

VetAgro Sup

Mémoire de fin d'études d'ingénieur

Étude de la fiabilité de la méthode et de la pertinence de la nitrate réductase comme indicateur de la gestion des sols.

Juliette SARRAZIN

CALICE
2019-2022

VetAgro Sup

Mémoire de fin d'études d'ingénieur

Étude de la fiabilité de la méthode et de la pertinence de la nitratre réductase comme indicateur de la gestion des sols.

Juliette SARRAZIN

CALICE
2019-2022

Tutrice entreprise : Nathalie CHEVIRON
Tutrice école : Nathalie VASSAL

« L'étudiant conserve la qualité d'auteur ou d'inventeur au regard des dispositions du code de la propriété intellectuelle pour le contenu de son mémoire et assume l'intégralité de sa responsabilité civile, administrative et/ou pénale en cas de plagiat ou de toute autre faute administrative, civile ou pénale. Il ne saurait, en cas, seul ou avec des tiers, appeler en garantie VetAgro Sup. »

Remerciements :

Je tiens à remercier Mme Cheviron pour la formation et les connaissances qu'elle m'a apportées tout au long de mon apprentissage.

Merci à Mme Vassal, ma tutrice école, pour le soutien et l'aide apporté tout au long de mon apprentissage à VetAgro Sup.

Merci à Mme. Grondin, tutrice technique, pour son accompagnement sur la plateforme, lors de mon arrivée. Je remercie Mme. Poiroux pour son aide technique au cours de mes trois années d'alternance. Merci à M. Hullot pour son soutien et son aide, pendant les trois années passées, plus particulièrement sur les statistiques et les techniques rédactionnelles.

Je remercie les différents partenaires, Mme. Resseguier, sur le site du SOERE PRO QualiAgro, Mme Novak et Mme. Decau, sur les sites du SOERE ACBB Lusignan et OASYS. Je remercie toutes les personnes qui m'ont aidées lors des prélèvements de sols sur les différents sites d'expérimentation.

Je remercie l'ensemble de mes collègues de la plateforme ainsi que mes collègues du pôle Ecotox, qui m'ont accompagnée au cours de mes trois années d'alternance.

« Le dispositif QualiAgro fait partie du SOERE PRO (Réseau de sites expérimentaux au champ de longue durée dédié à l'étude du recyclage agricole des Produits Résiduaire Organiques) intégré en tant que service AnaEE-France et bénéficiant d'une aide de l'Etat gérée par l'Agence Nationale de la recherche au titre du programme « Investissements d'avenir » portant la référence ANR-11-INBS-0001. Le dispositif QualiAgro a été créé et est toujours financé par INRAE et VEOLIA R&I »

Table des matières :

Introduction.....	1
1. Contexte et problématisation de l'étude	3
1.1. Le fonctionnement des sols et de la microfaune	3
1.1.1. Les caractéristiques physico-chimiques des sols.....	3
1.1.2. Le sol, un écosystème complexe	3
1.1.3. Les indicateurs de la santé des sols	3
1.1.4. L'origine et le fonctionnement des enzymes extracellulaires	4
1.2. La disponibilité de l'azote en agronomie	5
1.2.1. Le cycle de l'azote.....	5
1.2.2. La dénitrification.....	6
1.2.3. Les facteurs d'influence de la dénitrification	6
1.2.4. La nitrate réductase.....	7
1.3. Fonctionnement et intérêts de la validation de méthode	9
1.3.1. Objectifs de la validation de méthode	9
1.3.2. Principe du profil d'exactitude	10
2. Matériels et méthodes	11
2.1. Description des sols et sites de prélèvement.....	11
2.1.1. Sols utilisés pour la validation de méthode.....	11
2.1.2. Sites expérimentaux de l'étude	11
2.2. Prélèvements et préparation des sols.....	12
2.3. Dosage enzymatique	12
2.4. Validation de méthode/profils d'exactitudes.....	13
2.4.1. Méthode des ajouts dosés	13
2.4.2. Calculs de fidélité, justesse et incertitude.....	14
2.5. Traitement des données et analyses statistiques	14
3. Résultats	15
3.1 Validation de méthode	15
3.1.1. Fidélité de la méthode.....	15
3.1.2. Justesse de la méthode	15
3.1.3. Incertitude du dosage.....	15
3.1.4. Domaine de validité.....	16
3.1.5. Domaine d'application	16
3.2. Effet de l'occupation des sols sur l'activité de la nitrate réductase	17
3.2.1. Effet des critères physico-chimiques sur l'occupation des sols	17
3.2.2. Activité de la nitrate réductase	17
3.2.3. Liens entre les paramètres physico-chimiques et l'activité de la nitrate réductase.....	18

3.3.	Etude des pratiques agricoles sur le dosage de la nitrate réductase	18
3.3.1.	Couverts végétaux	18
3.3.2.	Apports d'intrants organiques ou minéraux	19
3.3.3.	Agroforesterie.....	19
4.	Discussion	20
4.1.	Validation de méthode	20
4.1.1.	Fidélité de la méthode.....	20
4.1.2.	Justesse de la méthode	20
4.1.3.	Incertitude du dosage.....	21
4.1.4.	Profils d'exactitudes	21
4.1.5.	Domaine d'application	21
4.1.6.	Impact sur le dosage de l'activité enzymatique	22
4.2.	Effet de l'occupation des sols sur l'activité de la nitrate réductase	22
4.2.1.	Effet des critères physico-chimiques sur l'occupation des sols	22
4.2.2.	Activité de la nitrate réductase	23
4.2.3.	Liens entre les paramètres physico-chimiques et l'activité de la nitrate réductase.....	23
4.3.	Etude des pratiques agricoles sur le dosage de la nitrate réductase	24
4.3.1.	Effet des couverts végétaux	24
4.3.2.	Impact des apports d'intrants organiques ou minéraux	24
4.3.3.	Effet de l'agroforesterie	24
4.3.4.	Retour sur la validation de méthode et impact sur l'étude	25
	Conclusion	26
	Bibliographie.....	27

Table des figures :

Figure 1 : Classification par taille des organismes du sol, modifiée par Hättenschwiler et al., 2018.	3
Figure 2 : Représentation des flux du cycle de l'azote (Sinaj et al., 2009).	5
Figure 3 : Etapes et enzymes associées au processus de la dénitrification (Hochstein & Tomlinson, 1988).	6
Figure 4 : Schématisation du dosage de la nitrate réductase par spectrophotométrie.	13
Figure 5 : Représentation graphique des profils d'exactitude	16
Figure 6 : Profil d'exactitude du domaine d'application regroupant les résultats des sols de prairie et culture, (n=36).	16
Figure 7 : Graphique de répartition de l'activité de la nitrate réductase en fonction l'occupations des sols.	17
Figure 8 : Graphique de corrélation de l'activité enzymatique de la nitrate réductase avec le pH, en fonction de l'occupation des sols.	18
Figure 9 : Effet de la gestion des prairies sur l'activité nitrate réductase (site SOERE ACBB, Lusignan)	18
Figure 10 : Effet de l'apport de PRO sur l'activité nitrate réductase (site SOEREPRO, QualiAgro).	19
Figure 11 : Effet de l'agroforesterie sur l'activité nitrate réductase (site OASYS, Lusignan).	19
Figure 12 : Profil d'exactitude du sol limoneux de forêt (n=15).	21
Figure 13 : Profil d'exactitude du sol limoneux de prairie après correction d'un biais de 30% (n=15).	21
Figure 14 : Profil d'exactitude du domaine d'application regroupant les sols de culture et prairie, avec une correction du biais de 10% (n=36).	21

Liste des tableaux :

Tableau I : Gamme étalon du dosage de la nitrate réductase	12
Tableau II : Choix des niveaux de concentration en $[\text{NO}_2^-]$ pour la réalisation des ajouts dosés.	13
Tableau III : Coefficients de variation de mesures de nitrates (n= 5)	15
Tableau IV : Ecart des résultats de quantification des nitrites par rapport aux valeurs cibles (n= 5)	15
Tableau V : Equations de l'incertitude, par type de sol	15
Tableau VI : Limites de quantification par type de sol	16
Tableau VII : Coefficients de variation des essais préliminaires du dosage des nitrites selon occupation des sols (n=5).	20
Tableau VIII : Ecart des résultats de quantification des nitrites par rapport aux valeurs cibles, selon l'occupation des sols (essais préliminaires 2021)(n=5).	20

Liste des abréviations :

AF : Agroforesterie
BCE : Biochem-Env
BIO : Compost de Biodéchets
BVD : Compost de boue de station d'épuration et déchets verts
CIPAN : Culture intermédiaire Piège à Nitrates
CP : Fumier de porcs compostés
CV : Coefficient de variation
DNP : 2,4-Dinitrophénol
EC : *Enzyme commission numbers*, Commission des enzymes
EcoSys : Ecologie fonctionnelle et écotoxicologie des agroécosystèmes
EFELE : Nom de site « EFluents d'ELEvages »
FB : Fumier de bovins
FUM : Fumier de bovins composté
FR : Forêt
FV : Fumier de volailles
GC : Grande culture
INRAE : Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement
ISO : *International Organization for Standardization*, Organisation internationale de normalisation
LQ : Limite de quantification
NAR : Nitrate réductase
NO : monoxyde d'azote
NO₂⁻ : Nitrite
Ntot : Azote total
OASYS : Nom du site « Produire du lait biOclimAtique en expérimentation-SYSTème »
PR : Prairie
PRO : Produits Résiduaire Organiques
P 3ans : Prairie temporaire de 3 ans
P 6ans : Prairie temporaire de 6 ans
P 6ans N- : Prairie temporaire de 6 ans avec réduction en apport d'azote minéral
P 20ans : Prairie permanente
QualiAgro : Etude des composts urbains
RMQS : Réseau de Mesure de la Qualité des Sols
RSD : *Relative standard deviation*, Dispersion relative
SOERE : Système d'Observation et d'Expérimentation sur le long terme pour la Recherche en Environnement
SOERE ACBB : Système d'Observation et d'Expérimentation sur le long terme pour la Recherche en Environnement Agrosystèmes, Cycle Biogéochimique et Biodiversité
SOERE PRO : Système d'Observation et d'Expérimentation sur le long terme pour la Recherche en Environnement, Produits Résiduaire Organiques
TEM : Témoin
UMR : Unité Mixte de Recherche
VIM : Vocabulaire International de Métrologie
VV : Vignes et vergers
2/D : Distance inter rang divisée par 2
4/D : Distance inter rang divisée par 4

Introduction

Les évolutions de l'agriculture ont permis d'augmenter les rendements grâce à la gestion de l'eau, le développement des pratiques de culture et des technologies. Depuis quelques années, la question sur la durabilité des pratiques culturales a été soulevée. Elles doivent non seulement répondre aux besoins sociétaux actuels et futurs, par la quantité de nourriture et l'apport en fibres, mais également soutenir les services écosystémiques et la santé humaine, avec pour objectif de maximiser le bénéfice (Tilman et al., 2002). Pour cela, les sols doivent conserver une capacité multifonctionnelle (Kibblewhite et al., 2008) et répondre aux interrogations sur le fonctionnement des sols et les besoins en nutriments.

Le sol est composé d'éléments minéraux et organiques, ainsi que d'un réseau complexe de plantes et microorganismes. Ce milieu solide hétérogène présente des propriétés chimiques et physiques qui varient dans le temps. La matière organique influence ces conditions, impliquant le développement du système microbien et les plantes (Arias et al., 2005). Sa dégradation, essentiellement par voie enzymatique, induit une libération de nutriments disponibles pour la croissance des plantes et des microorganismes. Les enzymes du sol, essentielles au maintien de la vie des organismes vivants, sont des indicateurs de l'activité des microorganismes et sont considérées comme indicateurs de la santé et fertilité des sols (Singh & Kumar, 2008). Elles interviennent dans tous les grands cycles biogéochimiques et sont sensibles aux pratiques agricoles, au pH du sol, aux nutriments ainsi qu'aux conditions pédoclimatiques.

Indispensable à la vie, l'azote fait partie des premiers facteurs limitants dans la croissance des plantes. C'est pour cela que son cycle biogéochimique est très étudié, sur chacune des différentes étapes qui le compose. L'azote est majoritairement présent dans les sols sous forme organique. La minéralisation de la matière organique rend alors l'azote disponible pour les plantes. Cette forme, dite minérale, est peu mobile dans les sols dans le cas d'une forte concentration en l'argile ou d'un faible taux d'humidité (Kaye & Hart, 1997). Il fait partie des 3 éléments apportés au sol sous forme de fertilisants. Les engrais azotés permettent de combler les besoins des couverts. En réponse au manque en azote dans les sols agricoles, le procédé Haber-Bosch, créé en 1909, a permis de quadrupler la production agricole (Stein & Klotz, 2016). Mais l'industrie de production, ainsi que l'utilisation des engrais azotés, ont des conséquences néfastes sur l'environnement, favorisant par exemple l'eutrophisation, l'acidification des milieux, les pluies acides ... (Vincent, 2018). Ainsi, l'impact environnemental et les pertes d'azote dans les sols agricoles, ont poussé au développement de la recherche sur la dénitrification, depuis plus de 40 ans (Philippot et al., 2002).

L'INRAE, « Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement », a pour objectif d'orienter les recherches pour une alimentation saine et de qualité, pour une agriculture durable, et pour un environnement préservé et valorisé. L'institut est composé de plusieurs centres, divisés en unités de recherches orientées sur des thématiques spécifiques. Je suis en alternance sur le centre Île-de-France - Versailles-Grignon, centre qui est composé de 22 unités de recherches, dont l'Unité Mixte de Recherche Ecologie fonctionnelle et écotoxicologie des agroécosystèmes (UMR 1402, EcoSys). Je travaille sur la plateforme scientifique et technique Biochem-Env (BCE), qui évolue dans un cadre de qualité et est certifiée ISO 9001, version 2015, depuis 2017.

Les recherches de la plateforme sont centrées sur la biochimie des milieux et de la macrofaune associée. L'objectif de la plateforme est le développement et la mesure d'indicateurs biochimiques dans l'environnement et les organismes des écosystèmes continentaux et benthiques. Le travail s'oriente sur le dosage enzymatique des sols, des sédiments et des organismes. Ces dosages sont réalisés sur une gamme de nutriments permettant d'étudier le fonctionnement des milieux et les impacts sur la physiologie et la gestion du stress des organismes du sol, au travers des divers cycles biogéochimiques.

La plateforme est dédiée à la recherche. Elle intervient dans des projets de recherche pour des équipes académiques, ou des prestations de recherche pour des partenaires privés ou des associations. Centrée sur l'innovation technologique, le conseil et la formation, son objectif est d'être toujours au plus près des attentes et exigences de ses partenaires, mais également de leur fournir des indicateurs pertinents en lien avec leur questionnement scientifique autour de la santé des sols.

La bibliographie sur le cycle de l'azote est très étendue, et la plateforme a déjà développé plusieurs méthodes pour analyser les différentes étapes. Cependant, les méthodes d'analyses et les données acquises sur le processus de dénitrification, sont moins avancées. Mon projet de fin d'étude a été réfléchi afin d'acquérir des connaissances sur cette étape clé. Il est orienté sur le dosage de la nitrate réductase qui intervient dans le processus de dénitrification. La question abordée répond aux besoins de la plateforme sous deux angles. Tout d'abord, une étude de fiabilité de la méthode, vis-à-vis des résultats fournis aux partenaires, qui est abordée par une validation de méthode. La seconde question concerne les missions de conseil de la plateforme, afin de proposer des indicateurs pertinents en lien avec les questions scientifiques. Nous avons choisi, pour ce projet, de nous concentrer sur le filtre occupation des sols et pratiques culturales. Dans l'objectif d'expliquer les différences d'activité entre les sols, la présence d'un lien avec les paramètres physico-chimiques du sol sera analysée. La problématique rédigée est la suivante :

Quelle est la fiabilité de la méthode et la pertinence de la nitrate réductase comme indicateur de la gestion des sols ?

Chacun des items de la problématique sera étudié indépendamment et présenté séquentiellement. De ce fait, la première partie présentera la validation de la méthode de dosage sur plusieurs sols. La seconde partie détaillera l'étude de l'impact de la couverture végétale et des itinéraires techniques sur l'indicateur nitrate réductase.

Le rapport sera rédigé en cinq parties. En premier, un état de l'art sur la thématique, présente le fonctionnement des sols et le principe de validation des méthodes de dosage. Ensuite, la partie matériels et méthodes, fait un point détaillé sur les techniques utilisées lors de l'étude. La troisième et la quatrième partie présentent respectivement les résultats et la discussion. Elles seront rédigées en deux sous-parties, répondant à la fiabilité et à la pertinence de l'indicateur.

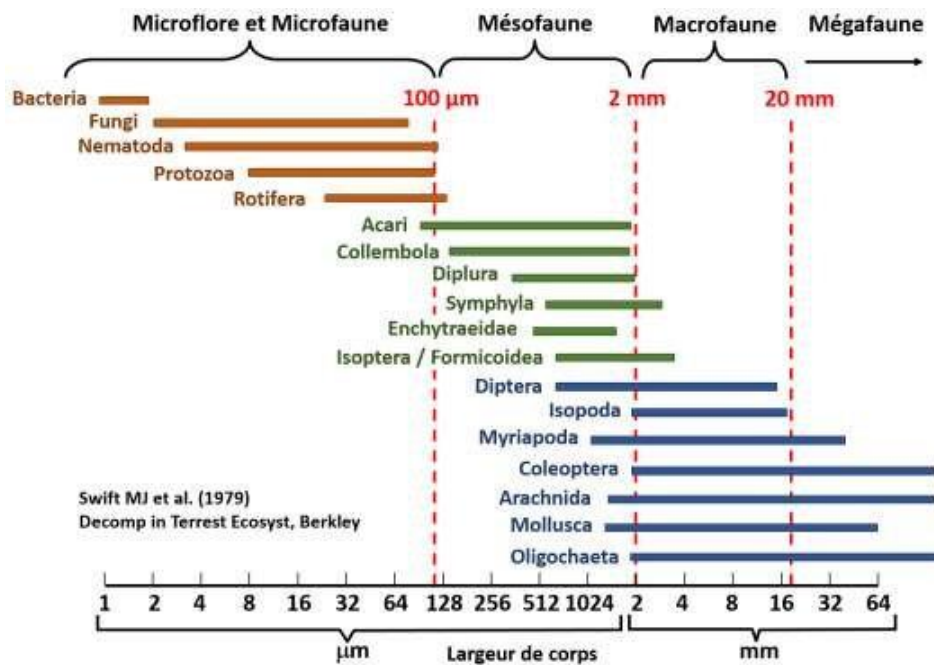


Figure 1 : Classification par taille des organismes du sol, modifiée par Hättenschwiler et al., 2018.

1. Contexte et problématisation de l'étude

1.1. Le fonctionnement des sols et de la microfaune

1.1.1. Les caractéristiques physico-chimiques des sols

Le sol est une couche plus ou moins fine à la surface de l'enveloppe terrestre. La roche mère est tributaire de son environnement et du climat. Elle se dégrade au cours du temps sous les interactions environnementales physiques et biologiques, tels que l'eau ou les organismes vivants. Ces actions altèrent la roche et il en résulte une couverture pédologique, plus communément appelée sol. Selon le référentiel pédologique (Baize & Girard, 2009), cette surface que nous foulons du pied est « *un objet naturel, continu et tridimensionnel* ». Le sol évolue dans le temps, dû à son environnement, et ses propriétés sont plus ou moins variables à l'échelle locale, voir du bassin versant (Bruand & Tessier, 2017). La structure du sol peut être définie par la taille, la forme et l'arrangement des particules du sol. Ces critères, pris simultanément, représentent l'espace dans lequel l'activité biologique prend place (Ladd & Foster, 1996). Ces composants peuvent être minéraux et organiques et organisés entre eux, ils influencent la structure des sols.

Les fonctions de la matière organique sont multiples, et elle contribue à la fertilité physique, chimique et biologique des sols (Chenu et al., 2017). Lors de sa dégradation et sa minéralisation, la matière organique fournit des nutriments minéraux aux plantes et organismes vivants dans les sols. Les processus de transports et de transformations des nutriments sont étudiés sous la représentation des cycles biogéochimiques, tel que le cycle du carbone et de l'azote. Les nutriments sont des composés disponibles pour les végétaux sous forme minérale. Cette matière organique, ainsi que la disponibilité des nutriments influencent les caractéristiques du sol, impliquant favorablement ou non la croissance du système microbien et les plantes (Arias et al., 2005). La matière organique contribue à former des agrégats de particules de compositions et de tailles variables (Ladd & Foster, 1996). Ils favorisent l'abri du vivant, tel que les plantes et les animaux.

