

## Caractérisation de l'impact du travail du sol sur la dynamique des processus microbiologiques responsables d'émissions de N<sub>2</sub>O en champ d'essai

**Auteur :** Goisse, Guillaume

**Promoteur(s) :** Heinesch, Bernard; Thonar, Cécile

**Faculté :** Gembloux Agro-Bio Tech (GxABT)

**Diplôme :** Master en bioingénieur : sciences et technologies de l'environnement, à finalité spécialisée

**Année académique :** 2022-2023

**URI/URL :** <http://hdl.handle.net/2268.2/18367>

---

### *Avertissement à l'attention des usagers :*

*Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.*

*Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.*

---

**CARACTÉRISATION DE L'IMPACT DU TRAVAIL DU  
SOL SUR LA DYNAMIQUE DES PROCESSUS  
MICROBIOLOGIQUES RESPONSABLES D'ÉMISSIONS  
DE N<sub>2</sub>O EN CHAMP D'ESSAI**

**GUILLAUME GOISSE**

**TRAVAIL DE FIN D'ETUDES PRESENTE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE  
MASTER BIOINGENIEUR EN SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE L'ENVIRONNEMENT**

**ANNEE ACADEMIQUE 2022-2023**

**CO-PROMOTEURS: BERNARD HEINESCH, CECILE THONAR**



© Toute reproduction du présent document, par quelque procédé que ce soit, ne peut être réalisée qu'avec l'autorisation de l'auteur et de l'autorité académique<sup>1</sup> de Gembloux Agro-Bio Tech.

Le présent document n'engage que son auteur.

---

<sup>1</sup> Dans ce cas, l'autorité académique est représentée par le(s) promoteur(s) membre du personnel(s) enseignant de GxABT.

**CARACTÉRISATION DE L'IMPACT DU TRAVAIL DU  
SOL SUR LA DYNAMIQUE DES PROCESSUS  
MICROBIOLOGIQUES RESPONSABLES D'ÉMISSIONS  
DE N<sub>2</sub>O EN CHAMP D'ESSAI**

**GUILLAUME GOISSE**

**TRAVAIL DE FIN D'ETUDES PRESENTE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE  
MASTER BIOINGENIEUR EN SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE L'ENVIRONNEMENT**

**ANNEE ACADEMIQUE 2022-2023**

**CO-PROMOTEURS: BERNARD HEINESCH, CECILE THONAR**

## REMERCIEMENTS

Ce travail n'aura pu aboutir sans l'aide et le soutien de nombreuses personnes que je tiens ici à remercier. Tout d'abord, je remercie François Boland pour sa grande disponibilité tout au long de ce travail. Merci pour ton aide et tes conseils précieux, pour le temps passé à galérer en champ, pour le temps accordé à la relecture et l'amélioration de mon travail mais aussi pour tous les instants moins sérieux où on s'est bien marré. Un grand merci également à Antoine André, qui a été mon binôme durant toute la durée de ce TFE. Merci à toi, on aura bien coopéré et on y sera finalement arrivé malgré pas mal de contretemps. J'aurais toutefois pu me passer des longues heures d'arrosage de maïs au crépuscule... Je suis très heureux d'avoir pu travailler dans un si chouette trio.

Merci également à Aude Mancia pour l'encadrement précieux durant tout ce travail et particulièrement dans le domaine microbiologique. Ton expertise m'a permis de beaucoup m'améliorer dans un domaine qui ne m'est à la base pas familier. Merci pour le temps passé avec moi en labo (qui se résumait en bonne partie à chercher du matos partout ...). Adrien Blum m'a également été d'une aide précieuse concernant la qPCR, de son fonctionnement au traitement des données.

Je tiens aussi à remercier mes deux co-promoteurs Bernard Heinesch et Cécile Thonar pour la proposition de ce TFE ainsi que pour l'encadrement et les réunions ou discussions ayant permis de recentrer le projet.

Un tout grand merci à toute l'équipe de l'axe BIODYNE. L'ambiance au bureau aura toujours été excellente et je suis très content d'avoir pu passer six mois dans un service aussi drôle et bienveillant. Merci notamment pour les nombreuses discussions du temps de midi, les débats sans queue ni tête et les petites blagues.

Merci à mes parents de m'avoir permis de suivre ces études et de m'avoir encouragé et soutenu durant ces 5 années. Merci à mes amis rencontrés à Gembloux pour ces 5 merveilleuses années passées bien trop vite et remplies de moments précieux, guindailles et autres. Un merci particulier au Crépuscule Belliciste pour les deux formidables années à vos côtés, ça aura été un plaisir de faire partie de cette grande famille noire et verte. Continuez à faire perdurer nos traditions dans nos vieux murs.

# PRÉFACE

Ce TFE s'inscrit dans le cadre de la thèse en cours de François Boland (BIODYNE, Gembloux Agro-Bio Tech, ULiège) dont l'objectif est d'étudier l'effet à long terme de la réduction du travail du sol sur les émissions de N<sub>2</sub>O. Depuis 2015, un dispositif de mesures des émissions de N<sub>2</sub>O est installés sur l'essai SolRésidus (2008) de la ferme expérimentale de Gembloux Agro-Bio Tech pour comparer deux modalités de travail du sol, conventionnel et réduit. L'étude présentée dans ce travail bénéficie, d'une part, de l'expertise des différents acteurs qui ont été actifs sur cet essai, notamment Margaux Lognoul (Thèse 2019) et Matthieu Delespesse (TFE 2021), et d'autre part, de la collaboration avec Antoine André dont le TFE s'intitule « Caractérisation de l'effet de la réduction du travail du sol sur les émissions de N<sub>2</sub>O en champ d'essais et analyse de la variabilité spatiale des émissions ». Ainsi, les parties qui concernent la description générale du site et des dispositifs de mesure de ce travail (§2.1, 2.2, 2.3) sont tirées de Delespesse (2021) avec le consentement des auteurs. Enfin, une partie du traitement des données ( § 3.1 , Figure 8) a été faite de manière commune avec Antoine André et sont identiques dans les deux manuscrits.

# RÉSUMÉ

Le N<sub>2</sub>O est un gaz à effet de serre principalement émis par les sols agricoles. Le passage du travail du sol conventionnel au travail du sol réduit d'une grande culture s'accompagne de la modification de nombreux paramètres pédologiques. Ces modifications affectent les communautés de microorganismes responsables des émissions de N<sub>2</sub>O. Ce travail a pour but d'étudier l'influence du travail du sol sur l'abondance des communautés de microorganismes à l'origine des émissions de N<sub>2</sub>O en champ. Dans ce contexte, une expérimentation a été mise en place sur l'essai SolRésidus de la ferme expérimentale de Gembloux Agro-Bio Tech, comparant deux modalités de travail du sol et deux modalités de gestion des résidus. A la suite de la fertilisation du champ et du semis d'une culture de maïs, un dispositif de mesure des flux de N<sub>2</sub>O et CO<sub>2</sub> par chambres à fermeture automatisée a été mis en place sur deux parcelles intégrant les résidus, l'une en travail du sol réduit (RT) et l'autre en conventionnel (CT). Des échantillons de sol ont été prélevés afin de quantifier l'abondance des populations microbiologiques nitrifiantes et dénitrifiantes. Cette quantification a été réalisée grâce à l'extraction de l'ADN et la PCR quantitative sur les gènes marqueurs de la nitrification/dénitrification (*16S rRNA* bactérien, *nirK*, *nirS*, *amoA* bactérien, *amoA* archéen). L'extraction d'ADN a permis la quantification des populations actives mais aussi dormantes ou mortes. En parallèle, les paramètres suivants du sol ont été mesurés : teneur en eau, en O<sub>2</sub>, concentration en NO<sub>3</sub><sup>-</sup> et NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, pH, carbone organique total et azote total. Une irrigation manuelle a été réalisée afin de provoquer un pic d'émission de N<sub>2</sub>O sur les deux parcelles. Les résultats ont montré des émissions moyennes de N<sub>2</sub>O et CO<sub>2</sub> significativement plus élevées sur RT sur la période de mesure. Suite à l'irrigation, un pic d'émission est apparu sur les deux parcelles. Celui-ci était supérieur et est apparu légèrement plus tôt sur RT. L'analyse biomoléculaire a démontré une plus grande abondance moyenne des gènes *16S rRNA* bactérien, *nirK*, *nirS* et *amoA* archéen sur RT et du gène *amoA* bactérien sur CT. Le premier pic d'émission sur RT a coïncidé avec une augmentation significative de l'abondance des populations de bactéries dénitrifiantes par rapport aux populations totales de bactéries (rapports *nirK/16S rRNA* bactérien, *nirS/16S rRNA* bactérien) et de l'abondance des populations d'archées nitrifiantes (*amoA* archéen). Sur CT, le pic d'émission a coïncidé avec la baisse de l'abondance de tous les gènes mesurés, mais pas de l'abondance de chaque population par rapport à la population globale de bactéries. Ces résultats montrent l'impact du travail du sol sur les paramètres pédologiques et microbiologiques du sol, qui affectent eux-mêmes les émissions de gaz à effet de serre d'une culture sur le court intervalle de temps étudié. Une étude plus détaillée du même type, se concentrant à la fois sur l'abondance et l'activité des populations microbiologiques, pourrait mener à une meilleure compréhension de l'impact du travail du sol sur les communautés microbiologiques à l'origine d'émissions de N<sub>2</sub>O. Certains paramètres biomoléculaires pourraient alors être utilisés comme variables prédictives plus précises dans les modèles de prédiction des flux de N<sub>2</sub>O.

