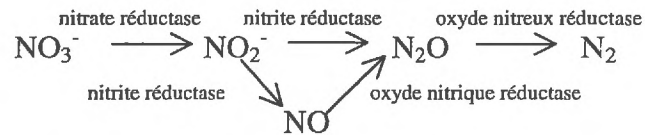
4.1 La dénitrification

4.1.1 Définition

La dénitrification est un processus respiratoire microbien au cours duquel des micro-organismes sont capables de substituer à l'oxygène des formes oxydées de l'azote comme accepteur terminal d'électrons dans leur chaîne respiratoire. Le mécanisme de base qui produit l'ATP au cours de la dénitrification est le même que celui de la respiration aérobie, mais ses accepteurs terminaux d'électrons sont des agents oxydants moins puissants que l'oxygène (Stouthamer, 1988).

Les oxydes d'azote solubles, nitrates (NO₃⁻) ou nitrites (NO₂⁻), sont transformés en composés gazeux oxyde nitrique (NO), protoxyde d'azote (N₂O) et/ou azote moléculaire (N₂) selon la

chaîne de réactions suivante:



Ce processus fait intervenir des transporteurs d'électrons tels que NAD et FAD. C'est un processus dissimilatif et chaque étape de la dénitrification est catalysée par un système enzymatique différent. Bien que les composés azotés impliqués dans la chaîne de dénitrification soient bien identifiés le mécanisme exact de formation de la liaison N-N au cours de la réduction de NO_2^- en N_2O est une question qui reste encore posée.

4.1.2 Les micro-organismes dénitrifiants

Les bactéries dénitrifiantes au sens strict sont des bactéries qui possèdent la nitrite réductase, qui sont capables de réduire NO_3^- ou NO_2^- en N_2O et/ou N_2 et qui peuvent utiliser l'énergie libérée au cours de cette réduction pour se développer (Mahne and Tiedje, 1995). En culture, les bactéries sont considérées dénitrifiantes lorsque le taux de réduction du nitrate en azote gazeux est d'au moins 80 % (Tiedje, 1988).

ORGANOTROPES **Généralement aérobies**

Pseudomonas
Alcaligenes
Flavobacterium
Achromobacter
Paracoccus
Corynebacterium
Acinobacter
Cytophaga
Gluconobacter
Xanthomonas

Oligocarbohiles

Hyphomicrobium
Aquaspirillum

Fermentaires

Azospirillum
Chromobacterium
Bacillus
Wolinella

Halophiles

Halobacterium
Paracoccus

Thermophiles

Bacillus
Thermothrix

Sporulantes

Bacillus

Magnetotactiles

Aquaspirillum

Fixatrices d'azote

Rhizobium
Bradyrhizobium
Azospirillum
Pseudomonas
Agrobacterium

Association/animaux

Neisseria
Kingella
Moraxella
Wolinella

PHOTOTROPES

Rhodopseudomonas

LITHOTROPES

utilisent H_2

Alcaligenes
Bradyrhizobium
Paracoccus
Pseudomonas

utilisent S

Thiobacillus
Thiomicrospira
Thiosphaera
Thermothrix

utilise NH_4^+

Nitrosomonas

Tab. 4 : Principaux genres de bactéries comprenant des espèces dénitrifiantes (Tiedje, 1988)

Les micro-organismes dénitrifiants sont généralement aérobies ou anaérobies facultatifs. Ils se répartissent dans plus de dix familles bactériennes (Tab.4). D'après une étude de Gamble et al. (1977) réalisée sur 19 sols provenant d'écosystèmes variés, les genres les plus abondants sont représentés par *Pseudomonas* et *Alcaligenes*. Mais, plus récemment Chèneby et al. (2000) ont pu mettre en évidence sur trois sols agricoles que d'autres genres de bactéries dénitrifiantes sont présents dans le sol : *Burholderia*, *Ralstonia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Frateuria*, *Streptomyces* et *Bacillus*.

4.1.3 Les enzymes de la dénitrification

Chacune des étapes de la chaîne de dénitrification est catalysée par une enzyme spécifique. Toutefois, certaines bactéries dénitrifiantes ne possèdent pas la totalité des enzymes et dans ce cas elles ne peuvent réaliser qu'une seule partie de la chaîne de dénitrification. Par exemple, certaines bactéries ne possèdent pas de nitrate réductase (enzyme qui catalyse la réduction des nitrates en nitrites). Dans ce cas les nitrites sont le substrat de la dénitrification. Certaines bactéries ne possèdent pas de N_2O réductase (enzyme qui catalyse la réduction de N_2O en N_2) et le N_2O est le produit final de la dénitrification

La nitrate réductase

Plusieurs types de nitrate réductases ont été mises en évidence chez les bactéries. Elles diffèrent soit par leur localisation, soit par leur mode de régulation. On a pu ainsi mettre en évidence l'existence de deux nitrates réductases membranaires, NRA ou Nar GHI qui est inductible et NRZ ou Nar ZYV qui est constitutive, et une nitrate réductase périplasmique, NAP.

Les nitrates réductases NRA et NRZ sont chacune constituées de trois sous-unités (Fig.5) : α (104 à 150 kDa), qui catalyse la réduction du nitrate à l'aide d'un site actif à molybdène, β (43 à 63 kDa), qui permet la fixation de l'enzyme à la membrane et qui intervient dans le transfert des électrons entre les deux autres sous-unités et γ (19 à 21 kDa) qui intervient dans le transfert d'électrons (Philippot and Hojberg, 1999).

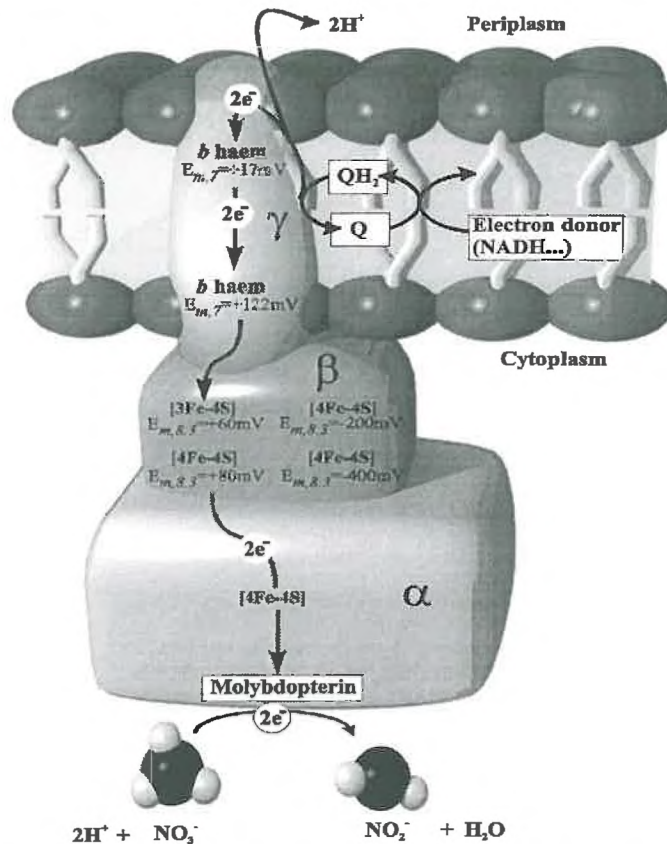


Fig. 5 : Représentation schématique des différentes sous-unités de la nitratre réductase membranaire NAR A ou Nar GHI d'E. Coli (Philippot and Hojberg, 1999).

La nitratre réductase périplasmique NAP est composée de deux sous unités : NAP A (83 à 93 kDa) qui catalyse la réduction du nitratre et NAP B (13 à 19 kDa) qui intervient dans le transfert des électrons.

La nitrite réductase

Cette enzyme catalyse la réduction de NO_2^- en NO et N_2O . Deux types de nitrite réductases peuvent être synthétisés par les bactéries dénitrifiantes, NiR *cdl* et NiR Cu qui diffèrent par leur structure. Ces deux types de nitrites réductases n'ont jamais été identifiés chez une même bactérie.

NiR *cdl* (90 à 140kDa) est composée de deux sous unités : une sous-unité contenant un hème à cytochrome *c* qui participe au transfert des électrons et une sous unité contenant un hème de type *dl* qui catalyse la réduction du nitrite (Fergusson, 1994).

Nir Cu (35 à 40 kDa) est une enzyme qui contient un centre cuivre Cu^{I} et/ou Cu^{II} . Dans la littérature, différentes compositions de l'enzyme sont proposées. Elle est composée soit d'une seule unité (Masuko et al., 1984), de deux (Zumft et al., 1987, Denariatz et al., 1991), de

trois (Abraham et al., 1993) ou de quatre sous-unités (Iwasaki and Matsubara, 1971).

L'oxyde nitrique réductase

L'existence de cette enzyme a fait l'objet de nombreuses discussions au sein de la communauté scientifique. Zumft et al. (1988) a mis en évidence son existence chez un mutant de *Pseudomonas stutzeri* incapable de synthétiser la nitrite réductase mais toujours capable de réduire l'oxyde nitrique. Depuis cette enzyme a été purifiée (Kastrau et al., 1994 ; Fujiwara and Fukumori, 1996). C'est une enzyme membranaire à cytochrome *bc* composée de deux sous-unités : une sous-unité de 37 à 53 kDa contenant deux hèmes de type *b*, et une sous-unité de 15 à 18 kDa contenant un hème de type *c*. Toutefois le mécanisme de réduction de NO en N₂O n'a toujours pas été élucidé.

L'oxyde nitreux réductase

Cette enzyme qui catalyse la réduction de N₂O en N₂ n'a pas encore été très bien localisée. Elle est soit périplasmique, soit associée à la surface de la membrane du côté du périplasma (Zumft and Walter, 1994). La N₂O réductase est de nature cuivrique. Elle se présente sous deux formes différentes en fonction de son nombre de sous-unités et de celui de ses atomes de cuivre (Zumft, 1997). Une forme monomérique (72 à 90 kDa) contenant 4 atomes de cuivre a été mise en évidence chez *Achromobacter cycloclates* (Hulse and Averill, 1990). Une forme dimérique (122 à 140 kDa) contenant huit atomes de cuivre a également été purifiée chez d'autres bactéries telle que *Pseudomonas stutzeri* (Coyle et al., 1985).

4.1.4 Les gènes de la dénitrification

L'organisation des gènes de la dénitrification codant pour les différentes enzymes décrites précédemment a été analysée chez plusieurs types de micro-organismes dénitrifiants tels que *Pseudomonas denitrificans*, *P. stutzeri*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* ou encore *Paracoccus denitrificans*.

Les gènes nar codant pour la(les) nitrate réductase(s)

Les gènes codant pour les deux nitrates réductases membranaires NAR A et NAR Z sont organisés en opérons *narGHJI* et *narZYVW* respectivement. Les sous-unités α , β et γ des enzymes NAR A et NAR Z sont respectivement codées par les gènes *narG*, *narH*, *narI* et

narZ, *narY*, *narV*. Les gènes *nar J* et *nar W* codent pour des protéines chaperons. En plus de ces opérons, des loci *chlC* et *chlZ* sont respectivement associés aux opérons *narGHJI* et *narZYVW* et participent à la régulation du processus de réduction du nitrate. Les deux sous unités NAPA et NAPB de la nitrate réductase périplasmique NAP sont respectivement codées par les gènes *napA* et *napB*. D'autres gènes *napC* et *napD* ont été identifiés sans connaître toutefois leur véritable fonction (Philippot et al., 1997).

Les gènes nir codant pour la nitrite réductase

Les nitrites réductases Nir *cdI* et Nir Cu sont respectivement codées par les gènes *nirS* et *nirU*. D'autres gènes à proximité de *nirS* ont été identifiés : *nirC*, *nirT*, *nirB* et *nirM* dont le produit est essentiel pour la biosynthèse de l'hème *dI* chez *Pseudomonas aeruginosa* (Kawasaki et al., 1997).

Les gènes nor codant pour l'oxyde nitrique réductase

La grosse et la petite sous-unité de l'oxyde nitrique réductase sont respectivement codées par les gènes *norB* et *norC*. L'activité de l'enzyme est sous le contrôle de l'activité des gènes *norQ* et *norD* situés en amont des gènes *norB* et *norD*.

Les gènes nos codant pour l'oxyde nitreux réductase

Les gènes *nosR*, *nosZ* et *nosDFY* sont 5 gènes qui sont impliqués dans la synthèse de la N₂O réductase (Zumft et al., 1990). *NosZ* est le gène de structure qui code pour la N₂O réductase périplasmique multicuivrique. Le gène *nosR* code pour une protéine qui active la transcription du gène *nosZ*. Les gènes *nosDFY* ont été identifiés comme gènes nécessaires pour l'incorporation du cuivre dans la N₂O réductase (Zumft et al., 1990, Zumft, 1997 ; Philippot et al., 2000).

4.1.5 Les émissions de NO et de N₂O au cours de la dénitrification dans les sols

Les quantités de N₂O et de NO produites au cours de la dénitrification dans les sols ne dépendent pas seulement des facteurs qui contrôlent l'intensité de l'activité dénitrifiante mais aussi des facteurs qui contrôlent le ratio des produits formés, par exemple N₂O/N₂ (Firestone and Davidson, 1989).

N₂ et N₂O sont classiquement considérés comme les produits finaux de la dénitrification. Le ratio N₂O/N₂ dépend principalement de la concentration en oxyde d'azote,

de la disponibilité en oxygène, de la disponibilité en carbone organique, de la diffusion des gaz dans le sol, du pH, de la température, de la concentration en sulfure, des activités enzymatiques et de l'activité dénitrifiante. La régulation imposée par la plupart de ces paramètres peut être expliquée par leur influence sur la disponibilité relative en élément oxydant par rapport aux éléments réducteurs. Quand le milieu est plutôt oxydant, les oxydes d'azote peuvent être incomplètement réduits et un important ratio N_2O/N_2 peut être observé (Tiedje, 1988). Dans un travail de synthèse, Pratt et al. (1977) avaient estimé, à partir d'une vingtaine d'expérimentations, le N_2O produit au cours de la dénitrification à 6-7 % de la quantité totale d'azote dénitrifié. Mais ce ratio peut s'écarter très nettement de cette valeur moyenne en fonction des conditions de milieu et peut varier de 0 à 100 % (Aulakh et al, 1992 ; Germon et al, 1999).

Actuellement, l'oxyde nitrique n'est pas considéré comme un produit final majeur de la dénitrification dans les sols. Il faut toutefois relativiser cette considération car les outils permettant d'analyser NO ne sont disponibles que depuis quelques années et par conséquent peu de travaux ont été réalisés sur ce sujet. Néanmoins, quelques auteurs ont pu démontrer sur des incubations de sol (Garcia, 1973 ; Tortoso et al., 1986), sur des cylindres de sol (Mc Keney et al., 1982) et sur des cultures pures de *Pseudomonas perfectomarinus* en milieu liquide (Zafiriou and Hanley, 1989) que le processus de dénitrification peut produire NO. Mais dans ces trois expérimentations, le milieu dénitrifiant était simplifié et la diffusion des gaz vers l'atmosphère était facilitée.

4.2 La nitrification

4.2.1 Définition

La nitrification est définie comme une oxydation biologique de l'ammonium en nitrite et nitrate, ou comme une augmentation de l'état d'oxydation de l'azote (Williams et al., 1992). Cette oxydation libère de l'énergie utilisée par les organismes nitrifiants. Ce processus résulte de l'activité de deux grands groupes de micro-organismes: une microflore hétérotrophe et une microflore autotrophe.

La nitrification hétérotrophe

Dans les milieux naturels, cette forme de nitrification réalisée par une microflore du sol qui se développe sur des substrats carbonés organiques est généralement moins active que la nitrification autotrophe. Elle se limite principalement aux sols forestiers et aux milieux à

faible pH et à température élevée, conditions trop extrêmes pour le développement des nitrifiants autotrophes. Néanmoins, Williams et al. (1992) rappellent dans leur synthèse qu'Anderson et al. (1991) et Papen et al. (1991) ont montré que la nitrification hétérotrophe peut être un processus beaucoup plus important qu'il est généralement admis.

Deux voies métaboliques ont été proposées pour expliquer la nitrification hétérotrophe :

- une voie inorganique (Alleem, 1975) :



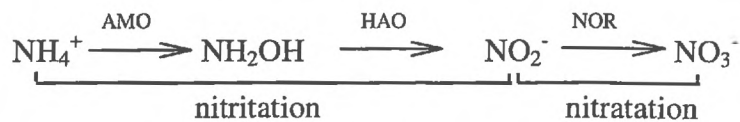
- une voie organique (Doxtader, 1965) :



Cependant, rien ne permet de trancher entre l'une ou l'autre des deux voies (Doxtader et Alexander, 1966 ; Kilham, 1986). L'hypothèse qu'il existe une combinaison de ces deux voies ou qu'il existe deux catégories de nitrifiants réalisant chacune l'une des deux voies a été émise par Kilham (1986).

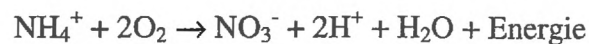
La nitrification autotrophe

En présence d'une source minérale de carbone, CO_2 ou bicarbonates, l'ammonium (NH_4^+) est oxydé successivement en hydroxylamine (NH_2OH), nitrites (NO_2^-) et nitrates (NO_3^-) selon la chaîne de réaction suivante:



Ce processus fait intervenir des transporteurs d'électrons tels que NAD et FAD. Chaque étape de la nitrification est catalysée par un système enzymatique différent : Ammoniac Mono-Oxygénase (AMO), l'Hydroxylamine Oxydoréductase (HAO) et la Nitrite OxydoRéductase (NOR).

La réaction globale est la suivante :



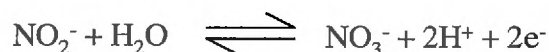
Cette réaction se décompose en deux étapes successives (Haynes, 1986) :

- La nitritation : oxydation de NH_4^+ en NO_2^- via NH_2OH

La nitritation est basée sur un mécanisme de transfert d'électrons qui permet d'établir un gradient de protons de part et d'autre de la membrane périplasmique des bactéries nitritantes et ainsi permettre la synthèse d'ATP (Fig.6).

- La nitratisation : oxydation de NO_2^- en NO_3^- :

L'étape d'oxydation des nitrites en nitrates ne fait intervenir aucun intermédiaire. La réaction mise en jeu est réversible et suit l'équation suivante:



Un atome d'oxygène, provenant d'une molécule d'eau et non de l'oxygène gazeux O_2 , est incorporé dans une molécule de nitrite pour former une molécule de nitrate. Toutefois, on ignore encore la forme exacte du substrat. Il pourrait s'agir de l'ion nitrite, de l'acide nitreux non dissocié ou sous forme hydratée, ou d'une autre forme. Cette réaction d'oxydation est réalisée grâce à un complexe enzymatique qui comporte notamment, l'enzyme Nitrite OxydoRéductase (NOR) (Bock et al., 1986).

4.2.2 Les micro-organismes nitrifiants

Les micro-organismes responsables de la nitrification appartiennent à deux grands groupes: une microflore hétérotrophe et une microflore autotrophe.

Les nitrifiants hétérotrophes

Dans la plupart des milieux naturels, de nombreuses espèces de champignons, de bactéries et d'actinomycètes hétérotrophes sont capables de réaliser la nitrification en culture pure à partir de sources d'azote organique ou ammoniacal (Kilham, 1986).

Il a été montré que de nombreux champignons isolés dans des sols forestiers sont capables de nitrifier : ainsi *Aspergillus flavus* qui est très fréquemment isolé. Remacle (1977) a montré qu'une espèce de *Penicillium* isolé d'un sol forestier allemand est capable de produire des nitrates à partir de peptone en cultures pures réalisées au laboratoire. Kilham (1986) souligne que les travaux sont encore nécessaires pour estimer précisément l'importance de la nitrification hétérotrophe dans les sols.

Les nitrifiants autotrophes

Les bactéries nitrifiantes autotrophes constituent un groupe bien défini physiologiquement. La plupart de ses bactéries sont lithotrophes, gram-négatives et sont classées dans la famille des *Nitrobacteraceae* (Watson, 1971; Bock et al., 1986). Les espèces appartenant aux genres *Nitrosomonas* et *Nitrobacter* sont responsables de la plus grande part de la nitrification naturelle (Anthonisen et al., 1976; Williams et al., 1992).

Les bactéries oxydant l'ammonium en nitrites s'organisent en 5 genres: Nitrosomonas, Nitrospira, Nitrosococcus, Nitrosolobus et Nitrosovibrio. Les bactéries oxydant les nitrites en nitrates s'organisent en 4 genres: Nitrobacter, Nitrococcus, Nitrospira et Nitrospina (Tab.5).