1.1.2. Le sol, un écosystème complexe

La matrice sol fonctionne avec un écosystème biologique non négligeable. Certaines espèces vivent partiellement dans le sol au cours de leur cycle, d'autres sont toute leur vie dans le sol. Un quart des espèces vivantes décrites sur terre sont des habitants stricts du sol (Decaëns et al., 2006). Les espèces sont de tailles différentes, allant de plusieurs centimètres pour la mégafaune, à quelques micromètres pour la microfaune et les microorganismes (Figure 1 –(Hättenschwiler et al., 2018)). La taille, la composition et les fonctionnements des communautés microbiennes (bactéries et champignons) influencent les propriétés physico-chimiques du sol (Elliott et al., 1996). Les communautés microbiennes représentent un des facteurs majoritaires qui influencent les cycles du carbone, du phosphore et de l'azote (Sinsabaugh et al., 2014). Dans le cycle de l'azote les microorganismes nitrates réducteurs ont la capacité de produire de l'énergie de cette réaction (Kandeler et al., 2011).

Pour étudier le fonctionnement des sols il existe de nombreux indicateurs.

1.1.3. Les indicateurs de la santé des sols

L'objectif d'un indicateur est d'apporter des informations utiles à la discrimination de certains paramètres, tels que l'occupations de sols, les pratiques agricoles ou encore les changements de températures. Il existe plusieurs types d'indicateurs, mais dans le cas présent l'accent est mis sur les indicateurs de la santé des sols. Ce terme est défini comme « *la capacité continue du sol à fonctionner*

comme un système vivant vital, dans les limites de l'écosystème et de l'utilisation des terres, pour soutenir la productivité biologique, maintenir ou améliorer la qualité de l'air et de l'eau, et promouvoir la santé des plantes, des animaux et des humains » (Doran, 1996). De ce fait, les indicateurs doivent répondre à ces critères. Les premiers indicateurs de la santé des sols sont des indicateurs chimiques (Lehmann et al., 2020). Les indicateurs physiques sont également bien connus et très répandus. L'un des principaux critères de sélection d'un indicateur réside dans sa capacité à fournir des réponses rapides aux modifications naturelles ou anthropiques. En ce sens les indicateurs biologiques possèdent la capacité de répondre plus rapidement (Cardoso et al., 2013).

De nombreux indicateurs biologiques sont étudiés, tels que la macro et la mésofaune, la biomasse microbienne, les enzymes du sol, la respiration du sol etc. Malgré la connaissance de nombreux indicateurs, il n'existe pas de méthode normalisée pour évaluer la santé des sols (Janvier et al., 2007), même s'il l'approche TRIADE (ISO 19204) est une méthodologie d'évaluation des risques écologiques plutôt utilisé en sites et sols pollués (Pucheux, 2020). La biomasse microbienne est un bon indicateur générale, mais biomasse et santé des sols n'ont pas toujours de lien direct (Janvier, 2008), même s'il est supposé, qu'une forte densité microbienne va favoriser la richesse du sol et donc sa santé. Si les activités enzymatiques représentent un grand potentiel pour évaluer la santé du biote des sols (Alkorta et al., 2003), elles présentent également des limites et ne peuvent pas être étudiées seules. Pour diagnostiquer la santé des sols, les indicateurs physico-chimiques et biologiques doivent être considérés conjointement. L'étude de la santé des sols ne peut être représentée par un cycle et doit regrouper plusieurs indicateurs. Dans le cas présent il est intéressant de développer des indicateurs spécifiques au cycle de l'azote, car il présente une grande importance dans les sols agricoles.

1.1.4. L'origine et le fonctionnement des enzymes extracellulaires

La libération et production des enzymes est régulée par les microorganismes en réponses aux signaux environnementaux de la disponibilité en ressources (Singh & Kumar, 2008; Sinsabaugh et al., 2014). Les enzymes sont des protéines composées de chaînes d'acides aminés qui dans leur conformation tridimensionnelle présentent un site actif. Cette propriété leur confère des capacités catalytiques, permettant de cliver des molécules spécifiques appelés substrats. Leur site actif permet au substrat de se lier pour former un complexe enzyme-substrat. La réaction chimique de ce complexe va permettre de couper ou transformer le substrat pour former des produits de la réaction. Chaque enzyme est spécifique d'un substrat et d'une réaction, qui est à la base de leur classification selon la nomenclature de la commission des enzymes (EC).

Dans les sols, il existe quatre types d'enzymes connues, dont deux plus largement étudiées : les oxydoréductases et des hydrolases (Ladd, 1978). Il existe également des transférases et lyases (Ladd, 1978). Elles interviennent dans les grands cycles biogéochimiques tels que le carbone, l'azote, le soufre. L'activité de ces protéines permet de décomposer les macromolécules de la matière organique afin de libérer des molécules plus petites, les nutriments, disponibles pour les plantes et les organismes vivants. Elles sont principalement produites et libérées par des bactéries et des champignons, une faible partie étant produite et libérée dans le milieu par les animaux et les végétaux (Singh & Kumar, 2008).

Ces enzymes du sol sont un indicateur de l'activité des microorganismes et considérées comme des indicateurs de la santé et la fertilité des sols (Singh & Kumar, 2008). Elles sont sensibles aux pratiques agricoles, au pH, à la quantité de nutriments présents, ainsi qu'aux conditions climatiques. Au niveau du cycle de l'azote, la communauté microbienne compte entre 10 et 50% des bactéries totales capables de réduire les nitrates. La proportion de champignons impliqués dans le processus est encore très controversée (Kandeler et al., 2011).

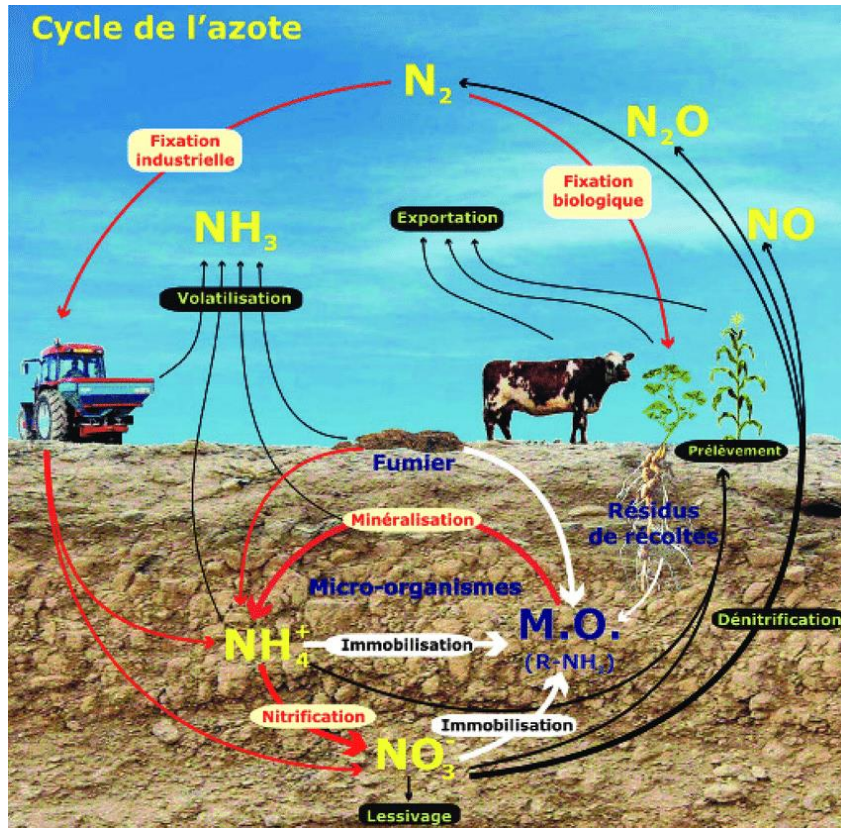


Figure 2 : Représentation des flux du cycle de l'azote (Sinaj et al., 2009).

1.2. La disponibilité de l'azote en agronomie

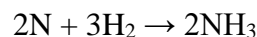
1.2.1. Le cycle de l'azote

Le cycle de l'azote décrit un ensemble de processus de transports et de transformations des formes chimiques azotées, dans les différentes interfaces (Figure 2 - (Sinaj et al., 2009)), permettant le passage de la forme organique à la forme minérale et inversement. Ces réactions ont lieu entre les différentes interfaces de l'écosystème terrestre, atmosphères, géosphères et hydrosphères. Dans les sols, 95% de l'azote est représenté par de l'azote organique (Chevron, 1996).

Il existe 4 réactions biochimiques dans le cycle de l'azote (Porter, 1975) i) fixation de l'azote, ii) ammonification, iii) nitrification et iv) dénitrification. Dans les sols, les micro-organismes induisent, par des processus enzymatiques, la transformation de l'azote sous ses diverses formes (Obriot, 2016; Stein & Klotz, 2016). Les microorganismes impliqués dans ce processus sont regroupés dans 4 catégories i) fixateurs d'azote, ii) oxydants de l'ammonium, iii) les nitrifiants et iv) les dénitrifiants (Obriot, 2016). Le processus majoritaire pour rendre l'azote disponible aux plantes est la fixation biologique (Vincent, 2018). La quantité d'azote dans les sols est variable selon l'écosystème et l'utilisation du milieu.

Fixation de l'azote

La fixation de l'azote est l'une des réactions du cycle de l'azote, elle permet le transfert du N₂ entre l'atmosphère et la biosphère. La réaction est réalisée par les micro-organismes ou lors d'une symbiose. La nitrogénase est l'enzyme présente lors de ce transfert, inactivée de façon irréversible lors d'un contact avec l'oxygène.



Des associations qui favorisent la fixation de l'azote pour les plantes, sont présentes dans les sols. La symbiose la plus connue est la présence des nodules chez les légumineuses. Cet organe spécialisé permet l'association de bactéries de la famille des rhizobia et les racines de légumineuses (Vincent, 2018).

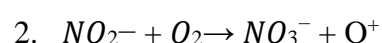
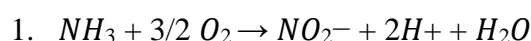
Ammonification

L'ammonification est la transformation de l'azote organique en ammonium en condition d'aérobie. Les macromolécules organiques (protéines, acides nucléiques, chitine, etc) sont dégradées en particules plus fines. Les termes de protéolyse ou de dépolymérisation sont utilisés dans le cas des protéines. Les macromolécules ainsi dégradées, peuvent être absorbées par les microorganismes du sol et transformées en azote inorganiques, le NH₄⁺ (Coulombe, 2014).



Nitrification

La nitrification est le passage de l'azote ammoniacal en nitrate, par une réaction d'oxydation. Cette réaction est réalisée en deux équations, sous conditions d'aérobiose : i) la nitritation, oxydation de l'azote ammoniacal en nitrites ; 2) la nitratisation, oxydation des nitrites en nitrates (Obriot, 2016; Stein & Klotz, 2016). Cette réaction est réalisée par des organismes autotrophes.



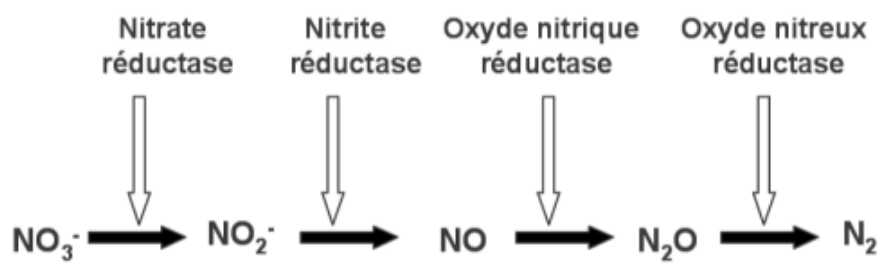


Figure 3 : Etapes et enzymes associées au processus de la dénitrification (Hochstein & Tomlinson, 1988).

Dénitrification

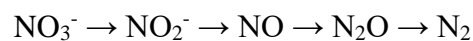
Cette étape du cycle de l'azote transforme l'azote disponible pour le vivant (nitrate) en gaz non disponible N₂. La dénitrification est un processus respiratoire anaérobie qui est catalysé principalement par des bactéries (Hartzog et al., 2017).

1.2.2. La dénitrification

Dernière étape décrite du cycle de l'azote, la dénitrification, est un ensemble successif de réduction des nitrates en azote par les microorganismes (Fowler et al., 2013), faisant intervenir différentes enzymes. Les microorganismes réalisant ces différentes étapes sont spécifiques. Ce sont les microorganismes dénitrifiants. Ils permettent de transférer l'azote des sols vers l'atmosphère.

Il existe deux voies de dénitrification : la voie assimilative et la voie dissimilative (Chatelier, 2010).

- La réduction assimilative des nitrates, se produit en condition anaérobie et forme de l'ammonium utilisé pour la croissance des microorganismes.
- La réduction dissimilative est réalisée uniquement par les bactéries autotrophes ou hétérotrophes. Elle réduit les ions nitrates sous une forme gazeuse.



La dénitrification se déroule en 4 étapes : i) dénitratation, ii) dénitrification, iii) réduction du monoxyde d'azote et iv) réduction du dioxyde d'azote. Chaque étape implique une enzyme spécifique, respectivement : la nitrate réductase, la nitrite réductase, l'oxyde nitrique réductase, et l'oxyde nitreux réductase (Figure 3 - (Hochstein & Tomlinson, 1988)).

L'oxygène est le premier facteur de régulation de la dénitrification. Si la réaction se déroule dans un milieu en présence d'oxygène, alors la réaction est incomplète, et produit du N₂O en quantité importante, comparée à la production de N₂ (Vilain et al., 2009). Les bactéries vont arrêter la réaction et utiliser l'oxygène pour réaliser une respiration énergétiquement favorable. Les organismes autotrophes ou hétérotrophes puisent leur énergie dans le carbone, qui est un des éléments essentiels à la vie. La disponibilité du carbone, est une source d'énergie dans la dénitrification hétérotrophe et l'un des plus importants facteurs de contrôle de la dénitrification (Vilain et al., 2009).

1.2.3. Les facteurs d'influence de la dénitrification

Le potentiel de dénitrification est utilisé pour quantifier la dénitrification dans les milieux. La dénitrification est influencée par divers facteurs, comme la concentration en oxygène, la teneur en humidité du sol, l'azote, le carbone et le pH, ainsi que la structure de la communauté microbienne (Giles et al., 2012).

Le climat et les saisons impactent l'activité dénitrifiante des sols. Les sols subtropicaux avec un climat chaud et humide, sont les sols les plus actifs (Liang et al., 2021; Nieder et al., 1989). En été, entre juin et juillet, les sols ont une activité de dénitrification plus importante (Lu et al., 2012; McGill et al., 2010; Shrewsbury et al., 2016), alors que le mois d'août présente, une activité plus faible, lorsque le sol est plus sec. La température optimale de la dénitrification est de 60 °C (Bremner & Shaw, 1958). Dans une étude in vitro, simulant des températures de climat tempérés (13-25 °C) aucune différence du potentiel de dénitrification n'a été mis en avant. L'humidité joue un rôle plus important. En effet, dans les sols plus humides, tel que des sols hydromorphes, la dénitrification est favorisée (Ducey et al., 2015; Fang et al., 2021; Lu et al., 2012). Les pores sont saturés par la présence d'eau, ceci implique des conditions d'anaérobiose plus importantes. L'humidité favorise également le développement des microorganismes par l'apport et le transport des nutriments. En lien avec la présence d'eau dans le sol, la granulométrie va jouer un rôle et modifier la taille des pores. Elle représente un critère à ne pas négliger, car certaines textures de sol peuvent faciliter la rétention d'eau

et créer plus facilement les conditions d'anaérobie (Aulakh et al., 1991; Barton et al., 1999; Groffman & Tiedje, 1989). De ce fait, la présence d'argile semble être un facteur favorisant la dénitrification. Dans le cadre du changement climatique, ces questions sont très importantes pour suivre le fonctionnement des sols.

L'oxygénation et la porosité des sols sont souvent modifiées par le travail du sol. La pratique du labour impacte la dénitrification des sols (Attard et al., 2011; Monti et al., 2021) car il favorise l'aération qui va ainsi réduire le processus de dénitrification. Le semi-direct est donc une méthode de culture qui devrait largement favoriser ce processus. L'intensification des cultures impacte les paramètres physico-chimiques des sols. Les pH des sols agricoles peuvent être modifiés par l'ajout de soufre ou la pratique du chaulage. Le pH optimum pour la dénitrification est situé entre 7 et 8 (Šimek & Cooper, 2002). Au sein du processus de dénitrification, le pH présente deux effets : un effet indirect et un effet direct. L'effet indirect est lié à l'activité microbienne des sols, car celle-ci est modifiée et va en réponse agir sur le potentiel de dénitrification des sols. La diminution du pH impacte également négativement l'activité bactérienne (Čuhel & Šimek, 2011; Herold et al., 2012; Liang et al., 2021), ce qui va réduire le potentiel de dénitrification. Il est également en lien avec l'activité des enzymes, en limitant la formation du complexe enzyme-substrat i) par modification de la conformation de l'enzyme, ii) par modification du degré d'ionisation du substrat (Naman et al., 1997). Les pH alcalins sont propices à la dénitrification, et, de ce fait, le chaulage est une pratique qui peut augmenter ce processus dans les sols trop acides (Anderson et al., 2017).

La présence de matière organique, et plus précisément de carbone organique, favorise la dénitrification. Le carbone organique des sols présente une corrélation positive avec le potentiel de dénitrification (Herold et al., 2012; Hu et al., 2020; Maurer et al., 2021). Il stimule la croissance des microorganismes et favorise l'activité microbienne dans les sols. A l'inverse, dans une autre étude, aucun impact n'a pu être démontré (Yu et al., 2014), mais ceci est expliqué par la faible dénitrification dans ces sols et le pH acide entre 4 et 5. Le carbone dans les sols peut être un critère d'explication vis à vis de différences de dénitrification entre les sols gérés en culture avec une activité moins élevée que les sols en prairies (Attard et al., 2011; Maurer et al., 2021).

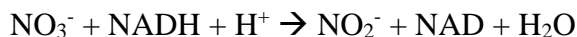
Il existe plusieurs méthodes de dosage du potentiel de dénitrification, mais elles présentent chacune des limites reconnues. La méthode la plus fréquente est le dosage des enzymes, de la dénitrification (Hartzog et al., 2017). Ces dosages impliquent l'ensemble du processus de dénitrification. Pour comprendre au mieux ce processus il est intéressant de se focaliser sur chacune des étapes qui le compose. La nitrate réductase est une enzyme spécifique à l'étape de la dénitrification.

1.2.4. La nitrate réductase

Il existe différentes formes de nitrates réductases, certaines étant propres aux procaryotes, et d'autres plus généralement présentes chez les eucaryotes. Les nitrates réductases sont des oxydoréductases. Les réactions d'oxydoréduction transfèrent les ions H^+ et les électrons. Le transporteur d'électrons est la flavine adénine dinucléotide, qui est un groupement prosthétique naturel de la nitrate réductase (Pouille, 1979). Elle intervient dans la phase de dénitrification, plus précisément la dénitrification. Elle est essentielle au contrôle du métabolisme de l'azote et permet la réduction des nitrates en nitrites dans des conditions d'anaérobie. La nitrate réductase est une molybdo-flavoprotéine d'un poids moléculaire compris entre 500 000 et 600 000. Le pH optimal de cette enzyme est compris entre 7 et 7,5 (Clément & Le Tacon, 1976). Elle est inactivée à partir de 40 °C (Abdelmagid & Tabatabai, 1987).

Les formes de nitrate réductase (Campbell, 1988, 1999) sont nombreuses, certaines étant assimilatives et d'autres dissimilatives. Cette voie est propre aux procaryotes (Philippot et al., 2002) et peut être réalisée en aérobie (Ji et al., 2015).

- Nitrate réductase à NADH



- Nitrate réductase NADPH



Nitrates réductase propres aux procaryotes :

- Nitrate réductase respiratoire/ nitrate réductase A



- Nitrate réductase assimilatoire/ ferredoxine nitrate réductase



- Nitrate réductase périplasmiques



La bibliographie est peu étayée sur l'activité de la nitrate réductase dans les sols. Certaines études sont plus orientées sur l'étude des gènes encodant les nitrates réductases (Liu et al., 2020; Philippot et al., 2002; Yu et al., 2014). Les autres mesurent l'activité de la nitrate réductase, en utilisant la méthode développée par Abdelmagid & Tabatabai (1987). Deux publications ont étudié les facteurs d'influence de l'activité nitrate réductase dans les sols. La fertilisation minérale azotée est un facteur d'influence et elle augmente l'activité de la NAR à partir de 150 mg-N.kg⁻¹ (Cao et al., 2019). Singh & Kumar (2008), ont montré que l'occupation des sols est également un facteur impactant. Dans leur étude la présence de forêt induit une activité plus importante qu'en sol en culture de coton (Singh & Kumar, 2008).

Les hypothèses de l'étude proposées ici sont axées sur le cadre d'intérêt de l'indicateur nitrate réductase dans les sols. Effectivement, même si la littérature présente quelques données sur les facteurs impactant l'activité, les résultats restent très succincts. Pour la mise en place de cet indicateur au sein de la plateforme Biochemenv, il est indispensable de mettre en place une étude plus conséquente, afin d'avoir une vision plus globale des effets que peuvent avoir l'occupation des sols et les pratiques culturales.