Mots clés : flux, N<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub>, travail du sol réduit, travail du sol conventionnel, chambres de mesure, bactéries, archées, ADN, ARN ribosomique *16S*, *nirK*, *nirS*, *amoA*



# ABSTRACT

N<sub>2</sub>O is a greenhouse gas mainly emitted by agricultural soils. The transition from conventional tillage to reduced tillage in field is accompanied by the modification of many soil parameters. These changes affect the communities of microorganisms responsible for N<sub>2</sub>O emissions. The aim of this work is to study the influence of tillage on the communities of microorganisms responsible for N<sub>2</sub>O emissions in the field. In this context, an experiment was set up on the SolRésidus trial at Gembloux Agro-Bio Tech experimental farm, comparing two tillage methods and two residue management methods. Following fertilisation of the field and sowing of maize, a system for measuring N<sub>2</sub>O and CO<sub>2</sub> fluxes using automated closing chambers was set up on two plots incorporating residues, one under reduced tillage (RT) and the other under conventional tillage (CT). Soil samples were collected to quantify the abundance of nitrifying and denitrifying microbiological populations. This quantification was carried out using DNA extraction and quantitative PCR on nitrification/denitrification marker genes (bacterial *16S rRNA*, *nirK*, *nirS*, bacterial *amoA*, archaeal *amoA*). DNA extraction was used to quantify active populations, but also dormant or dead. At the same time, the following soil parameters were measured: soil water content, O<sub>2</sub> concentration, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> concentration, soil pH, total organic carbon and total nitrogen. Manual irrigation was used to induce a N<sub>2</sub>O emissions peak on both plots. The results showed significantly higher average N<sub>2</sub>O and CO<sub>2</sub> emissions on RT over the measurement period. Following irrigation, a peak in emissions appeared on both plots. This peak was higher and appeared slightly earlier on RT. Biomolecular analysis showed a higher average abundance of the bacterial *16S rRNA*, *nirK*, *nirS* and archaeal *amoA* genes on RT and higher average abundance of the bacterial *amoA* gene on CT. The first emission peak on RT coincided with a significant increase in the abundance of denitrifying bacterial populations relative to total bacterial populations (ratios of *nirK*/bacterial *16S rRNA*, *nirS*/bacterial *16S rRNA*) and in the abundance of nitrifying archaeal populations (archaeal *amoA*). In CT, the emission peak coincided with a drop in the abundance of all the genes measured, but not in the abundance of each population relative to the overall population of bacteria. These results show the impact of tillage on soil pedology and microbiological parameters, which afterwards affect greenhouse gas emissions from a crop over the short time interval studied. A more detailed study of the same type, focusing on both the abundance and the activity of microbiological populations, could lead to a better understanding of the impact of tillage on microbiological communities responsible for N<sub>2</sub>O emissions. Some biomolecular parameters could then be used as more accurate predictors in N<sub>2</sub>O fluxes prediction models.

Key words : fluxes, N<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub>, reduced tillage, conventional tillage, closed chambers, bacteria, archaea, DNA, *16S* ribosomal RNA, *nirK*, *nirS*, *amoA*

# TABLE DES MATIÈRES

Remerciements .....	I
Préface .....	II
Résumé .....	III
Abstract .....	IV
Table des matières.....	V
Liste des figures .....	VII
Liste des tableaux.....	VIII
1. Introduction.....	1
1.1. Contexte général .....	1
1.2. Etat de l'art .....	3
1.2.1. Processus relâchant du N <sub>2</sub> O au sein du cycle de l'azote .....	3
1.2.2. Gènes marqueurs des populations nitrifiantes et dénitrifiantes .....	5
1.2.3. Influence des pratiques culturales sur les facteurs pédologiques et la microbiologie du sol .....	6
1.3. Objectifs et questions de recherche .....	7
2. Matériels et méthodes.....	8
2.1. Site expérimental .....	8
2.2. Dispositif de mesures des flux de N <sub>2</sub> O et CO <sub>2</sub> .....	10
2.3. Calcul et traitement des flux de N <sub>2</sub> O et CO <sub>2</sub> .....	12
2.3.1. Calcul des flux .....	12
2.3.2. Traitement des données .....	13
2.4. Analyses de l'azote minéral dans le sol, du pH, du COT et du N total .....	14
2.5. Données pédoclimatiques .....	15
2.6. Analyse biomoléculaire .....	16
2.6.1. Échantillonnage, méthode et gènes ciblés .....	16
2.6.2. Extraction de l'ADN .....	16
2.6.3. Quantification de l'abondance des gènes par qPCR et traitement des résultats .....	17
2.7. Analyse statistique .....	19
2.7.1. Traitement statistique des flux .....	19
2.7.2. Analyse de la variance.....	20
2.7.3. Coefficients de corrélation linéaire de Pearson .....	20

3. Résultats .....	21
3.1. Evolution temporelle des variables pédoclimatiques .....	21
3.2. Evolution des teneurs en azote minéral, pH, COT et N total du sol.....	25
3.3. Flux de N <sub>2</sub> O et CO <sub>2</sub> .....	29
3.4. Evolution de l'abondance des gènes ciblés .....	32
3.5. Relations entre les flux et les autres facteurs d'influence .....	34
4. Discussion.....	38
4.1. Rôle des pratiques agricoles sur les émissions de gaz à effet de serre et sur les microorganismes du sol.....	38
4.1.1. Modification du comportement hydrique du sol.....	38
4.1.2. Redistribution de la matière organique du sol .....	38
4.1.3. Azote minéral dans le sol .....	39
4.1.4. Influence des modalités de travail du sol sur les pics d'émission .....	39
4.1.5. Influence des modalités de travail du sol sur les populations microbiologiques.....	40
4.2. Dynamique des populations de microorganismes durant les émissions de N <sub>2</sub> O.....	41
4.2.1. Abondance moyenne des gènes marqueurs .....	41
4.2.2. Variation de l'abondance des gènes durant les pics d'émissions .....	42
4.2.3. Corrélations entre flux et abondance des gènes.....	43
4.3. Perspectives .....	43
5. Contribution personnelle .....	44
6. Conclusion .....	45
7. Bibliographie .....	47
8. Annexes .....	61

# LISTE DES FIGURES

Figure 1 – Principaux processus microbiologiques du cycle de l’azote à l’origine de la production de N <sub>2</sub> O dans les sols. Auteur : Delespesse (2021), adapté de Wrage et al. (2001). .....	3
Figure 2 - Schéma général de l’essai SolRésidus durant l’expérimentation. ....	9
Figure 3 - Schéma d’une parcelle avec chambres à fermeture automatisée et zones de prélèvement de sol. Dispositif identique sur les parcelles P07 et P12. La moitié inférieure de la parcelle était dédiée à la mesure du rendement et n’a pas été concernée par ce travail. ....	10
Figure 4 - Chambre de mesure à fermeture automatisée. Photo : François Boland, reprise de Delespesse (2021). ....	11
Figure 5 - Représentation schématique du circuit complet du dispositif de mesure automatisé. Auteur : Antoine André. ....	12
Figure 6 – Ligne du temps reprenant les échantillonnage de sol pour azote minéral et microbiologie, ainsi que les principales opérations. Attention : des précipitations ont eu lieu avant le 23/06 mais n’ont pas été mesurées sur la parcelle. Voir pour cela l’Annexe 1. ....	14
Figure 7 - Exemple de schéma d’une plaque qPCR. La plaque comprend la triple gamme de plasmides permettant la calibration (colonnes 1 à 3) ainsi que les échantillons 1 à 24 en triplicats (colonnes 4 à 12). ....	18
Figure 8 – Evolution temporelle des variables pédoclimatiques mesurées : précipitations [mm], T° de l’air [°C], humidité relative [%], rayonnement solaire [W/m <sup>2</sup> ], T° du sol [°C], teneur en eau du sol [%], teneur en O <sub>2</sub> du sol [%]. Auteur de la figure : Antoine André. ....	24
Figure 9 - Evolution temporelle des teneurs en N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (moyenne ± écart-type, n=4) sur CT et RT. . .....	26
Figure 10 - Evolution temporelle des teneurs en N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (moyenne ± écart-type, n=4) sur CT et RT. .....	27
Figure 11 - Evolution temporelle des teneurs en COT (moyenne ± écart-type si plusieurs échantillons) sur CT et RT. ....	27
Figure 12 – Evolution temporelle des teneurs en azote total dans le sol (moyenne ± écart-type si plusieurs échantillons) sur CT et RT. ....	28
Figure 13 - Evolution temporelle du pH (moyenne ± écart-type si plusieurs échantillons) sur CT et RT. ....	28
Figure 14 - Evolution temporelle des flux moyens de N <sub>2</sub> O calculés sur des périodes de 4h (moyenne ± erreur standard, n=8) sur CT et RT. ....	29
Figure 15 - Evolution temporelle des flux moyens de CO <sub>2</sub> calculés sur des périodes de 4h (moyenne ± erreur standard, n=8) sur CT et RT. ....	30
Figure 16 - Evolution temporelle des flux moyens quotidiens de N <sub>2</sub> O (gauche) et CO <sub>2</sub> (droite) (moyenne journalière ± écart-type, n=6) aux six dates étudiées sur CT et RT. ....	31
Figure 17 - Evolution temporelle de l’abondance du gène 16S rRNA bactérien (gauche) et du gène amoA archéen (droite) (moyenne ± écart-type, n=4) sur CT et RT. Échelle de l’axe Y : nombre de copies du gène par gramme de sol sec, multiplié par un facteur 10x (indiqué dans le coin supérieur gauche). Etoile noire : différence significative au 21 ou 23/06 par rapport au contrôle. ....	32

Figure 18 - Evolution temporelle de l'abondance du gène amoA bactérien (gauche) ainsi que du rapport amoA bactérien/16S rRNA bactérien (droite) (moyenne ± écart-type, n=4) sur CT et RT. Échelle de l'axe Y sur le graphe de gauche : nombre de copies du gène par gramme de sol sec, multiplié par un facteur 10X (indiqué dans le coin supérieur gauche). Etoile noire : différence significative au 21 ou 23/06 par rapport au contrôle. .... 32