Etape de la nitrification	Genre	Espèce
Nitrification	Nitrosomonas	<i>europaea</i>
		<i>communis</i>
		<i>ureae</i>
		<i>aestuarii</i>
		<i>marina</i>
		<i>nitrosa</i>
		<i>eutrophora</i>
		<i>oligotropha</i>
		<i>halophila</i>
		<i>cryptolerans</i>
		<i>nitrosus</i>
Nitrosococcus	<i>oceanus</i>	
	<i>mobilis</i>	
	<i>briensis</i>	
Nitrosospira	<i>multiformis</i>	
Nitrosolobus	<i>tenuis</i>	
Nitrosovibrio		
Nitratation	Nitrobacter	<i>winogradskyi</i>
		<i>hamburgensis</i>
		<i>vulgaris</i>
	Nitrococcus	<i>mobilis</i>
	Nitrospira	<i>marina</i>
	Nitrospina	<i>gracilis</i>

Tab. 5 : Liste des principaux nitrifiants autotrophes présents dans le sol (Schmidt and Belser, 1982; Bock et al., 1990)

4.2.3 Les enzymes de la nitrification

Chacune des étapes de la nitrification est catalysée par un système enzymatique spécifique.

L'ammoniac mono-oxygénase (AMO)

L'AMO est une enzyme membranaire dont la structure n'est pas encore clairement identifiée. Des études réalisées par Hyman et Wood (1985) ont permis de montrer que l'AMO serait constituée d'un seul polypeptide de 28 kDa. En revanche, Mac Tavish et al. (1993) ont mis en évidence chez *Nitrosomonas europaea* que l'AMO serait formée de deux sous-unités A et B de 32 et 40 kDa respectivement. Ce résultat a été confirmé par Moir et al. (1996) qui ont montré une analogie de structure entre l'AMO de *N. europaea* et de *Paracoccus*

denitrificans nitrifiant hétérotrophe qui possède une AMO de type ferrique et cuivrique constituée de deux polypeptides de 38 et 46 kDa.

L'Ammoniac Mono-Oxygénase présente la capacité d'hydroxyler une large gamme de substrats hydrocarbonés halogénés et non halogénés (Tab.6), et est irréversiblement inhibée par l'acétylène (Hommes et al., 1998):

Substrat	Produit	Source
méthane	méthanol	Hyman and Wood, 1983
méthanol	formaldéhyde	Wood, 1986
benzène	phénol	Drozd, 1976
éthylène	oxyde d'éthylène	Hyman and Wood, 1984

Tab. 6 : Les différents substrats de l'AMO

La description du cycle catalytique impliqué dans l'oxydation de NH_3 en NH_2OH est inspiré du cycle catalytique de la tyrosinase qui est l'enzyme mono-oxygénase cuivrique la mieux connue (Wood, 1986 ; Shears and Wood, 1985). En adaptant ce cycle à l'Ammoniac Mono-Oxygénase, on obtient le cycle suivant (Fig.7) :

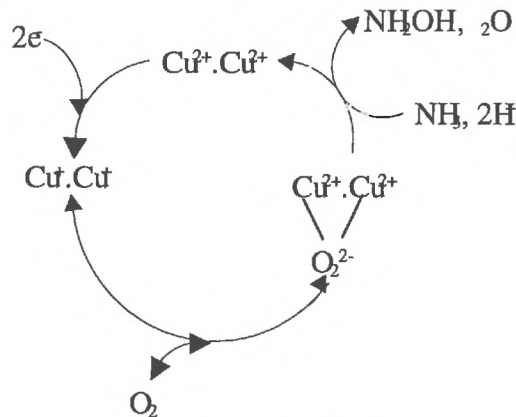


Fig. 7 : Cycle catalytique de la tyrosinase adapté au cas de l'AMO

L'hydroxylamine oxydoréductase (HAO)

L'HAO est une enzyme périplasmique hémoprotéinique très complexe. Plusieurs études ont été réalisées dans le but de définir la composition structurale de l'enzyme. Selon les techniques utilisées, les résultats ne sont pas tous en accord les uns avec les autres.

Les premières valeurs proposées pour la masse moléculaire de l'enzyme ont été de 200 kDa après des analyses sédimentologiques (Rees, 1968) et de 180 kDa après des analyses de chromatographie sur gel (Yamanaka et al. 1979). A l'aide de techniques de dénaturation conventionnelle, Terry and Hooper (1981) ont défini l'HAO comme un trimère d'environ 225

kDa, alors que des analyses par électrophorèse sur gel de polyacrylamide ont permis de proposer une masse moléculaire égale à 125 kDa (Masson et al., 1990). Ce dernier résultat a été confirmé ultérieurement par des travaux de Hoppert et al. (1995) qui ont défini une masse moléculaire de 120 ± 30 kDa à la suite d'analyses de l'enzyme par microscopie électronique.

L'aspect structural de l'hydroxylamine oxydoréductase a fait l'objet de quelques travaux chez *N. europaea* (Wood, 1986) mais aussi chez des nitrifiants hétérotrophes tels que *Paracoccus denitrificans* ou *Thiosphaera pantotropha* (Wehrfritz et al., 1993). Les travaux de Terry and Hooper (1981) ont permis de proposer une structure d'hétérodimère de type $\alpha_3\beta_3$. Selon ces auteurs, les sous-unités, α et β auraient un poids moléculaire respectif de 63 kDa et 11 kDa. Toutefois, d'autres auteurs ont proposé une structure différente de la molécule. Arciero et Hooper (1993) et Arciero et al. (1998) ont défini la molécule d'HAO comme un trimère. Chaque unité contiendrait huit molécules d'hèmes et présenterait un poids moléculaire de 63 kDa. Selon Hoppert et al. (1995), l'HAO serait constituée de deux unités identiques de 63 kDa, et chacune serait formée de "deux masses protéiques" de 30 ± 8 kDa (Fig.8).

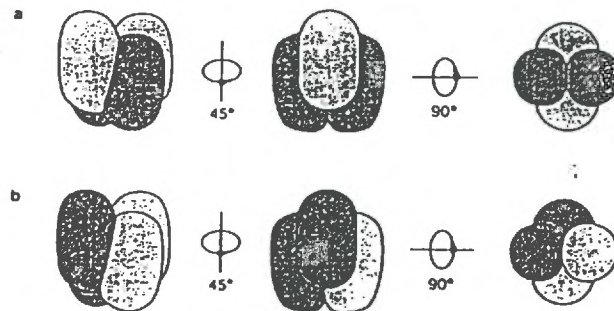


Fig. 8 : Représentation schématique de l'organisation structurale tridimensionnelle de l'HAO : a et b sont deux modèles possibles de l'arrangement des sous-unités (Hoppert et al., 1995).

Des études en microscopie électronique de la molécule d'HAO ont mis en évidence des propriétés de symétrie qui sont indicatrices de la présence d'un seul type de sous-unité. Cette indication repose sur les observations d'autres systèmes enzymatiques : ainsi, la formyltétrahydrofolate synthase de *Clostridium thermoaceticum* (Mayer et al., 1982) ou la pyruvate carboxylase de *Saccharomyces cerevisiae* (Rhode et al., 1986) sont deux enzymes qui présentent des propriétés de symétrie et qui sont constituées d'unités identiques, alors que des enzymes, tels que la méthylréductase de *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Wackett et al., 1987) et l'hydrogénase soluble d'*Alcaligenes eutrophus* (Johannssen et al.,

1991), constituées d'unités différentes, ne présentent pas de propriétés de symétrie. Chaque unité de l'hydroxylamine oxydoréductase contiendrait alors six chaînes polypeptidiques dont chacune est liée à un hème de type *c*, et un dipeptide, lui-même lié à la fois à un hème de type *c* et un hème de type *P₄₆₀*. Les liaisons des hèmes de type *c* aux chaînes peptidiques impliquent deux liaisons thioéther avec deux résidus cystéines. La liaison de l'hème *P₄₆₀*, hème qui correspond à un protohème de type IX (Arciero and Hooper, 1997), fait intervenir deux liaisons thioéther avec les résidus cystéines Cys229 et Cys232, et une liaison de type carbone-carbone avec le résidu tyrosine Tyr467 (Arciero and Hooper, 1993 ; Sayavedra-Soto et al., 1994).

La nitrite oxydoréductase (NOR)

Parmi les quatre genres de bactéries oxydant les ions nitrites, seuls les systèmes enzymatiques de *Nitrobacter* et *Nitrospira* ont été purifiés. Le système enzymatique est composé de trois entités (Yamanaka and Fukumori, 1988) :

- la nitrite oxydoréductase (NOR) proprement dite, qui est assimilée à un cytochrome de type *a₁c₁* chez *Nitrobacter winogradskyi* et à un cytochrome de type *c₁* chez *Nitrobacter hamburgensis*.
- un cytochrome *c₅₅₀*.
- une cytochrome *c* oxydase de type *aa₃*.

Cet ensemble est associé à des cytochromes de type *b*, une quinone inconnue et à une NADH déshydrogénase. Le système constitue alors des particules de 9 à 10 nm dans le cas de *Nitrobacter winogradskyi* (Tsien et al., 1968) ou de 13 à 15 nm dans le cas de *Nitrospira moscoviensis* (Spieck et al., 1998), qui sont associées aux membranes internes des bactéries.

L'enzyme NOR proprement dite a été étudiée seulement chez *N. hamburgensis* (Sundermeyer-Klinger et al., 1984 ; Kirstein and Bock, 1993 ; Spieck et al., 1998), chez *N. winogradskyi* (Yamanaka and Fukumori, 1988) et *N. moscoviensis* (Spieck et al., 1998). L'ensemble de ces travaux a permis de montrer que la NOR est constituée de trois unités chez *Nitrobacter hamburgensis* et *Nitrobacter winogradskyi* et de quatre unités chez *Nitrospira moscoviensis*. L'ensemble des travaux effectués sur la NOR des deux espèces de *Nitrobacter* a permis de mettre en évidence que l'enzyme correspond à une enzyme molybdique à centre fer-soufre qui agit comme une nitrite cytochrome *c* oxydoréductase (Tab.7).

Micro-organismes	les sous-unités de NOR	PM (kDa)	Références
<i>Nitrobacter hamburgensis</i>	α	116	Yamanaka et Fukumori (1988)
		115 à 130	Spieck et al. (1998)
	β	64	Bock et al. (1986)
		58	Kirstein et Boch (1993)
	$\gamma^{(1)}$	32	Yamanaka et Fukumori (1988)
			Kirstein et Boch (1993)
<i>Nitrobacter winogradskyi</i>	α	55	Yamanaka et Fukumori (1988)
	β	29	Yamanaka et Fukumori (1988)
	$\gamma^{(1)}$	19	Yamanaka et Fukumori (1988)
<i>Nitrospira moscoviensis</i>	α	130	Spieck et al. (1998)
	β	46	Spieck et al. (1998)
	$\gamma^{(2)}$	62	Spieck et al. (1998)
	$\delta^{(2)}$	29	Spieck et al. (1998)

⁽¹⁾ rôle inconnu

⁽²⁾ cytochrome c_1 associé aux sous unités α et β et qui est considéré comme la sous unité γ de la NOR.

Tab. 7 : Les caractéristiques des différentes sous unités de la NOR chez *Nitrobacter hamburgensis*, *Nitrobacter winogradskyi* et *Nitrospira moscoviensis*.

4.2.4 Les gènes de la nitrification

Les gènes *amo* codant pour l'AMO

Les travaux de MacTavish et al. (1993) ont permis de montrer que *N. europaea* contient deux copies de gènes codant pour des polypeptides impliqués dans le site actif de l'enzyme. Il existe en effet un gène *amoA* et un gène *amoB* qui codent respectivement pour des polypeptides de 32 kDa et 40 kDa et qui présentent la capacité de fixer l'acétylène, substrat suicide pour l'AMO. Les deux polypeptides codés par *amoA* et *amoB* ne présentent aucune homologie de séquence que ce soit entre eux ou avec des polypeptides d'autres mono-oxygénases connues. L'organisation des gènes *amo* ne semble pas universelle chez l'ensemble des nitrifiants. En effet, Klotz et al. (1997) ont mis en évidence, au sein du génôme de *Nitrosospira Sp NpAV*, la présence d'un troisième gène, appelé *amoC*, situé en amont des gènes *amoA* et *amoB*, qui coderait pour un polypeptide de 36 kDa constitué de 270 acides aminés (Fig.9).

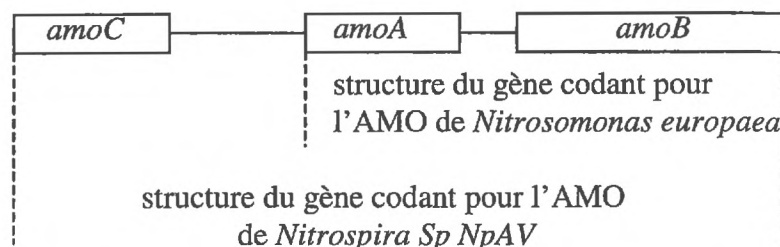


Fig. 9 : Organisation des gènes *amo* codant pour l'AMO chez *Nitrosomonas europaea* et *Nitrospira Sp NpAV*.

Le gène *hao* codant pour l'hydroxylamine oxydoréductase

Des travaux de Arciero and Hooper (1993) et de Sayavedra-Soto et *al.* (1994) ont permis de caractériser le gène *hao* codant pour l'enzyme HAO et de réaliser son séquençage. Ces études ont mis en évidence la présence d'un gène codant pour le cytochrome *c₅₅₄* localisé à 1200 pb de l'extrémité 3' du gène *hao* et la présence d'un cadre ouvert de lecture (*orf*) situé à l'extrémité 5' (Fig.10).

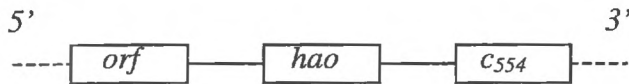


Fig. 10 : Structure du gène codant pour l'HAO.

Les gènes *nor* codant pour la NOR

Les séquences de gènes codant pour la nitrite oxydoréductase ont été étudiées chez *Nitrobacter hamburgensis* X14 par Kirstein and Bock (1993). Trois gènes disposés en opéron dans l'ordre *norA*, *norX* et *norB* ont été mis en évidence par séquençage de la partie N terminale de la sous-unité β de l'enzyme à partir de membranes purifiées.

Les séquences protéiques codées par le gène *norA* présentent d'étroites homologues avec les séquences protéiques des sous-unités α de la nitrate réductase d'*Escherichia coli* codées par les gènes *narG* et *narZ*, alors que les séquences protéiques codées par le gène *norB* présentent d'étroites homologues avec les séquences des sous-unités β de la nitrate réductase d'*Escherichia coli* codées par les gènes *narH* et *narY*. Kirstein et Bock (1993) ont donc conclu que *norA* coderait pour la sous-unité α et que *norB* coderait pour la sous-unité β de la NOR (Fig.11).

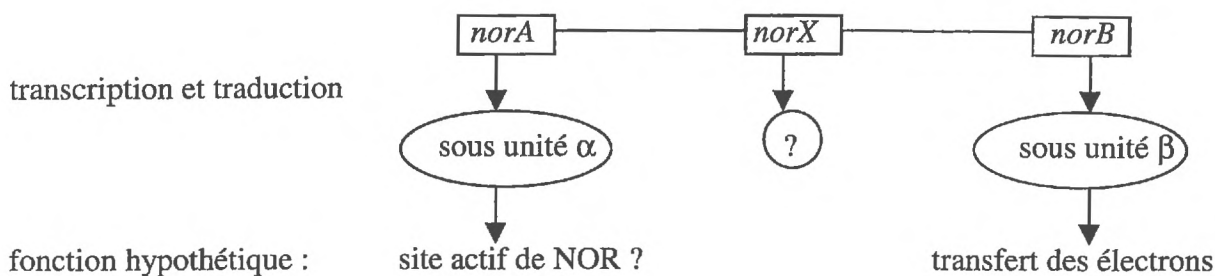
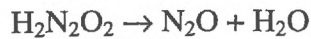


Fig. 11 : Schématisation de l'opéron *nor* purifié chez *Nitrobacter hamburgensis* X14.

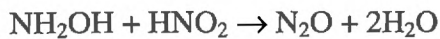
4.2.5 Les hypothèses de formation de N_2O et de NO liées à la nitrification

En 1935, Corbet a mis en évidence une production de N_2O sur une culture de micro-organismes non identifiés du sol capables de convertir l'ammonium ou l'hydroxylamine en nitrites. Suite à ces travaux, deux hypothèses ont été émises pour expliquer l'origine de ces émissions gazeuses:

- décomposition chimique de l'acide hyponitrique:



- interaction chimique de l'hydroxylamine et des nitrites en milieu acide:



Quelques travaux ont ensuite permis de mettre en évidence la présence d'un système enzymatique sur *Nitrosomonas europaea* qui réduit les nitrites en N_2O en conditions anaérobies. Ce système enzymatique a été identifié comme étant la nitrite réductase (Yoshida and Alexander, 1970; Ritchie and Nicholas, 1972). A partir de ces résultats un premier schéma de synthèse peut être proposé quant aux hypothèses de formation de N_2O (Fig.12):

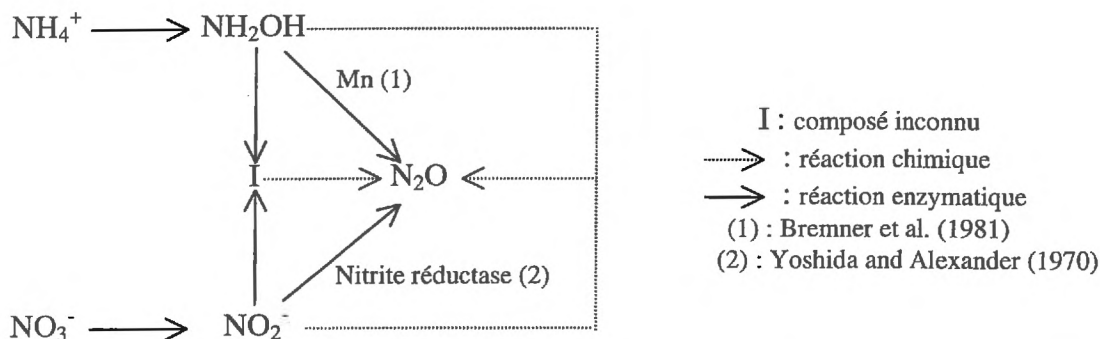


Fig. 12 : Représentation schématique des différentes hypothèses d'émissions de N_2O par nitrification d'après Bremner and Blackmer (1981).

Plus récemment, des travaux de Conrad (1990) ont permis de synthétiser les différentes voies possibles de formation de N_2O et de NO au cours de la nitrification (Fig.13). Cette formation serait la conséquence soit d'une réduction des nitrites qui aurait lieu en présence d'une très faible concentration en oxygène dans le milieu (Lipschultz et al., 1981; Anderson and Levine, 1986), soit de la transformation d'un composé intermédiaire hypothétique formé au cours de l'oxydation de l'hydroxylamine en nitrite et qu'il identifie comme étant le nitroxy (HNO). Le mécanisme impliqué demeure néanmoins indéterminé.

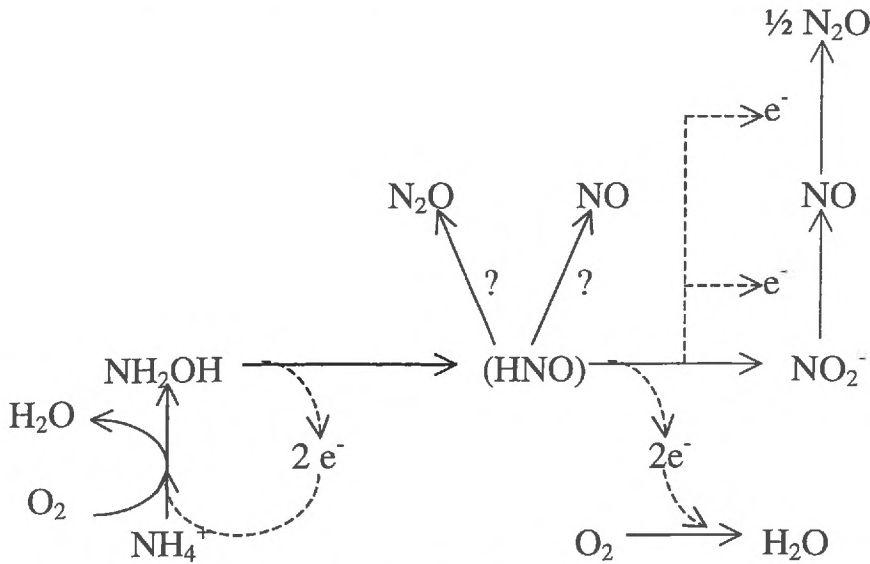


Fig. 13 : Représentation schématique des hypothèses de formation de N_2O et de NO au cours de la nitrification (Conrad, 1990).

Parton et al. (1996) ont émis l'hypothèse que NO serait un composé intermédiaire de la chaîne de nitrification. NO serait le produit issu de l'oxydation du nitroxy et serait lui même oxydé en nitrite (Fig.14). Selon les auteurs, l'oxydation du nitroxy pourrait également conduire à la formation d'un autre composé encore inconnu, appelé composé X, qui serait ensuite oxydé en nitrite. D'après Parton et al. (1996), les ions nitrites seraient à l'origine de la formation de NO et de N_2O mais par un mécanisme qui reste à élucider.