Avant de répondre à cette problématique, il est indispensable de travailler avec une méthode optimisée et validée. Le développement a été réalisé sur la plateforme Biochem-Env (INRAE, Versailles) en 2021, afin d'optimiser et miniaturiser le dosage. La partie validation de méthode est développée dans ce rapport afin de vérifier les critères de validité de la méthode.

1.3. Fonctionnement et intérêts de la validation de méthode

La validation de méthode s'applique aux méthodes déjà développées. La norme NF EN ISO/CEI 17025 :2005 met en avant le besoin de valider et d'estimer l'incertitude d'une méthode qui n'est pas normalisée afin de déterminer sa performance.

1.3.1. Objectifs de la validation de méthode

La validation de méthode s'intègre dans le développement d'une assurance qualité au laboratoire. Elle permet de définir si le protocole mis en œuvre est fiable et dans quel cadre. Plusieurs caractéristiques sont étudiées, telles que : répétabilité, reproductibilité, linéarité, sensibilité, robustesse, justesse, etc. Dans une approche intra-laboratoire il est essentiel de connaître la justesse, la répétabilité, la robustesse et la non-linéarité (Désenfant et al., s. d.).

Le mode opératoire de l'analyse définit la quantité mesurée, qui doit être identique à celle mesurée dans le mode opératoire. Il est important de faire la distinction entre deux types de méthode (Feinberg, 2010) :

- Les méthodes indirectes, pour lesquelles l'analyse nécessite la réalisation d'une courbe d'étalonnage utilisée pour mesurer les échantillons, tel que le dosage d'une activité enzymatique.
- Les méthodes directes, pour lesquelles l'analyse mesure elle-même l'échantillon, comme par exemple une pesée.

Il existe plusieurs critères importants à étudier pour valider une méthode de dosage. Ces critères sont définis dans la version 2007 du Vocabulaire International de Métrologie (VIM) (Guide ISO/CEI 99 :2007).

Fidélité : Etrete de l'accord entre les valeurs mesurées obtenues par des mesurages répétés du même objet ou d'objets similaires dans des conditions spécifiques.

Répétabilité : Fidélité de mesure selon un ensemble de condition de répétabilité (série).

Fidélité intermédiaire : Fidélité de mesure selon un ensemble de conditions de fidélité intermédiaires.

Justesse : La justesse est l'accord entre la moyenne des valeurs et la valeur cible.

Exactitude : Accord entre les valeurs mesurées et la valeur cible; elle combine la justesse et la fidélité.

Incertitude : Paramètre non négatif qui caractérise la dispersion des valeurs à la valeur attribuée à un mesurande ($u(x)$), à partir d'informations utilisées.

Incertitude élargie : Produit d'une incertitude composée et d'un facteur (k) supérieur au nombre 1. Pour un facteur de 2, on parle d'incertitude élargie à 95%, $U_{95\%}(x)$.

Incertitude élargie relative : Quotient de l'incertitude élargie par la valeur absolue de la valeur mesurée $UR_{95\%}$.

Domaine d'application : Ensemble des matrices auquel s'applique la méthode, en tenant compte de la gamme de concentration sur laquelle doit porter la validation.

Domaine de validité : Ensemble des types de matrices auquel s'applique la méthode sur laquelle a porté la validation et pour lequel les futurs résultats fournis par la méthode sont jugés valides.

Intervalle de tolérances : Intervalle qui contient en moyenne une proportion $\beta\%$ définie de futures mesurages obtenus selon un mode opératoire donnée et pour une concentration donnée.

Intervalle d'acceptabilités : Spécification de la performance exigée pour la méthode, exprimée comme un écart acceptable autour de la valeur de référence, notée $^{+/-}\lambda$.

Dans le cas d'un dosage sur des paramètres biologiques, la validation de méthode doit être réalisée en présence de la matrice. Pour cette raison, la méthode des ajouts dosés est utilisée. Une concentration connue du mesurande est ajoutée à une matrice pour observer l'effet de la matrice sur la mesure. Les différents critères sont étudiés dans le domaine d'application de la méthode, dans le cadre d'une validation par profil d'exactitude

1.3.2. Principe du profil d'exactitude

La validation est réalisée de manière identique à la méthode de dosage afin de reproduire à l'identique les conditions du dosage.

La méthode du profil d'exactitude est basée sur les principes décrits dans les normes de la série ISO 5725 (1, 2, 3, 4 ; 1994). Elle permet d'estimer l'exactitude d'une méthode et de répondre aux questions d'incertitude et de domaine de validation et d'application.

Le choix de plusieurs matrices de sols permet d'étudier l'effet de différentes caractéristiques de sols, afin de définir le domaine d'application du dosage. Le domaine de validité est déterminé par le calcul des limites de quantification et de linéarité de la méthode.

10 étapes sont nécessaires pour réaliser une validation de méthode par profil d'exactitude (Feinberg, 2010) :

- Définir la quantité mesurée : analyse, procédure et type de méthode directe ou indirecte
- Préciser les objectifs de la validation : domaine de validation, limites de tolérance et acceptabilité
- Sélectionner les échantillons de validation : matrice, valeurs de références
- Planifier les essais de la validation : mode opératoire, série et répétitions
- Planifier l'étalonnage : mode opératoire, série et répétitions
- Réaliser les essais : application de la méthode utilisée en routine
- Calculer les concentrations : du modèle d'étalonnage, par prédites inverses
- Calculer les critères de validation : justesse et fidélité par série et intervalles de tolérance
- Construire le profil d'exactitude
- Interpréter le profil d'exactitude pour la validation

2. Matériels et méthodes

2.1. Description des sols et sites de prélèvement

2.1.1. Sols utilisés pour la validation de méthode

Le choix des sols prélevés pour la validation de méthode a été réalisé selon deux critères : la texture du sol et la couverture végétale. La diversité des sols sélectionnés pour la validation de méthode permet de déterminer les sols pour lesquels la fiabilité de l'indicateur est assurée. Quatre sols ont été sélectionnés : un sol de forêt (sableux), un sol de culture (argilo-limoneux) et deux sols de prairies (sablo-limoneux et limoneux).

2.1.2. Sites expérimentaux de l'étude

Les dispositifs SOERE (Système d'Observation et d'Expérimentation sur le long terme pour la Recherche en Environnement), regroupent plusieurs orientations de recherche dont les SOERE PRO (dédiés aux produits résiduels organiques) et les SOERE ACBB (dédiés à l'étude des Agro-Écosystèmes, Cycles Biogéochimiques et Biodiversité). Ils sont répartis sur le territoire national ainsi qu'à l'étranger. Trois ont été échantillonnés pour l'étude :

Site expérimental QualiAgro (SOERE PRO)

Le site est localisé à Feucherolles (78) et s'étend sur 6 ha. Il est dédié à l'étude des composts urbains (Annexe 1). Ce site expérimental de longue durée a été mis en place en 1998, avec une répartition des parcelles sous 5 traitements, avec un épandage de produits résiduels organiques (PRO) tous les 2 ans. Il est structuré en quatre blocs (répétitions), les cinq traitements étant répartis aléatoirement sur les parcelles de chaque bloc : témoin sans amendements organiques (TEM), compost de biodéchets (BIO), fumier de bovins composté (FUM), compost de boue de station d'épuration et déchets verts (DVB) et compost d'ordures ménagères résiduelles (OMR). Le dernier épandage a eu lieu en septembre 2021 et une culture de seigle était présente lors des prélèvements.

Site expérimental EFELE (SOERE PRO)

Ce site, inauguré en 2012, est situé près de Rennes (35) sur la commune du Rheu et est dédié à l'étude des effluents d'élevage (Annexe 2). Il est réparti sur 2,3 ha, en deux sous essais. L'essai PROs, qui fait partie du rapport, est consacré à l'étude de l'impact des effluents d'élevage comme apport de produits résiduels. Il est composé de 4 blocs, comportant chacun 9 parcelles de 113 m². Les modalités pour chaque bloc sont : un témoin avec azote minéral, un témoin sans azote minéral, cinq PROs et deux conditions avec ajout d'azote minéral (fumier de bovins, fumier de porcs, fumier de volaille, fumier de porc composté, digestat de méthanisation). Le fumier bovins (FB), le fumier de porcs composté (CP) et le fumier de volailles (FV) sont épandus tous les deux ans, le dernier épandage a eu lieu en 2020. Les autres sont épandus annuellement. Le dernier apport d'azote minéral a été réalisé en 2021 sur du blé à 108 kg N.ha⁻¹. Le prélèvement a eu lieu en présence d'une CIPAN de moutarde.

Site expérimental Lusignan (SOERE ACBB)

Le site de 25 ha de Lusignan (86), comprend un dispositif en bloc (Annexe 3). Les traitements sont au nombre de 5 et représentent un gradient de prairies, dont un témoin en culture avec une rotation maïs, blé, orge. A la fin de chaque séquence une rotation de culture sur 3 ans est réalisée (maïs, blé, orge) avant un retour en prairie. Quatre modalités sont présentes sur le site, une modalité en prairie temporaire sur 3 ans, deux modalités en prairie temporaires sur 6 ans avec des niveaux différents de fertilisations et une prairie permanente de 20 ans.

Lors du prélèvement, le témoin est en culture d'orge, la prairie temporaire de 3 ans (P 3ans) est à la fin de son cycle après 3 années de prairie, les prairies temporaires de 6 ans (P 6ans et P 6ans N-) sont en culture pour la 3ème année consécutive, et la prairie permanente est en prairie depuis 18 ans (P 20ans).

Autres réseaux et sites

Site expérimental Oasys

Le site Oasys est situé sur une zone de plaine à Lusignan (86), sur 90 ha (Annexe 4). Ce site a une orientation animale, avec comme objectif de « produire du lait biOclimAtique en expérimentation-SYSTème ». Le dispositif a été mis en place en 2013 pour une durée de 20 ans. Afin de couvrir des pratiques complémentaires pour l'étude, deux parcelles menées en agroforesterie ont été sélectionnées : parcelles V12 et M2.

Au sein de chaque parcelle, le système présente une zone sans arbres (témoin agricole) et une zone en agroforesterie. La parcelle V12 présente également un témoin forêt. La parcelle M2 est une parcelle pâturable, avec une rotation culturale sur 7 ans, valorisée principalement par du pâturage. La parcelle V12 est une parcelle non pâturable, gérée sur une rotation de 8 ans.

Les prélèvements ont été réalisés sur chaque témoin (agricole et forêt) et à deux distances des arbres dans l'espace géré en agroforesterie. La distance entre les deux rangées d'arbres est divisée par 2 ou par 4, les échantillons sont respectivement nommés 2/D et 4/D. Lors du prélèvement la parcelle M2 est en prairie de ray-grass et trèfles et la parcelle V12 est en prairie de luzerne.

Le réseau RMQS

Le programme national du Réseau de Mesure de la Qualité des Sols (RMQS) est un réseau de 2240 sites répartis sur l'ensemble du territoire national et des départements d'outre-mer, selon une maille carrée de 16 km (Annexe 5). Son objectif est de dresser un bilan de l'état des sols français et de suivre leur évolution à long terme. Ce réseau permet d'avoir des sols représentatifs des différents couverts végétal tels que les forêts, les grandes cultures, les prairies et les vignes et vergers. Les prélèvements sont effectués sur le territoire français tout au long de l'année, à raison d'environ 250 prélèvements par an.

2.2. Prélèvements et préparation des sols

Les prélèvements sont effectués à l'aide d'une tarière sur l'horizon 0-20 cm. L'échantillon représentatif de la parcelle est réalisé avec 5 points de prélèvements par parcelle. Les points de prélèvement d'une parcelle sont regroupés dans un saut et mélangés ensembles, puis une cuillère de sol (environ 250 g) est déposée dans un sac. Les sacs sont annotés préalablement avec le numéro d'échantillon, le lieu de prélèvement, la parcelle et l'horizon de prélèvement. Les sols sont tamisés à 5 mm au laboratoire afin d'éliminer les cailloux et les débris de feuilles ou de branches. Les analyses sont réalisées sur des échantillons de sol frais conservés à 15 °C un maximum de 3 jours.

2.3. Dosage enzymatique

Les dosages de l'activité nitrate réductase ont été réalisés par dosage colorimétrique, avec une méthode modifiée de Abdelmagid & Tabatabai, (1987).

Une gamme étalon est réalisée lors de chaque analyse. Elle permet de mesurer l'absorbance associée à des concentrations connues en nitrites. Le gradient est réalisé avec une solution de nitrite de sodium (NaNO_2), d'une concentration allant de 0 à $0,1428 \mu\text{mole.mL}^{-1} [\text{NO}_2^-]$ (Tableau I).

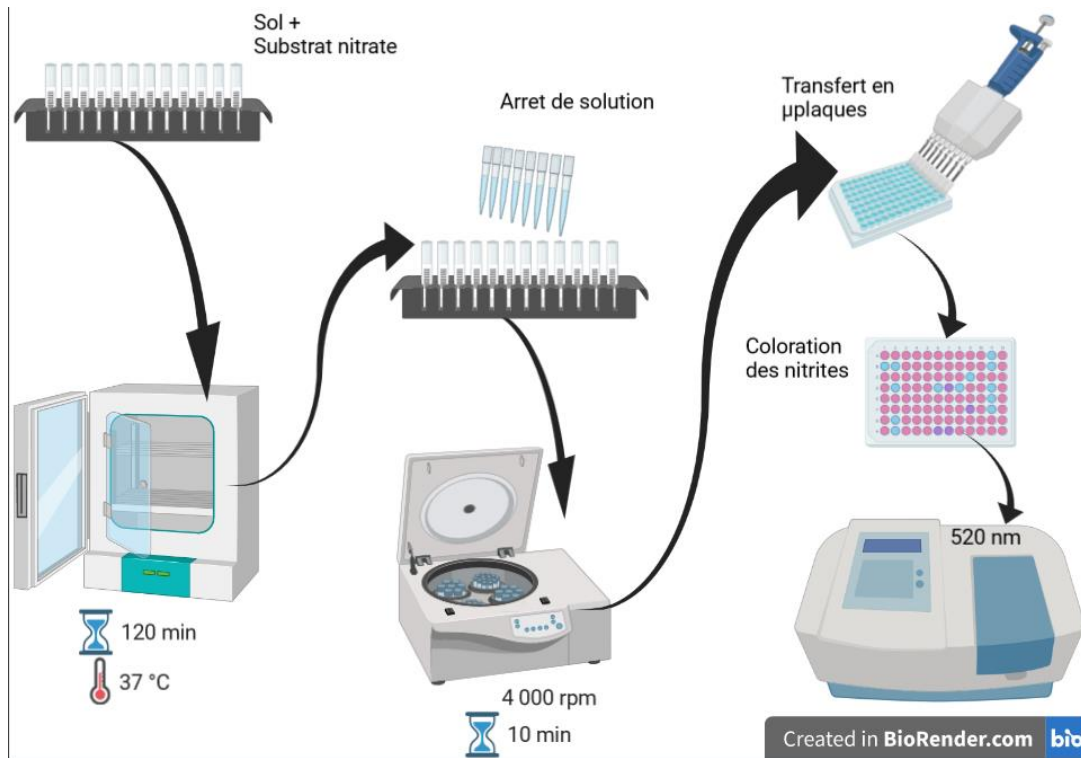


Figure 4 : Schématisation du dosage de la nitrate réductase par spectrophotométrie.

Tableau II : Choix des niveaux de concentration en $[\text{NO}_2^-]$ pour la réalisation des ajouts dosés.

Niveaux	A	B	C	D	E
$[\text{NO}_2^-] \mu\text{mol.mL}^{-1}$	0,0057	0,0114	0,0286	0,0857	0,1428

Environ exactement 1 g de sol frais est pesé dans un tube de 15 ml à fond rond. Les pesées sont réalisées en triplicats pour chaque échantillon, plus un témoin, soit 4 tubes par échantillon. Le substrat utilisé pour doser l'activité de la nitrate réductase est le nitrate de potassium (KNO₃). Il est ajouté dans les tubes "essais" qui sont incubés 2 h à 37 °C. Les témoins sont congelés à -20 °C. A la fin de l'incubation, la réaction est stoppée par ajout d'une solution de chlorure de potassium (KCl). Le substrat est alors ajouté dans les tubes témoins.

Les tubes sont centrifugés 10 minutes à 3 200 g et le surnageant est transféré en microplaques 96 puits. La quantification des nitrites est basée sur la réaction de Griess (diazotation d'une amine primaire aromatique en présence de nitrite en milieu acide puis complexation avec une autre amine aromatique). L'absorbance est mesurée à 520 nm au spectrophotomètre (SPECTROstar NANO, BMG LABTECH) après 7 minutes d'incubation (Figure 4). La concentration de produit formé est calculée à l'aide de la gamme étalon de nitrite de sodium. L'activité nitrate réductase est calculée selon l'équation suivante :

$$A = 1000 * \frac{\text{Vol}_{\text{réactionnel}} * (\text{Conc}_{\text{éch}} - \text{Conc}_{\text{tém}})}{\text{Tp}_{\text{Sréaction}} * m * h}$$

A : activité nitrate réductase en nmole [NO₂⁻] /min/g sol sec (mU/g sol sec)

Conc (éch ou tém) : concentration de NO₂⁻ en μmol.mL⁻¹

Vol_{réactionnel}: volume en mL

Tp_{Sréaction} : temps de la réaction en min

m : masse d'échantillon de sol pesée par tube en g

h : taux d'humidité de l'échantillon de sol (rapport pds sec/pds humide)

2.4. Validation de méthode/profils d'exactitudes

La validation concerne la méthode de dosage de l'activité de la nitrate réductase développée sur la plateforme BCE, adaptée de la méthode de Abdelmagid & Tabatabai, 1987. Le principe est d'apporter des nitrates en concentration saturante (substrat) et de mesurer l'activité de la nitrate réductase en quantifiant, par colorimétrie, les nitrites libérés par unité de temps. (Description paragraphe 2.3). L'activité enzymatique est la quantité de produit synthétisée par minute. Elle est exprimée en mU/g de sol sec.

2.4.1. Méthode des ajouts dosés

La validation des méthodes biologiques cinétiques est souvent plus complexe que des validations de concentration de produits chimiques. Il est souvent impossible de valider le processus en entier. Le choix se porte alors sur la validation de la quantification du produit de la réaction. La validation de la méthode a donc été réalisée à partir d'ajouts dosés de nitrites apportés en concentration croissante dans les sols. La validation de méthode est réalisée sur 4 matrices de sols détaillées précédemment (description paragraphe 2.1.1). Le produit dosé par spectrophotométrie est l'ion nitrite NO₂⁻. Les échantillons de validation sont préparés avec un gradient de NO₂⁻ entre 0,0057 et 0,1428 μmol.mL⁻¹ (Tableau II). Les analyses sont effectuées en 5 séries de 3 répétitions et sur 5 niveaux de concentration.

Les limites de tolérances (λ) et d'acceptabilités (β) ont été déterminées au début de la validation, et sont respectivement λ +/- 20% et β 80%. La limite de quantification est la concentration où la courbe de limite de tolérance et celle de limite d'acceptabilité se croisent. Les représentations graphiques des profils d'exactitude permettent de visualiser les limites de quantification et de déterminer le domaine de validité pour chaque sol.

2.4.2. Calculs de fidélité, justesse et incertitude

La reproductibilité de la méthode est étudiée par la dispersion relative (RSD) calculée pour chaque concentration par le taux de l'écart-type sur la moyenne des valeurs dosées.

La fidélité intermédiaire (Fi) est représentée par le calcul du coefficient de variation (CV). Ce coefficient est calculé avec l'écart type de fidélité intermédiaire et la moyenne.

La justesse est calculée par la division de la moyenne des valeurs dosée par le mesurande (valeur cible) moins 1.

L'incertitude élargie relative de mesure (pour $k=2$, $UR_{95\%}$) est estimée pour chaque concentration à l'aide d'un modèle empirique grâce aux données des essais de fidélité intermédiaire. Le modèle est représenté par $y=a*x^b$ avec x , concentration $NO_2^- \mu\text{mol.mL}^{-1}$ et y $UR_{95\%}$. L'incertitude élargie à 95% est calculée pour chaque concentration, dans le domaine de validité, par un produit en croix $y*x/100=U_{95\%}$ en $\mu\text{mol.mL}^{-1}$

2.5. Traitement des données et analyses statistiques

Toutes les données sont analysées avec le logiciel R, version 4.2.1. Les différences des tests sont considérées significatives quand la p-value est inférieure à 0,05, soit 5%.

Pour étudier l'effet de l'occupation des sols et l'impact des pratiques sur la nitrate réductase, des tests de comparaisons de moyennes ont été effectués. Lorsque le nombre de traitement est d'au moins trois, et si les conditions d'applications sont respectées, des ANOVA sont réalisées, suivies d'un test de Tukey. Les conditions d'application du test sont la normalité des données, testée par le test de Shapiro & Wilk et l'homogénéité des variances, testée par le test de Bartlett. Dans le cas où les conditions d'application ne sont pas respectées, des tests non paramétriques ont été appliqué, avec des tests de Kruskal & Wallis, suivi de test post oc de Dunn. Lorsque le nombre de traitements est de deux, si les conditions d'application sont respectées, des tests de Student ont été réalisés. Dans le cas contraire, la comparaison est réalisée par des tests de Mann & Whitney.