Figure 19 - Evolution temporelle de l'abondance du gène nirK (gauche) ainsi que du rapport nirK/16S rRNA bactérien (droite) (moyenne ± écart-type, n=4) sur CT et RT. Échelle de l'axe Y sur le graphe de gauche : nombre de copies du gène par gramme de sol sec, multiplié par un facteur 10X (indiqué dans le coin supérieur gauche). Etoile noire : différence significative au 21 ou 23/06 par rapport au contrôle. .... 33

Figure 20 - Evolution temporelle de l'abondance du gène nirS (gauche) ainsi que du rapport nirS/16S rRNA bactérien (droite) (moyenne ± écart-type, n=4) sur CT et RT. Échelle de l'axe Y sur le graphe de gauche : nombre de copies du gène par gramme de sol sec, multiplié par un facteur 10X (indiqué dans le coin supérieur gauche). Etoile noire : différence significative au 21 ou 23/06 par rapport au contrôle. .... 33

Figure 21 – Matrice de corrélation des différents facteurs sur CT. La couleur indique le signe du coefficient de corrélation linéaire de Pearson tandis que la taille du cercle indique l'importance du coefficient. .... 36

Figure 21 – Matrice de corrélation des différents facteurs sur RT. La couleur indique le signe du coefficient de corrélation linéaire de Pearson tandis que la taille du cercle indique l'importance du coefficient. .... 36

## LISTE DES TABLES

Table 1 - Succession des opérations culturales sur l'essai SOLRÉSIDUS à partir de la récolte de la culture précédente (froment d'hiver, 2022)..... 8

Table 2 - Dates d'échantillonnage et formes d'azote dosées pour l'échantillon correspondant... .... 14

Table 3 – Liste des gènes ciblés associés à leurs amorces (primers) et à la séquence correspondante aux amorces... .... 18

Table 4 - Evolution temporelle des teneurs en N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (moyenne ± écart-type, n=4) sur CT et RT... .... 25

Table 5 - Evolution temporelle des teneurs en N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (moyenne ± écart-type, n=4) sur CT et RT... .... 26

Table 6 : Coefficient de corrélation linéaire de Pearson (r) du logarithme en base 10 des flux de N<sub>2</sub>O en fonction des facteurs supposés d'influence sur CT et RT. Les seuils de signification obtenus par l'analyse de la variance de chaque facteur pris séparément sont : \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 (ns : non significatif)..... 35

# 1. INTRODUCTION

## 1.1. Contexte général

Dans le contexte de réchauffement climatique global, l'étude des émissions de gaz à effets de serre provenant de l'agriculture revêt une importance capitale (Schulze et al., 2009). Le N<sub>2</sub>O (protoxyde d'azote ou oxyde nitreux) est le troisième plus important gaz à effet de serre après le CO<sub>2</sub> (dioxyde de carbone) et le CH<sub>4</sub> (méthane) (Montzka et al., 2011) et possède un potentiel de réchauffement global (global warming potential, GWP) environ 275 fois plus élevé que celui du CO<sub>2</sub> (IPCC, 2022). Le GWP représente le pouvoir réchauffant d'une masse donnée d'un gaz par rapport au pouvoir réchauffant de la même masse de CO<sub>2</sub>, généralement sur une période de 100 ans (Stocker et al., 2014). Il s'agit donc d'un indice permettant de comparer l'impact sur le réchauffement climatique des différents gaz à effet de serre à masse égale. Bien qu'émis à des volumes largement inférieurs (Laborde et al., 2021; Thompson et al., 2019), le N<sub>2</sub>O représente à lui seul environ 6% des émissions de gaz à effet de serre en termes d'équivalents carbone (C. Wang et al., 2021). De plus, il s'agit de la plus importante source de dégradation de la couche d'ozone stratosphérique (Ravishankara et al., 2009).

Le N<sub>2</sub>O est émis naturellement, majoritairement par des processus microbiologiques se déroulant dans les sols (Butterbach-Bahl et al., 2013). Ces émissions sont accélérées par certaines activités anthropogéniques telles que l'exploitation des sols agricoles. La contribution actuelle de ceux-ci aux émissions totales de N<sub>2</sub>O est estimée à 60% (Syakila et Kroeze, 2011). A l'échelle globale, les concentrations atmosphériques sont en croissance, ayant augmenté de plus de 20% depuis le début de la révolution industrielle (Butterbach-Bahl et al., 2013; Davidson, 2009). Le développement et la modernisation de l'agriculture, impliquant notamment la généralisation de la fertilisation intensive, sont les principaux responsables de cette croissance des émissions de N<sub>2</sub>O (D. Ussiri et Lal, 2012). En effet, l'utilisation intensive d'intrants azotés aux périodes où l'efficacité du prélèvement de l'azote des plantes cultivées n'est pas optimale, entraîne son accumulation dans les sols. Par conséquent, le risque de pertes azotées est augmenté, par plusieurs processus tels que le lessivage de nitrates ou les émissions de N<sub>2</sub>O (C. Wang et al., 2021). En plus de ces émissions dites directes, des émissions indirectes existent également. Suite aux processus de volatilisation, de lessivage et d'érosion auxquels sont sujets de nombreux sols agricoles, différentes formes d'azote minéral peu stables (nitrates principalement) peuvent se déplacer du lieu d'application des fertilisants vers les écosystèmes en aval (Wey et al., 2021). L'enrichissement en azote de ces écosystèmes provoque alors l'apparition de nouveaux hotspots de N<sub>2</sub>O, contribuant aux émissions dites indirectes (Denier van der Gon et Bleeker, 2005; Hiscock et al., 2003).

Les principaux facteurs affectant la dynamique de production de N<sub>2</sub>O d'un sol sont la température, le pH, l'humidité et la quantité d'azote et de carbone dans le sol (C. Wang et al., 2021). Ces facteurs sont notamment influencés par le type de pratique agricole (travail du sol, fertilisation, gestion des résidus culturaux, culture en place, ...) appliquée à la parcelle. L'étude de l'influence des pratiques agricoles sur les émissions de N<sub>2</sub>O est donc nécessaire. Le travail du sol, par son action sur la structure, l'oxygénation du sol et la répartition spatiale de la matière organique, peut particulièrement influencer les échanges de N<sub>2</sub>O (Huang et al., 2018; van Kessel et al., 2013).

Le travail du sol représente une pratique fondamentale en agriculture. Il vise à créer dans un sol agricole un milieu le plus favorable possible à la croissance des plantes cultivées (Biberdzic et al., 2020; Huynh et al., 2019). Il influe sur la structure du sol en réduisant les agrégats, empêche le développement d'adventices qui pourraient concurrencer la culture (L. Zhang et al., 2021) et crée le lit de semence propice à la germination des graines. La réduction des agrégats permet de favoriser le développement racinaire et améliore l'infiltration d'eau (Lipiec et al., 2006). Le travail du sol primaire consiste en un travail profond (généralement 30 cm) effectué par une charrue retournant la couche de sol. Le travail du sol secondaire à plus faible profondeur (10 cm) prépare le lit de semence. Le travail du sol conventionnel (conventional tillage, CT) comprend un travail primaire suivi d'un travail secondaire avant le semis. Ce type de pratique agricole présente cependant plusieurs inconvénients, parmi lesquels la plus grande exposition des sols labourés à l'érosion (Komissarov et Klik, 2020), la compaction des couches plus profondes (>30cm) par la création d'une semelle de labour (couche de sol compactée directement sous le passage de la charrue) (Biberdzic et al., 2020), la diminution de la matière organique de surface (Curaqueo et al., 2010; Oorts et al., 2007) ou encore le risque accru de lessivage des nitrates (Syswerda et al., 2012).

Afin de pallier ces désavantages, l'agriculture de conservation met en avant le travail réduit du sol. Ce travail réduit (reduced tillage, RT) consiste généralement uniquement en un travail secondaire et ne comprend donc pas de retournement des couches profondes du sol. Cette technique permet la réduction de l'érosion du sol (Komissarov et Klik, 2020; Seta et al., 1993), la réduction des coûts et du temps de travail, une meilleure rétention en eau (Monsefi et al., 2022) ou encore une augmentation du taux de matière organique (Jakab et al., 2023; Oorts et al., 2007). L'effet du travail du sol réduit sur les émissions de N<sub>2</sub>O n'est cependant pas encore bien défini.

Le N<sub>2</sub>O est émis dans les sols par plusieurs communautés de microorganismes à travers différentes réactions du cycle de l'azote. La nitrification et la dénitrification sont les principaux processus responsables de la production de N<sub>2</sub>O (Butterbach-Bahl et al., 2013) et sont décrits dans la partie **1.3 "Etat de l'art"**. L'étude de la dimension microbiologique du sol est essentielle afin de permettre une bonne compréhension des différents processus à l'œuvre lors des émissions de gaz à effet de serre. Plusieurs types de communautés microbiologiques coexistent dans le sol : bactéries, archées et champignons. Chacun de ces embranchements comprend de nombreux taxons auxquels sont associés différents processus impliqués dans la production de N<sub>2</sub>O. Grâce notamment à l'extraction de l'ADN microbien et la PCR quantitative (Domeignoz-Horta et al., 2018), il est possible de quantifier l'abondance des différents gènes marqueurs (nirK, nirS, amoA, nosZ) des processus impliqués dans la production de N<sub>2</sub>O, permettant ainsi d'identifier quelles sont les réactions majoritaires durant toute la durée des émissions de N<sub>2</sub>O, et notamment durant les pics d'émission (Harter et al., 2014; Lognoul et al., 2017; Theodorakopoulos et al., 2017).