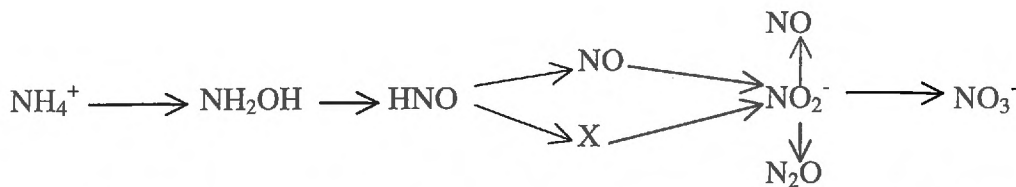


Fig. 14 : Hypothèses de formation de N_2O et NO au cours de la nitrification (Parton et al., 1996).

D'autre part, Remde et al. (1989) a mis en évidence la formation de NO et de N_2O à partir de la réduction des nitrites avec l'hydrazine (N_2H_4) comme donneur d'électrons (Fig.15). L'oxydation d'une demi-mole d'hydrazine en N_2 libère 2 électrons. Un électron est utilisé pour la réduction d'un ion nitrite en une mole de NO et le second électron est utilisé pour la réduction d'une mole de NO en une demi-mole de N_2O .

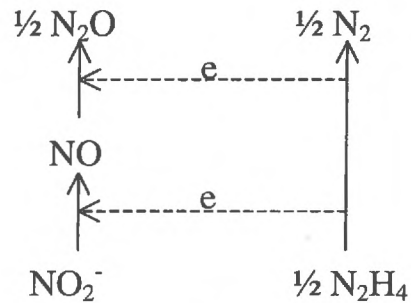


Fig. 15 : Hypothèse de formation de NO et de N₂O à partir de la réduction des ions nitrites (NO₂⁻) avec l'hydrazine (N₂H₄) comme donneur d'électrons.

4.3 Les autres mécanismes biologiques qui produisent N₂O

Dans les sols, la dénitrification et la nitrification sont les principaux mécanismes biologiques qui participent à la production de N₂O et de NO. D'autres mécanismes du sol sont également impliqués dans la production de ces gaz mais leur contribution respective est encore très mal évaluée. Des travaux de Matson and Vitousek (1987) in Schlesinger (1991) réalisés sur 10 sols de forêts tropicales ont permis de montrer que cette production de N₂O est proportionnelle à la quantité d'azote minéralisée (Fig.16).

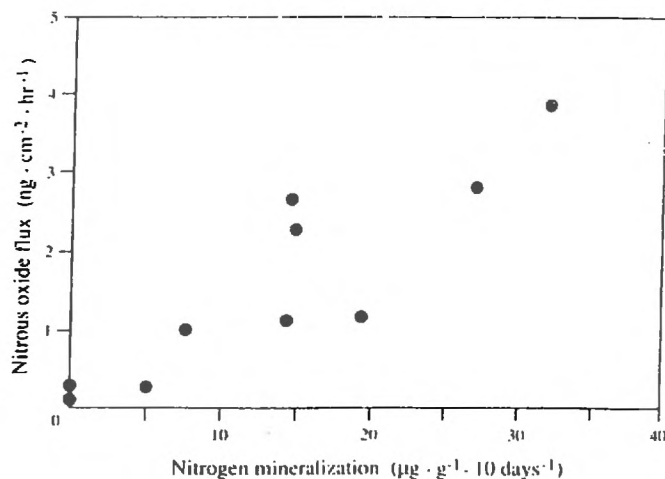


Fig. 16 : Corrélation entre les quantités d'azote minéralisé et les pertes en N₂O mesurées en laboratoire sur 10 sols de forêts de savane tropicale (Matson and Vitousek, 1987 in Schlesinger, 1991)

Par ailleurs, la production de N₂O a été observée à partir de cultures pures de champignons (Williams et al, 1992), au cours de la réduction assimilative des nitrates réalisée par les levures (Bleakley and Tiedje, 1982) et les productions de NO et de N₂O ont été simultanément observées à partir de la réduction des nitrates par différentes bactéries non dénitrifiantes (Smith and Zimmerman, 1981).

5. LA REGULATION DES EMISSIONS DE N₂O ET DE NO DANS LES SOLS :

De nombreux paramètres physico-chimiques et agroclimatiques régulent les processus microbiens responsables de la production de protoxyde d'azote. Les deux principaux mécanismes impliqués, nitrification et dénitrification, sont respectivement aérobie et anaérobie et de ce fait répondent à des schémas de régulation différents. (Fig.17 et 18). Ceci suggère que les émissions de N₂O et de NO par les sols peuvent exister dans des conditions relativement contrastées. Il est en effet généralement considéré que dans les zones de climat tempéré, la source majeure d'émissions de N₂O par les sols est la dénitrification, alors que dans les zones de climat contrasté, il semble que les émissions de N₂O répondent davantage à la régulation de la nitrification (Smith and Arah, 1990). Toutefois, la complexité des facteurs qui favorisent un processus plutôt qu'un autre rend difficile la description de la production des oxydes d'azote gazeux. L'effet des principaux facteurs concernés est présenté dans les paragraphes qui suivent.

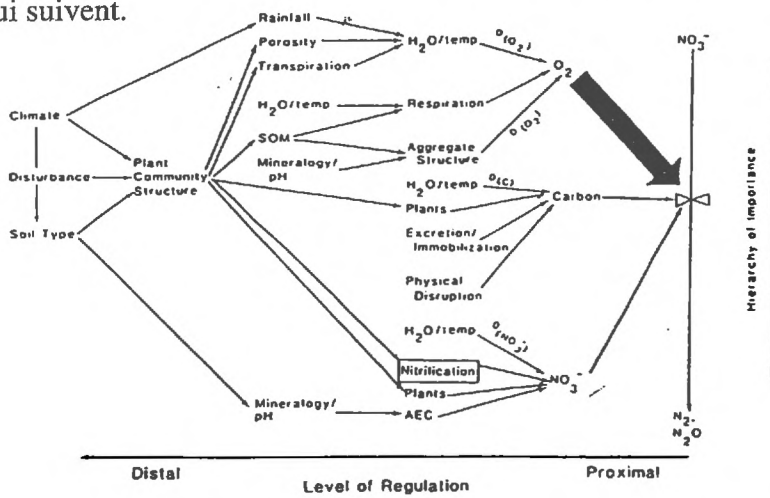


Fig. 17 : Les facteurs de contrôle de la dénitrification dans les sols (Robertson, 1989)

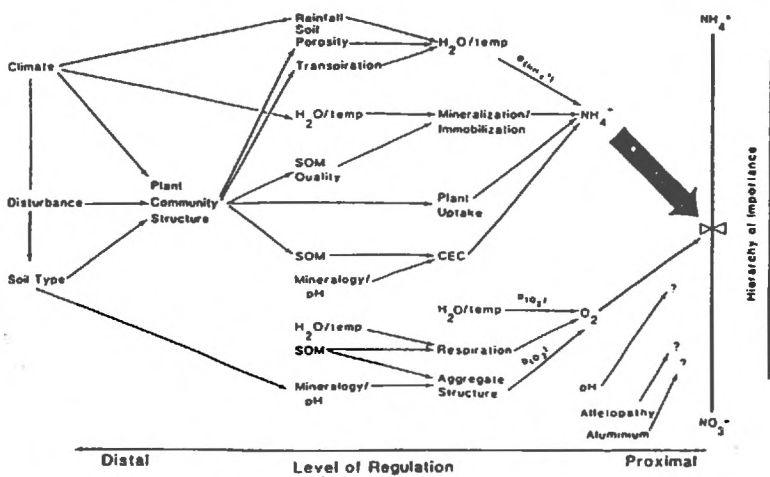


Fig. 18 : Les facteurs de contrôle de la nitrification dans les sols (Robertson, 1989)

5.1 Le contenu en eau du sol et l'aération du sol

Le contenu en eau du sol influence les émissions de N_2O et de NO par son action de régulation sur l'activité des microflores impliquées, sur la dissolution des substrats des réactions et sur la diffusion des gaz dans les sols. Notamment, il intervient sur le degré d'aération des sols. Pour traduire cet effet de l'humidité du sol sur l'aération, on exprime celle-ci en taux de saturation de la porosité ou part de porosité occupée par l'eau (PPOE), correspondant au water filled pore space (WFPS) des anglophones, qui est défini comme le ratio du contenu volumique en eau dans le sol (H_v) sur la porosité totale du sol (P_t) calculée à partir des densités réelles (d_r) et apparentes (d_a) (Linn and Doran, 1984) :

$$PPOE = H_v / P_t \quad \text{avec } P_t = (d_r - d_a) / d_r$$

La nitrification et la dénitrification sont généralement favorisées respectivement par des milieux à faible et à fort taux de saturation. La représentation de Linn et Doran (1984) des activités nitrifiantes et dénitrifiantes en fonction de la PPOE propose que la nitrification est active entre 10 à 80 % de la PPOE, avec un maximum d'activité à 60 %, et que la dénitrification se met en place lorsque la PPOE est supérieure à 60 % (Fig.19). Granli et Bockman (1994) ont suggéré que les émissions de N_2O sont particulièrement importantes dans les sols qui présentent des humidités très contrastées c'est-à-dire des sols dans lesquels alternent des périodes de faible humidité favorables à la nitrification, et des périodes de forte humidité permettant la dénitrification des nitrates formés précédemment. Le rôle de l'humidité du sol sur la part de N_2O relargué au cours de la dénitrification n'a pas été défini avec précision.

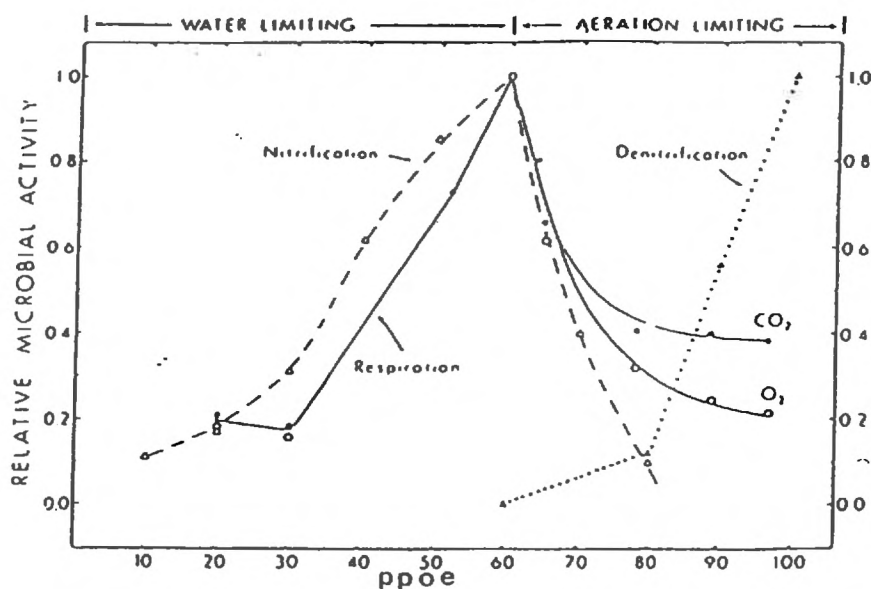


Fig. 19 : Relations entre la part de la porosité du sol occupée par l'eau (PPOE), la nitrification, la respiration et la dénitrification (Linn et Doran, 1984).

5.2 La disponibilité en azote

La teneur et la forme de l'azote minéral contenu dans le sol exercent un effet déterminant sur la nature des transformations productrices de N_2O et de NO et sur leur intensité. L'ammonium est le substrat de la nitrification et les formes NO_3^- et NO_2^- sont les substrats de la dénitrification. Des corrélations entre les émissions de NO et de N_2O et les teneurs en NH_4^+ ou NO_3^- du sol ont été établies (Aulakh et al., 1984 ; Rolston et al., 1984).

De nombreux auteurs ont observé que l'activité de dénitrification présente une réponse de type michaelienne par rapport à son substrat azoté (Focht, 1974). Les K_m observés varient avec les conditions d'incubation. Ils sont très faibles sur des cultures bactériennes (Betlach and Tiedje, 1981) et plus élevés lorsqu'ils sont mesurés sur des sols. Ainsi, Hénault (1993) a mesuré un K_m apparent de $22 \text{ mg N-NO}_3^- \cdot \text{kg}^{-1}$ de sol. L'action de la teneur en nitrates du sol sur les émissions de N_2O au cours de la dénitrification est complexe. Certains auteurs ont suggéré une inhibition de la N_2O réductase en présence de fortes concentrations en nitrates dans le sol, N_2O devenant alors le produit final majoritaire voire exclusif de la réaction (Betlach and Tiedje, 1981; Weier et al., 1993). Granli and Bockman (1994) ont souligné le fait que peu d'études ont été publiées sur l'effet de l'ammonium sur la nitrification et sur les émissions associées de N_2O . D'autres études proposent des ajustements de différents types (Michaelien de 1er ordre, Monod) entre l'activité de nitrification d'un sol et sa teneur en ammonium (Prosser, 1986).

5.3 La disponibilité en carbone et matière organique

La disponibilité en carbone dans le sol est un paramètre dont le rôle régulateur est différent pour la dénitrification et la nitrification. En ce qui concerne la dénitrification, le carbone disponible intervient directement dans le fonctionnement de la chaîne respiratoire en tant que donneur d'électrons et sa teneur dans le sol peut déterminer la nature des gaz produits, la réalisation de l'étape de réduction de N_2O en N_2 nécessitant une plus grande disponibilité d'éléments réducteurs. Le carbone exerce par ailleurs un effet indirect sur la nitrification par la régulation de la consommation en O_2 et ses conséquences sur la concentration de ce gaz, et par le contrôle sur la teneur en ammonium du sol par le biais de l'immobilisation ou de la minéralisation de cette forme d'azote. En effet, un apport de matière organique qui présente un ratio C/N élevé peut stimuler l'immobilisation des ions NH_4^+ libres et de ce fait réduire la nitrification par compétition pour le substrat. La situation inverse peut se produire avec la minéralisation de matière organique à C/N bas qui libère de l'ammonium

et peut ainsi stimuler la nitrification. Bremner and Blackmer (1981) ont montré que la vitesse de nitrification, le ratio N_2O/NO_3^- et l'intensité des émissions de N_2O augmentent lorsque le ratio C/N de la matière organique du sol diminue dans le cas d'un sol aéré.

5.4 Le pH

L'effet du pH sur les émissions de N_2O et de NO est complexe du fait d'effets contradictoires de ce paramètre sur le fonctionnement des chaînes des réactions concernées. Globalement, les pH neutres ou supérieurs à 7 semblent favorables aux activités microbiennes nitrifiantes et dénitrifiantes. Mais la N_2O réductase semble particulièrement sensible aux faibles pH, ce qui conduit à une augmentation des émissions de N_2O liées au processus de dénitrification aux faibles pH même si l'activité dénitrifiante est globalement ralentie (Garrido et al., 1996). La nitrification est optimale entre pH7.5 et 8.0 (Bock et al., 1986). La nitrification peut cependant fonctionner dans les milieux plus acides. Bremner et Blackmer (1981) ont montré que les émissions de N_2O par les sols en conditions aérées augmentent lorsque le pH passe de 5.9 à 8.3. La production de NO par les sols à différents pH varie avec le type de sol et son état d'aération. Une étude réalisée sur 13 sols n'a montré aucune corrélation significative entre le pH du sol et l'intensité des émissions de NO en conditions aérées (Baumgärtner et Conrad, 1992). En revanche, Nägele et Conrad (1990) ont démontré que la production de NO en conditions aérées était inversement proportionnelle au pH du sol pour des sols forestiers, avec des valeurs comprises entre 4 et 4.7. Des études sur l'effet de la modification du pH du sol sur les émissions de NO ont montré sur un sol agricole faiblement alcalin (pH7.8) que la production de NO augmente quand ce pH passe de pH7.8 à pH6.5, puis diminue quand le pH du sol est abaissé jusqu'à pH4. En conditions anaérobies, la production de NO a été montrée inversement proportionnelle au pH dans les sols agricoles pour des pH compris entre pH6 et pH8 (Murray et Knowles, 2000).

5.5 La température

La température du sol influence directement l'activité microbienne ainsi que les paramètres physiques et chimiques qui contrôlent la diffusion des gaz. L'activité dénitrifiante augmente avec la température et atteint des valeurs maximales situées entre 60 à 75°C ; entre 10 et 35°C on peut établir un Q_{10} variant de 1.5 à 3.0 (Knowles, 1982). En dessous de 10°C, l'effet de la température est beaucoup plus marqué (Standford et al., 1975). La gamme de

température optimale pour la nitrification est comprise entre 25 et 35°C (Haynes, 1986) : il semble toutefois que l'optimum thermique de la microflore nitrifiante varie avec le climat de la région. Les émissions de protoxyde d'azote sont réduites par l'abaissement de la température en période hivernale et deviennent significatives quand la température du sol est supérieure à 8-10 °C. Les ratio N_2O/NO_3^- et N_2O/N_2 au cours de la dénitrification ont tendance à augmenter avec la température. De même, le N_2O issu du processus de nitrification devient plus important quand la température croît (Yoshida and Alexander, 1970; Bremner et Blackmer, 1981; Goodroad and Keeney, 1984).

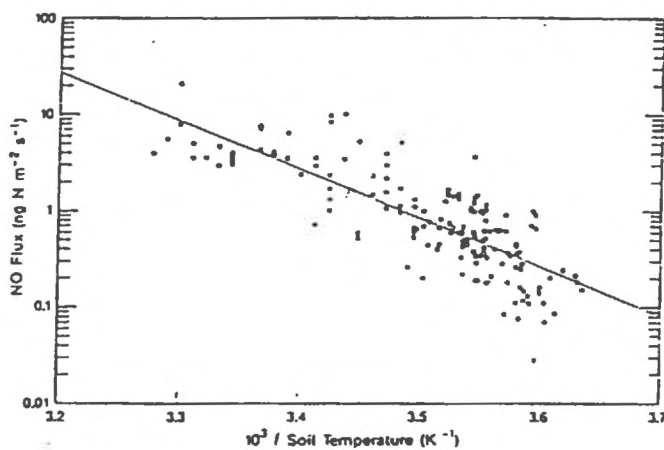


Fig. 20 : Régression linéaire entre les flux de NO et 1/T (Williams et al., 1987)

En ce qui concerne l'effet de la température sur les émissions de NO, des études réalisées par Williams et al. (1987) sur différents sols du Colorado ont permis d'établir une corrélation entre le logarithme du flux de NO et l'inverse de la température du sol (Fig.20).

5.6 Les pratiques culturales

Certaines pratiques culturales ont un impact sur les émissions de composés gazeux azotés par les sols. Le travail du sol a des effets sur les facteurs de contrôle précédemment cités. Il intervient sur la structure et donc le fonctionnement hydrique et les conditions d'aération du sol, sur l'évolution du pool de matière organique et donc sur la disponibilité en azote et en carbone dans le sol. La dose et la forme des fertilisants minéraux ou organiques appliqués dans une parcelle cultivée influencent l'intensité des émissions de N_2O et sans doute de NO par les sols. D'après des travaux de synthèse effectués par Bouwman, 1996 (Tab. 8) et

Eichner, 1990, l'utilisation d'ammoniac anhydre induirait une augmentation importante des émissions de N_2O . Les émissions de N_2O après apport de différents fertilisants minéraux (sulfate d'ammonium, urée, nitrate de potassium et ammonitrates) sont apparus peu variables entre ces différentes formes sur une période de 6 mois suivant les apports (Hénault et al. 1998). Mais les dynamiques des émissions, différentes en fonction de la forme apportée, suggèrent que les mécanismes microbiens mis en jeu étaient différents et que pour d'autres conditions climatiques, l'intensité des émissions aurait pu varier entre les formes de fertilisants apportés. Globalement, les émissions de N_2O seraient proportionnelles aux doses d'azote apportées (Bouwman, 1996), (Fig. 21).

L'irrigation des cultures ainsi que l'apport de composés organiques dans le sol (pesticides, ...) favorisent certainement la dénitrification mais leur impact sur le ratio N_2O / N_2 étant très complexe, on ne sait pas actuellement si ces pratiques augmentent ou non les émissions de N_2O .

Type de fertilisant	Moyenne % N apporté	Ecart type	Nombre de données
Ammoniac anhydre	1,6	1,6	23
Nitrate d'ammonium	0,3	0,3	10
Sels ammoniacaux	0,1	0,1	20
Urée	0,3	0,6	14
Sels nitriques	0,2	0,4	16
Combinaison de fertilisants organiques et minéraux	1,5	0,5	5

Tab. 8 : Proportion de l'azote épandu émis sous forme de N_2O en fonction de la forme de fertilisant apporté (d'après Bouwman, 1996)

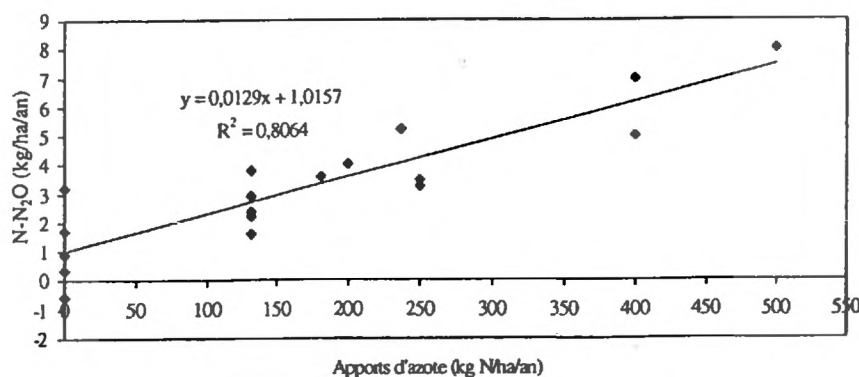


Fig. 21 : Emissions de N_2O en fonction des apports d'azote dans différentes expérimentations sur une année (sols non organiques, en cultures ou en prairies fauchées, recevant au plus $500 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$) d'après Bouwman, 1996 in Germon et al 1999.