Pour étudier le lien entre les activités et les paramètres du sol, des tests de corrélation ont été effectués pour déterminer le coefficient de Pearson. Pour valider ou non les corrélations la normalité des résidus et l'absence d'effet levier sont prises en compte via les distances de Cook.

Tableau III : Coefficients de variation de mesures de nitrates (n= 5)

Valeur cible (μM)	0,0057	0,0114	0,0286	0,0857	0,1428
Sol de culture Argilo-limoneux	15,44%	11,87%	5,88%	4,51%	5,26%
Sol de prairie Sablo-limoneux	13,40%	22,40%	8,17%	5,18%	4,11%
Sol de prairie Limoneux	23,19%	15,71%	10,81%	6,70%	8,60%
Sol de forêt Sableux	212,36%	79,82%	23,41%	13,02%	10,07%

Tableau IV : Ecart des résultats de quantification des nitrites par rapport aux valeurs cibles (n= 5)

Valeur cible (μM)	0,0057	0,0114	0,0286	0,0857	0,1428
Sol de culture Argilo-limoneux	-40,75%	-25,47%	-15,05%	-7,36%	-8,31%
Sol de prairie Sablo-limoneux	-21,56%	-28,95%	-12,79%	-9,75%	-9,50%
Sol de prairie Limoneux	-28,74%	-31,12%	-11,60%	-3,94%	-0,04%
Sol de forêt Sableux	-79,64%	-54,34%	-19,08%	-9,27%	-5,54%

3. Résultats

3.1 Validation de méthode

3.1.1. Fidélité de la méthode

La répétabilité est inférieure à 10% pour les sols de culture et de prairie, à la concentration $0,0057 \mu\text{mol.mL}^{-1}$. Le dosage en sols de culture et de prairie sablo-limoneux ont une répétabilité de 7%. Le dosage réalisé sur le sol de forêt à une répétabilité plus variable. Elle est inférieure à 5% pour les fortes concentrations ($0,0857$ et $0,0114 \mu\text{mol.mL}^{-1}$) et se situe au-dessus de 10% pour les concentrations les plus basses.

Les résultats de fidélité intermédiaire (Tableau III) montrent une variabilité inférieure à 11% pour des concentrations de NO_2^- supérieures à $0,0286 \mu\text{mol.mL}^{-1}$, dans le sols de prairie et de culture et $[\text{NO}_2^-]$ à $0,1428 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ dans le sol de forêt. Les coefficients de variation sont plus importants pour la concentration la plus faible à $0,0057 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ en NO, à l'exception du sol de prairie sablo-limoneuse. La variabilité augmente de 13,4% à 22,4% pour les concentration respectives de $[\text{NO}_2^-]$ $0,0057 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ et $0,0114 \mu\text{mol.mL}^{-1}$. Pour le sol de forêt, la variabilité est plus importante : de 10,07% à 212,36%.

3.1.2. Justesse de la méthode

Les écarts de justesse (Tableau IV) présentent des différences selon les concentrations et les sols. Les résultats montrent des écarts inférieurs à 10% pour des concentrations de nitrites supérieures ou égales à $0,0857 \mu\text{mol.mL}^{-1}$. Les écarts de justesse sont compris entre 10 et 15% à $0,0857 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ de nitrite pour les deux sols de prairie et le sol de culture. Pour les sols de prairie de texture sablo-limoneux, les écarts de justesse sont plus grand à $0,0114 \mu\text{mol.mL}^{-1}$, qu'à une concentration de $0,0057 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ de nitrite. Les mesures réalisées sur le sol de forêt présentent des écarts supérieurs à 50% dans pour des concentrations en nitrites inférieures à $0,0114 \mu\text{mol.mL}^{-1}$.

3.1.3. Incertitude du dosage

Les équations de l'incertitude (Tableau V) permettent de calculer l'incertitude élargie pour chaque sol et à chaque concentration de NO_2^- .

L'incertitude élargie relative est supérieure à 15% pour des concentrations inférieures à $0,0286 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ pour le sol de culture et le sol de prairie sablo-limoneux, ainsi qu'à $0,0857 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ pour le sol de prairie limoneux et pour l'ensemble des concentrations du sol de forêt.

Le calcul de l'incertitude pour le sol de culture suit l'équation $y=0,0471*x^{-0.353}$. A la concentration $0,0857 \mu\text{mol.mL}^{-1}$, l'incertitude $UR_{95\%}$ est de 11%. Le calcul de l'incertitude élargie donne $U_{95\%}(x)=0,0096 \mu\text{mol.mL}^{-1}$, soit $x=0,0857 \pm 0,0096 \mu\text{mol.mL}^{-1}$. L'incertitude $UR_{95\%}$ est inférieure à 9% pour $[\text{NO}_2^-]$ à $0,1428 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ en sol de culture et de prairie sablo-limoneux. Le calcul donne pour les deux sols : $U_{95\%}(x)=0,0013 \mu\text{mol.mL}^{-1}$, soit $x=0,1428 \pm 0,0013 \mu\text{mol.mL}^{-1}$.

Tableau V : Equations de l'incertitude, par type de sol

Sol de culture Argilo-limoneux	Sol de prairie Sablo-limoneux	Sol de prairie Limoneux	Sol de forêt Sableux
$y=0,0471*x^{-0.353}$	$y=0,038x^{-0.46}$	$y=0,0771x^{-0.343}$	$y=0,0289x^{-0.928}$

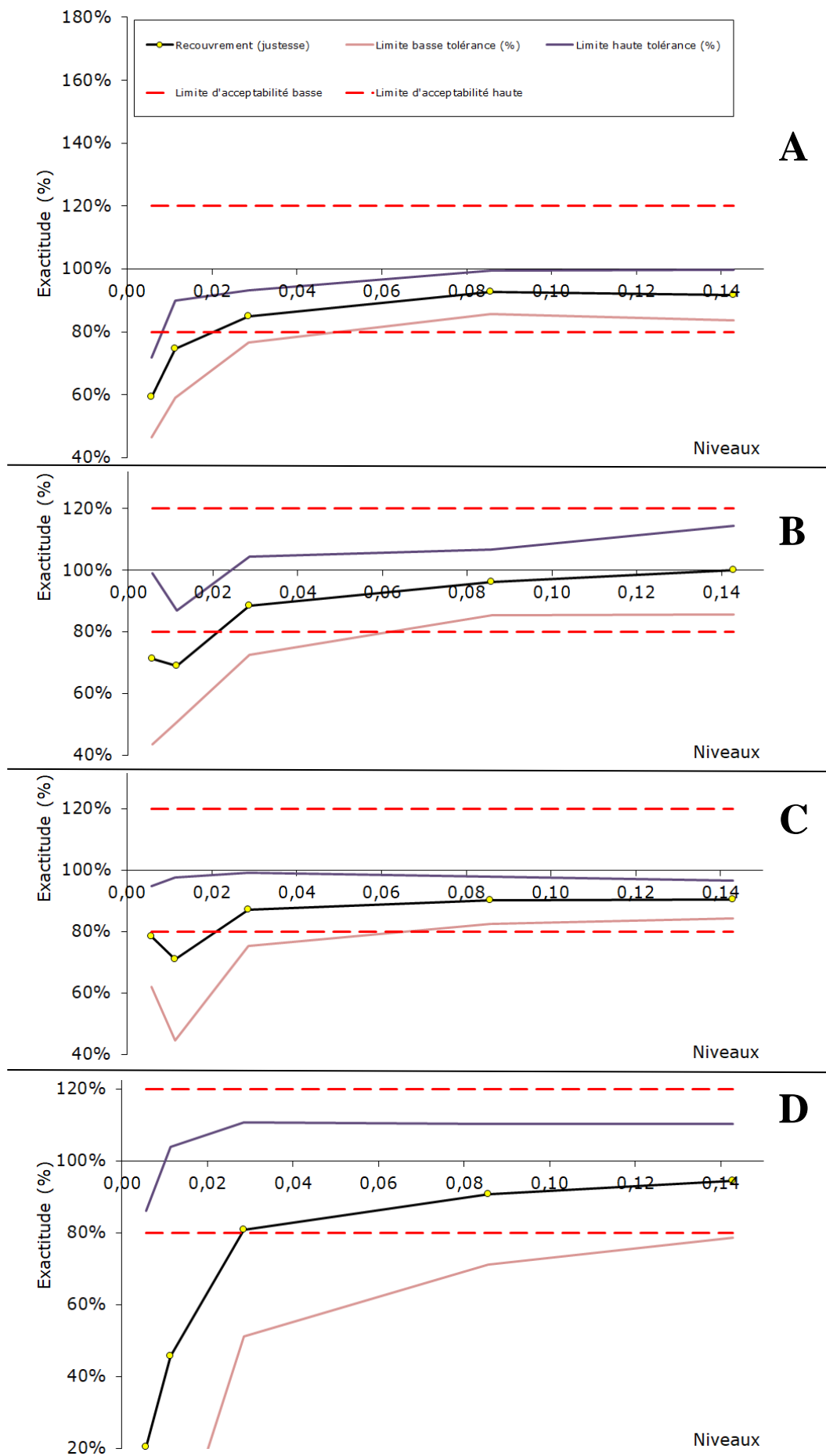


Figure 5 : Représentation graphique des profils d'exactitude
 A- sol de culture argilo-limoneux, B- sol de prairie limoneux, C- sol de prairie sablo-limoneux et D- sol de forêt sableux (n=15).

3.1.4. Domaine de validité

Les résultats de la validation de la quantification des nitrites dans les sols sont représentés par des profils d'exactitudes, pour chacun des sols étudiés. Ils permettent de déterminer rapidement les limites de quantification par le graphique, et plus précisément par le calcul. Ils servent aussi à visualiser le domaine de validité de la méthode.

La Figure 5 montre que le recouvrement de la quantité de nitrites mesurée est inférieur à 100% pour l'ensemble des profils d'exactitudes. Selon les sols, la courbe de recouvrement (en noire) dépasse la limite d'acceptabilité entre 0,0114 et 0,0286 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ de nitrites. La limite d'acceptabilité et la limite de tolérance se coupent entre le niveau C et D soit entre [0,0286-0,0857] $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ de nitrites, pour les sols de culture et de prairie. Les courbes des limites ne se coupent jamais sur le profil d'exactitude de la forêt. Les limites de quantification (Tableau VI), pour les sols de culture et de prairie, la LQ graphique varie entre 0,050 et 0,065 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$. La LQ calculée, grâce aux équations des droites de limites de tolérance et d'acceptabilité, est comprise entre 0,0377 et 0,0502 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$. Les domaines de validité sont donc de [0,0377 - 0,1428] $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ pour le sol de culture, et de [0,0469-0,1423] $\mu\text{mol.mL}^{-1}$, pour le sol de prairie limoneux. Le domaine de validité du sol de prairie Limono-sableux est [0,0502-0,1428] $\mu\text{mol.mL}^{-1}$.

Tableau VI : Limites de quantification par type de sol

[NO ₂ ⁻] $\mu\text{mol.mL}^{-1}$	Sol de culture Argilo-limoneux	Sol de prairie Limoneux	Sol de prairie Limono-sableux
LQ visuelles	0,05	0,06	0,065
LQ calculées	0,0377	0,0469	0,0502

3.1.5. Domaine d'application

Les résultats montrent des tendances proches entre les sols de culture et de prairie. Un profil d'exactitude englobant les deux types de sols est donc construit avec l'ensemble des données des trois sols (Figure 6) afin d'élargir le domaine d'application. La LQ calculée est alors de 0,0376 \pm 0,0065 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$. Le domaine de validité du domaine d'application est [0,0376-0,1428] $\mu\text{mol.mL}^{-1}$.

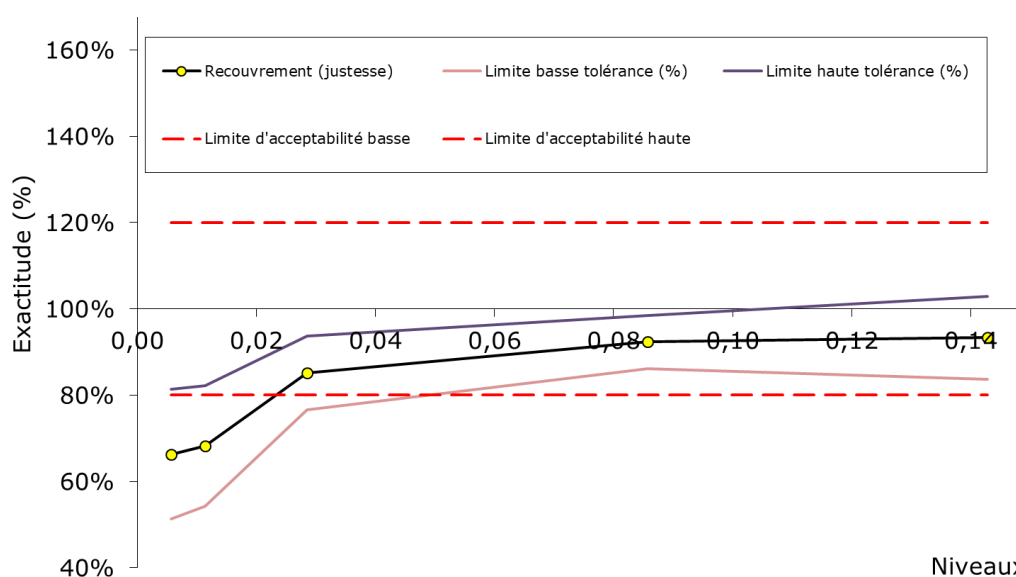


Figure 6 : Profil d'exactitude du domaine d'application regroupant les résultats des sols de prairie et culture, (n=36).

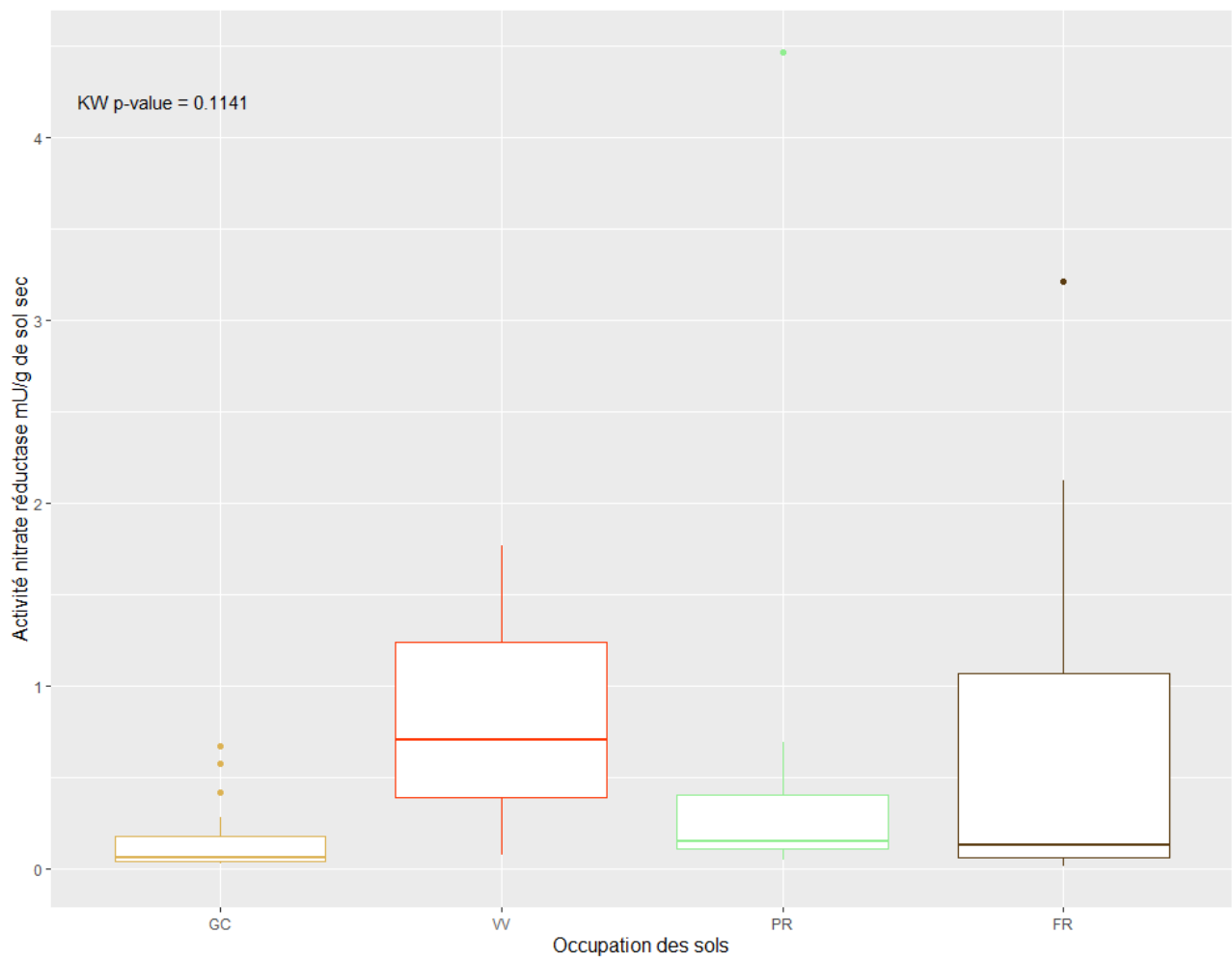


Figure 7 : Graphique de répartition de l'activité de la nitrate réductase en fonction l'occupations des sols. Orange grande culture (GC), en rouge vignes et vergers (VV), en vert prairie (PR) et en marron forêt (FR), (n=44).

3.2. Effet de l'occupation des sols sur l'activité de la nitrate réductase

L'étude de l'effet de l'occupation des sols sur l'activité nitrate réductase est basée sur l'occupation présente lors du prélèvement. Les quatre occupations étudiées sont, la grande culture (GC), la prairie (PR), la forêt (FR) et les vignes et vergers (VV). Au total 44 sols ont été analysés, la moitié étant en GC, 8 en PR et 11 en FR. L'occupation VV représente 3 valeurs, ce qui est assez faible sur l'ensemble du jeu de données. Ces données sont donc représentées graphiquement, mais ne sont pas analysées lors des études statistiques sur l'effet de l'occupation. En effet, le peu de valeurs et la grande variabilité de pratiques entre vignes et vergers introduit une variabilité supplémentaire. De plus, afin de ne pas surreprésenter les parcelles des sites expérimentaux sur la comparaison des occupations, la moyenne des quatre modalités identiques a été utilisée.

3.2.1. Effet des critères physico-chimiques sur l'occupation des sols

Les données physico-chimiques ont été fournies par les responsables des sites expérimentaux et des réseaux. La variabilité des valeurs de pH, de la teneur en l'azote total (Ntot) et de l'humidité des sols, n'est pas significativement différente entre les différentes occupations. Les données en Ntot sont très homogènes dans les sols de GC, et varient entre 1,05 et 3,68 g/kg de sol sec. Les teneurs des sols VV sont plus variables et sont comprises entre 0,87 et 4,02 g/kg de sol sec. L'amplitude de variation est plus élevée pour les sols FR, comme pour les teneurs de pH qui vont du simple au double (4,1 à 8,2).

L'analyse des textures, montre des différences significatives entre les différentes occupations. Le taux de limon est significativement supérieur en GC par rapport aux autres occupations VV et PR (p-value<0,01) et FR (p-value<0,001). La dispersion des données est très importante pour le sol de forêt et varie entre 18 et 652 g/kg de sol sec. En GC, il passe de 486 à 790 g/kg de sol sec. Le taux de sable est significativement inférieur en sols GC par rapport aux sols PR et VV (p-value<0,05). Pour les sols de forêt, la teneur en sable varie de 102 et 957 g/kg de sol sec. Enfin, le pourcentage d'argile dans les sols de GC est significativement inférieur aux teneurs des sols en PR et VV (p-value<0,01). La dispersion en GC est petite, variant de 130 à 203 g/kg de sol sec. La dispersion en argile dans les sols FR est entre 25 et 457 g/kg de sol sec.

La distribution des différents paramètres ne dépend pas des occupations de sol, il est alors intéressant de poursuivre l'étude en regardant l'activité de la NAR selon les occupations de sol.

3.2.2. Activité de la nitrate réductase

L'activité NAR dosée n'est pas significativement différente entre les occupations de sol (p-value=0,1141). Le graphique (Figure 7) montre que, au sein de nos données, la dispersion des valeurs varie plus pour certaines occupations. Sous GC, les résultats sont assez homogènes, et varient entre 0,026 et 0,669 mU/g sol sec. La variabilité intra-modalité est également faible dans les sols sous prairie (0,047 et 0,690 mU/g sol sec). Cependant, la figure 7 montre un point en prairie très loin du dernier quartile, avec une activité de 4,471 mU/g de sol sec. En sols FR, la variabilité est plus importante, et les données se dispersent entre 0,011 et 3,213 mU/g sol sec. Les 3 valeurs de l'occupation VV représentent une forte dispersion, avec des activités variant d'un facteur dix à vingt (0,075 ; 0,707 et 1,768 mU/g sol sec).