Des efforts sont mis en œuvre pour analyser et proposer des stratégies visant à réduire les émissions de N<sub>2</sub>O d'origine agricole. Il est donc primordial d'étudier le rôle du travail du sol sur les microorganismes impliqués dans les émissions de N<sub>2</sub>O, afin de garantir une gestion optimale des systèmes agricoles permettant une réduction globale de l'impact climatique de l'agriculture. Certains paramètres biomoléculaires plus précis pourraient notamment être intégrés aux modèles de prédiction des flux de N<sub>2</sub>O existants actuellement.

## 1.2. Etat de l'art

### 1.2.1. Processus relâchant du N<sub>2</sub>O au sein du cycle de l'azote

Plusieurs processus du cycle de l'azote dans les sols peuvent être à l'origine d'émissions de N<sub>2</sub>O (Figure 1). Ces processus sont principalement réalisés par des bactéries, mais des archées (Fu et al., 2020; Hu et al., 2022; Tzanakakis et al., 2019) et des champignons (Gui et al., 2021; Liu et al., 2023) peuvent également être responsables d'émissions parfois importantes dans certaines conditions. Les processus d'émission considérés comme principaux par la communauté scientifique sont la nitrification autotrophe ainsi que la dénitrification (Butterbach-Bahl et al., 2013). Cependant, d'autres réactions à l'origine de la production de N<sub>2</sub>O existent et peuvent prendre une importance variable en fonction des conditions : la nitrification hétérotrophe (Zhang et al., 2015), la dénitrification opérée par des bactéries généralement nitrifiantes appelée nitrification-dénitrification (Kool et al., 2011; Wrage et al., 2001; Wrage-Mönnig et al., 2018), la décomposition chimique de l'hydroxylamine (NH<sub>2</sub>OH) (Bremner et al., 1980; Prosser et al., 2020), la chimio dénitrification des nitrites (Butterbach-Bahl et al., 2013) ou encore la décomposition des nitrates d'ammonium (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) (Babrauskas et Leggett, 2020; Vangeli et al., 2022). Ces trois derniers processus sont abiotiques.

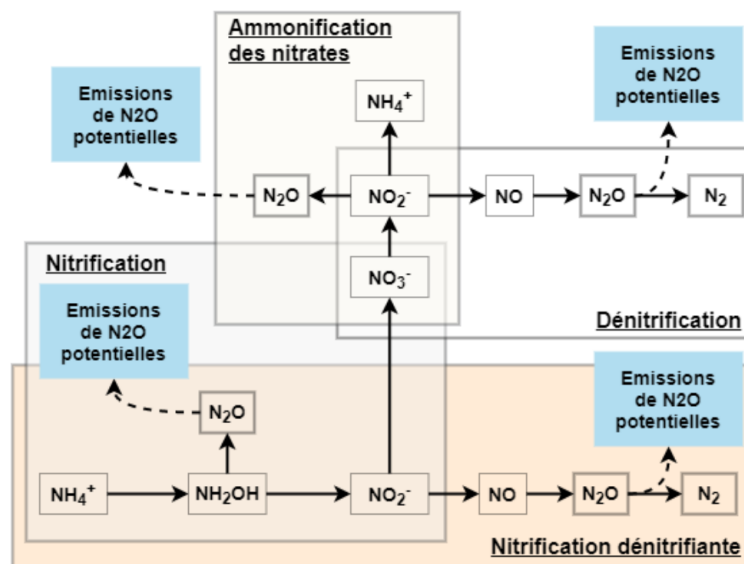


Figure 1 – Principaux processus microbiologiques du cycle de l'azote à l'origine de la production de N<sub>2</sub>O dans les sols. Auteur : Delespesse (2021), adapté de Wrage et al. (2001).



La nitrification consiste en l'oxydation de l'ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) en nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ), en passant par deux intermédiaires que sont l'hydroxylamine ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ) et les nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ). Ce processus est réalisé principalement en conditions aérobies car les réactions d'oxydation nécessitent du dioxygène comme accepteur d'électrons. Les bactéries autotrophes nitrifiantes sont les principaux contributeurs de la nitrification dans le sol (Schmidt et Belser, 1994). L'ensemble des microorganismes nitrifiants peut être classé en trois groupes (Stein et Klotz, 2016). La cohorte I oxydant l'ammonium en nitrites, la cohorte II oxydant les nitrites en nitrates et la cohorte III contenant les organismes capables de réaliser les deux étapes de la nitrification. Bien que la majorité de ces groupes soient composés de bactéries, la capacité de certains groupes d'archées à participer en proportions parfois importantes à la nitrification a été démontrée, principalement dans les sols acides (Gubry-Rangin et al., 2010; Nicol et al., 2008). La nitrification a comme issue la transformation de l'ammonium en nitrates, mais produit également comme coproduits du  $\text{N}_2\text{O}$  à travers la dégradation de l'hydroxylamine. Les  $\text{NO}_3^-$  produits par nitrification peuvent entre autres être prélevés par la plante pour sa croissance, être lessivés durant les épisodes pluvieux (Fowler et al., 2013) ou servir de substrat pour la dénitrification dans des conditions principalement anoxiques. La contribution de la nitrification aux émissions de  $\text{N}_2\text{O}$  des sols n'est pas uniquement limitée à des conditions strictement aérobies. En cas de baisse de la teneur en oxygène, certaines bactéries peuvent réduire les nitrites en  $\text{N}_2\text{O}$  au cours de la dénitrification opérée par des bactéries nitrifiantes (nitrifier dénitrification) (Kool et al., 2011). Plusieurs études suggèrent que cette réaction précise peut contribuer significativement aux émissions de  $\text{N}_2\text{O}$  en champ (Kool et al., 2011). Enfin, la nitrification hétérotrophe (Zhang et al., 2015) existe également et peut mener au relargage de  $\text{N}_2\text{O}$  à travers l'oxydation de composés azotés organiques ou inorganiques dans certaines conditions, principalement acides.

La dénitrification est le processus de réductions successives des nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ) en nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ), oxyde nitrique (NO), oxyde nitreux ( $\text{N}_2\text{O}$ ) et enfin diazote ( $\text{N}_2$ ) (Kuypers et al., 2018; van Spanning et al., 2007). Ce processus est principalement effectué par des microorganismes hétérotrophes aérobies facultatifs placés en conditions anaérobies (Stein et Klotz, 2016; J. Wang et al., 2018). Cependant, plusieurs groupes de bactéries et d'archées ne présentent pas le bagage génétique codant les enzymes responsables de certaines étapes de la dénitrification, pouvant amener à la réalisation d'un schéma incomplet de la dénitrification (Signor et Cerri, 2013). Ces schémas incomplets résultent alors en l'émission des formes intermédiaires d'azote gazeux telles que NO et  $\text{N}_2\text{O}$ . Enfin, il est à noter que la dénitrification est le seul processus biologique de consommation de  $\text{N}_2\text{O}$  dans les sols puisque la dénitrification complète inclut la réduction du  $\text{N}_2\text{O}$  en  $\text{N}_2$  comme étape finale (Cavigelli et Robertson, 2001; Vieten et al., 2008).

## 1.2.2. Gènes marqueurs des populations nitrifiantes et dénitrifiantes

Comme introduit ci-dessus, les trois clades responsables des émissions de N<sub>2</sub>O et CO<sub>2</sub> en champ sont les bactéries, les archées et les champignons. Ce travail se concentre uniquement sur les deux premiers clades cités.

Le gène de l'ARN ribosomique *16S* (*16S rRNA*) est le composant de la plus petite sous-unité du ribosome, présent chez l'ensemble des procaryotes. Son séquençage est couramment utilisé afin d'identifier des populations ou retracer l'histoire évolutive des organismes (Tringe et Hugenholtz, 2008). Sa quantification permet également de mesurer l'abondance des populations microbiologiques totales, puisqu'il est présent chez tous les procaryotes (Henry et al., 2006; Schloss et al., 2005). Il est possible de scinder cette analyse entre 16S rRNA bactérien et archéen, afin de mesurer l'abondances totales des bactéries et des archées séparément.

L'enzyme ammonium monooxygénase est codée par le gène *amoA* et est responsable de l'oxydation de l'ammonium en hydroxylamine, plus tard oxydé en nitrite. La séquence de ce gène est différente pour les bactéries et archées oxydant l'ammonium (ammonia-oxidizing bacteria : AOB et ammonia-oxidizing archaea : AOA). La distinction est donc faite entre *amoA* archéen et *amoA* bactérien. L'augmentation de l'abondance de ce gène est associée à une augmentation de l'activité de l'enzyme ammonium monooxygénase et donc à la stimulation de la nitrification. Si le rôle du gène *amoA* chez les AOB est connu depuis un certain temps, il n'a été mis en évidence dans les communautés d'AOA que depuis quelques années (Gubry-Rangin et al., 2010; Stahl et de la Torre, 2012). Le rôle des archées dans la nitrification et la part que peuvent prendre ces organismes dans les émissions totales de N<sub>2</sub>O à travers la nitrification n'est donc pas encore bien connu. Certaines études comme Theodorakopoulos et al. (2017) ont mis en évidence une augmentation significative de l'expression du gène *amoA* bactérien après un épisode pluvieux. Di et al. (2010) montrent une corrélation significative positive entre les flux de N<sub>2</sub>O et l'abondance du gène *amoA* chez les AOB, mais pas chez les AOA.

Les gènes *nirK* et *nirS* sont les gènes codant l'enzyme nitrite reductase, responsable de la réduction des nitrites en NO, étape-clé de la dénitrification. L'augmentation des concentrations de ces gènes est mise en parallèle à l'augmentation des populations dénitrifiantes. Krauss et al. (2017a) mettent en évidence une augmentation de plus de 100% de l'expression du gène *nirK* dans la modalité de travail du sol réduit, confirmant la tendance de plusieurs études de l'augmentation des communautés dénitrifiantes en conditions de travail du sol réduit. De plus, l'augmentation des gènes *nirS* et *nirK* est selon plusieurs études directement liée à des émissions de N<sub>2</sub>O plus élevées (Han et al., 2020; Zhang et al., 2022).