6. METHODES DE MESURE ET D'ETUDES DES EMISSIONS DE N₂O ET DE NO

6.1 Méthodes de mesures des émissions de N₂O et de NO

6.1.1 Dispositifs expérimentaux permettant de mesurer les émissions de N₂O et de NO

A l'échelle de la parcelle, deux grands types de méthodes sont utilisés pour mesurer les émissions de N₂O :

- Les méthodes par chambres : des enceintes sont enfoncées dans le sol sur quelques centimètres et délimitent un volume dans lequel les gaz émis vers l'atmosphère sont piégés et leur vitesse de production est mesurée (Hénault, 1993; Delorme, 1995).
- les méthodes micrométéorologiques qui mesurent un flux vertical de N₂O au-dessus de la surface du sol (principalement les méthodes par gradient de concentrations et les méthodes par corrélation turbulente).

On peut aussi mesurer les émissions de N₂O à partir d'expérimentations en laboratoire. Des cylindres de sol non remanié permettent de travailler sur des échantillons de taille définie et dans des conditions proches de celles au champ. Des expérimentations peuvent également être effectuées sur des échantillons de sol tamisés et mis à incuber en conditions contrôlées afin d'étudier les différents mécanismes microbiens impliqués dans les émissions de N₂O, et leur régulation.

6.1.2 Dosage des gaz émis

Pour doser N₂O, quatre grandes méthodes sont classiquement utilisées (Hénault and Germon, 1995):

- la spectrométrie infra-rouge dont le seuil de détection est très bas, 1 nl.l⁻¹, est généralement associée aux mesures en continu de production de protoxyde d'azote à la surface du sol.
- la chromatographie en phase gazeuse (C.P.G.) qui est actuellement la méthode de référence grâce à sa fiabilité, sa grande sensibilité (100 nl.l⁻¹ en routine) et sa souplesse d'utilisation. Pour mesurer des concentrations au voisinage de la concentration atmosphérique, on utilise habituellement des détecteurs à capture d'électrons ; on peut utiliser aussi des détecteurs moins sensibles, notamment des catharomètres. Ces mesures sont généralement associées à la méthode des chambres ou aux méthodes d'incubation

en laboratoire.

- la spectrométrie de masse qui permet de différencier et de doser les produits à partir de composés marqués (^{15}N).
- les détecteurs à diode laser accordable (tunable diode laser) qui permettent des suivis très rapides des concentrations et des flux des gaz analysés au voisinage de la concentration atmosphérique. Ils sont généralement associés à la micrométéorologie.

Pour doser NO qui est un composé très réactif, il existe quatre grandes techniques dont deux sont basées sur le principe de la chimiluminescence :

- Le dosage par chimiluminescence basé sur la réaction de NO avec l’ozone. Les molécules de NO en présence d’ozone se transforment en NO_2 avec émission de lumière selon la réaction suivante : $\text{NO} + \text{O}_3 \rightarrow \text{NO}_2 + \text{O}_2 + h\nu$. La caractéristique de cette réaction est la production de molécules de NO_2 dans un état électroniquement excité, suivi d’un retour immédiat à l’état non excité, accompagné d’une libération de photons. Ces photons sont recueillis par un détecteur photomultiplicateur qui produit un courant directement proportionnel à la concentration en NO.
- Le dosage par chimiluminescence basé sur la réaction de NO_2 avec une solution de luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione) qui donne un produit excité qui émet un photon en repassant à son état stable. Le NO est préalablement oxydé en NO_2 par un passage de l’échantillon gazeux dans un convertisseur à l’oxyde de chrome (CrO_3).
- La fluorescence induite par laser (LIF). Le principe est basé sur la photofragmentation qui convertit NO_2 en NO par un laser avec émissions photons qui induit de la fluorescence.
- Spectrométrie d’absorption par diode laser accordable (TDLAS) technique qui couple l’absorption infrarouge pour la détection moléculaire et la résolution spectrale des diodes laser.

6.2 Etudes des sources d’émissions de N_2O et de NO

6.2.1 Inhibition sélective des mécanismes sources

Afin de différencier le rôle des processus de nitrification et de dénitrification dans les émissions de N_2O , plusieurs inhibiteurs sélectifs de ces transformations peuvent être utilisés.

La méthode basée sur les propriétés inhibitrices de l'acétylène sur la nitrification d'une part et sur la réduction de N_2O en N_2 au cours de la dénitrification d'autre part est la plus couramment utilisée. Cette méthode repose sur le fait qu'une faible pression partielle en acétylène de l'ordre de 2.5 à 5 Pa inhibe la nitrification et n'a qu'un très faible effet sur l'activité de la N_2O réductase alors qu'une forte pression partielle d'acétylène, de l'ordre de 0.1 à 5 kPa, inhibe à la fois la dénitrification au stade N_2O et la nitrification (Davidson et al., 1986; Klemmedtsson et al. 1988).

Ainsi dans le cas d'émissions de N_2O liées à la nitrification, ces émissions sont inhibées à la fois par une faible et une forte pression partielle en acétylène. Dans le cas d'émissions liées à la dénitrification, ces émissions ne sont jamais inhibées par l'acétylène, et ne sont pas significativement modifiées par l'introduction d'une faible pression partielle de ce gaz. Elles sont ou équivalentes ou accrues en présence d'une forte pression partielle en acétylène (Fig.22). Cette méthode présente néanmoins des limites, concernant les doses à appliquer, qui peuvent varier d'un sol à un autre : ainsi l'inhibition de l'activité de la N_2O réductase par l'acétylène est remise en cause dans les sols très argileux.

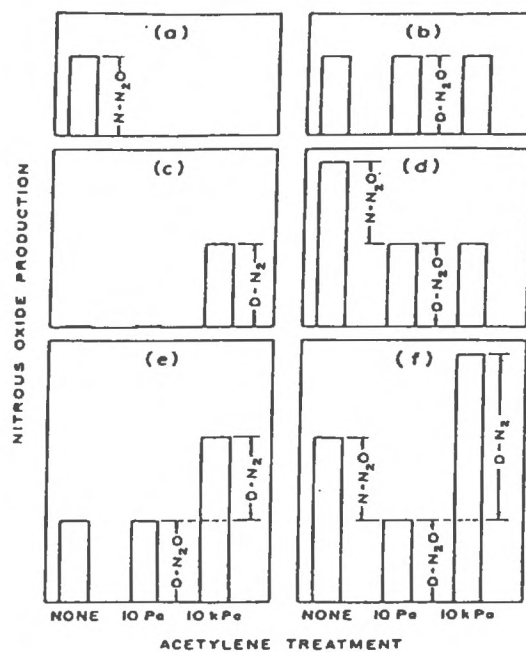


Fig. 22 : Résultats théoriques possibles des émissions de N_2O que l'on peut obtenir après traitement à l'acétylène

(a) émissions de N_2O issues de la nitrification, (b) émissions de N_2O issues de la dénitrification s'arrêtant totalement au stade N_2O , (c) émissions de N_2O issues de la dénitrification s'arrêtant au stade N_2 , (d) émissions de N_2O issues à la fois de la nitrification et de la dénitrification qui s'arrête totalement au stade N_2O , (e) émissions de N_2O issues de la dénitrification produisant à la fois N_2O et N_2 et (f) émissions de N_2O par nitrification et par dénitrification qui produit à la fois N_2O et N_2 .

Par ailleurs, d'autres inhibiteurs de la nitrification ont également été utilisés pour des études de laboratoire, tels que le carbure de calcium (Bronson and Mosier, 1991; Keerthisinghe et al., 1993), le thiosulfate (Sallade and Sims, 1992), le chlorate de sodium (Tortoso and Hutchinson, 1990 ; Kilham, 1986), le fluorométhane (Oremland and Culbertson, 1992 ; Miller et al., 1993), l'éther de diméthyl (Oremland and Culbertson, 1992, Miller et al., 1993). Pour ces deux derniers inhibiteurs, leur action intervient au niveau de la nitrification et plus précisément au niveau de l'étape d'oxydation de l'ammonium en hydroxylamine (Miller et al., 1993) alors que le chlorate de sodium intervient au niveau de la nitrification.

A l'échelle de la parcelle, d'autres inhibiteurs de la nitrification sont utilisés. La nitrapyrine (2-chloro-6 (trichlorométhyl)-pyridine), commercialisée sous le nom N-serve par Dow Chemical Company, est le produit le plus utilisé aux Etats Unis depuis trente ans; il n'est cependant plus utilisé en France. Des études de laboratoire ont montré que la nitrapyrine inhibe l'étape d'oxydation de NH_4^+ en NO_2^- réalisée par *Nitrosomonas* (Bremner and Blackmer, 1978; Aulakh et al., 1984). La Dicyandiamide ou DCD, commercialisé par BASF sous le nom de Didin, est utilisée comme fertilisant inhibiteur de la première réaction de la nitrification à raison d'un apport de $15 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$. Ce produit a une activité qui pourrait se maintenir pendant 2 à 3 mois. Sa décomposition ne laisse pas de résidu dans le sol et s'accompagne d'une libération supplémentaire d'azote utilisable par la culture (DCD contient 67% d'azote).

6.2.2 *Suivi des activités de nitrification et dénitrification*

Une autre approche pour étudier les transformations de l'azote dans le sol sans passer par les inhibiteurs spécifiques, qui peuvent plus ou moins perturber les cinétiques de transformation, est d'utiliser le marquage isotopique. Un apport de substrat marqué au ^{15}N peut permettre en effet de définir les proportions de ce substrat qui vont évoluer au cours de différentes transformations (Guiraud, 1984 ; Robertson et al., 1995). Après avoir marqué un des substrats source de N_2O , la connaissance du marquage isotopique du pool gazeux de N_2O informe sur le mécanisme qui a conduit à la formation de N_2O . Les deux techniques, marquage isotopique et acétylène peuvent être utilisées conjointement (Stevens et al., 1997).

7. QUANTIFICATION ET MODELISATION DES EMISSIONS

Les mesures qui concernent le bilan de N₂O dans l'écosystème Terre-atmosphère sont obtenues soit par des mesures directes dans l'atmosphère, intégratives, soit par des mesures ponctuelles dans le temps (de quelques heures à quelques jours) et dans l'espace (en général à l'échelle de la parcelle cultivée). La jonction entre ces deux échelles de mesures nécessite la mise au point de méthodes d'extrapolation spatiale et temporelle. Les techniques d'extrapolation temporelle mettent en œuvre des modèles, dont la complexité peut être très variables, allant de l'utilisation de relations statistiques empiriques (Myrold, 1988) à des modèles mécanistes décrivant à la fois des processus physiques et biologiques (Grant et al. 1993 ; Renault et al. 1997). Les techniques d'extrapolation spatiale font généralement appel à l'utilisation de systèmes d'informations géographiques (Pennock, 1999).

7.1 Estimation des émissions de N₂O à l'échelle de la parcelle cultivée et/ou régionale

Plusieurs modèles proposés dans la littérature permettent de simuler le cycle de l'azote dans le sol (Focht, 1974, Smith, 1980, Molina et al., 1983), mais seuls quelques modèles incluent la prévision des émissions de N₂O. Une synthèse des modèles opérationnels d'émission de ce gaz par les sols aux échelles régionales a été établie par Renault (1999). Ils décrivent généralement des processus liés au fonctionnement physique et biologique du sol en intégrant les paramètres "plantes" (croissance et développement) et "conditions climatiques" (Tab. 9).

Modèles d'émission de N ₂ O	Références
DNDC (DeNitrification-Decomposition) model	Li et al., 1992
Modèle de Bouwman	Bouwman et al., 1990, 1993
NGAS	Parton et al., 1996
ECOSYS	Grant, 1991, 1993, 1995
NLEAP-N ₂ O	Shaffer et al., 1991 ; Xu et al., 1998
Modèle de Müller	Müller et al., 1997

Tab. 9 : Principaux modèles d'émission de N₂O recensés dans la littérature (d'après Renault, 1999).

Parton et al. (1988 et 1996) ont développé un modèle prédictif des émissions de N₂O par les sols (NGAS). Ce modèle comporte un module qui utilise la texture du sol, la

température du sol et le contenu en eau du sol, la disponibilité en azote et la respiration du sol. Li et al. (1992) ont modélisé les émissions de N_2O , CO_2 et N_2 à partir des sols agricoles. Dans ce modèle, un module d'estimation des émissions de N_2O par nitrification est couplé à la fois à un module prédictif de la décomposition de la matière organique du sol et à un module d'estimation des émissions de N_2O par dénitrification. Li et al. (1996) ont ensuite proposé leur modèle DNDC (dénitrification et décomposition) pour simuler la distribution régionale des émissions de N_2O et pour étudier les rôles respectifs de différents facteurs du milieu sur ces émissions. Ce modèle DNDC et le modèle ECOSYS sont ceux qui décrivent le plus précisément les processus microbiens du sol (Renault, 1999). Un modèle NLEAP- N_2O (Shaffer et al., 1991 ; Xu et al., 1998) a été développé pour décrire empiriquement l'influence des facteurs du milieu sur les émissions de N_2O et correspond à une transcription à l'échelle parcellaire de certains modèles utilisés pour prédire les émissions de N_2O aux échelles régionales (Renault, 1999). Müller et al. (1997) ont développé un modèle qui combine les effets des nitrates, de l'ammonium, de la température et de l'humidité du sol pour calculer les émissions de N_2O issues de la nitrification et de la dénitrification.

7.2 Estimation des émissions de N_2O par les sols à l'échelle d'un pays

Dans le cadre de accords de Kyoto, les pays industrialisés sont tenus de fournir une estimation de leurs émissions de N_2O . L'IPCC propose une méthodologie par défaut d'estimation des émissions de N_2O à partir des sols cultivés :

$$N_2O = [(F_{SN} + F_{AW} + F_{BN} + F_{CR}) \times EF_1] + F_{OS} \times EF_2$$

Avec :

N_2O Emissions directes de N_2O à partir des sols agricoles d'un pays ($kg\ N\ an^{-1}$)

EF_1 Facteur d'émissions directes par les sols ($kg\ N-N_2O\ kg^{-1}\ N\ apporté$)

F_{SN} N apporté sous forme de fertilisants ($kg\ N\ an^{-1}$)

F_{AW} N apporté par les effluents d'animaux, corrigé ($kg\ N\ an^{-1}$)

F_{BN} N fixé biologiquement dans le pays ($kg\ N\ an^{-1}$)

F_{CR} N provenant des résidus de culture enfouis ($kg\ N\ an^{-1}$)

EF_2 Facteur d'émissions directes par minéralisation des sols organiques mis en culture ($kg\ N-N_2O\ kg^{-1}\ an^{-1}$)

F_{OS} Surface de sols organiques mis en culture (ha)

Ce mode de calcul a été déterminé par l'analyse d'une banque de données comprenant environ 250 dispositifs expérimentaux dont l'essentiel en Amérique du Nord. Le coefficient EF1 a été défini à partir de la relation présentée dans la figure 21. Une première estimation des émissions de N₂O avec cette méthodologie conduit à des valeurs de 172 Gg N an⁻¹ en France (Fontelle et al., 1998 in Cellier et Laville, 1999) et à 12.8 Gg N an⁻¹ en Belgique (Van Moortel et al., 2000).

7.3 Estimation des émissions de N₂O par les sols à l'échelle planétaire

A cause de l'importance de NO et N₂O dans la chimie et la physique de l'atmosphère, il est nécessaire de pouvoir quantifier ces flux gazeux à l'échelle de la planète. Bouwman et al. (1993) ont développé une méthode d'estimation des émissions de N₂O à partir des sols sous végétation naturelle avec une résolution de 110 x 110 km². Ils ont développé un modèle dont la sortie est un indice sans dimension, compris entre 0 et 80, croissant avec les potentialités des sols à émettre N₂O. Les données d'entrée pour faire tourner ce modèle concernent le climat, le type de sol, la texture des sols et la végétation et sont obtenues à partir d'images satellite. Les résultats obtenus ont fait ressortir l'importance des variables climatiques sur les émissions de N₂O. Les indices les plus importants ont été obtenus par des sols tropicaux humides (Nitosols, Ferrassols). Les indices les plus élevés obtenus par les sols des climats tempérés étaient de l'ordre de 20, typiquement attribués au Luvisols couvrant des surfaces importantes. Pour passer à des prédictions quantitatives, des flux mesurés sur quelques sites ont été reliés à l'indice correspondant. Ainsi des émissions totales planétaires, en faisant l'hypothèse que les sols sont sous végétation naturelle, de 6.8 Tg N ha⁻¹ an⁻¹ dont 5.4 provenant des zones tropicales ont été obtenues.

Potter et al. (1993 et 1996) ont construit un modèle pour simuler la distribution mondiale des émissions de N₂O et de NO, appelé modèle CASA. Ce modèle ne fait pas la distinction entre la nitrification et la dénitrification comme source de N₂O. Il associe un modèle de production végétale à un modèle de fonctionnement physique et biologique du sol ; il tient compte des conditions climatiques et n'intègre pas directement la fertilisation azotée. Avec ce modèle, les émissions de N₂O par les sols ont été estimées à 6.1 Tg N an⁻¹.

7.4 Les modèles d'émissions de NO par les sols

Très peu de modèles prédictifs des émissions de NO sont disponibles dans la littérature. Galbally (1985) a proposé un modèle mathématique qui n'intègre pas les paramètres du sol qui contribuent à la variabilité spatiale et temporelle des émissions de NO à l'échelle de la parcelle.

Galbally et Johanson (1989) ont modélisé les flux de NO à partir d'études réalisées à la fois au champ et au laboratoire en intégrant uniquement des paramètres physiques du sol. Les paramètres chimiques et biologiques ne sont pas pris en considération.

Williams et al. (1992) ont proposé un modèle empirique qui repose sur un coefficient caractéristique du sol pondéré par l'effet de la température :

$$\text{NO} = A * e^{0.071T}$$

avec NO : émissions de NO ($\text{ng N m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

A : facteur déterminant les propriétés physico-chimiques du sol ($\text{ng N m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

T : température du sol ($^{\circ}\text{C}$)

8. CONCLUSION

Le protoxyde d'azote et l'oxyde nitrique sont deux constituants naturels de l'atmosphère qui interviennent dans la chimie de l'ozone, dans les phénomènes de pluies acides, dans l'effet de serre et les changements climatiques. Les sols, et notamment les sols agricoles, jouent un rôle prépondérant dans les émissions de ces gaz et leurs concentration dans l'atmosphère.

Au travers de cette synthèse bibliographique, nous avons montré qu'il reste actuellement de nombreuses incertitudes sur les sources et les puits de N_2O et de NO, et que l'importance respective de chacun des principaux mécanismes producteurs de ces gaz dans les sols (dénitrification et nitrification) et leur régulation sont encore mal définis. Ceci est principalement dû à la grande diversité des systèmes agricoles et à l'hétérogénéité du milieu sol qui rendent les études très complexes. L'essentiel des travaux de recherches sur ces composés traces a été consacré aux émissions de N_2O . Depuis quelques années seulement, des recherches sont développées pour étudier les émissions de NO par les sols et actuellement de nombreuses questions restent posées.

Jusqu'à un passé récent les travaux sur les émissions de N_2O ont porté principalement sur la dénitrification considérée comme la principale source de ce gaz et les mesures

d'émissions de N_2O ont été principalement réalisées en milieu relativement humide. Ces travaux ont permis d'acquérir de solides connaissances à des échelles macroscopique et microscopique quant au fonctionnement de la dénitrification et des émissions de N_2O en conditions anaérobies dans les sols. Des travaux plus récents ont montré que la nitrification peut également être une source de N_2O dans les sols sans que l'importance de ces émissions ait pu être évaluée dans différentes conditions agro-climatiques. Malgré, la prise en considération récente de l'importance des émissions de NO par les sols, celles-ci ne sont pour la plupart du temps pas prises en compte dans les bilans azotés.