Les occupations ne sont donc pas dissociables en ne regardant que l'activité enzymatique. Pour avancer dans l'analyse, des études de corrélation sont réalisées.

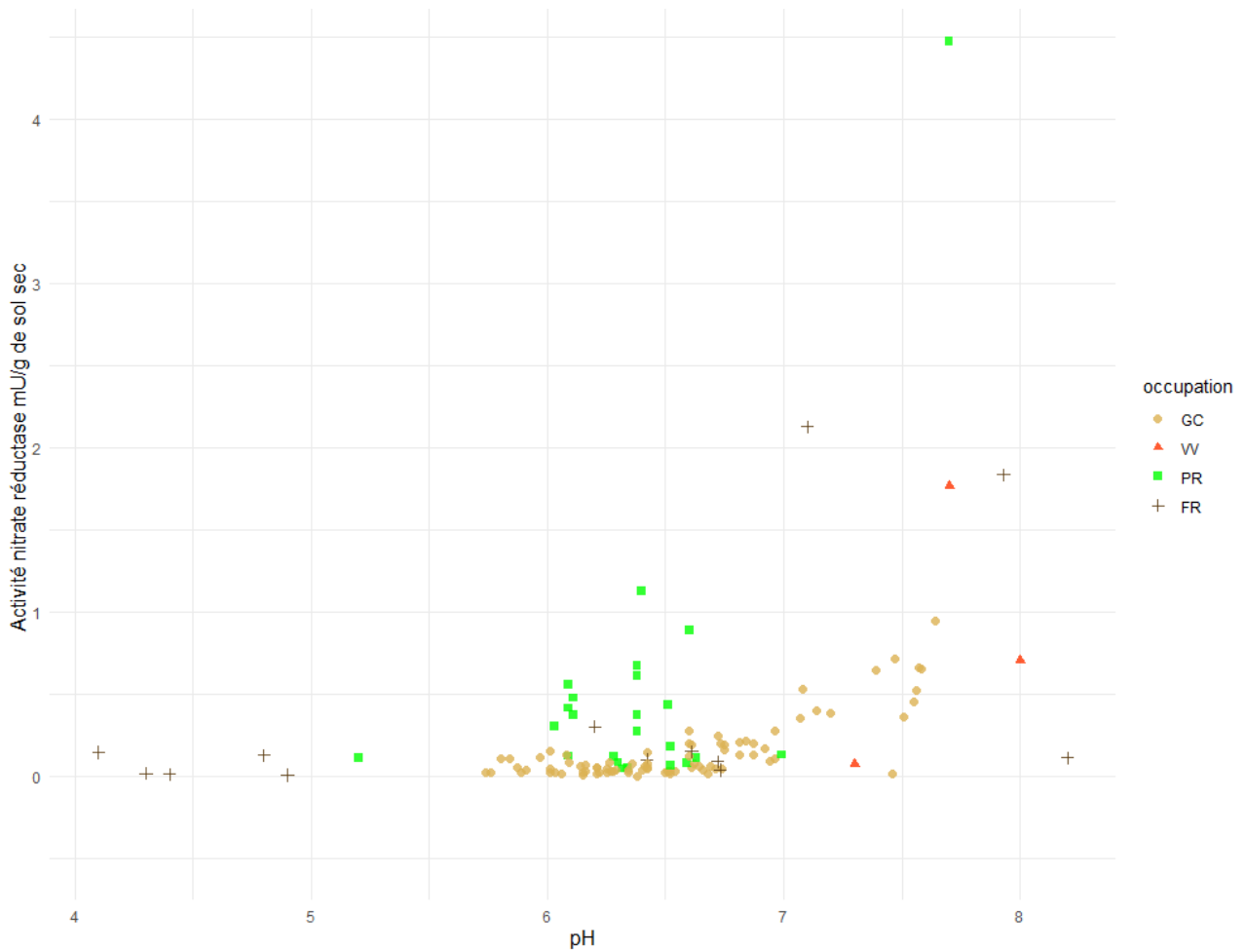


Figure 8 : Graphique de corrélation de l'activité enzymatique de la nitrate réductase avec le pH, en fonction de l'occupation des sols.

Ronds oranges : grande culture (GC), triangles rouges : vignes et vergers (VV), carrés verts : prairie (PR) et croix marrons : forêt (FR), (n=43).

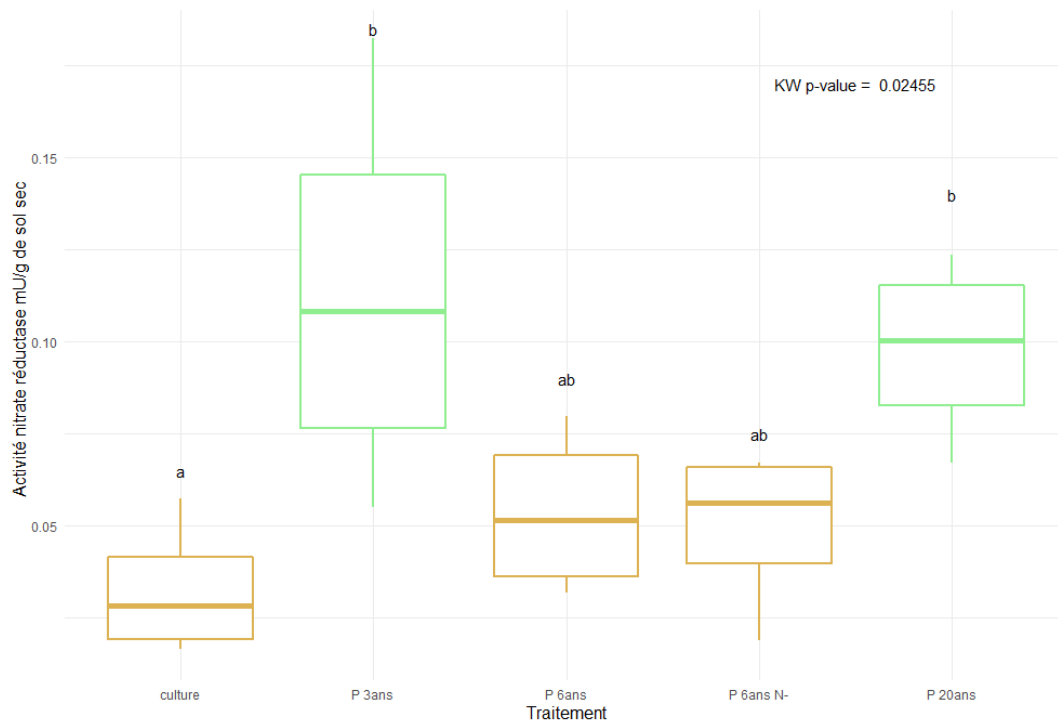


Figure 9 : Effet de la gestion des praires sur l'activité nitrate réductase (site SOERE ACBB, Lusignan) Vert prairie en cours, en orange grande culture en cours (n=20).

3.2.3. Liens entre les paramètres physico-chimiques et l'activité de la nitrate réductase

L'étude vise à déterminer des corrélations linéaires de l'activité de la NAR en fonction de différents paramètres physico-chimiques. Le jeu de données montre une corrélation positive significative entre le pH et la NAR (p -value $<0,01$), avec un R^2 de 20% (Figure 8). L'activité enzymatique augmente lorsque le pH augmente également, sur la gamme des données entre 4,1 et 8,1. Plusieurs points sont très éloignés de la corrélation, majoritairement pour des activités et des pH élevés qui ne sont pas en GC. Les autres paramètres physico-chimiques ne présentent pas de corrélations significatives avec les activités NAR. Les données de textures sont réparties sur une gamme plus ou moins large avec les sables entre 67 à 957 g/kg de sol sec, les limons de 18 à 790 g/kg de sol sec et les argiles entre 25 à 503 g/kg de sol sec. Les taux d'humidité présentent une gamme entre 4 et 48% dans les sols et une moyenne à 16% d'humidité. Les concentrations en azote totale varient entre 0,28 et 5,81 g N/kg de sol sec. L'étude plus approfondie pour chaque occupation de sol ne présente pas de corrélations significatives avec l'activité NAR.

L'occupation des sols est un des critères le plus visuels pour distinguer les parcelles. Mais au-delà des paramètres physico-chimiques, chaque exploitation agricole ou parcelle présente des pratiques propres. Les effets de ces pratiques sont analysés dans le paragraphe suivant

3.3. Etude des pratiques agricoles sur le dosage de la nitrate réductase

Les pratiques agricoles sont étudiées au sein de chaque site expérimental. Des critères plus techniques sont étudiés, tels que la durée du couvert végétal, les épandages et l'agroforesterie.

3.3.1. Couverts végétaux

A l'échelle de Lusignan où sont regroupés les sites SOERE ACBB et OASYS. Les résultats sont significativement différents (p -value $>0,001$). Les sols PR présentent une activité NAR significativement supérieure aux sols GC (p -value $<0,001$). La comparaison des deux sites montre des activités significativement différentes pour les sols PR (p -value $<0,001$). Le site OASYS a une activité NAR supérieure au site du SOERE. Les activités sont comprises entre 0,055 et 0,0182 mU/g sol sec sur le site du SOERE et entre 0,127 et 1,128 mU/g sol sec sur le site OASYS.

Au sein du dispositif SOERE ACBB, l'analyse de l'effet de l'occupation des parcelles met en avant une différence significative entre les modalités. En effet, l'activité de la nitrate réductase pour les sols PR est supérieure au sol GC (p -value $<0,01$). Les données sont très homogènes pour les sols GC avec des données entre 0,016 et 0,079 mU/g sol sec. La Figure 9 montre une différence significative entre les modalités du gradient de prairie (p -value $<0,05$). L'analyse met en évidence deux différences significatives entre le témoin GC et avec PR 3 ans (p -value $<0,01$) et avec PR 20 ans (p -value $<0,01$). Après 3 ans de culture, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les parcelles GC depuis 18 ans et les prairies temporaires de 6 ans, en culture depuis trois ans. Les activités NAR des sols en prairies temporaires P 3ans et sous prairie permanente P 20ans ne sont pas différents. Les parcelles actuellement sous prairies, ont des activités plus homogènes comprises entre 0,067 à 0,123 mU/g sol sec pour les prairies permanentes que pour les prairies temporaires de 3 ans comprises entre 0,055 et 0,182 mU/g de sol sec.

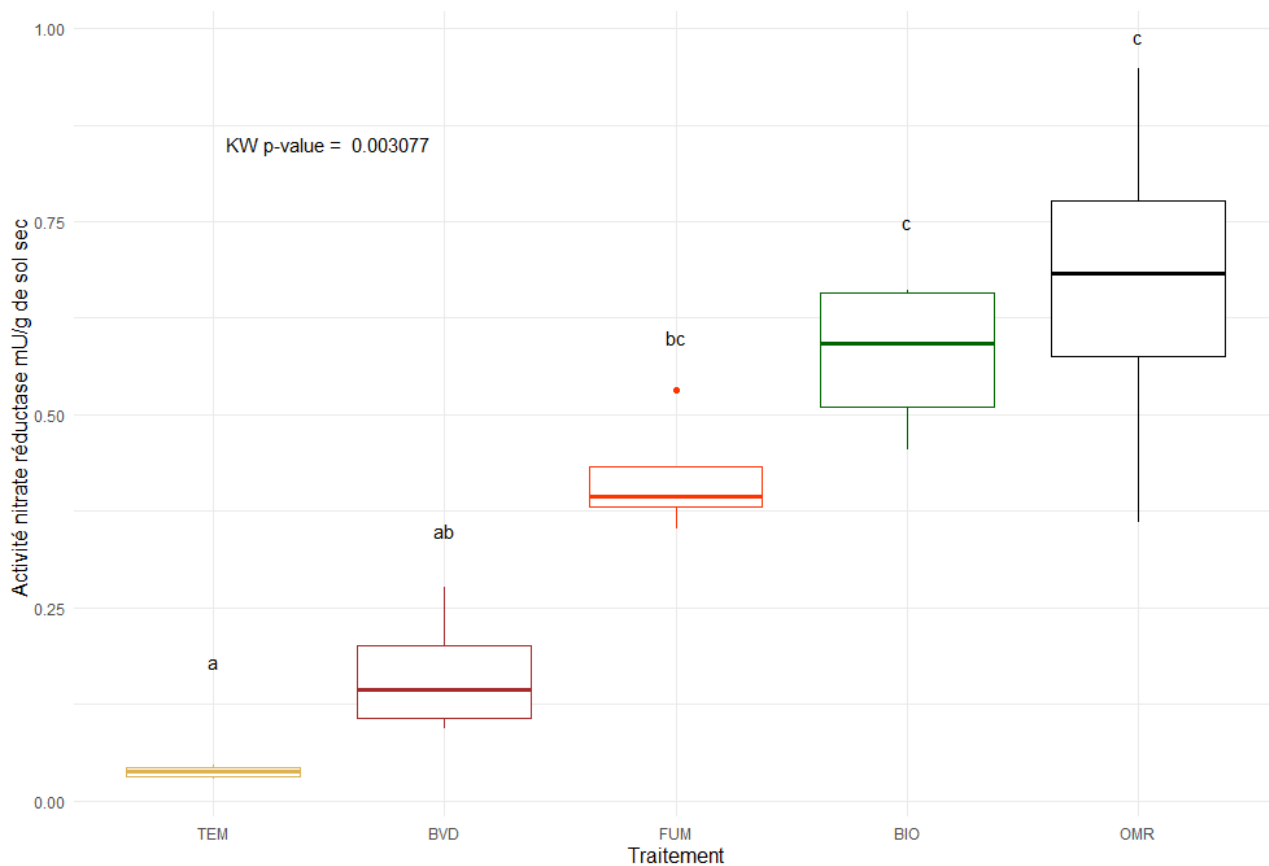


Figure 10 : Effet de l'apport de PRO sur l'activité nitrate réductase (site SOEREPRO, QualiAgro). Témoin (TEM), compost de boue de station d'épuration et déchets verts (DVB), fumier de bovins composté (FUM) compost de biodéchets (BIO), et compost d'ordures ménagères résiduelles (OMR) (n=20).

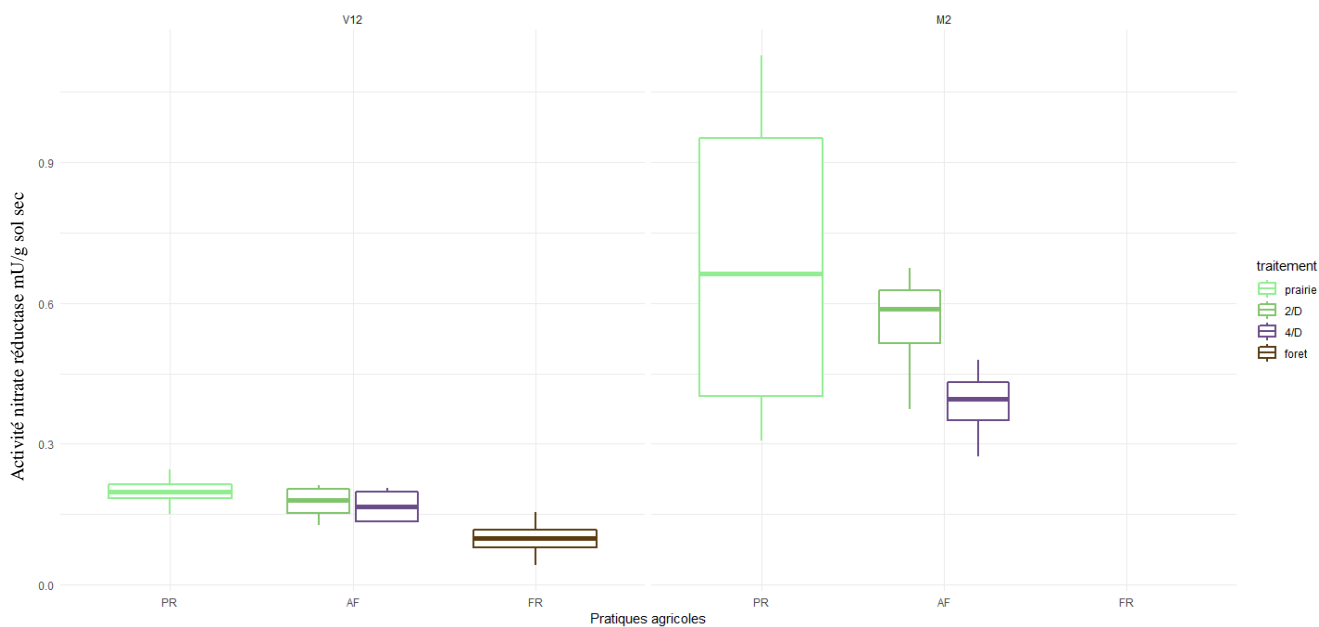


Figure 11 : Effet de l'agroforesterie sur l'activité nitrate réductase (site OASYS, Lusignan). Prairie (PR), agroforesterie (AF) et forêt (FR). Sur les parcelles V12 et M2 du site expérimental OASYS. Vert clair : prairie, amande : 2/D et glauque : 4/D, marron : forêt (n=24).

3.3.2. Apports d'intrants organiques ou minéraux

Les mesures de l'activité NAR sont très différentes entre les sites de QualiAgro et d'EFELE (p-value<0,001). Elles varient entre 0,027 à 0,949 mU/g de sol sec sur le site QualiAgro et entre 0,003 à 0,158 mU/g de sol sec sur le site EFELE.

Les activités NAR mesurées sur le site EFELE ne présentent pas de différences significatives selon les PROs épandus. Même si les sols avec l'épandage de fumiers ont tendance à avoir une activité nitrate réductase plus élevée que les sols témoins.

Sur le site de QualiAgro, l'analyse montre des différences significatives entre les traitements (p-value<0,01) (Figure 10). Le sol en absence d'épandage TEM est différent des traitements FUM (p-value<0,01) ainsi que des amendements BIO et OMR (p-value<0,001). La modalité DVB est différente des modalités BIO (p-value<0,05) et OMR (p-value<0,01). Les résultats obtenus avec les épandages des composts FUM, BIO et OMR ne sont pas significativement différents. L'activité TEM est le traitement qui a les activités les plus homogènes entre parcelles, avec une variation entre 0,027 et 0,046 mU/g sol sec. La modalité OMR est celle qui présente la variabilité la plus élevée entre 0,361 à 0,948 mU/g sol sec.

Plusieurs sites présentent des conditions similaires avec deux fertilisations azotés minérales distinctes, c'est le cas pour le site de EFELE et SOERE ACBB. La fertilisation minérale est apportée dans le cas de plusieurs traitements sur le site EFELE. Ce sont les traitements des témoins, avec CP et FB. Pour le site de Lusignan, seule la modalité sous prairie temporaire P 6ans est amendée avec deux fertilisations. L'analyse de l'activité NAR pour chacune des 2 fertilisations, ne révèle pas de différence significative.

3.3.3. Agroforesterie

L'étude des résultats obtenus sur le site OASYS est réalisée parcelle par parcelle (Figure 11), du fait de la différence significative (p-value<0,001) qui existe entre les deux. L'activité NAR est inférieure sur la parcelle V12, avec des activités entre 0,042 et 0,246 mU/g sol sec. Sur la parcelle M2 la variabilité est entre 0,274 et 1,128 mU/g sol sec. L'étude des effets de l'implantation de l'agroforesterie sur les parcelles M2 et V12 ne montre aucune différence significative, quel que soit la distance aux arbres considérée (4/D et 2/D). Ces deux paramètres sont regroupés sous la pratique agricole agroforesterie (AF). Pour la parcelle V12, les différentes modalités présentent des différences significatives. La modalité FR est significativement inférieure de AF et PR (p-value<0,001). Au sein de la parcelle M2, les modalités ne sont pas significativement différentes.

Tableau VII : Coefficients de variation des essais préliminaires du dosage des nitrites selon occupation des sols (n=5).

Niveaux	Niveau A	Niveau B	Niveau C	Niveau D	Niveau E
Valeur cible ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$)	0,0057	0,0114	0,0286	0,0857	0,1714
Prairie	120,00%	0,01%	0,03%	0,07%	0,07%
Forêt	0,11%	0,09%	12,13%	0,02%	0,01%

Tableau VIII : Ecart des résultats de quantification des nitrites par rapport aux valeurs cibles, selon l'occupation des sols (essais préliminaires 2021)(n=5).