### 1.2.3. Influence des pratiques culturales sur les facteurs pédologiques et la microbiologie du sol

Le travail du sol peut impacter significativement les paramètres pédologiques et microbiologiques du sol, et donc impacter les émissions de  $N_2O$  qui dépendent de ces facteurs. L'étude de l'effet du travail du sol sur les émissions de  $N_2O$  a souvent montré des résultats contradictoires (van Kessel et al., 2013). Dans les systèmes sans travail du sol, une hausse des émissions de  $N_2O$  est généralement observée par rapport au travail du sol conventionnel (Abdalla et al., 2013; Huang et al., 2018; Mei et al., 2018; Shakoor et al., 2021; Yue et al., 2023). Certaines études ont mesuré des émissions supérieures sur CT (e.g. Ussiri et al., 2009), tandis que d'autres n'ont pas constaté de différences (Boeckx et al., 2011; Krauss et al., 2017b; van Kessel et al., 2013).

Le travail du sol modifie notamment la structure et la porosité du sol, ce qui conditionne l'aération du sol et la capacité d'infiltration en eau (Horn et Peth, 2009). La réduction de l'intensité du travail du sol induit aussi généralement une augmentation de la densité apparente, un changement dans la distribution de la taille des pores et une amélioration de la capacité de rétention en eau du sol (Strudley et al., 2008).

Un des principaux facteurs influençant les processus de nitrification/dénitrification (et donc la production de  $N_2O$ ) est l'humidité du sol, impactée par les changements de structure et de porosité sur RT. A un WFPS (water filled pore space, fraction volumique du sol remplie d'eau) compris entre 35 et 60%, la nitrification serait le processus dominant selon plusieurs études (Bateman et Baggs, 2005; Schaufler et al., 2010), mais à partir de 70 % la dénitrification deviendrait le processus principal, voire seul responsable des émissions de  $N_2O$  (Chapuis-Lardy et al., 2007; Davidson et al., 2000). Cependant, d'autres études prouvent que l'oxydation de l'ammonium (c'est-à-dire la première phase de la nitrification) est un phénomène pouvant être important même à un WFPS élevé (Theodorakopoulos et al., 2017).

Si l'effet positif du travail du sol réduit sur les stocks de C dans la couche supérieure du sol (couche de 0 à 30 cm) est relativement faible par rapport au CT (Angers et Eriksen-Hamel, 2008; Ogle et al., 2019), le RT provoque une redistribution nette du C vers la surface du sol (Angers et Eriksen-Hamel, 2008; Hiel et al., 2018; Meurer et al., 2018). Cette situation en surface pourrait provoquer des émissions plus élevées en RT. A l'inverse, la réduction de la température du sol (Johnson et Lowery, 1985), l'augmentation de la stabilité des agrégats et une meilleure stabilisation de la matière organique peuvent conduire à une réduction des émissions de  $N_2O$  dans les systèmes de non-labour.

La gestion des résidus culturaux est un autre facteur modifiant l'activité des microorganismes du sol. En tant que source d'azote, les résidus sont un réservoir important pour les émissions de  $N_2O$ . L'intégration des résidus augmente notamment le stockage du carbone dans le sol. Ce stockage du carbone pourrait permettre de diminuer les émissions de  $CO_2$  en grande culture. Cependant, cet effet positif pourrait être contrebalancé par une augmentation des émissions de  $N_2O$ . Abalos et al. (2022) observent ainsi des émissions de  $N_2O$  supérieures dans les systèmes avec incorporation des résidus culturaux, ce qui crée un pool de matière organique plus grand à disposition des microorganismes. De plus, les résidus culturaux peuvent se caractériser par une micro-porosité élevée et donc une forte capillarité. Même en conditions relativement sèches, ils absorbent l'eau des particules de sols alentours et favorisent localement la dénitrification (Kravchenko et Robertson, 2015).

### 1.3. Objectifs et questions de recherche

Dans le contexte général de l'étude de l'impact du travail du sol sur les émissions de N<sub>2</sub>O, une expérience à long terme est menée depuis 2008 à la ferme expérimentale de Gembloux Agro-Bio Tech, ULiège (Belgique). Plusieurs parcelles ont été créées dans un champ afin de comparer deux modalités de travail du sol (labour conventionnel = CT et travail du sol réduit = RT) ainsi que deux modalités de gestion des résidus cultureux (intégration des résidus = IN et exportation = OUT). Les émissions de CO<sub>2</sub> et N<sub>2</sub>O sont suivies et comparées grâce à un dispositif de chambres de mesure automatisées, mis en place dans le cadre de la thèse de doctorat de François Boland (axe BIODYNE, Gembloux Agro-Bio Tech). Dans le cadre de ce projet de recherche, le présent travail vise à ajouter la dimension microbiologique à l'étude de l'impact du travail du sol sur les émissions de gaz à effet de serre.

L'objectif principal du travail est formulé de la sorte :

#### **Caractériser l'impact du travail du sol sur la dynamique des processus microbiologiques à l'origine des émissions de N<sub>2</sub>O en champ**

Plusieurs sous-objectifs ont été créés afin d'apporter les éléments de réponse :

#### **Comprendre le rôle des pratiques agricoles sur les émissions de gaz à effet de serre et sur les microorganismes du sol :**

- Quel est l'impact du travail du sol sur les émissions de N<sub>2</sub>O/CO<sub>2</sub> et sur les communautés de microorganismes ?

Hypothèse 1 : Le travail du sol réduit provoque des émissions de N<sub>2</sub>O/CO<sub>2</sub> plus élevées que le travail du sol conventionnel

Hypothèse 2 : Les communautés de microorganismes sont plus nombreuses sur RT que sur CT

#### **Comprendre la dynamique des microorganismes durant les émissions de N<sub>2</sub>O :**

- Observe-t-on une différence d'abondance des différents gènes impliqués dans la nitrification et la dénitrification, en fonction du temps et du travail du sol ?

Hypothèse 3 : Les gènes marqueurs de la nitrification/dénitrification sont plus abondants sur RT que sur CT

- Quels sont les processus dominants durant un pic d'émission de N<sub>2</sub>O sur les parcelles d'essai étudiées ?

Hypothèse 4 : Lors d'un pic d'émission suivant les précipitations, la part de populations dénitrifiantes augmente par rapport à la part de populations nitrifiantes

## 2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

### 2.1. Site expérimental

Cette expérimentation a été réalisée au sein de l'essai SolRésidus. Cet essai pluridisciplinaire a été mis en place en 2008 sur la ferme expérimentale de Gembloux Agro-Bio Tech. Il vise à étudier à court et moyen terme l'effet de différentes pratiques de travail du sol et de gestion des résidus de culture sur l'ensemble des paramètres physico-chimiques du sol, le développement de la culture, la vie microbienne du sol, les émissions de gaz à effet de serre et les bilans carbone et eau.

Le dispositif expérimental, représenté à la figure 2, est un carré latin composé de 16 parcelles comportant quatre modalités et quatre répétitions par modalité. Les deux modalités du facteur "travail du sol" sont travail réduit (RT) et travail conventionnel (CT) tandis que les deux modalités du facteur "gestion des résidus" sont l'incorporation (IN) et l'exportation des résidus (OUT). La modalité en labour conventionnel comporte un labour primaire (retournement sur 25 cm) et un labour secondaire sur une profondeur de 10 cm (passage d'une herse rotative pour la préparation du lit de semence), alors que le labour réduit ne comporte que le travail superficiel sur une profondeur de 10 cm. La gestion des résidus concerne les pailles provenant des cultures de froment une année sur deux, qui sont exportées ou non avant le labour primaire. Les quatre modalités du dispositif sont donc RT-IN, RT-OUT, CT-IN et CT-OUT. Pour plus d'informations, se référer à Hiel et al. (2018).

L'historique des cultures ayant été mises en place sur l'essai est le suivant : colza d'hiver (2009), froment d'hiver (2010, 2011, 2012), féverole (2013), froment d'hiver (2014), maïs (2015), froment d'hiver (2016), betterave sucrière (2017), froment d'hiver (2018), colza d'hiver (2019), maïs (2019), froment d'hiver (2020), betterave sucrière (2021), froment d'hiver (2022) et maïs (2023). Les opérations culturales qui concernent la période d'intérêt dans le cadre de cette étude sont présentées à la table 1.

Date	Modalité	Opération	Détails
11/08/2022	CT/RT	Déchaumage	
29/08/2022	CT/RT	Semis interculture	Moutarde phacélie : 10 kg.ha <sup>-1</sup>
18/01/2023	CT	Labour	Charrue 3 socs (25 cm)
01/03/2023	CT/RT	Désherbage chimique	Herbicide systématique : U 46 M750 (0.118 kg.ha <sup>-1</sup> )
28/03/2023	CT/RT	Désherbage chimique	Herbicide systématique : Stern 360 (1.5 kg.ha <sup>-1</sup> )
03/05/2023	CT/RT	Fertilisation solide	1000 kg/ha en 12 N-9P-22K, composé solide au distributeur centrifuge
03/05/2023	CT/RT	Préparation lit de semence	Herse rotative, poussculteur, croskillette

17/05/2023	RT	Désherbage chimique	Gestion repousses de vulpin sur RT
18/05/2023	CT/RT	Préparation lit de semence	Herse rotative, pousculteur
19/05/2023	CT/RT	Semis maïs	2 doses/ha (100 000 graines/ha), variété : Anovi Cs
22/05/2023 - 26/05/2023	P07/P12	Installation dispositif de mesure des flux	
06/06/2023	P07/P12	Arrosage	20 mm
20/06/2023	P07/P12	Arrosage	20 mm

Table 1 - Succession des opérations culturales sur l'essai SOLRÉSIDUS à partir de la récolte de la culture précédente (froment d'hiver, 2022).