Dans le but de maîtriser et de réduire les émissions de ces gaz, il est important d'avoir une évaluation plus précise des différentes sources liées au sol, notamment les parts respectives de la nitrification et de la dénitrification, et de connaître l'effet des facteurs du milieu, plus particulièrement ceux liés aux pratiques agricoles sur lesquelles il est possible d'intervenir (Germon et al., 1999).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abraham, Z. H. M., Lowe, D. J., and Smith, B. E., 1993. Purification and characterization of the dissimilatory nitrite reductase from *Alcaligenes xylooxidans subsp. xylooxidans* (N.C.I.M.B. 11015): evidence for the presence of both type 1 and type 2 copper centres. *Biochem. J.* 295, 587-593.
- Aleem, M.I.H., 1975. Biochemical reaction mechanisms in sulphur oxidation by chemosynthetic bacteria. *Plant and Soil* 43, 556-558.
- Anderson, I. C., and Levine, J. S., 1986. Relative rates of nitric oxide and nitrous oxide production by nitrifiers, denitrifiers, and nitrate respirers. *Appl. Environ. Microbiol.* 51(5), 938-945.
- Anderson, I.C., Burdige, D., and Homstead, J., 1991. A comparison of nitrogen trace gas production by autotrophic and heterotrophic nitrifiers. In: 10th International Symposium on Environmental Biogeochemistry Abstracts, San Fransisco, pp.2.
- Anthonisen, A. C., Loehr, R. C., Prakasan, T. B. S., and Srinath, E. G., 1976. Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *J. W. P. C. F.* 48(5), 835-852.
- Arciero, D. M., and Hooper, A. B. 1993. Hydroxylamine oxidoreductase from *Nitrosomonas europaea* is a multimer of an *octa*-heme subunit. *J. Biol. Chem.* 268(20), 14645-14654.
- Arciero, D. M., and Hooper, A. B., 1997. Evidence for a crosslink between *c*-heme and a lysine residue in cytochrome *P*₄₆₀ of *Nitrosomonas europaea*. *FEBS Lett.* 410, 457-460.
- Arciero, D. M., Golombek, A., Hendrich, M. P., and Hooper, A. B., 1998. Correlation of optical and EPR signals with the *P*₄₆₀ heme of hydroxylamine oxidoreductase from *Nitrosomonas europaea*. *Biochemistry* 37(2), 523-529.
- Arya, S.P., 1988. Introduction to micrometeorology, Academic press, Inc. ed, San Diego.
- Aulakh, M. S., Rennie, D. A., and Paul, E. A., 1984. The influence of plant residues on denitrification rates in conventional and zero tilled soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 48, 790-794.
- Aulakh, M. S., Doran, J. W., and Mosier, A. R., 1992. Soil denitrification significance, measurement, and effects of management. *Adv. Soil Sci.* 18, 1-57.

-
- Baumgärtner, M., and Conrad, R., 1992. Role of nitrate and nitrite for production and consumption of nitric oxide during denitrification in soil. *FEMS Microbiol Ecol.* 101, 59-65.
- Betlach, M. R., and Tiedje, J. M., 1981. Kinetic explanation for accumulation of nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide during bacterial denitrification. *Appl. Environ. Microbiol.* 42(6), 1074-1084.
- Bleakley, B.H., and Tiejje, J.M., 1982. Nitrous oxide production by organisms other than nitrifiers or denitrifiers. *Appl. Environ. Microb.* 44, 1342-1348.
- Bock, E., Koops, H. P., and Harms, H., 1986. Cell biology of nitrifying bacteria. In: Prosser, J.J. (Ed.), *Nitrification* IRL Press, Oxford, pp. 17-38.
- Bock, E., Koops, H. P., Möller, U. C., and Rudert, M., 1990. A new facultatively nitrite oxidizing bacterium, *Nitrobacter vulgaris sp. nov.* *Arch. Microbiol.* 153, 105-110.
- Bouwman, A. F., 1990. Analysis of global nitrous oxide emission from terrestrial natural and agro ecosystems. *Congress of Soil Sci.* 2, 261-266.
- Bouwman, A. F., Fung, I., Matthews, E., and John, J., 1993. Global analysis of the potential for N₂O production in natural soils. *Global Biogeochem. Cy.* 7(3), 557-597.
- Bouwman, A. F., 1995. Compilation of a global inventory of emissions of nitrous oxide.
- Bouwman, A. F., 1996. Direct emissio of nitrous oxide from agricultural soils. *Nutr. Cycl. Agroecosys.* 46, 53-70.
- Bremner, J. M., and Blackmer, A. M., 1978. Nitrous oxide: Emission from soils during nitrification of fertilizer nitrogen. *Science* 199, 295-296.
- Bremner, J. M., and Blackmer, A. M., 1981. Terrestrial nitrification as a source of atmospheric nitrous oxide. In: Celwich, C.C., (Ed.), *Denitrification, nitrification and atmospheric N₂O*, J. Wiley and L. Sons, Chichester, pp. 151-170.
- Bronson, K. F., and Mosier, A. R., 1991. Effect of encapsulated calcium carbide on dinitrogen, nitrous oxide, methane and carbon dioxide emissions from flooded rice. *Biol. Fertil. Soils* 11, 116-120.

- Cellier, P., and Laville, P., 1999. Les émissions de N₂O par les sols agricoles en France : quelle évaluation possible ? C.R. Acad. Agri. de France 85,177-192.
- Chèneby, D., Philippot, L., Hartmann, A., Hénault, C., and Germon, J.C., 2000. 16S rDNA analysis for characterization of denitrifying bacteria isolated from three agricultural soils. FEMS Microbiol. Ecol. 1176, 1-8.
- Conrad, R., 1990. Flux of NO_x between Soil and atmosphere: importance and Soil metabolism. In: Revsbech, N.P. and Sorensen, J. (Ed.). Denitrification in soil and sedimentol. Plenum Press, New York, 1, pp. 105-127.
- Corbet AS, 1935. The formation of hyponitrous acid as an intermediate compound in the biological or photochemical oxidation of ammonia to nitrous acid. II. Microbiological oxidation. Agric. Res., 1086-1096.
- Coyle, C.L., Zumft, W.G., Kroneck, P.M.H., Körner, H., and Jakob, W., 1985. Nitrous oxide from denitrifying *Pseudomonas perfectomarina*: purification and properties of a novel multicopper enzyme. Eur. J. Biochem. 153, 459-167.
- Crutzen, P. J., 1979. The role of NO and NO₂ in the chemistry of the trophosphere and stratosphere. Ann. Rev. Earth Planet. Sci. 7, 443-472.
- Davidson, E. A., 1991. Fluxes of nitrous oxide and nitric oxide from terrestrial ecosystems. Microbial production and consumption of greenhouse grass: methane, nitrogen oxides and halomethanes, J. E. Rogers and W. B. Withman, eds., Washington, 219-235.
- Davidson, E. A., Swank, W. T., and Terry, T. O., 1986. Distinguishing between nitrification and denitrification as sources of gaseous nitrogen production in soil. Appl. Environ. Microbiol. 52(6), 1280-1286.
- Davidson, E. A., and Kinglerlee, W., 1997. A global inventory of nitric oxide emissions from soils. Nutr. Cycl. Agroecosys. 48, 37-50.
- Delorme, S., 1995. Les émissions de protoxyde d'azote (N₂O) par la jachère énergétique. ENESAD, Quétigny. 39 p.
- Denariáz, G., Payne, W. J., and LeGall, J., 1991. The denitrifying nitrite reductase of *Bacillus*

halodenitrificans. Biochem. Biophys. Acta 1056, 225-232.

Doxtader, K. G., 1965. Nitrification by heterotrophic micro-organisms. Cornell University, New-York.

Doxtader KG, Alexander M., 1966. Nitrification by heterotrophic soil micro-organisms. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 30:351-355.

Drozd, J. W., 1976. Energy coupling and respiration in *Nitrosomonas europaea*. Arch. Microbiol. 110, 257-262.

Dunglas, J., 1993. Effet de serre et activités humaines (gaz à effet de serre d'origine anthropique). Sécher. 4(4), 211-220.

Eichner, M.J., 1990. Nitrous oxide emissions from fertilized soils: summary of available data. J. Environ. Qual. 19, 272-280.

Ferguson, S. J., 1994. Denitrification and its control. Anton. Leeuw. 66, 89-110.

Firestone, M. K., and Davidson, E. A., 1989. Microbiological basis of NO and N₂O production and consumption in soil. In: Andrea, M.O., and Schimel, D.S., (Ed.), Exchange of trace gases between terrestrial ecosystems and the atmosphere, J. Wiley and L. Sons, Chichetser, United Kingdom, pp. 7-21.

Focht, D. D., 1974. The effect of temperature, pH, and aeration on the production of nitrous oxide and gaseous nitrogen - a zero order kinetic model. Soil Sci. 118(3), 173-179.

Fontelle, J.P., Chang, J.P., Allemand, N., Audoux, N., Lévy, C., Rivière, E., 1998. Inventaire des émissions dans l'air en France au cours de la période 1990-96. CITEPA, Paris.

Fujiwara, T., and Fukumori, Y., 1996. Cytochrome *cb* type nitric oxide reductase with cytochrome *c* oxidase activity from *Paracoccus denitrificans* ATCC35512. J. Bacteriol. 178(7), 1866-1871.

Galbally, I.E., 1985. The emission of nitrogen to the remote atmosphere. The biochemical cycling of sulfur and nitrogen in the remote atmosphere, I.E. Galbally, R.J. Charlson, M.O. Andreae and H. Rohde, ed., Reidel Publishing Company, Dordrecht, 27-53.

- Galbally, I. E., and Johansson, C., 1989. A model relating measurements of rates of nitric oxide production and field measurements of nitric oxide emission from soils. *J. Geophys. Res.* 94(D5), 6473-6480.
- Gamble, T. N., Betlach, H. R., and Tiedje, J. M., 1977. Numerically dominant denitrifying bacteria from world soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 33(4), 926-939.
- Garcia, J.L., 1973. Séquence des produits formés au cours de la dénitrification dans les sols de rizières du Sénégal. *Ann. Microbiol.* 124 B, 351-362
- Garrido, F., Hénault, C., Guérin, N., Chèneby, D., and Germon, J. C., 1996. Soils abilities to reduce nitrous oxide: an indicator of in "situ" N₂O emission. Transactions of the 9th nitrogen workshop, Braunschweig, Germany, 487.
- Germon J.C., Hénault C., Garrido F., Reau R., 1999. Mécanismes de production, régulation et possibilités de limitation des émissions de N₂O à l'échelle agronomique. *C.R. Acad. Agri. de France* 85,148-162.
- Goodroad, L. L., and Keeney, D. R., 1984. Nitrous oxide production in aerobic soils under varying pH, temperature and water content. *Soil Biol. Biochem.* 16(1), 39-43.
- Granli, T., and Bockman, O. C., 1994. Nitrous oxide from agriculture. *Norw. J. Agr. Sci.* 12(supplément), 7-128.
- Grant, R. F., 1991. A technique for estimating denitrification rates at different soil temperatures, water contents, and nitrate concentrations. *Soil Sci.* 152(1), 41-52.
- Grant, R. F., Juma, N. G., and McGill, W. B., 1993. Simulation of carbon and nitrogen transformations in soil: microbial biomass and metabolic products. *Soil Biol. Biochem.* 25(10), 1331-1338.
- Grant, R. F., 1995. Mathematical modelling of nitrous oxide evolution during nitrification. *Soil Biol. Biochem.* 27(9), 1117-1125.
- Grundmann, G. L., Lensi, R., and Chalamet, A., 1993. Delayed NH₃ and NO₂ uptake by maize leaves. *New Phytol.* 124, 259-263.
- Guiraud, G., 1984. Contribution du marquage isotopique à l'évaluation des transferts d'azote

entre les compartiments organiques et minéraux dans les systèmes sol-plante. Thèse, Paris 6, 335 p.

Haynes, R. J., 1986. Nitrification. Mineral nitrogen in the plant-Soil system, R. J. Haynes and O. F.L., eds., Academic Press, New-York, 127-165.

Hénault, C., 1993. Quantification de la dénitrification dans les sols à l'échelle de la parcelle cultivée, à l'aide d'un modèle prévisionnel, ENSA, Montpellier. 108p.

Hénault, C., and Germon, J. C., 1995. Quantification de la dénitrification et des émissions de protoxyde d'azote (N₂O) par les sols. *Agronomie* 15, 321-355.

Hénault, C., Devis, X., Lucas, J.L., and Germon, J.C., 1998. Influence of different agricultural practices (type of crop, form of N-fertilizer) on soil nitrous oxide emissions. *Biol. Fertil. Soils*. 27, 299-306.

Hommel, N. G., Russell, S. A., Bottomley, P. J., and Arp, D. J., 1998. Effects of soil on ammonia, ethylene, chloroethane, and 1,1,1-trichloroethane oxidation by *Nitrosomonas europaea*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(4), 1372-1378.

Hooper A.B., Debey P., Andersson K.K., Balny C., 1983. Heme P₄₆₀ of hydroxylamine oxidoreductase of *Nitrosomonas*. Reaction with CO and H₂O₂. *Eur. J. Biochem.* 134:83-87.

Hoppert, M., Mahony, T. J., Mayer, F., and Miller, D. J., 1995. Quaternary structure of the hydroxylamine oxidoreductase from *Nitrosomonas europaea*. *Arch. Microbiol.* 163, 300-306.

Hulse, C. L., and Averill, B. A., 1990. Isolation of a high specific activity pink, monomeric nitrous oxide reductase from *Achromobacter cycloclastes*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 166(2), 729-735.

Hyman, M. R., and Wood, P. M., 1985. Suicidal inactivation and labelling of ammonia mono oxygenase by acetylene. *Biochem. J.* 227, 719-725.

Hyman M.R., and Wood P.M., 1983. Methane oxidation by *Nitrosomonas europaea*. *Biochem. J.* 212:31-37.

Hyman, M. R., and Wood, P. M., 1984. Ethylene oxidation by *Nitrosomonas europaea*. *Arch. Microbiol.* 137, 155-158.

IPCC, 1995. Climate change 1994. Report of working groups I and III of the intergovernmental panel on climate change, Cambridge University Press, UK, 339p.

IPCC, 1996. Climate change 1995. The science of climate change, contribution of working group to the second assessment report of the intergovernmental panel on climate change, Cambridge University Press, UK, 572p.

Iwasaki, H., and Matsubara, T., 1971. Cytochrome *c*₅₅₇ (551) and cytochrome *cd* of *Alcaligenes faecalis*. J. Biochem. 69, 847-857.

Johannssen, W., Gerberding, H., Rohde, M., Zaborosch, C., and Mayer, F., 1991. Structural aspects of the soluble NAD dependent hydrogenase isolated from *Alcaligenes eutrophus* H16 and from *Nocardia opaca* 1b. Arch. Microbiol. 155, 303-308.

Kastrau, D. H. W., Heiss, B., Kroneck, P. M. H., and Zumft, W. G., 1994. Nitric oxide reductase from *Pseudomonas stutzeri*, a novel cytochrome *bc* complex. Phospholipid requirement, electron paramagnetic resonance and redox properties. Eur. J. Biochem. 222, 293-303.

Kawasaki, S., Arai, H., Kodoma, T., and Igarashi, Y., 1997. Gene cluster for dissimilatory nitrite reductase (*nir*) for *Pseudomonas aeruginosa*: sequencing and identification of a locus for heme *d*₁ biosynthesis. J. Bacteriol. 179(1), 235-242.

Keerthisinghe, D. G., Freney, J. R., and Mosier, A. R., 1993. Effect of wax-coated calcium carbide and nitrapyrin on nitrogen loss and methane emission from dry-seeded flooded rice. Biol. Fertil. Soils 16, 71-75.

Killham, K., 1986. Heterotrophic nitrification. In: Prosser, J.I., (Ed.), Nitrification, IRL Press, pp. 1-16.

Kirstein, K., and Bock, E., 1993. Close genetic relationship between *Nitrobacter hamburgensis* nitrite oxidoreductase and *Escherichia coli* reductases. Arch. Microbiol. 160, 447-453.

Kleiner, D., 1985. Bacterial ammonium transport. FEMS Microbiol. Rev., 32, 87-100.

Klemedtsson, L., Svensson, B. H., and Rosswall, V., 1988. A method of selective inhibition to

distinguish between nitrification and denitrification as sources of nitrous oxide in soil. *Biol. Fertil. Soils* 6(6), 112-119.

Klotz, M. G., Alzerreca, J., and Norton, J. M., 1997. A gene encoding a membrane protein exists upstream of the *amoA/amoB* genes in ammonia oxidizing bacteria: a third member of the amo operon. *FEMS Microbiol. Lett.* 150, 65-73.

Li, C., Frohling, S., and Frohling, T. A., 1992. A model of nitrous oxide evolution from soil driven by rainfall events: I. Model structure and sensitivity. *J. Geophys. Res.* 97(D9), 9759-9776.

Li, C., Narayanan, V., and Harriss, R. C., 1996. Model estimates of nitrous oxide emissions from agricultural lands in the United States. *Global Biogeochem. Cy.* 10(2), 297-306.

Linn, D. M., and Doran, J. W., 1984. Effect of water filled pore space on carbon dioxide and nitrous oxide production in tilled and nontilled soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 48, 1267-1272.

Logan, J. A., 1983. Nitrogen oxides in the troposphere: global and regional budgets. *J. Geophys. Res.* 88(C15), 10,785-10,807.

Lipschultz, F., Zafiriou, O. C., Wofsy, S. C., McElroy, M. B., Valois, F. W., and Watson, S. W., 1981. Production of NO and N₂O by Soil nitrifying bacteria. *Nature* 294, 641-643.

MacTavish, H., Fuchs, J. A., and Hooper, A. B., 1993. Sequence of the gene coding for ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea*. *J. Bacteriol.* 175(8), 2436-2444.

Mahne, I., and Tiedje, J. M., 1995. Criteria and methodology for identifying respiratory denitrifiers. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1110-1115.

Masson, P., Arciero, D. M., Hooper, A. B., and Balny, C., 1990. Electrophoresis at elevated hydrostatic pressure of the multiheme hydroxylamine oxidoreductase. *Electrophoresis* 11, 128-133.

Masuko, M., Iwasaki, H., Sakurai, T., Suzuki, S., and Nakahara, A., 1984. Characterization of nitrite reductase from a denitrifier *Alcaligenes Sp.* NCIB 1105. A novel copper protein. *J. Biochem.* 96, 447-454.

Mayer, F., Elliott, J. I., Sherod, D., and Ljungdahl, L. G., 1982. Formyltetrahydrofolate

synthase *Clostridium thermoaceticum*. An electron microscopic study and specific interaction of the enzyme with ATP and ADP. *Eur. J. Biochem.* 124, 397-404.

McKenney, D. J., Shuttleworth, K. F., Vriesacker, J. R., and Findlay, W. I., 1982. Production and loss of nitric oxide from denitrification in anaerobic brookston clay. *Appl. Environ. Microbiol.* 43(3), 534-541.

Miller, L. G., Coutaki, M. D., Oremland, R. S., and Ward, B. B., 1993. Selective inhibition of ammonium oxidation and nitrification-linked N₂O formation by methyl fluoride and dimethyl ether. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 2457-2464.

Moir, J. W. B., Crossman, L. C., Spiro, S., and Richardson, D. J., 1996. The purification of ammonia monooxygenase from *Paracoccus denitrificans*. *FEBS Lett.* 387, 71-74.

Mollina, J.A.E., Clapp, C.E., Shaffer, M.J., Chichester, F.W., and Larson, W.E., 1983. NCSOIL, a model of nitrogen and carbon transformations in soil: description, calibration, and behavior. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 47, 85-91.

Müller C., Sherlock R.R., Williams P.H., 1997. Mechanistic model for nitrous oxide emission via nitrification and denitrification. *Biol. Fertil. Soils* 24:231-328.

Murray RE, Knowles R, Sous presse 2000. Influence of pH on production and consumption of NO by an agricultural soil under denitrifying conditions. *Biol. Fertil. Soils*.

Myrold, D.D., 1988. Denitrification in ryegrass and winter wheat cropping systems of western Oregon. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 52: 412-416.

Nägele W., Conrad R., 1990 Influence of pH on the release of NO and N₂O from fertilized and unfertilized soil. *Biol. Fertil. Soils* 10:139-144.

Oremland, R. S., and Culbertson, C. W., 1992. Evaluation of methyl fluoride and dimethyl ether as inhibitors of aerobic methane oxidation. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(9), 2983-2992.

Papen H., Hellmann B., Papke H., Rennenberg H., 1991 Emission of N-oxides from acid irrigated and limed soils of a coniferous forest in Bavaria. In: Oremland RS (Ed.) Tenth International Symposium on Environmental Biogeochemistry, U.S. Geol. Surv., San Francisco, California, 1, pp. 245-260.

Parton, W. J., Mosier, A. R., Ojima, D. S., Valentine, D. W., Schimel, D. S., Weier, K., and Kulmala, A. E., 1996. Generalized model for N₂ and N₂O production from nitrification and denitrification. *Global Biogeochem. Cy.* 10(3), 401-412.

Parton, W. J., Mosier, A. R., and Schimel, D. S., 1988. Rates and pathways of nitrous oxide production in a shortgrass steppe. *Biogeochemistry* 6, 45-58.

Pennock, D., 1999. A scaling-up to the Landscape. In: Desjardins, R. L., Keng J. C., and Haugen-Kozyra, K. (Ed.), *International Workshop on reducing nitrous oxide emissions from agroecosystems*. Banff, Alberta, Canada.

Philippot, L., Clays-Josserand, A., Lensi, R., Trinsoutreau, I., Normand, P., and Potier, P., 1997. Purification of the dissimilative nitrate reductase of *Pseudomonas fluorescens* and the cloning and sequencing of its corresponding genes. *Biochim. Biophys. Acta* 1350, 272-276.

Philippot, L., and Hojberg, O., 1999. Dissimilatory nitrate reductase in bacteria. *Biochem. Biophys. Acta* 1446, 1-23.

Philippot, L., Mirleau, P., Mazurier, S., Siblot, S., Hartmann, A., Lemanceau, P., and Germon, J. C., soumis en 2000. Genetic and transcriptional analyses of *Pseudomonas fluorescens* denitrifying clusters containing the *nar*, *nir*, *nor* and *nos* genes.