Valeur cible ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$)	0,0057	0,0114	0,0286	0,0857	0,1714
Prairie	-11,69%	-6,63%	-2,38%	0,79%	6,15%
Forêt	7,42%	-14,32%	-2,60%	-7,62%	-14,75%

4. Discussion

4.1. Validation de méthode

4.1.1. Fidélité de la méthode

La répétabilité présentée par le calcul de la RSD est optimale en dessous de 5%. Lorsqu'elle se situe entre 5 et 10% elle est encore correcte, mais au-delà de 10%, la fiabilité des données n'est pas assurée. La méthode de dosage est très répétable sur une grande partie des concentrations et des sols. Pour la plus faible concentration des sols de culture et de prairie sablo-limoneux, la répétabilité est correcte. Par contre, en sol de forêt le dosage n'est pas répétable à faible concentrations de NO_2^- . Les études préliminaires avaient montré une répétabilité similaire à l'étude pour le sol de prairie. Pour les sols de culture et de prairies la méthode est moins répétable sur des concentrations faibles, car les dosages sont moins précis lorsque la concentration approche la limite de quantification. Les résultats obtenus pour les sols de forêt sont différents, avec une répétabilité des résultats correcte à $0,0286 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ et une meilleure répétabilité au-dessus sur les concentrations de $0,0857$ et $0,1428 \mu\text{mol.mL}^{-1}$.

L'étude de la fidélité intermédiaire apporte des informations sur la dispersion des données. Elle tolère une variabilité de $\pm 10\%$ environ, avec une certaine flexibilité, et au-delà, les résultats sont considérés comme peu fidèles. Dans notre étude, pour des concentrations inférieures à $0,0286 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ en nitrite la méthode n'apparaît pas très fidèle, pour les sols de prairie et de culture. En sol de forêt, les mesures sont très dispersées et la méthode pas très fidèle. Ces résultats de validation de la mesure de l'activité nitrate réductase des sols ne sont pas en total accord avec les études préliminaires réalisées en 2021 sur deux sol limoneux, l'un en forêt et l'autre en prairie. En effet, les coefficients de variations obtenus l'an dernier étaient inférieurs à 10% pour des concentrations au-dessus de $[\text{NO}_2^-] 0,0058 \mu\text{mol.mL}^{-1}$, pour le sol de prairie. Pour le sol de forêt, la dispersion des données étaient inférieures à 10% pour l'ensemble des concentrations, à l'exception de la concentration en NO_2^- de $0,0286 \mu\text{mol.mL}^{-1}$, avec un CV à 12,13%, très proche des 10%. Des dispersions plus élevées pour les concentrations les plus faibles sont couramment observées en raison de la proximité de la limite de quantification.

Les résultats de chaque série sont peu variables, mais la fidélité intermédiaire de la méthode n'est pas toujours optimale. Il est possible que les séries entre elles soient trop différentes, ce qui peut être dû à la variabilité du sol, impliquant un manque de précision impactant plus visiblement les faibles concentrations.

4.1.2. Justesse de la méthode

L'écart entre la moyenne des résultats et la valeurs cible doit également être dans la fourchette de $\pm 10\%$ pour que la méthode soit considérée comme juste. Les résultats montrent que la méthode est juste pour des concentrations en nitrites supérieures à $0,0857 \mu\text{mol.mL}^{-1}$. A l'inverse, les analyses sur les concentrations inférieures sont beaucoup plus éloignées de la valeur cible. Les résultats des tests préliminaires (Tableau VII) ont montré une meilleure justesse des résultats. Les résultats obtenus sur les sols de forêt présentent un écart de mesure au-delà de 10% pour les concentrations $0,0114$ et $0,1714 \mu\text{mol.mL}^{-1}$. Dans les sols de prairie, les résultats montrent un biais de 30% qui est homogène sur l'ensemble du profil d'exactitude. De ce fait, une correction des données est possible en appliquant un facteur correctif sur les mesures obtenues. Cette correction donne alors des résultats justes, excepté pour la concentration la plus basse $[\text{NO}_2^-] 0,0057 \mu\text{mol.mL}^{-1}$.

Les concentrations dosées sont toujours en dessous de la concentration théorique. La raison pourrait être dû à la volatilisation des nitrites, elle est augmentée par les pH acides et la matière organique (Nelson & Bremner, 1969). La deuxième hypothèse pourrait être liée au protocole. En effet, le 2,4-Dinitrophénol (DNP) présent, et qui a pour objectif d'inhiber l'assimilation des nitrites

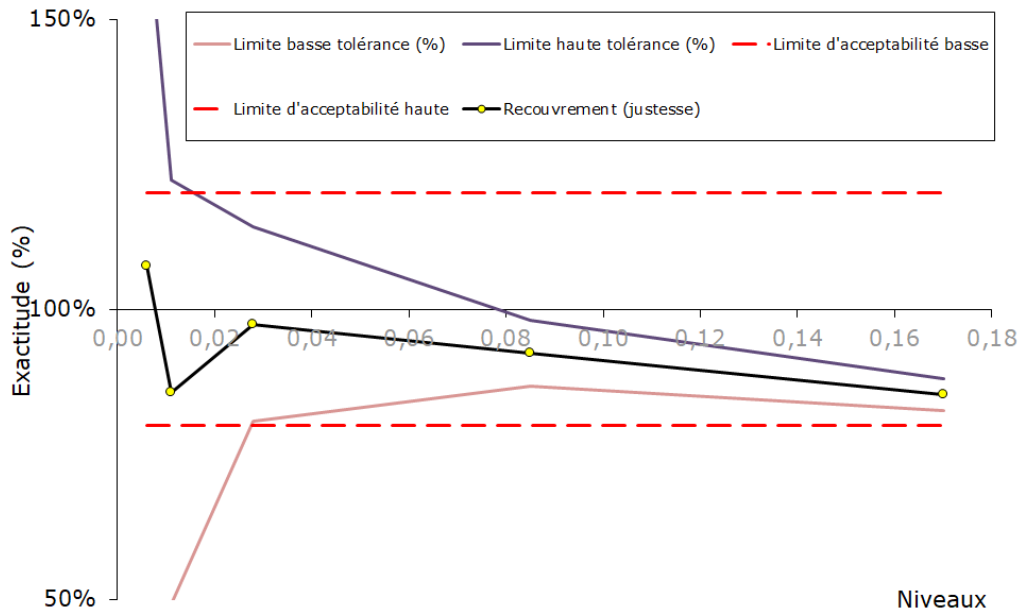


Figure 12 : Profil d'exactitude du sol limoneux de forêt (n=15).

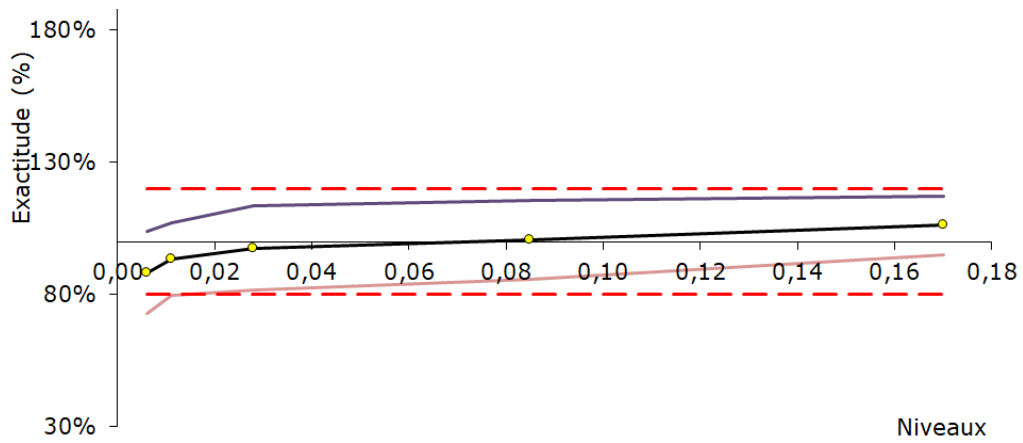


Figure 13 : Profil d'exactitude du sol limoneux de prairie après correction d'un biais de 30% (n=15).

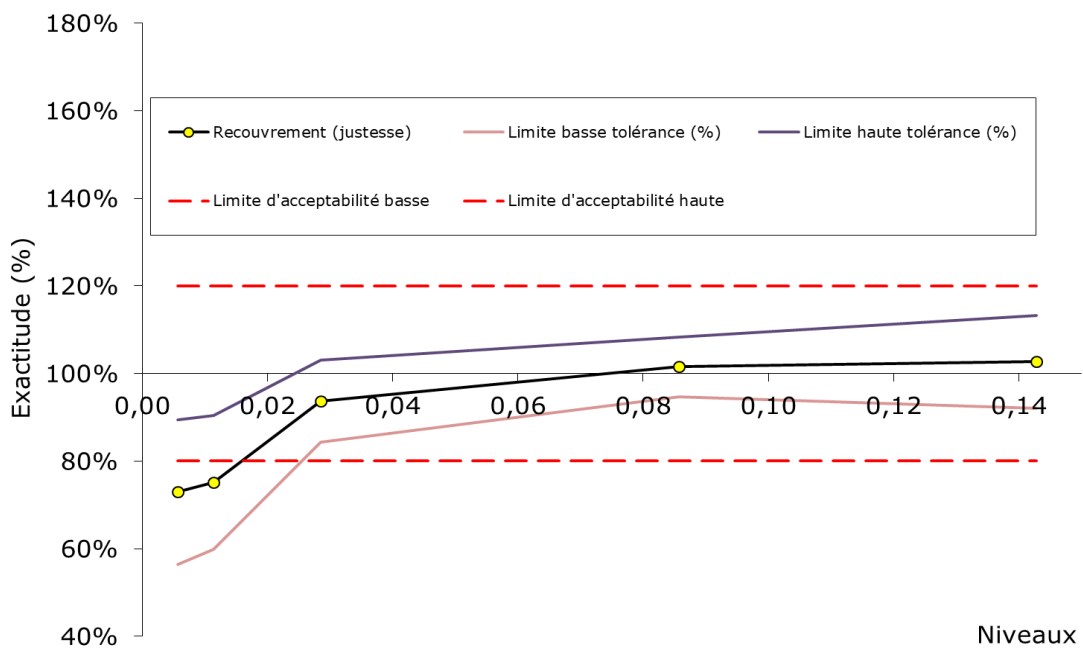


Figure 14 : Profil d'exactitude du domaine d'application regroupant les sols de culture et prairie, avec une correction du biais de 10% (n=36).

(Abdelmagid & Tabatabai, 1987), pourrait être en concentration trop faible pour inhiber toutes les réactions. De ce fait, une partie des nitrites se transforment et ne sont donc pas dosés. Lors du développement de la méthode ce paramètre n'a pas été modifié du protocole original. Enfin, selon la composition des sols, les nitrites apportés pourraient se fixer sur les constituants du sol et potentiellement inhiber leur dosage.

4.1.3. Incertitude du dosage

L'incertitude sur la mesure peut varier jusqu'à $\pm 15\%$ pour être considérée comme acceptable. Les incertitudes obtenues lors de l'étude sont souvent supérieures à 15% sur l'ensemble des matrices. Les mesures réalisées avec le sol de forêt ne sont jamais inférieures à l'erreur tolérée. Avec le sol de prairie limoneuse l'incertitude calculée est de 15% à la concentration de $0,1428 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ en nitrite. Pour les autres sols, l'incertitude varie entre 9 et 12% pour une concentration inférieure ou égale à $[\text{NO}_2^-] 0,0286 \mu\text{mol.mL}^{-1}$. Lors de l'essai préliminaire sur le sol de prairie, les résultats du calculs d'incertitude étaient plus satisfaisants (Tableau VIII), avec des valeurs inférieures à 10%, quelle que soit la concentration. Comme pour la validation actuelle, les résultats obtenus l'an dernier pour les sols de forêt présentent une incertitude bien supérieures pour des concentrations en nitrite inférieures à $0,0286 \mu\text{mol.mL}^{-1}$.

4.1.4. Profils d'exactitudes

Le domaine de validité de la méthode est un autre paramètre à déterminer dans une validation de méthode. Il est défini sur l'intervalle compris entre la limite de quantification et la concentration maximale de linéarité de la gamme.

De façon générale, les limites de quantification calculées lors de la validation sont très élevées par rapport au domaine de linéarité de la gamme. Pour le sol de forêt, il n'est pas possible de déterminer le domaine de validité, car la limite de quantification n'a pas pu être calculée avec le profil d'exactitude. Ces résultats indiquent que le dosage des nitrites dans les sols n'est réalisable que sur une petite gamme de concentrations, ce qui réduit les possibilités de mesures lors du dosage d'échantillons. Ces résultats sont assez différents de ceux obtenus lors des essais préliminaires réalisés sur un sol limoneux sous couvert de forêt et de prairie. Les profils d'exactitude présentaient des limites de quantification de $0,0126 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ pour le sol de prairie et $0,0257 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ pour le sol de forêt. Le sol de forêt limoneux (Figure 12) présente un domaine de validité de ce trouve entre les concentration $0,0257$ et $0,1714 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ de NO_2^- , contrairement au sol de forêt sableux présenté dans la validation réalisée pour ce rapport. Dans les tests préliminaires, le sol de prairie (Figure 13) présente une limite de quantification calculée deux fois plus faible que celle pour le sol limoneux de prairie. Ils mettent en avant la grande différence des analyses et un effet opérateur possible sur le dosage.

4.1.5. Domaine d'application

Pour définir le domaine d'application, les données obtenues sur les sols de prairie et culture ont été compilées, car les données sont assez proches. Ce nouveau profil d'exactitude permet de définir un nouveau domaine de validité allant de $[0,0376-0,1428] \mu\text{mol.mL}^{-1}$. Le biais de 10% est toujours présent, et sa correction (Figure 14) permet d'obtenir une meilleure justesse de la méthode. Le nouveau domaine de validité est $[0,0227-0,1428] \mu\text{mol.m}^{-1}$. Il est à noter que la méthode n'est pas fidèle et exacte sur l'ensemble de ce domaine d'application.

Afin d'ouvrir un peu plus le domaine d'application, un nouveau profil d'exactitude a été construit en ajoutant des données préliminaires obtenues sur le sol de prairie. Les réponses très différentes des deux études ne permettent pas d'obtenir un domaine d'application avec une fidélité,

une justesse et une exactitude suffisante pour le valider. La méthode n'a pas été validée sur les sols de forêt.

L'interprétation des résultats de cette étude met en avant deux points importants. Tout d'abord, il existe une différence importante avec les résultats obtenus lors des essais préliminaires, ce qui peut être expliqué soit par une différence de méthodologie, de sol, ou d'opérateur. En second lieu, les résultats de cette étude ne permettent pas de valider la méthode de dosage des nitrites quel que soit le sol, car les données ne sont pas assez fidèles et exactes sur le domaine d'application.

La validation de méthode réalisée a permis de voir comment le dosage réagissait sur les différentes matrices de sols. De ce fait, les résultats ont soulevé des questions sur la méthode de dosage de l'enzyme.

4.1.6. Impact sur le dosage de l'activité enzymatique

La validation de méthode a mis en avant une question concernant la méthode de dosage des nitrites dans les sols. Le développement et la validation d'une méthode suivent un logigramme (Annexe 6) permettant de valider chaque étape. En cas de résultats non conformes, une boucle de rétroaction permet de remonter à l'étape précédente. Pour cette validation, la méthode des ajouts dosés de quantités connues de nitrite a été utilisée. L'échantillon du niveau 0 (sans apport de nitrate), utilisé comme témoin pour la validation, présente des absorbances plus fortes que celles des témoins des échantillons qui sont préparés avec une congélation et non incubés. L'absence de congélation de l'échantillon témoin produit des concentrations de nitrites très proches entre le témoin et les échantillons. Dans la littérature, ce paramètre n'a pas été étudié et l'ensemble des articles utilisent un blanc échantillon congelé (Cao et al., 2019; Kandeler et al., 2011; Singh & Kumar, 2008). La congélation stoppe les processus de minéralisation des composés azotés qui ont naturellement lieu dans les sols et permet de quantifier les nitrites initialement contenus dans les sols avant analyse. Cette préparation des blancs échantillons apporte un biais par rapport aux échantillons et mérite une attention particulière pour analyser ces techniques différentes qui ne sont pas comparables. La méthode a été développée en tenant compte de la littérature, mais en réalisant des essais sans congélation pour les témoins et, l'absorbance observée en fin d'expérimentation est semblable à celle retrouvée dans les échantillons avec un apport de substrat. Se pose donc la question de la concentration en substrat utilisée dans le mode opératoire. En effet, pour les mesures d'activité enzymatique, le substrat doit être en excès dans les échantillons pour forcer l'activité de l'enzyme. Si la concentration en substrat optimisée durant la phase de développement n'est pas en excès, alors cela pourrait expliquer le résultat des témoins non congelés similaires aux échantillons. Une deuxième explication possible, serait que l'activité nitrate réductase est naturellement faible dans les sols sélectionnés.

L'étude de la pertinence de l'activité de la nitrate réductase a cependant été réalisée en conservant le protocole développé avec la congélation du témoin.

4.2. Effet de l'occupation des sols sur l'activité de la nitrate réductase

4.2.1. Effet des critères physico-chimiques sur l'occupation des sols

Les textures des sols sélectionnés pour l'étude ne sont pas spécifiques à l'occupation des sols, et elle varie de façon importante pour l'ensemble des échantillons. Par contre, nous pouvons noter que, les textures des sols de grandes cultures sont plus homogènes que celles des sols de forêts, et contiennent globalement moins de sable. Cette faible présence en sable en sols de grandes cultures

augmente les probabilités d'avoir des conditions d'anaérobie, paramètre important pour le processus de dénitrification (Aulakh et al., 1991; Groffman & Tiedje, 1989).

Le pH des sols de grandes cultures et de prairies est très proche du pH optimum de la nitrate réductase. Il varie de 6 et 7. En sol de forêt, le pH est beaucoup plus variable, ce qui peut induire une activité également plus variable.

Les taux l'humidité ne sont pas corrélés à l'occupations des sols. Dans ces conditions, la pression de l'humidité, facteur impactant dans le processus de dénitrification (Ducey et al., 2015; Fang et al., 2021; Lu et al., 2012), n'est pas un critère de variation de l'activité nitrate réductase dans notre étude.

4.2.2. Activité de la nitrate réductase

Les activités de la NAR ne sont pas corrélées aux occupations des sols. Les sols FR présente des résultats très dispersés, surtout par la présence d'un échantillon ayant une activité NAR et une humidité très forte, ainsi qu'un taux d'argile et un taux d'azote total haut. A l'opposé, un sol beaucoup moins actif présente une humidité, un taux d'argile et un taux d'azote très faibles. La distribution des données des sols PR présente un point considéré comme aberrant dans la représentation graphique des résultats. Cet échantillon a une activité NAR élevée, un pH optimum pour l'activité et une humidité élevée par rapport à la moyenne. Certaines études mettent en avant des différences de potentiel de dénitrification entre les cultures et les prairies (Attard et al., 2010 ; Maurer et al., 2021) ou entre les prairies et les forêts (Barton et al., 1999). La répartition des différentes occupations des sols dans le jeu de données est une raison statistique pouvant impacter les résultats, du fait du poids plus important des données de GC.

D'autres critères non étudiés limitent l'interprétation des différences entre les sols. Sur un plus grand jeu d'échantillons nationaux, il serait intéressant de tenir compte des données climatiques, la France étant un pays réparti en cinq climats (Cuny et al., 2020). Le climat est, en effet, considéré comme un facteur d'influence de la dénitrification (Liang et al., 2021; Nieder et al., 1989).

4.2.3. Liens entre les paramètres physico-chimiques et l'activité de la nitrate réductase

La corrélation du pH des sols avec l'activité NAR explique une dispersion de l'activité enzymatique plus importante dans les sols de forêt. Les pH acides ont un impact négatif sur l'activité de bactéries dénitrifiantes, ce qui réduit le potentiel de dénitrification (Herold et al., 2012). La dénitrification présente également une corrélation positive entre le pH et le potentiel de dénitrification (Čuhel & Šimek, 2011; Liang et al., 2021). Dans cette étude, les paramètres physico-chimiques étudiés n'induisent pas d'impact sur l'activité NAR. Pour certaines variables physico-chimiques, le manque de corrélation avec les données de la bibliographie peut être expliqué par l'échantillonnage des sols étudiés. Pour l'étude de la texture par exemple, la répartition des données sur la quantité de sable est complète, tandis qu'à l'opposé la gamme de l'argile présente reflète moins de 50% de la diversité dans les sols. La même observation est faite sur les taux d'humidité avec seulement 2 valeurs entre 29 et 48%.

Les occupations de sols étudiés ne sont pas spécifiques à l'activité de la nitrate réductase. Il est possible que les pratiques agricoles soient des caractéristiques permettant la discrimination entre les parcelles au niveaux des sites expérimentaux étudiés.

4.3. Etude des pratiques agricoles sur le dosage de la nitrate réductase

4.3.1. Effet des couverts végétaux

Sur les sites de Lusignan, les résultats montrent que les occupations des sols peuvent être discriminées, lorsque les pratiques culturales sont différentes. Les prairies du site OASYS sont plus actives que dans les parcelles du SOERE ACBB. La gestion du site du SOERE semble ainsi réduire l'activité de la NAR. Il est possible que cela soit dû à des perturbations plus importantes sur le site du SOERE. Les perturbations peuvent être variées, tel que le travail du sol lors de périodes de cultures, ou des plantes présentes, car la dénitrification est sensible à l'oxygène et à la porosité des sols (Attard et al., 2011; Monti et al., 2021). La rhizosphère est également un facteur impactant la dissimilation des nitrates (Philippot et al., 2002).