Deux irrigations sur les parcelles P07 et P12 ont eu lieu afin de simuler un épisode de précipitations, aucune précipitation n'ayant eu lieu entre l'installation du dispositif (22 mai) et le 6 juin. La première irrigation a eu lieu le 6 juin et la deuxième le 20 juin. L'irrigation sur les parcelles P07 et P12 a concerné la zone couverte par le système de mesure des flux ainsi que la zone dédiée à l'échantillonnage de sol (Figure 3). 20 mm d'eau de distribution ont été arrosés pour chaque irrigation, en deux passages de 10 mm espacés d'au moins six heures. L'irrigation a été réalisée au moyen d'un tuyau équipé d'un pistolet d'arrosage (Gardena 18311-32) simulant au mieux la pluie. Le pistolet a été équipé d'un compteur volumique (Gardena 18350-20) permettant de contrôler le volume irrigué sur la surface voulue.

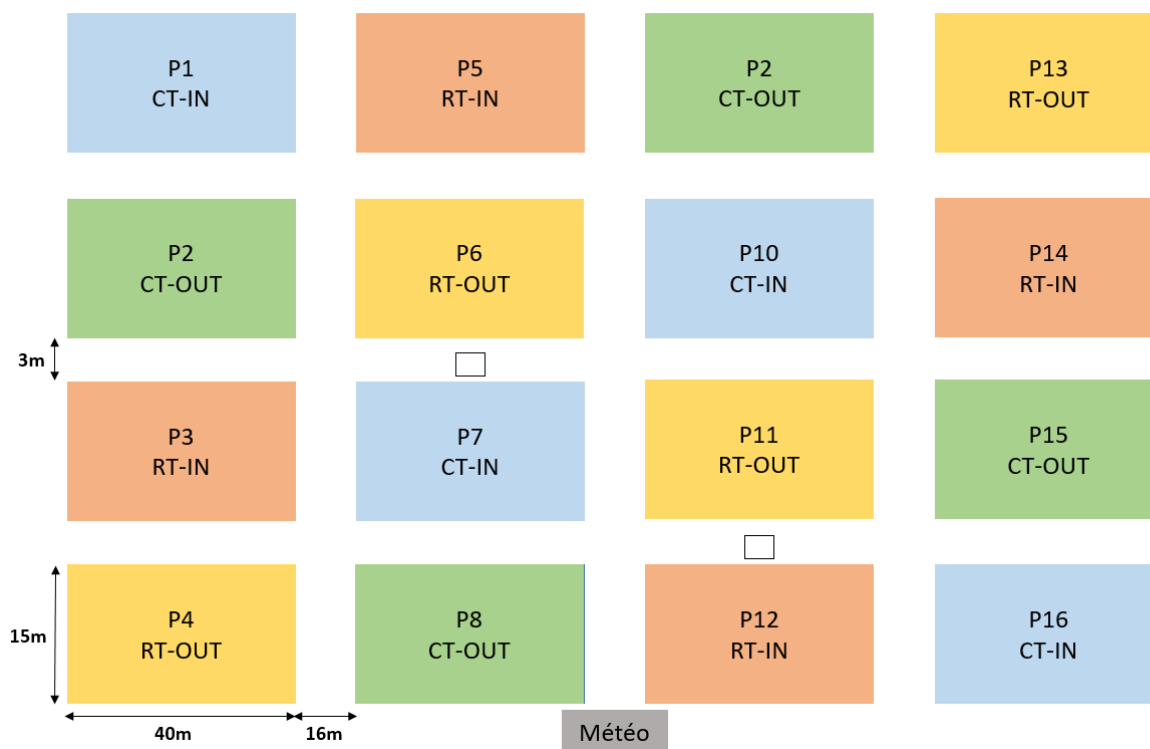


Figure 2 - Schéma général de l'essai SolRésidus durant l'expérimentation.

## 2.2. Dispositif de mesures des flux de N<sub>2</sub>O et CO<sub>2</sub>

Les mesures ont été effectuées sur deux parcelles parmi les 16 présentes sur l'essai : P07 (modalité CT-IN) et P12 (modalité RT-IN). Les concentrations et flux de N<sub>2</sub>O et CO<sub>2</sub> ont été mesurés sur ces deux parcelles au moyen de deux dispositifs de huit chambres de mesures à fermeture automatisée. Le principe de mesure d'un flux avec une chambre est relativement simple. Une chambre fermée est placée sur le sol hermétiquement et plusieurs mesures de concentrations du gaz d'intérêt dans la chambre sont réalisées à intervalles réguliers. Le flux  $f_0$  est alors donné par la dérivée première de la concentration au cours du temps  $C(t)$  au moment même où la chambre est installée (Venterea et al., 2020) :

$$f_0 = \frac{V}{S} \left| \frac{dC(t)}{dt} \right|_{t=0}$$

où  $V$  est le volume de la chambre et du circuit pneumatique associé, et  $S$  la surface du sol couverte par la chambre.

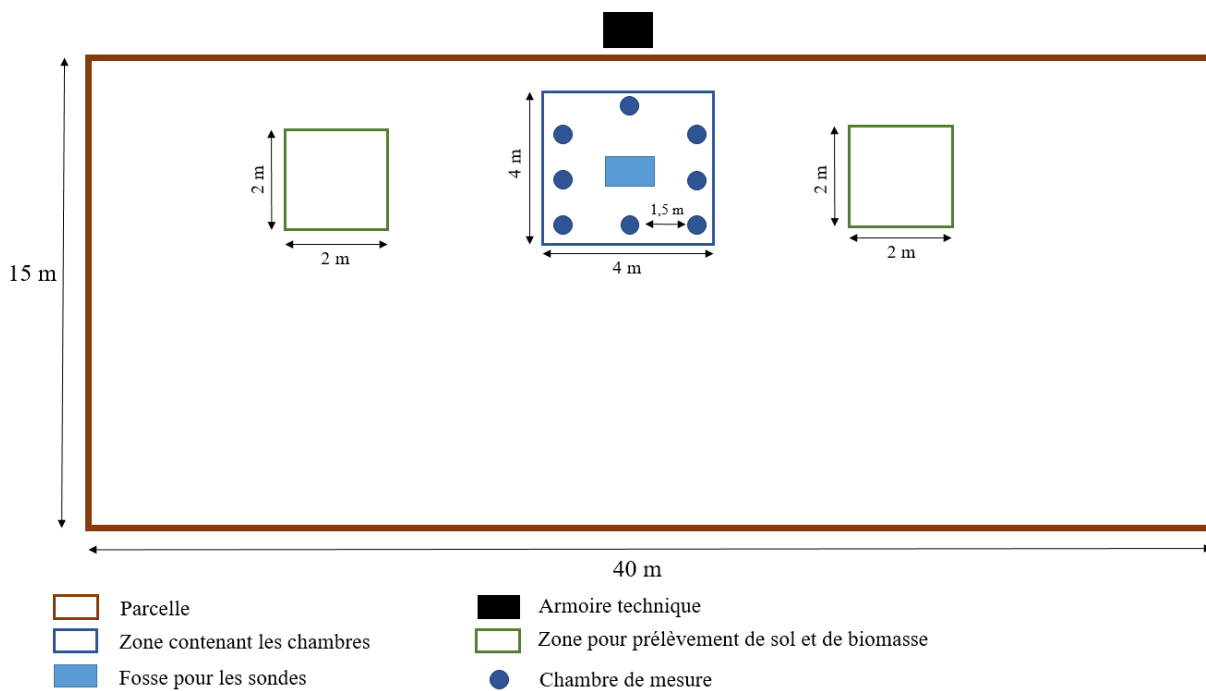


Figure 3 - Schéma d'une parcelle avec chambres à fermeture automatisée et zones de prélèvement de sol. Dispositif identique sur les parcelles P07 et P12. La moitié inférieure de la parcelle était dédiée à la mesure du rendement et n'a pas été concernée par ce travail.

Les chambres sont constituées d'un cylindre en PVC (hauteur : 14.5 cm et diamètre : 19.2 cm) équipé d'un couvercle motorisé permettant la fermeture hermétique de la chambre (Figure 4). Les chambres sont enfoncées de 3 cm dans le sol et installées dans l'inter rang des lignes de maïs. Elles forment un carré de 4 m x 4 m, et sont espacées d'environ 1,5 m (Figure 3). Un tube inséré latéralement permet l'équilibrage de la pression interne avec la pression atmosphérique et est dirigé perpendiculairement à la direction des vents dominants de façon à limiter l'effet Venturi (Suleau et al., 2009). Identiquement pour chaque chambre, deux tuyaux en polyéthylène (diamètre interne : 4 mm) permettent, d'une part, la prise de l'échantillon d'air vers les analyseurs de gaz, et d'autre part, le retour de l'échantillon vers la chambre. La chambre et la tuyauterie associée constituent le circuit principal et la circulation de l'air dans ledit circuit est réalisée à l'aide d'une pompe à air (KNF, LABOPORT® N 86 KT.18, débit nominal 5,5 L/min). Celle-ci permet d'homogénéiser en permanence le circuit principal pendant la mesure de l'évolution de la concentration des gaz mesurés.