Potter, C. S., Randerson, J. T., Field, C. B., Matson, P. A., Vitousek, P. M., Mooney, H. A., and Klooster, S. A., 1993. Terrestrial ecosystem production: a process model based on global satellite and surface data. *Global Biogeochem. Cy.* 7(4), 811-841.

Potter, C. S., Matson, P. A., Vitousek, P. M., and Davidson, E. A., 1996. Process modeling of controls on nitrogen trace gas emissions from soils worldwide. *J. Geophys. Res.* 101(D1), 1361-1377.

Pratt, P. F., Davis, S., and Laag, A. E., 1977. Manure management in an irrigated bassin relative to salt leachate to ground water. *J. Environ. Qual.* 6(4), 397-401.

Prosser, J. I., 1986. *Nitrification*, IRL Press, Oxford.

Rees M.K., 1968. Studies of the hydroxylamine metabolism of *Nitrosomonas europaea*. II. Molecular properties of the electron transport particle, hydroxylamine oxidase. *Biochem.*

7:366-372.

- Remacle, J., 1977. Microbial transformation of nitrogen in forests. *Oecol. Plant.* 12(1), 33-43.
- Remde, A., Slemr, F., and Conrad, R., 1989. Microbial production and uptake of nitric oxide in Soil. *FEMS Microbiol Ecol.* 62, 221-230.
- Renault, P., Parry, S., Sierra, J., and Bidel, L., 1997. Les transferts de gaz dans les sols, implications environnementales et agronomiques. *Courrier de l'environnement de l'INRA* 32, 33-50.
- Renault P., 1999 Les modèles opérationnels d'émissions de N₂O par les sols aux échelles régionales. *C.R. Acad. Agri. de France* 85:163-176.
- Ritchie, G. A. F., and Nicholas, D. J. D., 1972. Identification of the sources of nitrous oxide produced by oxidative and reductive processes in *Nitrosomonas europaea*. *Biochem. J.* 126, 1181-1191.
- Robertson, G.P., 1989. Nitrification and denitrification in humid tropical ecosystems: Potential controls on nitrogen retention, in mineral nutrient. *Tropical Forest and Savanna Ecosystems*, J. Procter, eds, Blackwell Scientific, Boston, Mass., 55-69.
- Robertson, L. A., Dalsgaard, T., Revsbech, N. P., and Kuenen, J. G., 1995. Confirmation of aerobic denitrification in batch cultures using gas chromatography and ¹⁵N mass spectrometry. *FEMS Microbiol Ecol.* 18, 113-120.
- Rohde, M., Lim, F., Wallace, J.C., 1986. Pyruvate carboxylase from *Saccharomyces cerevisiae*. Quaternary structure, effects of allosteric ligands and binding of avidin. *Eur. J. Biochem.* 156, 15-22.
- Rolston, D. E., Rao, P. S. C., Davidson, J. M., and Jessup, R. E., 1984. Simulation of denitrification losses of nitrate fertilizer applied to uncropped, cropped, and manure amended field plots. *Soil Sci.* 137(4), 270-279.
- Sallade, Y. E., and Sims, J. T., 1992. Evaluation of thiosulfate as a nitrification inhibitor for manures and fertilizers. *Plant Soil* 147, 283-291.
- Sayavedra-Soto, L. A., Hommes, L. A., and Arp, D. J., 1994. Characterization of the gene

encoding hydroxylamine oxidoreductase in *Nitrosomonas europaea*. J. Bacteriol. 176(2), 504-510.

Schlesinger, W. H., 1991. Biogeochemistry an analysis of global change, Academic press, London.

Schmidt, E. L., and Belser, L. W., 1982. Nitrifying bacteria, , Madison USA.

Shaffer, M.J., Halvorson, A.D. and Pierce F.J., 1991. Nitrate leaching and economic analysis package (NLEAP): model description and application. Managing Nitrogen for Grounwater Quality and Farm Profitability, Soil Sci. Soc. Am. J. ed, 285-322.

Shears J.H., Wood P.M., 1985. Spectroscopic evidence for a photosensitive oxygenated state of ammonia mon oxygenase. Biochem. J. 226:499-507

Smith K.A., 1980. A model of the extent of anaerobic zones in aggregated soils, and its potential application to estimates of denitrification. J. Soil Sci. 31:263-277.

Smith, M. S., and Zimmerman, K., 1981. Division S3 soil microbiology and biochemistry: Nitrous oxide production by nondenitrifying soil nitrate reducers. Soil Sci. Soc. Am. J., 45, 865-871.

Smith, K. A., and Arah, J. R. M., 1990. Losses of nitrogen by denitrification and emissions of nitrogen oxides from soils. Fert. Soc. Proc. 299, 1-34.

Spieck, E., Ehrich, S., Aamand, J., and Bock, E., 1998. Isolation and immunocytochemical location of the nitrite-oxidizing system in *Nitrospira moscoviensis*. Arch. Microbiol. 169, 225-230.

Stanford, G., Dziena, S., Vander Pol, R.A., 1975. Effect of temperature on denitrification rate in soil. Soil Sci. Amer. Proc. 39, 867-870.

Stevens, R. J., Laughlin, R. J., Burns, L. C., Arah, J. R. M., and Hood, R. C., 1997. Measuring the contributions of nitrification and denitrification to the flux of nitrous oxide from soil. Soil Biol. Biochem. 29, 139-151.

Stouthamer, A. H., 1988. Dissimilatory reduction of oxidized nitrogen cempounds. In: Zehnder, A.J.B., (Ed.), Biology of anaerobic microorganisms, J. Willey Sons, Chichester, pp.

245-303.

Sundermeyer-Klinger, H., Meyer, W., Warninghoff, B., and Bock, E., 1984. Membrane bound nitrite oxidoreductase of *Nitrobacter*: evidence for a nitrate reductase system. *Arch. Microbiol.* 140, 153-158.

Suzuki, I., Dular, U., and Kwok, S.C., 1974. Ammonia or ammonium ions as substrate for oxidation by *Nitrosomonas europaea* cells and extracts. *J. Bacteriol.* 120, 556-558.

Terry, K. T., and Hooper, A. B., 1981. Hydroxylamine oxidoreductase: a 20-heme; 200000 molecular weight cytochrome *c* with unusual denaturation properties which forms a 63 000 molecular weight monomer after heme removal. *Biochemistry* 20, 7076-7032.

Tiedje, J. M., 1988. Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. In: Zehnder, A.J.B., (Ed.), *Biology of anaerobic microorganisms*, J. Wiley and Sons, New York, pp. 179-244.

Tortoso A.C., Hutchinson G.L., Guenzi W.D., 1986. Nitric and nitrous oxide emissions during nitrification and denitrification in soil. *Agronomy Aso.*, ed, *Agronomy Abstracts*, Madison, pp 190-191.

Tortoso, A. C., and Hutchinson, G. L., 1990. Contributions of autotrophic and heterotrophic nitrifiers to soil NO and N₂O emissions. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(6), 1799-1805.

Tsien, H. C., Lambert, R., and Laudelout, H., 1968. Fine structure and the localisation of the nitrite oxidizing system in *Nitrobacter winogradskyi*. *Anton. Leeuw.* 34, 483-494.

Van Moortel, E., Boeckx, P., and Van Cleemput O. 2000. Inventory of nitrous oxide emissions from agriculture in Belgium calculations according to the revised 1996 Intergovernmental Panel on Climate Change guidelines. *Biol. Fertil. Soils*; 30, 500-509.

Wackett L.P., Hartweg E.A., King J.A., Orme-Johnson W.H., Walsh C.T., 1987. Electron microscopy of nickel containing methanogenic enzymes: methyl reductase and F₄₂₀ reducing hydrogenase. *J. Bacteriol.* 169:718-727.

Watson, S. W., 1971. Reisolation of *Nitrosospira briensis* S. Winogradsky and *H. Winogradsky* 1933. *Arch. Microbiol.* 75, 179-188.

Wehrfritz, J. M., Reilly, A., Spiro, S., and Richardson, D. J., 1993. Purification of hydroxylamine oxidase from *Thiosphaera pantotropha*. FEBS Lett. 335(2), 246-250.

Weier, K. L., MacRae, I. C., and Myers, R. J. K., 1993. Denitrification in a clay soil under pasture and annual crop: estimation of potential losses using intact soil cores. Soil Biol. Biochem. 25(8), 991-997.

Williams E.J., Parrish D.D., Fehsenfeld C.F., 1987 Determination of nitrogen oxide emissions from soils: results from a grassland site in Colorado, united states. J. Geophys. Res. 92:2173-2179.

Williams, E. J., Hutchinson, G. L., and Fehsenfeld, F. C., 1992. NO_x and N₂O emissions from soil. Global Biogeochem. Cy. 6(4), 351-388.

Wingen, L. M., and Finlayson-Pitts, B. J., 1998. An upper limit on the production of N₂O from the reaction of O(1D) with CO₂ in the presence of N₂. Geophys. Res. Lett. 25(4), 517-520.

Wood, P. M., 1986. Nitrification as a bacterial energy source. In: Prosser, J.I., (Ed.), Nitrification, IRL Press, Oxford, pp. 39-62.

Xu, C., Shaffer, M.J., Al-Kaisi, M., 1998. Simultaing the impact of management practices on nitrous oxide emissioins. Soil Sci. Soc. Am. J. 62, 736-742.

Yamanaka, T., and Fukumori, Y., 1988. The nitrite oxidizing system of *Nitrobacter winogradskyi*. FEMS Microbiol. Rev., 54, 259-270.

Yamanaka, T., Shinra, M., Takahashi, K., and Shibasaka, M., 1979. Highly purified hydroxylamine oxidoreductase derived from *Nitrosomonas europaea*. J. Biochem. 86, 1101-1108.

Yoshida, T., and Alexander, M., 1970. Nitrous oxide formation by *Nitrosomonas europaea* and heterotrophic micro-organisms. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 34, 880-882.

Zafiriou, O. C., and Hanley, Q. S., 1989. Nitric oxide and nitrous oxide production and cycling during dissimilarory nitrite reduction by *Pseudomonas perfectomarina*. J. Biol. Chem. 264(10), 5694-5699.

Zumft, W. G., Gotzmann, D. J., and Kroneck, P. M. H., 1987. Type 1, blue copper proteins constitute a respiratory nitrite reducing system in *Pseudomonas aureofaciens*. Eur. J. Biochem. 168, 301-307.

Zumft, W. G., Döhler, K., Körner, H., Löchelf, S., Viebrock, A., and Frunzke, K., 1988. "Defects in cytochrome *cd₁* dependent nitrite respiration of transposon *Tn₅* induced mutants from *Pseudomonas stutzeri*. Arch. Microbiol. 149, 492-498.

Zumft, W. G., Viebrock-Sambale, A., and Braun, C., 1990. Nitrous oxide reductase from denitrifying *Pseudomonas stutzeri*: genes for copper-processing and properties of the deduced products, including a new member of the family of ATP/GTP-binding proteins. Eur. J. Biochem. 192, 591-599.

Zumft, W. G., and Walter, G., 1994. Current topics in the biochemistry and genetics of bacterial denitrification. Nova Acta Leopold 70(288), 237-249.

Zumft, W. G., 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61(4), 533-536.

CHAPITRE 2

Inhibitory capacities of acetylene on nitrification in two agricultural soils

Short communication

Garrido F.¹, Hénault C.¹, Gaillard H.² and Germon J.C.¹

¹ INRA - CMSE, Laboratoire de Microbiologie des Sols, 17 rue Sully, BP 1540, 21034 Dijon Cedex, France.

² INRA, Service d'Etude des Sols et de la Carte Pédologique de France, Centre de Recherche d'Orléans, Ardon, 45160 Olivet, France.

Soil Biology and Biochemistry

(Accepted 21 February 2000)

Abstract

Acetylene is currently used to distinguish between the relative contribution of nitrification and denitrification to soil emissions of the greenhouse gas, N₂O. The basis of this method is that acetylene at low partial pressures inhibits nitrification without affecting N₂O reduction. This paper reports experiments where low acetylene partial pressures were insufficient to totally inhibit nitrification in an hypercalcareous rendosol at water potentials higher than -3.5 MPa while they were always sufficient in a redoxic luvisol.

Key words

Nitrification ; Soil ; Acetylene ; Water potentials

Acetylene is currently used to distinguish between the relative contribution of nitrification and denitrification to soil emissions of the greenhouse gas, N_2O (Klemmedtsson *et al.*, 1988). The basis of this method is that acetylene at low partial pressures inhibits nitrification without affecting N_2O reduction. In soils, the low acetylene partial pressures generally used to inhibit nitrification are between 5 and 100 Pa. Acetylene is also frequently used to measure total denitrification by blocking nitrous oxide reduction at partial pressures higher than 1 kPa (Knowles, 1982). We report experiments where low acetylene partial pressures were insufficient to totally inhibit nitrification.

Soil samples were taken from the top horizon (0-20 cm) of two agricultural soils : (i) an hypercalcareous rendosol (48°50N, 2°15E) with 32.4% clay, 2.03% organic C, 74.2% total chalky calcareous, pH 8.1, and (ii) a redoxic luvisol (47°16N, 5°18E) with 20.0% clay, 1.08 % organic C, <1% total calcareous and a pH 6.0. Hydric potential curves were established on each soil sieved through 1 mm (fig 1).

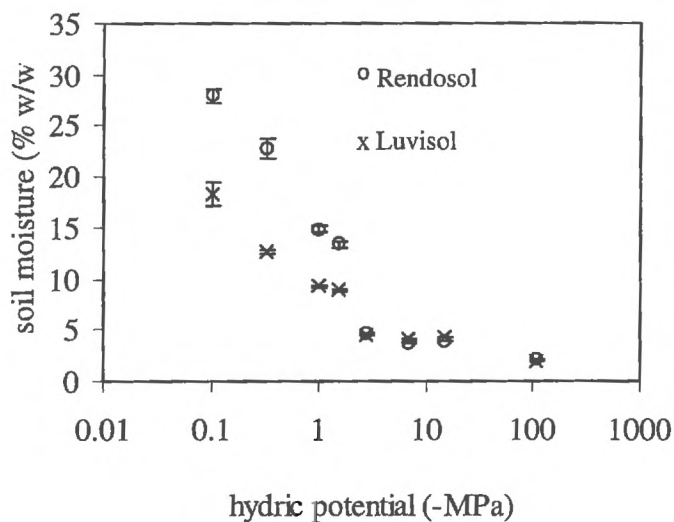


Fig.1: Hydric characterisation of the rendosol and the luvisol. Error bars are the standard errors of means (n=3) or are smaller than the symbols.

The rendosol was sampled in July 1995 (moisture 22.3 % w/w), and the luvisol in December 1997 (moisture 32.9 % w/w). Samples of the rendosol were stored in sampling conditions at 4°C while samples of the luvisol were stored at 4°C either in the sampling or in two dry conditions (7 and 12 % w/w). The fresh samples of the two soils were sieved (1mm) and air-

dried to water contents of 4.4 and 6.0 % (w/w), respectively, and mixed with 1 ml of an ammonium sulfate solution (1.79M) to obtain soil moistures of 5.4 and 6.9 % (w/w), respectively, and ammonium contents of 500 and 530 $\mu\text{g N kg}^{-1}$ soil, respectively. Samples (5 g) of both soil preparations were incubated for 15 days at 20°C in tightly-closed 37 ml flasks containing O₂ at the surrounding concentration and acetylene at partial pressures of 0, 0.1, 1, 10, 100, 1000 or 10000 Pa. Soil mineral N was determined at the beginning and end of the incubation using three replicates.

To establish the gradients of soil water potential, batches of 100 g of the rendosol stored under field moisture conditions were mixed (i) with 1ml of an ammonium sulfate solution (3.6M) and dried with a cool air thermoventilator to obtain soil samples at moistures of 4.9, 14.2 and 19.5 % (w/w) respectively, (ii) with 6 ml of an ammonium sulfate solution (0.6M) to obtain a soil moisture content of 27.4 % (w/w) and (iii) with 14 ml of an ammonium sulfate solution (260 mM) to obtain a soil moisture content of 35.7 % (w/w). The ammonium contents of these samples were $610 \pm 70 \mu\text{g N g}^{-1}$ soil. Nitrification was checked to be independent of ammonium concentrations for values higher than 500 $\mu\text{g N g}^{-1}$ soil. For the luvisol, (i) the air-dried soil (7 % w/w) was further dried to 4.49 % (w/w) and then 100 g were mixed with 1 ml of an ammonium sulfate solution (3.42M) to obtain a soil moisture of 5.44 % (w/w). (ii) Batches of 100 g of air-dried soil (7 % w/w) were mixed with 3.4 and 9.4 ml of an ammonium sulfate solution (980 and 360 mM, respectively) to obtain soil moistures of 9.88 and 16.17 % (w/w) respectively. (iii) Two batches of 100 g of air-dried soil (12.0 % w/w) were mixed with 1 and 6.8 ml of an ammonium sulfate solution at 3.1 and 0.45 M, respectively, to obtain soil moistures of 11.9 and 18.9 % (w/w), respectively. The ammonium contents of these samples were $530 \pm 30 \mu\text{g N g}^{-1}$ soil.

Samples (5g) of both soil preparations were incubated for 9 d at 20 °C in air-tight 37 ml flasks containing O₂ at the surrounding concentration and different partial pressures of acetylene : 0, 100 or 10000 Pa. Soil mineral N was determined at t₀, and after 2, 5, 7 and 9 days of incubation. The nitrification rates were determined from the linear increase in nitric nitrogen. Denitrification was observed to be less than 1 % of nitrification in all these samples. Correspondences between soil moistures and hydric potentials were obtained using the experimental curves of soil moistures versus hydric potentials (Fig 1) fitting to power equations.

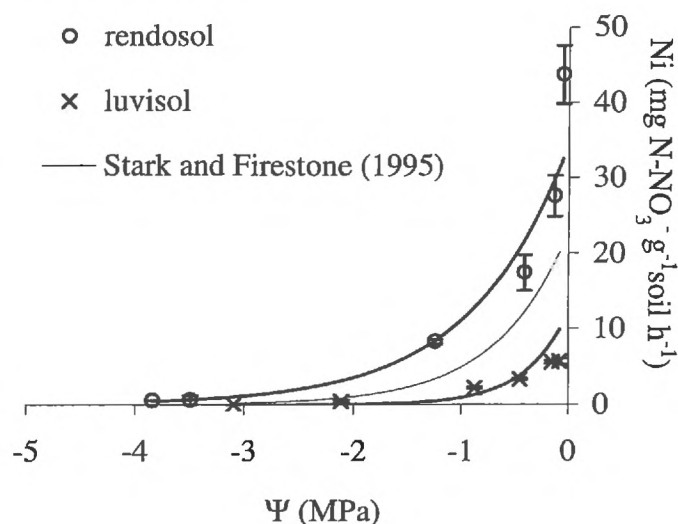


Fig. 2: Relationship between nitrification rates (Ni) and soil hydric potential (Ψ). Error bars are the standard errors of means ($n=3$) or are smaller than the symbols. The equations of the fitted curves are for the rendosol: $Ni=34.45e^{1.13\Psi}$ ($r^2=0.99$), for the luvisol: $Ni=12.19e^{2.56\Psi}$ ($r^2=0.87$) and for the soil studied by Stark and Firestone (1995): $Ni=15.4e^{0.58\Psi}$ ($r^2=0.96$).

Nitrification increased exponentially with soil water potential in both soils (Fig 2). During incubation, the acetylene partial pressures remained constant in the flasks. While the nitrification rates were very close for both soils at low water potentials, the partial pressures of acetylene required to inhibit nitrification were different (Table 1).

Partial pressure of acetylene (Pa)	Soil	Rendosol	Luvisol	
	Ψ	- 3.5 MPa	-2.1 MPa	
	Moisture	5.4 % w/w	6.9 % w/w	
	nitrification rate ¹ ($\mu\text{gN-NO}_3^- \text{kg}^{-1} \text{d}^{-1}$)	inhibition of nitrification activity (%)	nitrification rate ¹ ($\mu\text{gN-NO}_3^- \text{kg}^{-1} \text{d}^{-1}$)	inhibition of nitrification activity (%)
0	580 ^c	0	440 ^c	0
0.1	660 ^c	0	340 ^c	23
1	750 ^d	0	90 ^b	78
10	750 ^d	0	00 ^a	100
100	330 ^b	43	00 ^a	100
1 000	290 ^b	49	00 ^a	100
10 000	000 ^a	100	00 ^a	100

Table 1: Inhibition of nitrification by different acetylene partial pressures at low water potentials (ψ) in the rendosol and in the luvisol. ¹ Nitrification rate followed by different letters are significantly different at the 0.05 level (Newman-Keuls test).