Sur le site de Lusignan, les sols gérés en prairie présentent une activité plus importante que les cultures. Cependant, les prairies temporaires de 3 ans ou de 6 ans avec 3 années de culture ne sont pas significativement différentes. Les 3 années de cultures ont impacté l'activité enzymatique, mais les niveaux d'activité ne sont pas identiques à ceux des sols de culture. L'absence de différence d'activité entre les prairies de 3 ans et celles de 20 ans, peut être expliqué par une stabilisation, et une homogénéisation de l'activité avec le temps.

4.3.2. Impact des apports d'intrants organiques ou minéraux

Sur le site de Qualiagro, la fertilisation avec les composts OMR et BIO augmentent significativement l'activité de la nitrate réductase. A contrario sur le site d'EFELE, la fertilisation avec du fumier n'induit pas de différence d'activité par rapport aux autres modalités. Cette différence de réponse entre les deux sites pourrait s'expliquer par le fait que le site de QualiAgro est en fonctionnement depuis 24 ans, alors que EFELE n'a été mis en place qu'il y a 12 ans. Les résultats, significativement différents entre les deux sites de PRO, peuvent également être expliqués par un contexte pédoclimatique différent entre les Yvelines et l'Ille-et-Vilaine (Obriot, 2016). Les PROs issus de l'agriculture peuvent également être plus similaires entre eux que les produits résiduels organiques d'origine étudiés sur le site de QualiAgro.

La fertilisation azotée minérale apportée sur les sols n'induit pas de modification significative de l'activité NAR. Cela peut être expliqué par les faibles doses utilisées car au-delà de 150 mg N/kg, un impact positif a été mis en évidence sur l'activité nitrate réductase (Cao et al., 2019). L'impact de la fertilisation sur le processus de dénitrification n'a pas été réellement clair. En effet, dans certaines études, une corrélation positive a néanmoins été mise en avant (Barton et al., 1999; Tatti et al., 2013). A l'inverse, dans une autre étude, l'ajout de nitrate n'induit pas d'effets (Yu et al., 2014) ou peut limiter la dénitrification (Stevenson et al., 2011).

4.3.3. Effet de l'agroforesterie

La présence d'arbre sur les parcelles gérées en agroforesterie n'impacte pas significativement l'activité NAR quel que soit la distance aux arbres étudiées. Il a été montré que l'agroforesterie induisait une augmentation de l'abondance des gènes de la dénitrification (Beule et al., 2020; Luo et al., 2022), mais la présence de gène ne donne pas d'information sur leur expression, ni sur l'activité. Sur le site OASYS, les arbres ont été plantés depuis plus de 8 ans. Les sols subissent les mêmes perturbations dû aux pratiques agricoles. Il est possible que l'âge ou les essences d'arbres impactent l'activité de la nitrate réductase.

Des pratiques ont présenté des activités enzymatiques significativement différentes, tel que le couvert végétal et l'apport de PRO sur certains site d'expérimentation. Mais il est important de revenir sur la validation de méthode pour analyser l'ensemble des données

4.3.4. Retour sur la validation de méthode et impact sur l'étude

La mesure par les ajouts dosés a montré que la fidélité et la justesse des résultats étaient validées entre 0,0376 et 0,1428 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ de nitrite. De plus, l'incertitude de la mesure est très élevée pour les concentrations inférieures à 0,1248 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$. Ce domaine de validité est appliqué aux sols de grandes cultures et de prairies. Cela indique que les sols de FR, qui ne rentrent pas dans le domaine d'application, ne peuvent pas être discutés car la validation n'a pas permis d'obtenir un domaine de validité. Le domaine d'application défini avec un biais de 10% a un domaine de validité entre les concentrations 0,0227 et 0,1428 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ de NO_2^- . Cela implique que, tous les échantillons en dessous de 0,0227 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ ne sont pas quantifiables. Plus précisément, la valeur a un grand risque d'être fausse.

La conversion de la concentration en activité enzymatique ou inversement montre de faibles concentrations. La grande majorité des résultats des échantillons dosés pour l'étude sont ainsi en dessous de la limite de quantification.

Conclusion

Aux vues de cette étude, la validation de la méthode de dosage de la NAR n'est pas concluante contrairement aux résultats obtenus lors des tests préliminaires. Afin de conclure définitivement sur l'utilisation possible, ou non, de cette méthode de dosage en routine, il sera important de refaire la validation en sélectionnant de nouveaux sols de texture et propriétés physico-chimiques plus variées, en prenant soin de choisir des occupations de sols différentes.

L'effet de l'occupation des sols sur l'activité NAR n'a pas été mise en évidence. Les résultats obtenus ne permettent pas d'utiliser la nitrate réductase comme indicateur de l'occupation des sols. Les analyses sur les sites expérimentaux mettent en avant des différences lors de pratiques cultures différentes au sein d'une même occupation.

A la suite de ce travail, de nouvelles des perspectives sont à envisager pour le dosage : revoir les critères de validation pour prendre une décision définitive sur la méthode de dosage par colorimétrie. Pour cela, il pourrait être intéressant de modifier le protocole de validation en ajoutant un niveau supplémentaire pour augmenter la précision au niveau de la limite de quantification. L'effet de la texture sur le dosage des sols de forêt n'est pas clair. Il sera important de comprendre les réactions qui impactent le dosage dans les sols de forêt et de tester en parallèle des sols de forêts de textures différentes. Par ailleurs, avant de réaliser une nouvelle validation, il sera important de tester l'effet opérateur en effectuant des mesures, ainsi que la validation, en même temps, sur les mêmes échantillons avec différentes personnes.

Si la méthode est validée, alors la seconde perspective est de multiplier les analyses pour pouvoir proposer le dosage de l'enzymes sur la plateforme. L'étude de nouveaux échantillons doit être faite sur des occupations différentes et des pratiques agricoles variées. L'étude de la bibliographie sur la dénitrification a présenté des effets comme du labour ou le chaulage. Ces pratiques pourraient être testés pour voir les effets sur la nitrate réductase.

Ceci permettrait de proposer cet indicateur dans les cas où des distinctions sont présentes entre les occupations et les pratiques. L'objectif de la plateforme étant de présenter des indicateurs pertinents aux différentes parties intéressées.

Bibliographie

- Abdelmagid, H. M., & Tabatabai, M. A. (1987). Nitrate reductase activity of soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 19(4), 421-427. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(87\)90033-2](https://doi.org/10.1016/0038-0717(87)90033-2)
- AFNOR (1994). Norme NF ISO 5725-1, *Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure. Partie 1 : Principes généraux et définitions*, ISO, Genève
- AFNOR (1994). Norme NF ISO 5725-2, *Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure. Partie 2 : Méthode de base pour la détermination de la répétabilité et de la reproductibilité d'une méthode de mesure normalisée*, ISO, Genève
- AFNOR (1994). Norme NF ISO 5725-3, *Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure. Partie 3 : Mesures intermédiaires de fidélité pour une méthode de mesure*, Association Française de Normalisation, ISO, Genève
- AFNOR (1994). Norme NF ISO 5725-4, *Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure. Partie 4 : Mesures de base pour la détermination de la justesse d'une méthode de mesure normalisées*, ISO, Genève.
- AFNOR (2005). Norme NF EN ISO/CEI 17025 (NF X 50-061) *Exigence générales concentration la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais*, Afnor, Paris
- AFNOR (2015), NF EN ISO 9001, *Systèmes de management de la qualité - Exigences* ». Edition Afnor, www.afnor.org, 01-nov-2008. Afnor, Paris.
- Alkorta, I., Aizpurua, A., Riga, P., Albizu, I., Amézaga, I., & Garbisu, C. (2003). Soil Enzyme Activities as Biological Indicators of Soil Health. *Reviews on Environmental Health*, 18(1), 65-73. <https://doi.org/10.1515/REVEH.2003.18.1.65>
- Anderson, C., Peterson, M., & Curtin, D. (2017). Base cations, K⁺ and Ca²⁺, have contrasting effects on soil carbon, nitrogen and denitrification dynamics as pH rises. *Soil Biology and Biochemistry*, 113, 99-107. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.06.002>
- Arias, E. M., González-Pérez, J. A., González-Vila, F. J., & Ball, A. S. (2005). Soil health—A new challenge. *International Microbiology*, 8, 13-21.
- Attard, E., Recous, S., Chabbi, A., De Berranger, C., Guillaumaud, N., Labreuche, J., Philippot, L., Schmid, B., & Le Roux, X. (2011). Soil environmental conditions rather than denitrifier abundance and diversity drive potential denitrification after changes in land uses. *Global Change Biology*, 17(5), 1975-1989. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2010.02340.x>
- Aulakh, M. S., Doran, J. W., Walters, D. T., & Power, J. F. (1991). Legume residue and soil water effects on denitrification in soils of different textures. *Soil Biology and Biochemistry*, 23(12), 1161-1167. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(91\)90029-J](https://doi.org/10.1016/0038-0717(91)90029-J)
- Baize, D., & Girard, M.-C. (2009). *Référentiel pédologique 2008* (Quae).
- Barton, L., McLay, C. D. A., Schipper, L. A., & Smith, C. T. (1999). Annual denitrification rates in agricultural and forest soils : A review. *Soil Research*, 37(6), 1073-1094. <https://doi.org/10.1071/sr99009>
- Beule, L., Lehtsaar, E., Corre, M. D., Schmidt, M., Veldkamp, E., & Karlovsky, P. (2020). Poplar Rows in Temperate Agroforestry Croplands Promote Bacteria, Fungi, and Denitrification Genes in Soils. *Frontiers in Microbiology*, 10, 3108. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03108>
- Bremner, J. M., & Shaw, K. (1958). Denitrification in soil. II. Factors affecting denitrification. *The Journal of Agricultural Science*, 51(1), 40-52. <https://doi.org/10.1017/S0021859600032779>
- Bruand, A., & Tessier, D. (2017). Les sols et la vie souterraine : Des enjeux majeurs en agroécologie. In *Les sols et la vie souterraine* (p. 17-28). Quae. <https://www.torrossa.com/en/resources/an/5063351>
- Campbell, W. H. (1988). Nitrate reductase and its role in nitrate assimilation in plants. *Physiologia Plantarum*, 74(1), 214-219. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1988.tb04965.x>
- Campbell, W. H. (1999). Nitrate reductase structure, function and regulation : Bridging the Gap between Biochemistry and Physiology. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50(1), 277-303. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.50.1.277>
- Cao, H., Ning, L., Xun, M., Feng, F., Li, P., Yue, S., Song, J., Zhang, W., & Yang, H. (2019). Biochar can increase nitrogen use efficiency of *Malus hupehensis* by modulating nitrate reduction of soil and root. *Applied Soil Ecology*, 135, 25-32. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.11.002>
- Cardoso, E. J. B. N., Vasconcellos, R. L. F., Bini, D., Miyachi, M. Y. H., Santos, C. A. dos, Alves, P. R. L., Paula, A. M. de, Nakatani, A. S., Pereira, J. de M., & Nogueira, M. A. (2013). Soil health : Looking for suitable indicators. What should be considered to assess the effects of use and management on soil health? *Scientia Agricola*, 70, 274-289. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162013000400009>
- Chatelier, M. (2010). *Faisabilité d'un pilote de dénitrification in situ dans un aquifère karstifié* [Phdthesis, Université de Poitiers]. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00537371>
- Chenu, C., Nunan, N., Vieublé, L., Garnier, P., Pot, V., & Recous, S. (2017). Localisation des matières organiques et des activités microbienne : Conséquences pour le fonctionnement du sol. In *Les sols et la vie souterraine : Des enjeux majeurs en agroécologie* (Quae, p. 29-41). Éditions Quae. <https://www.torrossa.com/en/resources/an/5063351>

- Chevron, F. (1996). *Dénitrification biologique d'une nappe phréatique polluée par des composés azotés d'origine industrielle : Expérimentations en laboratoire sur les cinétiques, le métabolisme et les apports de nutriments* [These de doctorat, Lille 1]. <https://www.theses.fr/1996LIL10112>
- Clément, A., & Le Tacon, F. (1976). Observations sur l'activité de la nitrate réductase et sur l'aptitude à réduire les nitrites par voie non enzymatique chez des résineux calcicoles et calcifuges. *Annales des Sciences Forestières*, 33(1), 27-45. <https://doi.org/10.1051/forest/19760103>
- Coulombe, D. (2014). *Effet de l'éclaircie commerciale et de trouées sur le cycle de l'azote dans le sol d'une jeune forêt résineuse à l'interface boréal-tempéré* [Masters, Université du Québec à Rimouski]. <https://semaphore.uqar.ca/id/eprint/990/>
- Čuhel, J., & Šimek, M. (2011). Proximal and distal control by pH of denitrification rate in a pasture soil. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 141(1), 230-233. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2011.02.016>
- Cuny, M., Lapertot, A., Lin, J., Kadoch, B., & Le Metayer, O. (2020). Multi-criteria optimization of an earth-air heat exchanger for different French climates. *Renewable Energy*, 157, 342-352. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.04.115>
- Decaëns, T., Jiménez, J. J., Gioia, C., Measey, G. J., & Lavelle, P. (2006). The values of soil animals for conservation biology. *European Journal of Soil Biology*, 42, S23-S38. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2006.07.001>
- Désenfant, M., Priel, M., & Rivier, C. (s. d.). *De la validation des méthodes d'analyse à l'évaluation de l'incertitude des résultats de mesure*. 6.
- Doran, J. W. (1996). Soil health and sustainability. *Advances in Agron.*, 56, 1-54.
- Ducey, T. F., Miller, J. O., Lang, M. W., Szogi, A. A., Hunt, P. G., Fenstermacher, D. E., Rabenhorst, M. C., & McCarty, G. W. (2015). Soil Physicochemical Conditions, Denitrification Rates, and nosZ Abundance in North Carolina Coastal Plain Restored Wetlands. *Journal of Environmental Quality*, 44(3), 1011-1022. <https://doi.org/10.2134/jeq2014.09.0403>
- Elliott, L. F., Lynch, J. M., & Papendick, R. I. (1996). The microbial component of soil quality. In *Soil biochemistry* (Vol. 9, p. 1-21). Marcel Dekker, INC.
- Fang, X., Zheng, R., Guo, X., Fu, Q., Fan, F., & Liu, S. (2021). Yak excreta-induced changes in soil microbial communities increased the denitrification rate of marsh soil under warming conditions. *Applied Soil Ecology*, 165, 103935. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.103935>
- Feinberg, M. (2010). Validation des méthodes d'analyse quantitative par le profil d'exactitude. *Le cahier des techniques de l'INRA, Numéro spécial*, 58.
- Fowler, D., Coyle, M., Skiba, U., Sutton, M. A., Cape, J. N., Reis, S., Sheppard, L. J., Jenkins, A., Grizzetti, B., Galloway, J. N., Vitousek, P., Leach, A., Bouwman, A. F., Butterbach-Bahl, K., Dentener, F., Stevenson, D., Amann, M., & Voss, M. (2013). The global nitrogen cycle in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368(1621), 20130164. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0164>
- Giles, M., Morley, N., Baggs, E., & Daniell, T. (2012). Soil nitrate reducing processes – drivers, mechanisms for spatial variation, and significance for nitrous oxide production. *Frontiers in Microbiology*, 3. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2012.00407>
- Gis Sol. (2013). *Fiche Réseau de Mesures de la Qualité des Sols : RMQS*. <https://www.gissol.fr/publications/fiche-reseau-de-mesures-de-la-qualite-des-sols-rmqqs-2183>
- Groffman, P. M., & Tiedje, J. M. (1989). Denitrification in north temperate forest soils: Relationships between denitrification and environmental factors at the landscape scale. *Soil Biology and Biochemistry*, 21(5), 621-626. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(89\)90054-0](https://doi.org/10.1016/0038-0717(89)90054-0)
- Hartzog, P. E., Sladek, M., Kelly, J. J., & Larkin, D. J. (2017). Bottle effects alter taxonomic composition of wetland soil bacterial communities during the denitrification enzyme activity assay. *Soil Biology and Biochemistry*, 110, 87-94. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.03.006>
- Hättenschwiler, S., Barantal, S., Ganault, P., Gillespie, L., & Coq, S. (2018). *Quels enjeux sont associés à la biodiversité des sols ?* 69, 1-14.
- Herold, M. B., Baggs, E. M., & Daniell, T. J. (2012). Fungal and bacterial denitrification are differently affected by long-term pH amendment and cultivation of arable soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 54, 25-35. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.04.031>
- Hochstein, L. I., & Tomlinson, G. A. (1988). The Enzymes Associated with Denitrification. *Annual Review of Microbiology*, 42(1), 231-261. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.42.100188.001311>
- Hu, J., Inglett, K. S., Wright, A. L., Clark, M. W., & Reddy, K. R. (2020). Nitrous oxide dynamics during denitrification along a hydrological gradient of subtropical grasslands. *Soil Use and Management*, 36(4), 682-692. <https://doi.org/10.1111/sum.12637>
- ISO (2007). *Guide ISO/CEI 99 Vocabulaire international de métrologie – concepts fondamentaux et généraux et termes associés (VIM)*, ISO, Genève.
- ISO (2017). *Qualité du sol — Procédure d'évaluation des risques écologiques spécifiques au site de la contamination des sols (approche TRIADE de la qualité du sol)* ISO, Genève.
- Janvier, C. (2008). *Recherche d'indicateurs de la santé des sols* [Phdthesis, INAPG (AgroParisTech)]. <https://pastel.archives-ouvertes.fr/pastel-00003443>

- Janvier, C., Villeneuve, F., Alabouvette, C., Edel-Hermann, V., Mateille, T., & Steinberg, C. (2007). Soil health through soil disease suppression : Which strategy from descriptors to indicators? *Soil Biology and Biochemistry*, 39(1), 1-23. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.07.001>
- Ji, B., Yang, K., Zhu, L., Jiang, Y., Wang, H., Zhou, J., & Zhang, H. (2015). Aerobic denitrification : A review of important advances of the last 30 years. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 20(4), 643-651. <https://doi.org/10.1007/s12257-015-0009-0>
- Kandeler, E., Poll, C., Frankenbeger Jr., W. T., & Tabatabai, M. A. (2011). Nitrogen cycle enzymes. In *Methods of soil Enzymology* (Vol. 9). John Wiley & Sons.
- Kaye, J. P., & Hart, S. C. (1997). Competition for nitrogen between plants and soil microorganisms. *Trends in Ecology & Evolution*, 12(4), 139-143. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(97\)01001-X](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(97)01001-X)
- Kibblewhite, M. G., Ritz, K., & Swift, M. J. (2008). Soil health in agricultural systems. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363(1492), 685-701. <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2178>
- Ladd, J. N. (1978). Origin and range of enzymes in soil. In *Soil enzymes* (p. 51-80). Academic Press.
- Ladd, J. N., & Foster, R. C. (1996). Soil structure and biological activity. In *Soil biochemistry* (Vol. 9, p. 23-78). Marcel Dekker, INC.
- Lehmann, J., Bossio, D. A., Kögel-Knabner, I., & Rillig, M. C. (2020). The concept and future prospects of soil health. *Nature Reviews Earth & Environment*, 1(10), 544-553. <https://doi.org/10.1038/s43017-020-0080-8>
- Liang, Y., Wu, C., Wei, X., Liu, Y., Chen, X., Qin, H., Wu, J., Su, Y., Ge, T., & Hu, Y. (2021). Characterization of nirS- and nirK-containing communities and potential denitrification activity in paddy soil from eastern China. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 319, 107561. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2021.107561>
- Liu, N., Liao, P., Zhang, J., Zhou, Y., Luo, L., Huang, H., & Zhang, L. (2020). Characteristics of denitrification genes and relevant enzyme activities in heavy-metal polluted soils remediated by biochar and compost. *Science of The Total Environment*, 739, 139987. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139987>
- Lu, X., Yan, Y., Fan, J., & Wang, X. (2012). Gross Nitrification and Denitrification in Alpine Grassland Ecosystems on the Tibetan Plateau. *Arctic Antarctic and Alpine Research*, 44(2), 188-196. <https://doi.org/10.1657/1938-4246-44.2.188>
- Luo, J., Beule, L., Shao, G., Veldkamp, E., & Corre, M. D. (2022). Reduced Soil Gross N2O Emission Driven by Substrates Rather Than Denitrification Gene Abundance in Cropland Agroforestry and Monoculture. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, 127(3), e2021JG006629. <https://doi.org/10.1029/2021JG006629>
- Maurer, D., Malique, F., Alfarraj, S., Albasher, G., Horn, M. A., Butterbach-Bahl, K., Dannenmann, M., & Rennenberg, H. (2021). Interactive regulation of root exudation and rhizosphere denitrification by plant metabolite content and soil properties. *Plant and Soil*, 467(1-2), 107-127. <https://doi.org/10.1007/s11104-021-05069-7>
- McGill, B. M., Sutton-Grier, A. E., & Wright, J. P. (2010). Plant Trait Diversity Buffers Variability in Denitrification Potential over Changes in Season and Soil Conditions. *Plos One*, 5(7), e11618. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011618>
- Monti, M., Badagliacca, G., Romeo, M., & Gelsomino, A. (2021). No-Till and Solid Digestate Amendment Selectively Affect the Potential Denitrification Activity in Two Mediterranean Orchard Soils. *Soil Systems*, 5(2), 31. <https://doi.org/10.3390/soilsystems5020031>
- Naman, F., Zaoui, D., Ouaaka, A., & Chraaibi, A. (1997). Mesures in vivo et in vitro de l'activité nitrate réductase dans les feuilles de la betterave à sucre (*Beta vulgaris* var. Maghribel). *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires*, 17(2), 95-101.
- Nelson, D. W., & Bremner, J. M. (1969). Factors affecting chemical transformations of nitrite in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 1(3), 229-239. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(69\)90023-6](https://doi.org/10.1016/0038-0717(69)90023-6)
- Nieder, R., Schollmayer, G., & Richter, J. (1989). Denitrification in the rooting zone of cropped soils with regard to methodology and climate : A review. *Biology and Fertility of Soils*, 8(3), 219-226. <https://doi.org/10.1007/BF00266482>
- Obriot, F. (2016). *Epannage de produits résiduels organiques et fonctionnement biologique des sols : De la quantification des impacts sur les cycles carbone et azote à l'évaluation multicritère de la pratique à l'échelle de la parcelle* (p. 456 p.) [Phdthesis, AgroParisTech]. <https://hal.inrae.fr/tel-02801385>
- Philippot, L., Piutti, S., Martin-Laurent, F., Hallet, S., & Germon, J. C. (2002). Molecular Analysis of the Nitrate-Reducing Community from Unplanted and Maize-Planted Soils. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.12.6121-6128.2002>
- Porter, L. K. (1975). Nitrogen transfert in ecosystems. In *Soil biochemistry* (Vol. 4, p. 1-30). Marcel Dekker, INC.
- Pouille, M. (1979). *Etude de la NAFH : nitrate réductase d'une suspension cellulaire de silene alba : Caractérisation, induction et purification*. Université des sciences et techniques de Lille.
- Pucheux, N. (2020, novembre). La méthodologie TRIADE appliquée aux sites et sols pollués. *Journée de restitution du projet de recherche COMBINE "La caractérisation des risques environnementaux au service de la reconversion des friches"*. <https://hal-ineris.archives-ouvertes.fr/ineris-03236296>
- Shrewsbury, L. H., Smith, J. L., Huggins, D. R., Carpenter-Boggs, L., & Reardon, C. L. (2016). Denitrifier abundance has a greater influence on denitrification rates at larger landscape scales but is a lesser driver than environmental variables. *Soil Biology and Biochemistry*, 103, 221-231. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.08.016>