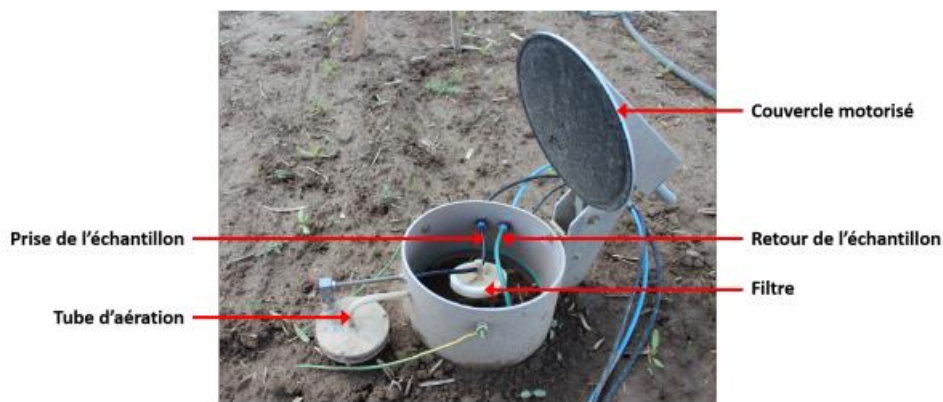


Figure 4 - Chambre de mesure à fermeture automatisée. Photo : François Boland, reprise de Delespesse (2021).

L'analyseur  $N_2O$  (Thermo Scientific 46i, Waltham, USA) et l'analyseur  $CO_2$  (Gascard NG, Edimburgh Instruments, Edimburgh, UK) sont installés dans une armoire électrique située en dehors de la parcelle de mesure. Ils sont connectés en parallèle au circuit d'air principal par l'intermédiaire d'un pot de mélange. L'analyseur  $N_2O$ , disposant d'une pompe interne d'un débit de 1L/min, prélève dans le circuit principal et renvoie, par l'intermédiaire de l'analyseur  $CO_2$ , le sous-échantillon d'air dans le pot de mélange. Les deux appareils réalisent une mesure moyenne toutes les 30 secondes. Pour réaliser une mesure de flux distincte par chambre, chacune est refermée tour à tour durant 26 minutes (série temporelle de 52 mesures) et un système d'électrovannes permet d'isoler les autres chambres ouvertes du circuit. Entre deux mesures de flux, le système est purgé durant 4 minutes avec toutes les chambres ouvertes. La mesure du flux des huit chambres constitue un cycle de 4 heures. L'acquisition et la commande du système sont réalisées par l'intermédiaire d'un datalogger (CR3000 Campbell Scientific, Logan, Utah, USA). La figure 5 fournit une vue schématique du circuit complet.



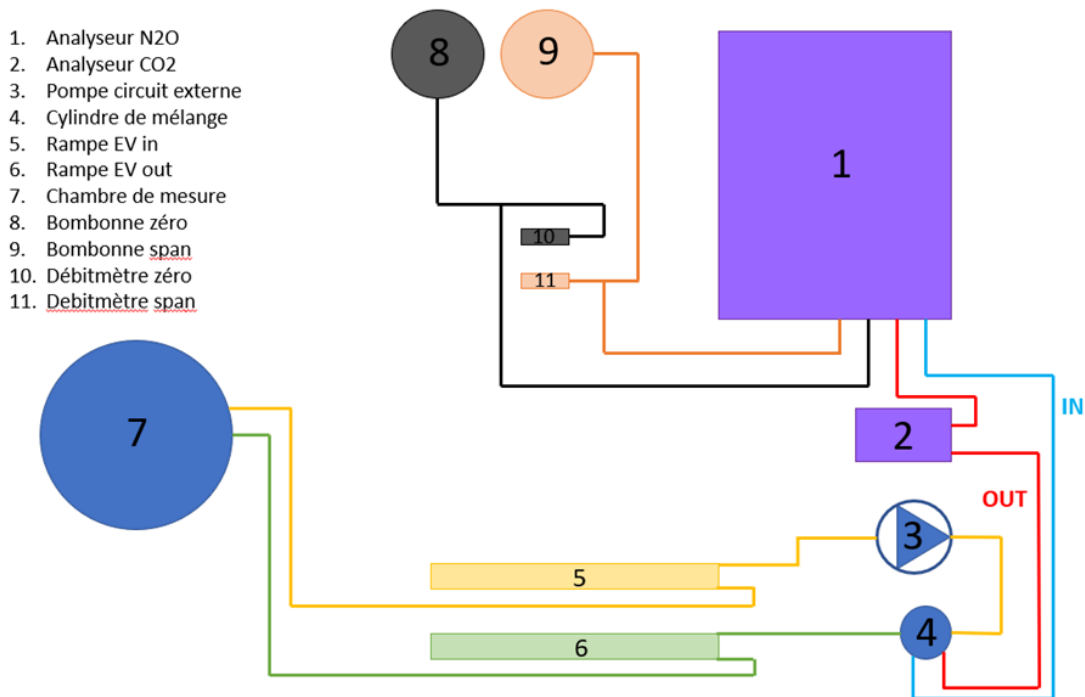


Figure 5 - Représentation schématique du circuit complet du dispositif de mesure automatisé.  
 Auteur : Antoine André.

## 2.3. Calcul et traitement des flux de N<sub>2</sub>O et CO<sub>2</sub>

### 2.3.1. Calcul des flux

Afin de calculer les flux, il est d'usage d'appliquer une régression (linéaire ou non) sur les séries temporelles de concentrations. Plusieurs modèles empiriques ou théoriques sont proposés pour décrire l'évolution de la concentration au cours du temps et réaliser une régression pour déterminer le flux. Pour plus d'informations sur les différents modèles utilisés dans la littérature, se référer à l'article de Venterea et al. (2020).

Dans le cadre de ce travail, un modèle empirique linéaire et un modèle théorique non linéaire ont été utilisés. Le modèle linéaire pour représenter l'évolution de la concentration au cours du temps  $C(t)$  est donné par l'équation suivante (Matthias et al., 1980) :

$$C(t) = C_{atm} + f_{LR} \cdot t$$

avec  $C_{atm}$  concentration du gaz dans l'air ambiant,  $f_{LR}$  le flux et  $t$  le temps. La valeur de flux est ici égale à l'estimation de la pente de la droite donnée par la régression linéaire. L'utilisation du modèle linéaire est assez fréquente dans la littérature, mais elle peut entraîner une sous-estimation du flux. La présence de la chambre peut notamment impacter le gradient de concentration entre le sol et l'atmosphère (Hutchinson et Mosier, 1981; Matthias et al., 1980), la concentration en gaz mesuré augmentant dans la chambre quand elle se ferme. Cet effet, lorsqu'il est important, entraîne une non-linéarité de la relation  $C(t)$  et n'est alors plus pertinent.

Le modèle non linéaire, tenant compte de la variation de concentration dans la chambre, utilisé dans le cadre de cette étude est le modèle exponentiel d'Hutchinson et Mosier, décrit par la relation suivante :

$$C(t) = C_{atm} + (\phi - C_{atm}) \cdot (1 - e^{-\kappa t})$$

où  $\phi$  est la concentration de la source et  $\kappa$  le paramètre de non-linéarité, décrit par la relation suivante :

$$\kappa = \frac{D}{L} \cdot \frac{S}{V}$$

où  $D$  est le coefficient de diffusivité du sol,  $L$  la distance parcourue par le gaz entre la source d'émission et la surface du sol,  $S$  la surface et  $V$  le volume de la chambre. Le flux  $f_{HMR}$  à l'origine de la série temporelle est alors obtenu par la dérivée comme suit :

$$f_{HMR} = \frac{V}{S} \cdot \left. \frac{dC(t)}{dt} \right|_{t=0} = \frac{D}{L} \cdot (\phi - C_{atm})$$

L'équation d'Hutchinson et Mosier peut ainsi se réécrire de la manière suivante :

$$C(t) = C_{atm} + \frac{f_{HMR}}{\kappa} \cdot (1 - e^{-\kappa t})$$

L'estimation des trois paramètres ( $C_{atm}$ ,  $f_{HMR}$  et  $\kappa$ ) de cette équation par une régression non linéaire permet d'obtenir le flux. Même si l'estimation du flux par ce modèle est plus exacte que par le modèle linéaire, l'estimation du flux par un modèle non linéaire est plus sensible à l'erreur aléatoire associée à la mesure de la concentration du  $N_2O$  dans la chambre. Ainsi, les flux déterminés par un modèle non linéaire seront davantage associés à une incertitude plus importante que dans le cas linéaire (i.e. Parkin et al., 2012). Il est donc important de trouver un compromis entre obtenir la bonne estimation tout en réduisant l'incertitude associée (Venterea et al., 2020).

### 2.3.2. Traitement des données

Avant de calculer les flux, il faut éliminer les séries temporelles des concentrations qui présentent un problème et qui ne donneront pas une valeur de flux fiable. Ce problème peut être technique (mauvaise herméticité de la chambre, mauvaise circulation de l'air) ou concerner une série temporelle incohérente. La mise en évidence des mesures non fiables se fait sur base de l'examen des séries temporelles de  $CO_2$ . Ces séries sont non-linéaires et ont une forme caractéristique pour le type d'écosystème (Kutzbach et al., 2007), ce qui permet de repérer aisément les comportements anormaux. De plus, l'évolution de ces séries est beaucoup plus régulière que celle des séries de  $N_2O$ . Les mesures problématiques sont alors supprimées manuellement.

Une fois que les mesures problématiques ont été éliminées, il faut choisir, pour chaque série, quel modèle sera appliqué pour estimer le flux. Lorsque l'intervalle de confiance de l'estimation du flux par le modèle non-linéaire comprend 0, c'est le modèle linéaire qui est utilisé. Dans les autres cas, c'est le modèle pour lequel la RMSE (Root mean square error) de la régression est la plus faible qui est retenu.

Une fois que tous les flux ont été estimés, la moyenne par cycle de quatre heures est calculée. Pour certains cycles, les flux associés à une ou plusieurs chambres sont manquants. Dans ce cas, ils sont remplacés par une interpolation linéaire entre le flux de la chambre au cycle précédent et au cycle suivant.