For the rendosol ($\Psi = -3.5$ MPa), the nitrification rate of $580 \mu\text{g N kg}^{-1} \text{ soil d}^{-1}$ was not inhibited by acetylene pressures less than or equal to 10 Pa. The inhibiting effects began at 100 Pa but only became total at 10 kPa. For the luvisol ($\Psi = -2.1$ MPa), the inhibiting effect of acetylene on the nitrification rate of $440 \mu\text{g N kg}^{-1} \text{ soil d}^{-1}$ began significantly at 1 Pa and was total at 10 Pa. The partial pressure of acetylene which inhibited nitrification also changed with the soil water potential (Table 2).

soil hydric potential (MPa)	partial pressure of acetylene (Pa)	nitrification rate ($\text{mg N kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$)	inhibition of nitrate production (%)
<i>Rendosol</i>			
	0	0.51	0
-3.84	100	ND	100
	10000	ND	100
	0	0.58	0
-3.49	100	0.33	43
	10000	ND	100
	0	8.28	0
-1.24	100	2.98	64
	10000	ND	100
	0	17.42	0
-0.41	100	5.23	70
	10000	ND	100
	0	27.60	0
-0.13	100	37.68	0
	10000	ND	100
	0	43.68	0
-0.05	100	41.76	4
	10000	ND	100
<i>Luvisol</i>			
	0	ND	0
-3.09	100	ND	100
	10000	ND	100
	0	0.44	0
-2.11	100	ND	100
	10000	ND	100
	0	2.21	0
-0.87	100	ND	100
	10000	ND	100
	0	3.36	0
-0.45	100	ND	100
	10000	ND	100
	0	5.62	0
-0.15	100	ND	100
	10000	ND	100
	0	5.71	0
-0.08	100	0.14	98
	10000	ND	100

Table 2: Nitrification vs. hydric potentials at different acetylene partial pressures (ND : not detectable) in the rendosol and the luvisol

For the rendosol at water potential below -3.49 MPa, a partial pressure of acetylene of 100 Pa was sufficient to totally inhibit nitrification. Within the range of -3.49 and -0.41 MPa the inhibition of nitrification by 100 Pa of acetylene was partial. In conditions of water potential above -0.13 MPa an acetylene partial pressure of 100 Pa had no significant effect on the nitrification rate. A partial pressure of 10 kPa was nevertheless always sufficient to totally inhibit nitrification. On the luvisol a partial pressure of 100 Pa of acetylene was always sufficient to totally inhibit nitrification whatever the soil water potential in a range between -3.09 and -0.08 MPa.

	Soil characteristics	Nitrification rates (0 C ₂ H ₂)	% inhibition of nitrification			
			10	100	1000	10000
			Pa C ₂ H ₂			
Bremner and Blackmer, 1979	pH 8.2 OC 0.4 % Clay 12 % $\Psi=-1$	83 $\mu\text{g N g}^{-1}$ soil (12 d)		100		
	pH 8.1 OC 4.2 % Clay 37 % $\Psi=-1$	105 $\mu\text{g N g}^{-1}$ soil (12 d)		100		
	pH 6.8 OC 3.8 % Clay 25 % $\Psi=-1$	82 $\mu\text{g N g}^{-1}$ soil (12 d)		100		
	pH 6.2 OC 2.6 % Clay 27 % $\Psi=-1$	105 $\mu\text{g N g}^{-1}$ soil (12 d)		100		
Mosier, 1980	pH 7.8 OM 0.88 % Clay Loam $\Psi=-0.5$	> 200 $\mu\text{g g}^{-1}$ soil (7 d)			77	92
	pH 7.8 OM 0.88 % Clay Loam $\Psi=0$	> 200 $\mu\text{g g}^{-1}$ soil (7 d)			78	89
Bollmann and Conrad, 1997	pH 7.5 OC 1.33 % Clay 10 % WHC 40 %	0.15 $\mu\text{g N g}^{-1} \text{ h}^{-1}$	100			
	pH 6.5 OC 1.13 % Clay 5 % WHC 30 %	0.09 $\mu\text{g N g}^{-1} \text{ h}^{-1}$	100			
Neufeld and Knowles, 1999	pH 7.1 Humisol		100			
This paper	pH 8 OC 2.03 % Clay Loam $\Psi=-0.41$	17.42 $\mu\text{g g}^{-1} \text{ d}^{-1}$		70		100
	pH 6 OC 0.8 % Loam $\Psi=-0.45$	3.36 $\mu\text{g g}^{-1} \text{ d}^{-1}$		99		100

Table 3 : Inhibiting effect of acetylene on nitrification in different soil types.

The low partial pressures of acetylene, generally used to inhibit nitrification in soil, are clearly sufficient for a total inhibition in most studies (Table 3). Nevertheless, the inhibition of nitrification by 1 kPa of acetylene was only partial in the Clay loam soil studied by Mosier (1980). The common point between this soil and the rendosol presented in this paper would be the pH of about 8. However nitrification was also observed to be inhibited by low acetylene partial pressures on alkaline soils (Bremner and Blackmer, 1979 ; Bollmann and Conrad, 1997). We suggest that in the rendosol, nitrifiers could be protected within microenvironments due to the high amounts of carbonates present in this soil.

When using the acetylene method to quantify the relative contribution of nitrification to N₂O emission, total inhibition of the process is really important to ensure that this contribution is not underestimated. As the factors responsible for the differing efficacies of acetylene in inhibiting nitrification are still unclear, we emphasize the importance of determining the dose required for total inhibition of nitrification in each soil. The dose required for the rendosol in this study attained 10 kPa. In this particular case, interference with nitrous oxide reduction probably exists so that the acetylene method would be inadequate to distinguish between nitrification and denitrification as sources of N₂O.

Acknowledgements :

Thanks to Philippe Quéting, Francis Andreux, Bernard Nicolardot and Olivier Théobald. This work was supported by the ADEME and the Conseil Régional de Bourgogne.

References

- Bollmann, A., and Conrad, R., 1997. Recovery of nitrification and production of NO and N₂O after exposure of soil to acetylene. *Biology and Fertility of Soils* 25, 41-46.
- Bremner, J. M., and Blackmer, A. M., 1979. Effects of acetylene and soil water content on emission of nitrous oxide from soils. *Nature* 280, 380-381.
- Neufeld J. D., and Knowles R., 1999. Inhibition of nitrifiers and methanotrophs from an agricultural humisol by allylsulfide and its implications for environmental studies. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 2461-2465.

Klemedtsson, L., Svensson, B. H., and Rosswall, T., 1988. A method of selective inhibition to distinguish between nitrification and denitrification as sources of nitrous oxide. *Biology and Fertility of Soils* 6, 112-119.

Knowles, R., 1982. Denitrification. *Microbiology Reviews* 46, 43-70.

Mosier, A. R., 1980. Acetylene inhibition of ammonium oxidation in soil. *Soil Biology & Biochemistry* 12, 443-444.

Stark, J. M., and Firestone, M. K., 1995. Mechanisms for soil moisture effects on activity of nitrifying bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 218-221.

CHAPITRE 3

N₂O and NO emissions by agricultural soils

with low hydric potentials

Garrido F.¹, Hénault C.¹, Gaillard H.², Pérez S.¹ and Germon J.C.¹

¹ INRA - CMSE, Laboratoire de Microbiologie des Sols, 17 rue Sully, BP 86510, 21065 Dijon Cedex, France.

² INRA, Service d'Etude des Sols et de la Carte Pédologique de France, Centre de Recherche d'Orléans, Ardon, 45160 Olivet, France.

Soil Biology and Biochemistry

(Article soumis en octobre 2000)

Abstract

N₂O and NO production were studied on five agricultural soils with low hydric potentials. All experiments were performed in a laboratory under standard incubation conditions to limit any intrinsic soil heterogeneity. The mechanisms involved in NO and N₂O production were investigated using the inhibitory properties of acetylene on nitrification and N₂O reduction. This work confirmed that N₂O and NO can be produced by soils under aerobic conditions. Nitrification seemed to be the only process involved in NO production and the main process involved in N₂O production by the five studied soils when the water content was low. Nevertheless, aerobic denitrification with N₂O release was observed on one soil. The proportion of N emitted as NO and N₂O through nitrification varied considerably from soil to soil and, in certain soils, also varied with soil hydric potential, ranging from 0 to 2.5 %, and from 0.03 to 1 % respectively. This study clearly shows that both NO emission and the gaseous N emitted in aerated conditions should be taken into account in determining the N-budget on cultivated soils.

Key words

Nitrification, Denitrification, Soil, Nitric oxide, Nitrous oxide, Hydric potentials, Acetylene

INTRODUCTION

Nitrous oxide (N_2O) and nitric oxide (NO) are trace gases involved in atmospheric pollution. N_2O contributes to the greenhouse effect and NO is involved in tropospheric ozone production (Crutzen, 1981; Williams et al., 1992). Soils contribute about 65% of the total N_2O produced by the terrestrial ecosystem (Inubushi et al., 1996) and between 24 and 62% of the total NO production (Skiba et al., 1997). NO and N_2O are mainly produced in soils during biological denitrification and nitrification (Firestone et Davidson, 1989). Denitrification, the progressive reduction of nitrate (NO_3^-) and nitrite (NO_2^-) into dinitrogen (N_2), has for a long time been considered as the main mechanism of N_2O formation by soils (Hénault et Germon, 1995). The relative contribution of this process in NO production is still not clearly known. Denitrification generally occurs in anaerobic conditions and hot spots of N_2O emission are currently observed under wet conditions (Granli et Bockman, 1995; Mogge et al., 1999). Nitrification is the oxidation of ammonium (NH_4^+) to nitrite (NO_2^-) and nitrate (NO_3^-). It has been clearly shown that this process can produce N_2O in pure cultures of nitrifiers and in soil samples (Blackmer et al., 1980; Stevens et al., 1997). Nevertheless, nitrification has for a long time been considered as the main source of NO production in soils but as a minor source of N_2O . Hénault et al. (1998) observed fluxes of N_2O , exceeding $20 \text{ g N ha}^{-1} \text{ d}^{-1}$ *in situ* in agricultural soils with low water contents. These conditions are generally acknowledged to be unfavourable to the denitrification process (Linn and Doran, 1984). These authors speculated that such N_2O emissions were due to nitrification.

Assessments of N_2O emissions from soils are mainly based on the production of this gas by denitrification (Li et al., 1992). This is partly due to the lack of knowledge concerning the mechanisms of N_2O production and the regulation of N_2O resulting from nitrification. The few models of NO emission, available in the literature are based on empirical mathematical relations (Galbally et Johanson, 1989; Williams et al., 1992). Distinction between the sources (denitrification and nitrification) of N_2O and NO produced by soils remains difficult. (i) Denitrification and nitrification can occur at the same time in soil aggregates (Arah, 1997). (ii) These processes interact with each other and denitrification rates in natural conditions depend on the supply of substrates (NO_3^- and NO_2^-) derived from nitrification. (iii) No efficient inhibitor exists for the initial step of denitrification in soils.

In this work, we have studied aerobic N_2O and NO production on five agricultural soils. All experiments were performed in a laboratory under standard conditions of incubation to limit the intrinsic soil heterogeneity. Our aim was to confirm that N_2O and NO can be produced in aerobic conditions, to determine the mechanisms involved in these gaseous emissions and to quantify the proportion of nitrified nitrogen emitted as N_2O and NO by soils.

MATERIALS AND METHODS

Soils sampling

This study involved five agricultural soils from which samples were composed by pooling 16 replicates (each weighing about 2 kg) from the top horizon (0-20 cm) : (i) a hypercalcareous rendosol from Châlons en Champagne (48°57N, 2°15E) with 32.4% clay, 2.03% organic C, 74.2% total calcareous, pH8.1, (ii) a redoxic luvisol (A) from Longchamp (47°16N, 5°18E) in Burgundy with 20.0% clay, 0.86% organic C, <1% total calcareous, pH6.0, (iii) a redoxic luvisol (B) from Arrou (48°08N, 1°06E) with 14.0% clay, 1.08% organic C, <10% total calcareous, pH6.3, (iv) a pachic calcisol from Villamblain (47°98N, 1°34E) with 33.4% clay, 1.42% organic C, <10% total calcareous, pH7.9 and (v) a neoluvisol from La Saussaye (48°24N, 1°34E) with 24.2% clay, 1.18% organic C, <10% total calcareous and a pH of 7.6. The latter 3 soils were all from the south of Paris Basin and were not distant from each other. The hypercalcareous rendosol was sampled in July 1995 (moisture 22.3% w/w ; nitrate content $3 \mu\text{g N g}^{-1}$ soil), the redoxic luvisol A in December 1997 (moisture 32.9% w/w ; nitrate content $7 \mu\text{g N g}^{-1}$ soil), and the redoxic luvisol B, the pachic calcisol and neoluvisol in August 1999 (moisture 24.4, 21.2 and 19.9% w/w ; nitrate content 20 , 8, and $8 \mu\text{g N g}^{-1}$ soil, respectively). The soil samples were stored at 4°C after gentle air drying to around 10 % w/w and were sieved through a 1mm mesh before use.

Soil hydric potential curves

Hydric potential curves were established for each soil sieved through 1 mm by measuring the soil gravimetric water content of three replicates for water potentials (ψ) of -0.03, -0.10, -0.32, -1.00, -1.50, -2.79, -6.88, -14.9 and -106 MPa. Soil gravimetric water contents were determined by oven drying samples at 105°C for 24h (Fig. 1).

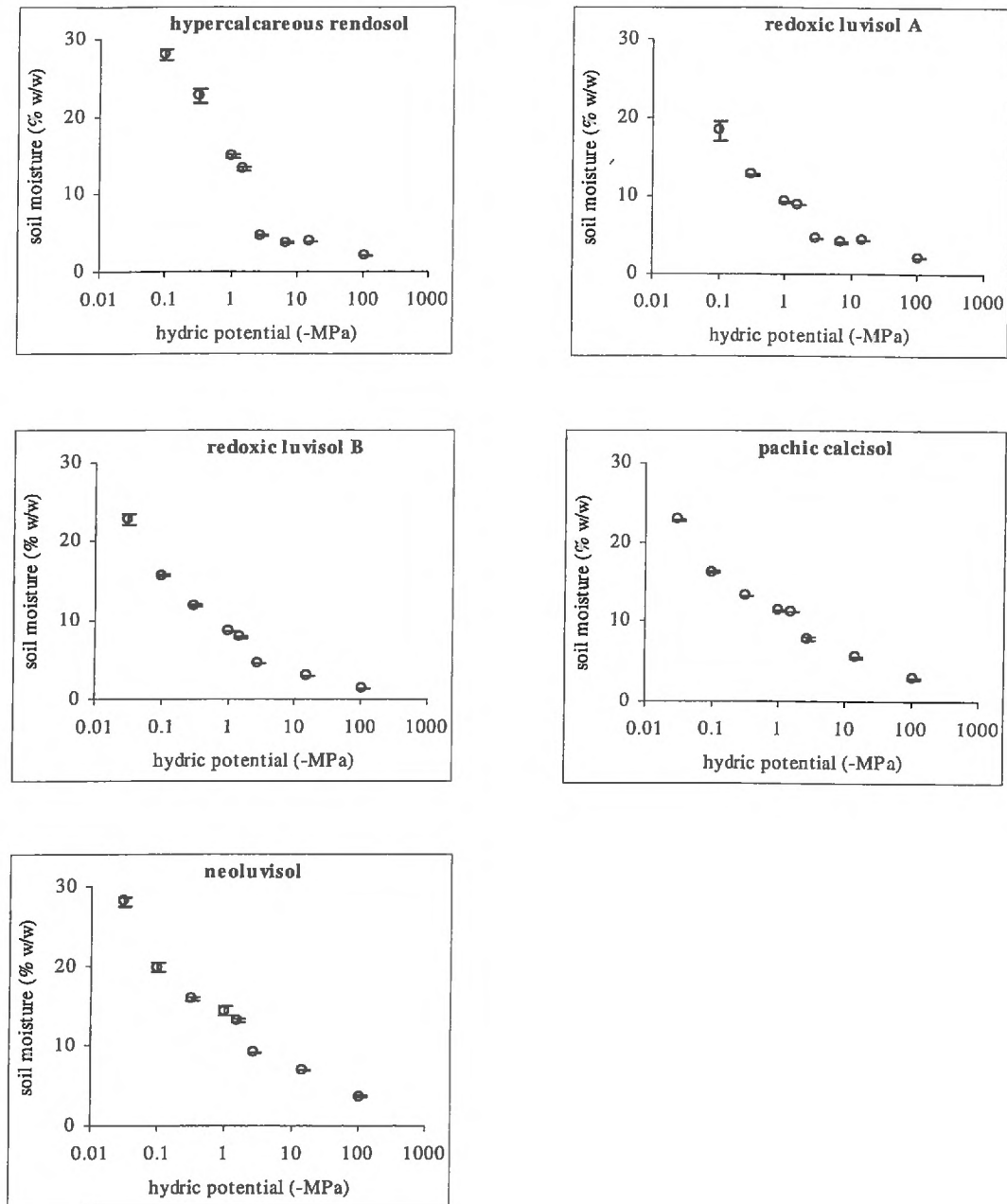


Fig. 1 : Hydric characterisation of the soils. The experimental points were fitted by curves with power equations. The following equations were then used to establish correspondances between soil moistures (m) and hydric potentials (Ψ): $\Psi = 11859m^{-3.45}$ and $\Psi = 18.82m^{-0.99}$ for the hypercalcareous rendosol at soil moistures higher and lower than 13 % w/w respectively; $\Psi = 3427m^{-3.61}$ and $\Psi = 42.89m^{-1.56}$ for the redoxic luvisol A at soil moistures higher and lower than 9 % w/w respectively; $\Psi = 2815m^{-3.68}$ and $\Psi = 224.34m^{-2.58}$ for the redoxic luvisol B at soil moistures higher and lower than 8 % w/w; $\Psi = 855018m^{-5.22}$ and $\Psi = 10264m^{-3.50}$ for the pachic calcisol at soil moistures higher and lower than 13 % w/w; and $\Psi = 461058m^{-5.37}$ and $\Psi = 3021m^{-3.22}$ for the neoluvisol at soil moistures higher and lower than 11 % w/w. Error bars are the standard errors of means (n=3) or are smaller than the symbols.

Soil hydric conditions during incubation

Gradients of soil water content were obtained by first air-drying the sieved soils with a cool thermo-ventilator to soil moistures around 5 % (w/w) and then adding different amounts of water. Correspondences between the soil moistures (m) and hydric potentials (ψ) were obtained from the experimental curves of soil moisture versus hydric potential (Fig 1). The gradients of soil water potential were between -5.15 and -0.001 MPa for the hypercalcareous rendosol, between -3.35 and -0.001 MPa for the redoxic luvisol A, between -24.48 and -0.002 for the redoxic luvisol B, between -25.48 and -0.003 for the pachic calcisol and between -87.86 and -0.001 MPa for the neoluvisol.

Soil ammonium and nitrate conditions during incubations

For those experiments in which the nitrification process was emphasized, ammonium was added as ammonium sulfate at the same time as water to produce a soil concentration of around 0.40 mg N g^{-1} soil. Nitrification rates had previously been observed to be independent of the ammonium concentrations for such concentrations in all five studied soils (data not shown).

For those experiments in which the denitrification process was emphasized, nitrate was added as potassium nitrate at the same time as water to produce a soil concentration of around 0.40 mg N g^{-1} soil.

Soil incubations

Soils incubations were performed at 20°C , under dark conditions, in 37 ml air-tight flasks. During incubation each flask contained the equivalent of 5 g of dry soil in the surrounding atmosphere without or with acetylene (100 Pa or 10 kPa).

Use of acetylene

Acetylene was used (1) to totally inhibit the first step of the nitrification process at a partial pressure of 100 Pa (Bremner et Blackmer, 1979) on the redoxic luvisol A, the redoxic luvisol B, the pachic calcisol and the neoluvisol, and at a partial pressure of 10000 Pa on the hypercalcareous rendosol (Garrido et al. 2000), and (2) to inhibit N_2O reductase at a partial pressure of 10000 Pa in all five soils (Knowles, 1982).

N_2O kinetics

The kinetics of N_2O production by soils were determined by measuring the changes in N_2O concentration in the flask atmosphere during a 9-day period of incubation. 0.5 ml of the flask atmosphere was sampled at t_0 and after 2, 5, 7 and 9 days of incubation of 3 replicates per treatment. These gas samples were analysed on a Varian 3400 Cx gas chromatograph equipped with an electron capture detector at 350°C with a detection limit of around 0.3 (\pm 0.1) $\mu\text{l l}^{-1}$.

NO kinetics

The kinetics of NO production by soils were determined (1) by measuring the changes in NO concentration in the flask atmosphere over a 9-day period or (2) by measuring the changes of NO concentration in the flask atmosphere over an 8-hour period. During these periods, 3 replicates were analysed (1) at t_0 and after 2, 5, 7 and 9 days or (2) at t_0 and after 2, 4, 6 and 8 hours in a chemoluminescent analyser, (Topaze 3000, Cosma) adapted for the analysis of small gas samples, less than 1 liter, calibrated at 872 $\mu\text{l l}^{-1}$ on gas samples of 37 ml. The detection limit was 10 (\pm 10) nl l^{-1} .

Nitrification kinetics

The soil mineral nitrogen (NH_4^+ , NO_2^- and NO_3^-) was extracted from the soil samples using a KCl solution (1M) with a soil/solution ratio of 1/5 and analysed by colorimetric assay using the procedure of Griess-Ilosvay (Nelson and Keeney, 1982) on a Perstorp Analytical

(Alpkem, Oregon) analyser. The nitrification rates were determined from the increase in nitric nitrogen ($\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$) occurring in the soils during a 9-day period of incubation. The soil mineral nitrogen was determined on 3 replicates per treatment at t0 and after 2, 5, 7 and 9 days of incubation.