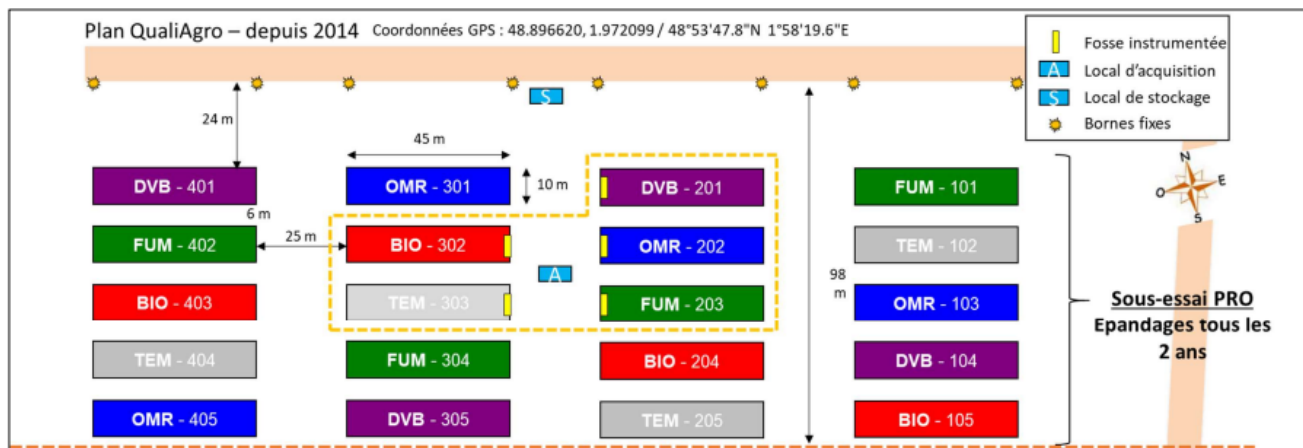
- Šimek, M., & Cooper, J. E. (2002). The influence of soil pH on denitrification : Progress towards the understanding of this interaction over the last 50 years. *European Journal of Soil Science*, 53(3), 345-354. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2389.2002.00461.x>
- Sinaj, S., Richner, W., Flisch, R., & Charles, R. (2009). Données de base pour la fumure des grandes cultures et des herbages (DBF-GCH). *Revue Suisse D'Agriculture*, 41, 1-98.
- Singh, D. K., & Kumar, S. (2008). Nitrate reductase, arginine deaminase, urease and dehydrogenase activities in natural soil (ridges with forest) and in cotton soil after acetamiprid treatments. *Chemosphere*, 71(3), 412-418. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.11.005>
- Sinsabaugh, R. L., Belnap, J., Findlay, S. G., Shah, J. J. F., Hill, B. H., Kuehn, K. A., Kuske, C. R., Litvak, M. E., Martinez, N. G., Moorhead, D. L., & Warnock, D. D. (2014). Extracellular enzyme kinetics scale with resource availability. *Biogeochemistry*, 121(2), 287-304. <https://doi.org/10.1007/s10533-014-0030-y>
- Stein, L. Y., & Klotz, M. G. (2016). The nitrogen cycle. *Current Biology*, 26(3), R94-R98. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.12.021>
- Stevenson, B. A., Schipper, L. A., McGill, A., & Clark, D. (2011). Denitrification and Availability of Carbon and Nitrogen in a Well-drained Pasture Soil Amended with Particulate Organic Carbon. *Journal of Environmental Quality*, 40(3), 923-930. <https://doi.org/10.2134/jeq2010.0463>
- Tatti, E., Goyer, C., Zebarth, B. J., Burton, D. L., Giovannetti, L., & Viti, C. (2013). Short-Term Effects of Mineral and Organic Fertilizer on Denitrifiers, Nitrous Oxide Emissions and Denitrification in Long-Term Amended Vineyard Soils. *Soil Science Society of America Journal*, 77(1), 113-122. <https://doi.org/10.2136/sssaj2012.0096>
- Tilman, D., Cassman, K. G., Matson, P. A., Naylor, R., & Polasky, S. (2002). Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature*, 418(6898), 671-677. <https://doi.org/10.1038/nature01014>
- Vilain, G. G., Garnier, J., Martinez, A., & Nghiem, X. A. (2009). *Potentiel de dénitrification et production de N2O dans des profils de sols dans un transect plateau-fond de vallée dans le bassin de l'Orgeval*. 13.
- Vincent, B. (2018). *Contribution de la symbiose fixatrice d'azote dans l'adaptation d'une légumineuse à des sols contrastés : Le modèle Acacia spirorbis et les contraintes édaphiques extrêmes rencontrées en Nouvelle-Calédonie* (Nouvelle-Calédonie) [Thesis, Université de Montpellier]. <https://doi.org/10.1/ID593110.pdf>
- Yu, Y., Zhang, J., Chen, W., Zhong, W., Zhu, T., & Cai, Z. (2014). Effect of land use on the denitrification, abundance of denitrifiers, and total nitrogen gas production in the subtropical region of China. *Biology and Fertility of Soils*, 50(1), 105-113. <https://doi.org/10.1007/s00374-013-0839-x>

Table des annexes :

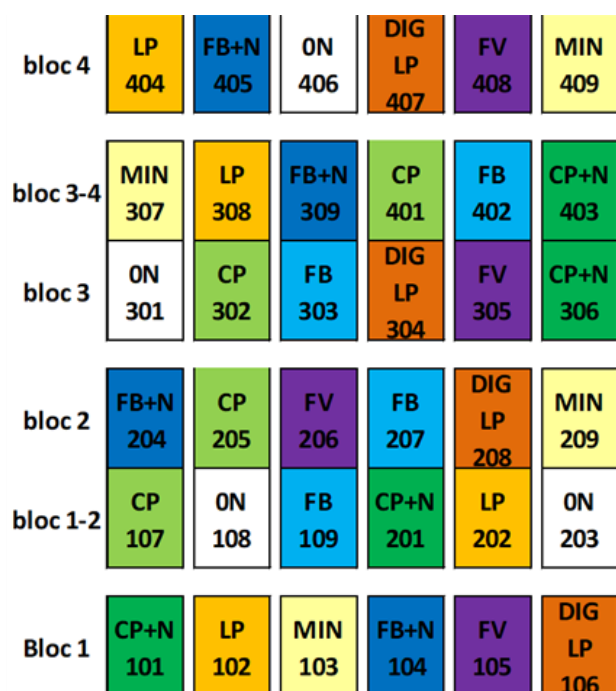
Annexe 1 : Représentation des parcelles du site expérimental de QualiAgro, à Feucherolles (78).	I
Annexe 2 : Représentation des parcelles du site expérimental EFELE, à Rennes (35.)	I
Annexe 3 : Représentation des parcelles du site du SOERE ACBB, à Lusignan (86).	II
Annexe 4 : Représentation des parcelles et des rotations culturales du site expérimental OASYS et des rotations des parcelles, à Lusingnan (86).	II
Annexe 5 : Représentation du maillage des sols Français du projet RMQS (Gis sol).	III
Annexe 6 : Logigramme de prise de décision dans le cadre de la mise en place d'une nouvelle méthode de dosage en laboratoire	III

Annexe 1 : Représentation des parcelles du site expérimental QualiAgro, à Feucherolles (78).

Témoin sans amendements organiques (TEM), compost de biodéchets (BIO), fumier de bovins composté (FUM), compost de boue d'épuration et déchets verts (DVB) et compost d'ordures ménagères résiduelles (OMR)

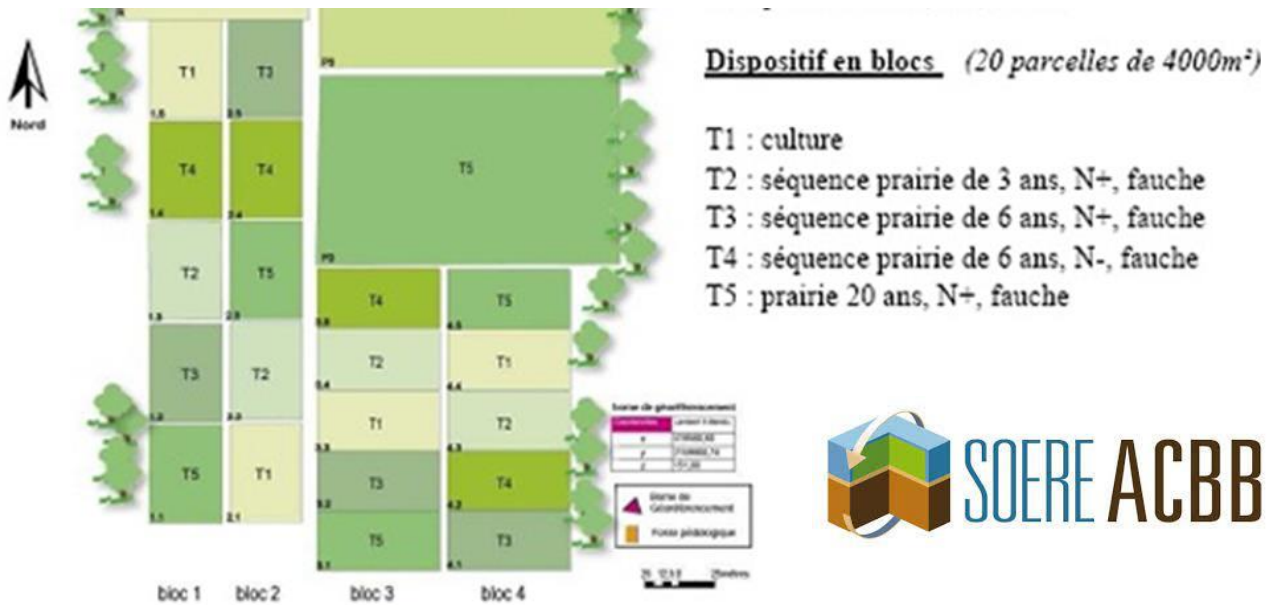


Annexe 2 : Représentation des parcelles du site expérimental EFELE, à Rennes (35.)



- ON Témoin sans fertilisation minérale
- MIN Témoin + fertilisation minérale
- LP lisier de porc
- DIG LP digestat de méthanisation de lisier de porc
- CP fumier de porc composté
- CP+N fumier de porc composté + fertilisation minérale
- FB Fumier de bovins
- FB+N fumier de bovins + fertilisation minérale
- FV Fumier de volailles
- TS Travail du sol simplifié
- LAB Labour

Annexe 3 : Représentation des parcelles du site du SOERE ACBB, à Lusignan (86).



Annexe 4 : Représentation des parcelles et des rotations culturales du site expérimental OASYS et des rotations des parcelles, à Lusignan (86).

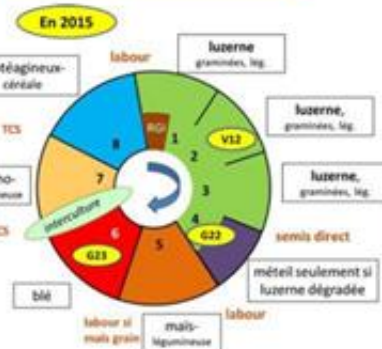
**Unité expérimentale
 Ferlus, INRA Lusignan
 projet OasYs**



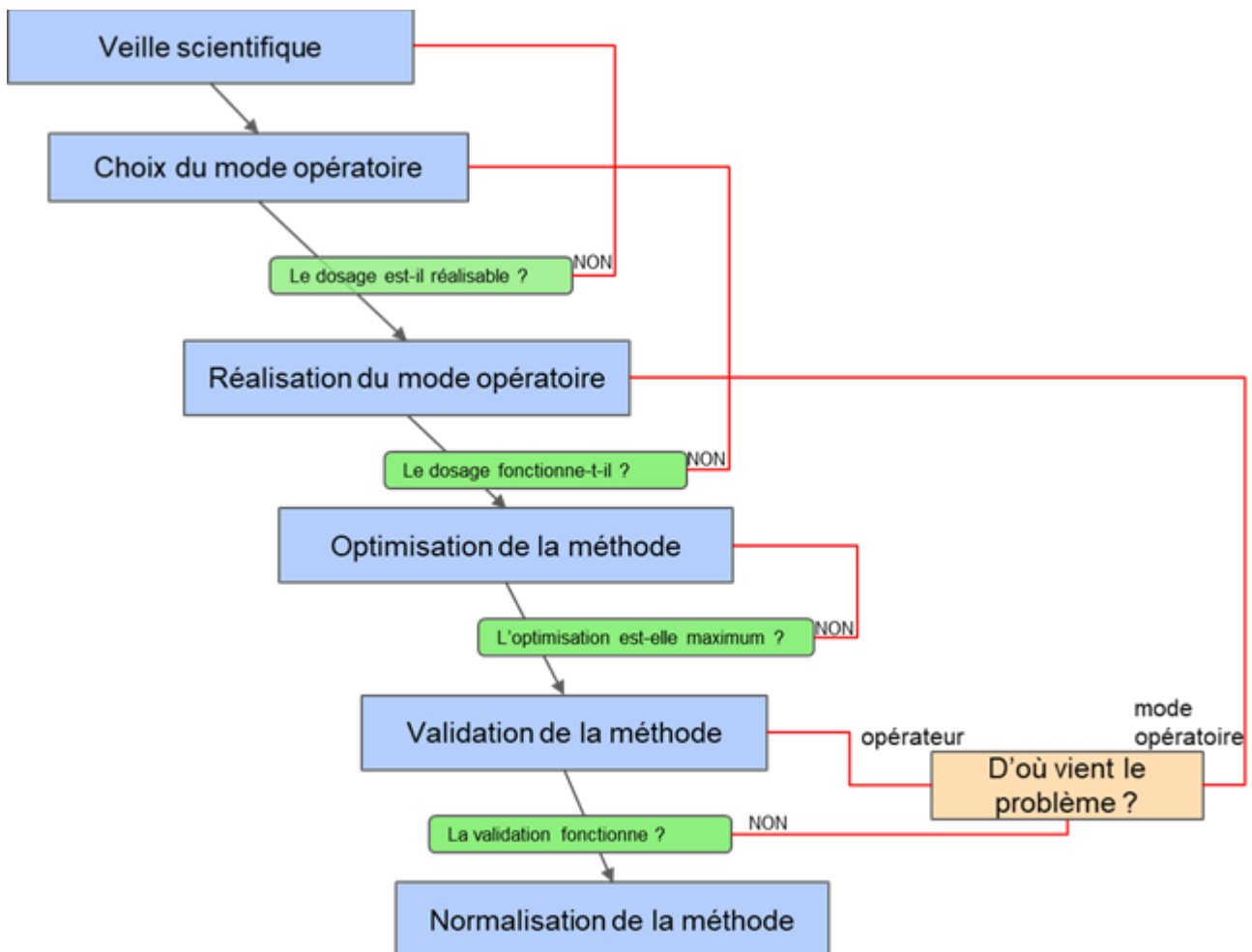
En pointillés : les parcelles représentatives

Zone facilement pâturable

Zone non pâturable



Annexe 5 : Représentation du maillage des sols Français du projet RMQS (Gis sol).



Annexe 6 : Logigramme de prise de décision dans le cadre de la mise en place d'une nouvelle méthode de dosage en laboratoire



SARRAZIN, Juliette, 2022, Étude de la fiabilité de la méthode et de la pertinence de la nitrate réductase comme indicateur de la gestion des sols, Mémoire de fin d'études, VetAgro Sup Clermont-Ferrand, 2022.

STRUCTURE D'ACCUEIL ET INSTITUTIONS ASSOCIEES :

- ◆ Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement (INRAE), plateforme BiochemEnv (BCE)

ENCADRANTS :

- ◆ Maître de stage : CHEVIRON, Nathalie (BCE)
- ◆ Tuteur pédagogique : VASSAL, Nathalie

CALICE : Concevoir et accompagner l'innov'action en agronomie

RESUMÉ

Le fonctionnement des sols est régi grâce aux grands cycles biogéochimiques dans lesquels interviennent les enzymes du sol. Libérées par les microorganismes, ce sont des indicateurs biologiques de la santé des sols. Le cycle de l'azote est un cycle divisé en quatre étapes, un focus est fait sur la dénitrification dans les sols. L'étape de dénitrification est régulée par la nitrate réductase (NAR), qui permet de réduire les nitrates en nitrites.

Le projet a deux objectifs : i) déterminer la fiabilité de la méthode de dosage et ii) connaître la pertinence de la mesure. La fiabilité de la méthode est étudiée par une validation de méthode, par la méthode des ajouts dosés de nitrites. Les dosages sont réalisés sur des sols d'occupations variées. La pertinence du dosage est étudiée par la mesure de l'activité de la nitrate réductase sur des échantillons de sols avec des couverts et des pratiques agricoles distincts. Les couverts principaux sont la grande culture (GC), la prairie (PR), la forêt (FR) et les vignes et vergers (VV).

Les résultats de la validation de la méthode de dosage ne sont pas concluants et nécessitent des tests complémentaires. La nature du couvert végétal, la fertilisation minérale et l'agroforesterie n'impactent pas significativement l'activité de la nitrate réductase. Par contre, dans un même gradient pédoclimatique, la NAR est supérieure en PR par rapport à la GC. L'apport de produits résiduels organiques (PRO) augmente l'activité, mais cet effet n'est significatif que sur l'un des sites expérimentaux.

Mots clés : Nitrate réductase – enzyme – dénitrification – validation de méthode – occupation des sols – pratique agricole

ABSTRACT

Soil functioning is governed by major biogeochemical cycles in which soil enzymes are involved. Released by microorganisms, they are biological indicators of soil health. The nitrogen cycle is divided into four stages, with a focus on denitrification in soils. The denitrification step is regulated by nitrate reductase (NAR), which reduces nitrate to nitrite. The project has two objectives: i) to determine the reliability of the assay method and ii) to find out the relevance of the measurement. The method reliability is studied by means of a method validation, using the nitrite dosing method. The dosages are made on soils of several occupations. The relevance of the assay is studied by measuring nitrate reductase activity on soil samples with different cover types and agricultural practices. The main covers are field crops (GC), grassland (PR), forest (FR) and vineyards and orchards (VV).

The results of the validation of the dosing method are not conclusive and require further testing. The nature of the vegetation cover, mineral fertilisation and agroforestry did not significantly impact nitrate reductase activity. On the other hand, within the same soil and climate gradient, NAR is higher in PR than in GC. The addition of organic waste products (PRO) increases the activity, but this effect is significant on one of the experimental sites.

Key words : Nitrate reductase – enzyme – denitrification – validation method – land use – agricultural practice