Denitrification kinetics

Denitrification kinetics were established from the change of N_2O concentration in the flask atmosphere containing acetylene at a partial pressure of 10 kPa over a 9-day period of incubation. 0.5 ml of 3 replicates per treatment were analysed on the Varian 3400 Cx gas chromatograph at t0 and after 2, 5, 7 and 9 days.

Fitted curves

The experimental points of soil water potential, nitrification rates, N_2O and NO emissions rates were fitted using a Sigmaplot v4.0 system.

RESULTS

N_2O and NO emission rates during incubation without acetylene

During the aerobic incubations with ammonium addition, the N_2O concentrations in the flask atmosphere increased linearly with time ($p < 0.05$). The measured N_2O emission rates were between 0 and $0.45 \text{ mg N-N}_2\text{O kg}^{-1} \text{ soil d}^{-1}$. N_2O production by soils amended with ammonium started at very low water potentials (as low as -3.73 MPa on the neoluvisol for example). For all soils, the N_2O emission rates increased exponentially with soil hydric potential ($p < 0.01$). The N_2O emission rates measured on the hypercalcareous rendosol were generally much higher than those observed on the other soils (Fig. 2).

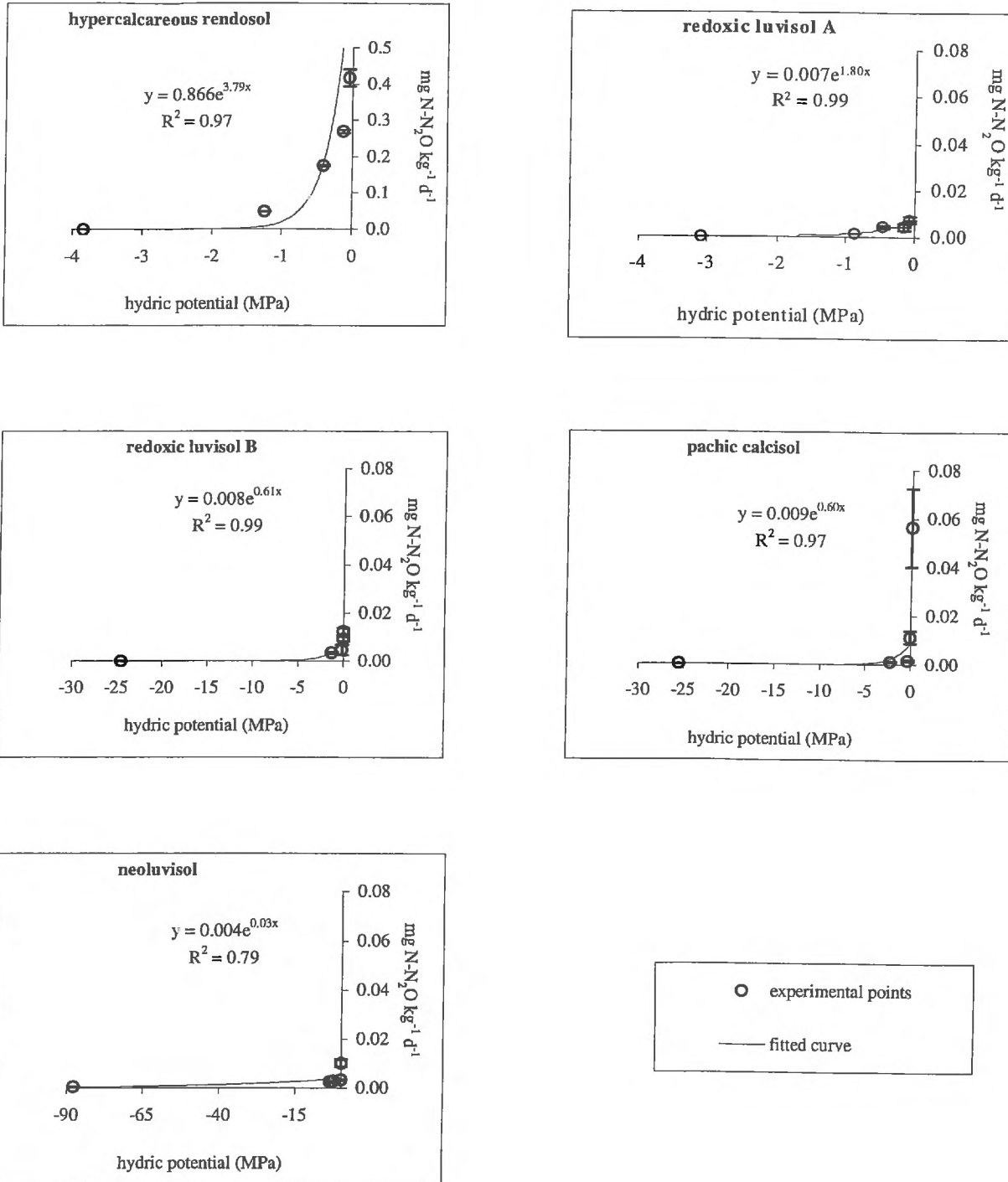


Fig. 2: Relationship between the N₂O emission rate and the soil hydric potential. Error bars are the standard errors of means (n=3) or are smaller than the symbols.

Under the same conditions of incubation, the NO concentrations in the flask atmospheres increased during the initial hours of incubation and then decreased in most cases (data not shown). In other cases, they increased linearly with time over the 9 days of incubation. During incubations over short periods of 8 hours, the NO concentrations increased linearly for all soils ($p < 0.01$), leading to rates between 0 and $0.22 \text{ mg N-NO kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$. NO production was detected on the five soils incubated in aerobiosis with ammonium addition at very low water potentials. For every soil, the NO emission rates increased with the soil hydric potential (Ψ) up to a maximum and then decreased with further increases in Ψ . The maximum measured rate of NO emission was $197 \text{ } \mu\text{g N-NO kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$ on the hypercalcareous rendosol at a water potential of -0.20 MPa , $9.31 \text{ } \mu\text{g N-NO kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$ on the redoxic luvisol A at a water potential of -0.07 MPa , $19.8 \text{ } \mu\text{g N-NO kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$ on the redoxic luvisol B at a water potential of -0.05 MPa , $31.9 \text{ } \mu\text{g N-NO kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$ on the pachic calcisol at a water potential of -0.18 MPa and $217 \text{ } \mu\text{g N-NO kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$ on the neoluvisol at a water potential of -0.05 MPa . We fitted the experimental

points by curves to equations of the form $\text{NO} = a.e^{-0.5*\left(\frac{\Psi-X_0}{b}\right)^2}$ ($p < 0.05$) with NO in $\text{mg N kg}^{-1} \text{ soil d}^{-1}$ and Ψ in MPa (Fig. 3).

Nitrification rates

During the aerobic incubations carried out for 9 days on the five soils with ammonium addition, the nitric nitrogen in the flasks increased linearly with time ($p < 0.05$). The estimated nitrification rates were between 0 and $43.68 \text{ mg N-NO}_3^- \text{ kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Nitrification started at a very low water potential in all five soils. The nitrification rates increased exponentially with soil hydric potential in all five soils (Fig. 4). Nitrification rates were generally higher on the hypercalcareous rendosol than on the other soils.

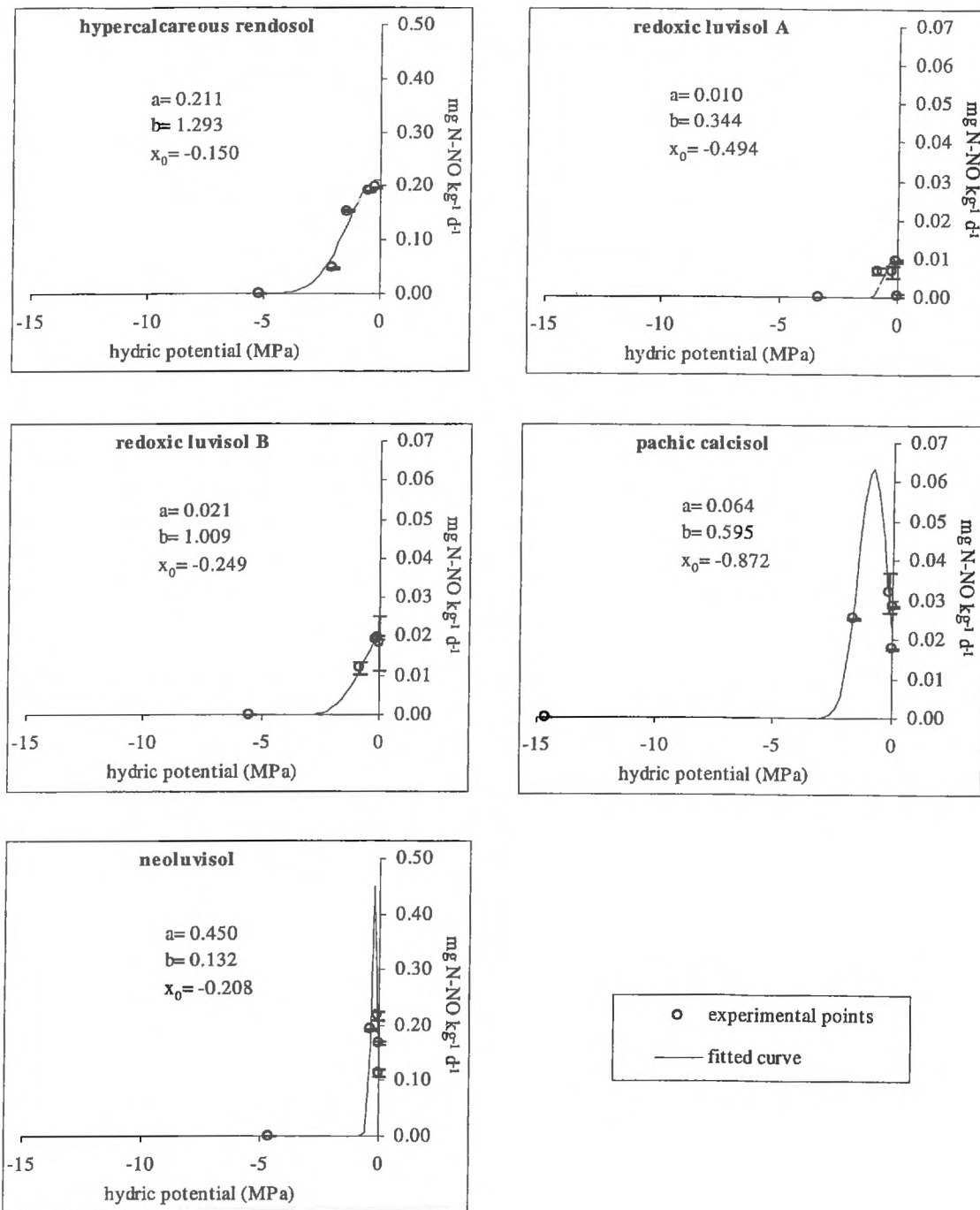


Fig. 3: Relationship between the NO emission rate (NO) and the soil hydric potential (Ψ). The experimental

points were fitted by curves to equations of the form: $NO = a \cdot e^{-0.5 \cdot \left(\frac{\Psi - x_0}{b}\right)^2}$. Error bars are the standard errors of means (n=3) or are smaller than the symbols.

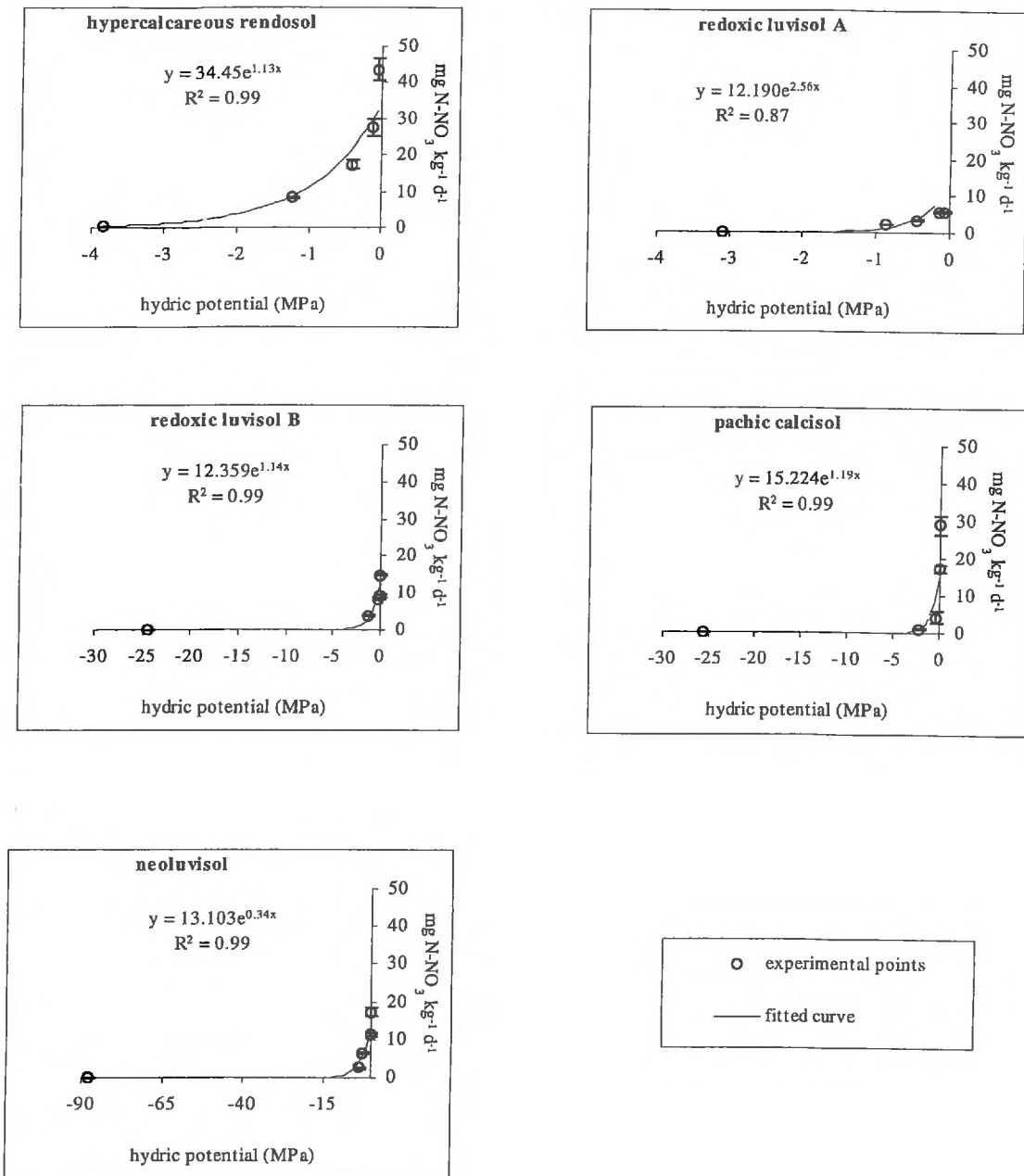


Fig. 4: Relationship between the nitrification rate and the soil hydric potential. Error bars are the standard errors of means (n=3) or are smaller than the symbols.

Denitrification rates

During aerobic incubation over a 9 day-period with nitrate and the addition of 10 kPa of acetylene, no N₂O emission was produced by the hypercalcareous rendosol, the redoxic luvisol B, the pachic calcisol or the neoluvisol, when their soil hydric potentials were less than or equal to -0.056, -0.004, -0.020 and -0.004 MPa respectively (Fig. 5). We therefore consider that the denitrification activity of these soils under such conditions was nil. At higher soil hydric potentials, these soils produced N₂O during aerobic incubation. We then roughly estimated the initial rates of denitrification, over 0 – 48 hours of incubation, to be 0.600, 0.400, 1.400 and 0.700 mg N-N₂O kg⁻¹ d⁻¹ for the hypercalcareous rendosol ($\Psi = -0.009$ MPa), the redoxic luvisol B ($\Psi = -0.002$ MPa), the pachic calcisol ($\Psi = -0.003$ MPa) and the neoluvisol ($\Psi = -0.001$ MPa), respectively. The redoxic luvisol A, incubated in the same experimental conditions, produced N₂O when the soil hydric potential was as low as -1.67 MPa. In this latter soil, denitrification starts at a very low water potential. The denitrification rates were between 0.002 and 0.020 mg N-N₂O kg⁻¹ d⁻¹ for hydric potentials between -1.67 and -0.006 MPa respectively.

Mechanisms of nitrous oxide production

In the absence of denitrification activity, the hypercalcareous rendosol, the redoxic luvisol B, the pachic calcisol and the neoluvisol produced N₂O, during aerobic incubation with ammonium addition, at hydric potentials less than -0.056, -0.004, -0.020 and -0.004 MPa, respectively. A total inhibition of the nitrification process with acetylene also totally inhibited N₂O production by these soils (Table 1).

N₂O production in these 4 soils under aerobic conditions was linked solely to the nitrification process. The 100 Pa dose of acetylene which was insufficient to totally inhibit nitrification in the hypercalcareous rendosol at hydric potentials higher than -0.41 MPa, also partially inhibited N₂O production by this soil at this latter hydric potential.

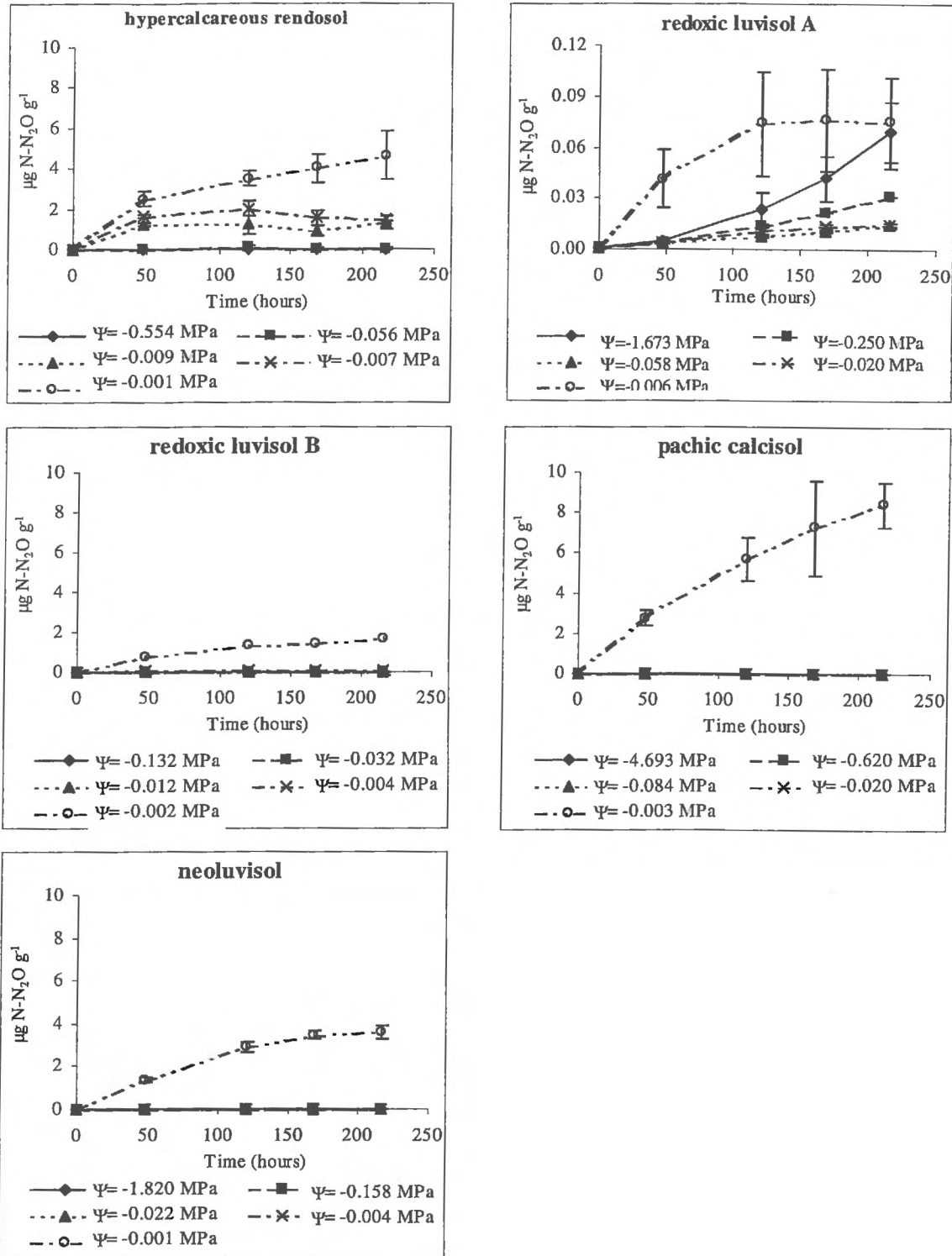


Fig. 5 : N_2O emissions of soil samples incubated at different soil hydric potentials in aerobiosis with nitrate and 10kPa of acetylene. Error bars are the standard errors of means (n=3) or are smaller than the symbols.