## 2.4. Analyses de l'azote minéral dans le sol, du pH, du COT et du N total

Une campagne de prélèvements de sol a été réalisée en parallèle des mesures de flux de N<sub>2</sub>O afin d'observer la dynamique temporelle des concentrations des principales formes d'azote minéral, à savoir les ions NO<sub>3</sub><sup>-</sup> et NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Cette campagne s'est concentrée uniquement sur les parcelles P07 et P12. Les dates d'échantillonnage et les formes d'azote minéral mesurées sont mises en contexte dans la figure 6 et résumées dans le tableau ci-dessous (Table 2).

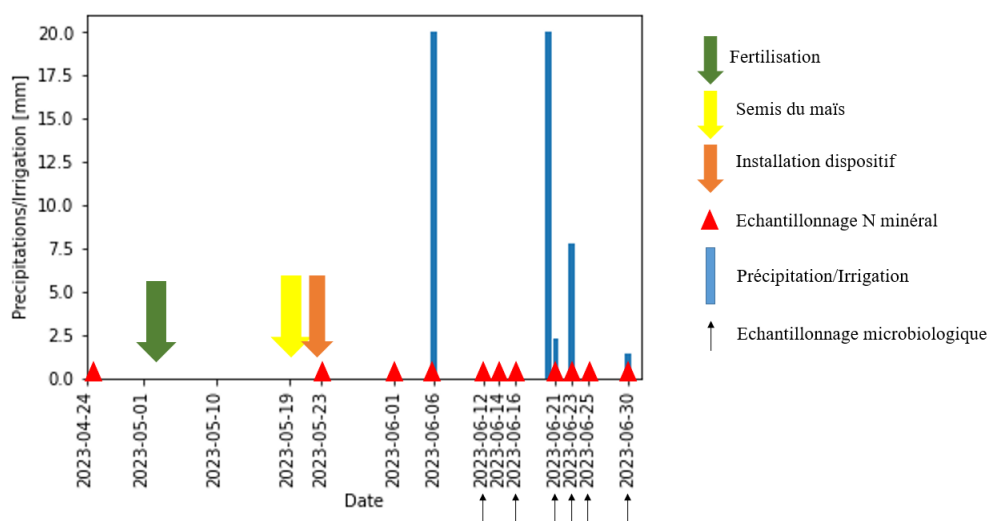


Figure 6 – Ligne du temps reprenant les échantillonnage de sol pour azote minéral et microbiologie, ainsi que les principales opérations. Attention : des précipitations ont eu lieu avant le 23/06 mais n'ont pas été mesurées sur la parcelle. Voir pour cela l'Annexe 1.

24-04-23	23-05-23	01-06-23	12-06-23	14-06-23	16-06-23	21-06-23	23-06-23	25-06-23	30-06-23
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>					NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	

Table 2 - Dates d'échantillonnage et formes d'azote dosées pour l'échantillon correspondant.

Les échantillons de sol ont été prélevés dans les placettes réservées à cet effet (figure 3). Deux répliqués par placette ont été prélevés, soit quatre répliqués pour chaque parcelle. Dix sondages ont été effectués par échantillon. Les sondages ont été réalisés au moyen d'une tarière pour échantillons de sol (diamètre : 2 cm). La profondeur d'échantillonnage était de 0 à 10 cm, la couche superficielle du sol étant en effet la plus importante pour les processus microbiologiques (He et al., 2022). Une fois les échantillons collectés, ceux-ci étaient stockés à 4°C avant de procéder aux analyses dans les 24h suivantes au maximum.

Pour doser les ions  $\text{NO}_3^-$  et  $\text{NH}_4^+$ , il est nécessaire de procéder à leur extraction de la matrice du sol. Pour ce faire, pour chaque échantillon, 10 g de sol humide sont pesés dans un tube Falcon de 50 mL, puis sont ajoutés 20 mL d'une solution de chlorure de potassium (KCl) 1M. Les tubes sont ensuite placés à l'agitateur durant une heure à une fréquence de 165 rpm puis centrifugés. La filtration est ensuite réalisée avec des filtres Whatman n°42 et le filtrat collecté dans des tubes Falcon 15 mL, puis stocké à -20°C avant le dosage.

Le dosage de l'azote minéral a été effectué par le laboratoire du Centre Provincial de l'Agriculture et de la Ruralité (CPAR) de La Hulpe (Belgique) et qui est accrédité BELAC (norme ISO 17025), qui a fourni les résultats sous la forme de concentrations en nitrates et ammonium en g/L de solution et en kg d'azote par hectare (voir annexe 13 pour la formule de conversion). Le dosage des  $\text{NO}_3^-$  est réalisé par la méthode  $\text{VCl}_3$ -Griess décrite par Miranda et al. (2001), qui consiste à réduire les ions  $\text{NO}_3^-$  en nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ) puis à déterminer la concentration en nitrites grâce au réactif de Griess. Le dosage du  $\text{NH}_4^+$  est quant à lui effectué par la méthode de Berthelot (Patton et Crouch, 1977), basée sur le réactif de Berthelot consistant en un mélange de phénolate de sodium et d'hypochlorite de sodium réagissant avec les ions  $\text{NH}_4^+$  pour donner une coloration bleutée. La mesure des deux formes azotées est ensuite réalisée par colorimétrie à flux d'injection. En complément, le même laboratoire a également effectué les mesures de pH du sol (KCl 0.1 N), du taux en carbone organique total (méthode de Walkley-Black – (Nelson et Sommers, 1983)) exprimé en g de C par kg de sol sec et du taux en azote total (combustion sèche dérivée de la norme ISO 13878) exprimé en g de N par kg de sol sec.

## 2.5. Données pédoclimatiques

Dans les parcelles P07 et P12, trois sondes d'humidité du sol (Delta-T ML2x, UK), de température (PT1000) et de teneur en  $\text{O}_2$  (Apogee Instruments SO-110, Logan, Utah, USA) ont été insérées horizontalement au milieu de trois horizons différents (0-10 cm, 10-20 cm, 20-30 cm, soit à 5, 15 et 25 cm de la surface, respectivement), au centre du carré formé par les 8 chambres (Figure 3). Sur chaque parcelle, les neuf sondes ont été connectées au datalogger via un multiplexeur. Les mesures ont été effectuées toutes les 30 secondes et ont ensuite été moyennées sur la période de mesure des flux (27 minutes). La teneur en eau volumétrique ( $\theta_v$ , [ $\text{m}^3 \cdot \text{m}^{-3}$ ]) a été obtenue en utilisant les équations de calibration fournies par le fabricant. Les précipitations et la température de l'air ont été mesurées respectivement à l'aide d'un pluviomètre à auget et d'un thermomètre présent sur le mât météorologique situé en bordure de l'essai.

## 2.6. Analyse biomoléculaire

### 2.6.1. Échantillonnage, méthode et gènes ciblés

Les échantillons de sol utilisés pour l'analyse de l'ADN des populations microbiologiques proviennent des mêmes échantillons prélevés pour les mesures d'azote minéral. Chaque échantillon de sol a été placé dans un tube Eppendorf de 2 mL directement placé au champ dans de l'azote liquide puis stocké à -80°C afin de figer les communautés microbiennes. Six dates de mesures ont été retenues : les 6, 12, 21, 23, 25 et 30 juin 2023, soit entre 34 et 58 jours après la fertilisation (Figure 6). Le choix s'est porté sur ces dates après visualisation des flux de N<sub>2</sub>O et CO<sub>2</sub> afin d'obtenir des valeurs avant, pendant et après les pics d'émission observés après l'irrigation du 20 juin.

L'analyse microbiologique choisie dans le cadre de ce travail est une PCR quantitative (qPCR) opérée sur l'ADN microbien extrait des échantillons de sol. Cette qPCR permet de mesurer l'abondance des gènes fonctionnels de la nitrification et dénitrification (Krauss et al., 2017a; Regan et al., 2011) des populations vivantes mais aussi dormantes ou mortes. Les résultats finaux sont exprimés en nombre de copies du gène par masse de sol sec.

La qPCR a été effectuée sur les gènes suivants : *amoA* archéen, *amoA* bactérien, *nirK*, *nirS* et le gène de l'ARN ribosomal 16S bactérien (*16S rRNA* bactérien). Le gène *amoA* code l'enzyme ammonium monooxygénase, responsable de l'oxydation de l'ammonium en nitrite, et est mis en parallèle à la nitrification. Les gènes *nirK* et *nirS* codent eux pour l'enzyme nitrite réductase, responsable de la réduction des nitrites en NO (monoxyde d'azote), et sont associés à la dénitrification (Philipot et al., 2011; Regan et al., 2011). Le *16S rRNA* bactérien permet lui de quantifier les populations totales de bactéries.

### 2.6.2. Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN est faite à l'aide d'un kit DNeasy PowerLyzer PowerSoil Kit (QIAGEN) suivant le protocole fourni. La masse de sol pesée en début d'expérience est de 0.25 g ( $\pm$  0.02 g). Après les différentes étapes d'ajout de solutions réactives, centrifugations et filtration décrites dans le protocole associé, la dernière étape d'élution est réalisée avec 50  $\mu$ L de la solution C6 et non 100  $\mu$ L comme inscrit dans le protocole afin d'obtenir un éluat plus concentré. Les extraits d'ADN sont stockés dans des tubes Eppendorf à -20°C avant le dosage.

Avant de procéder aux qPCR, les extraits d'ADN sont amenés à une concentration de 10 ng d'ADN par  $\mu$ L de solution. Les extraits sont donc dosés préalablement à l'aide du système QuantiFluor dsDNA System. Une solution contenant le tampon ainsi que le marqueur fluorescent fourni dans le kit QuantiFluor est réalisée suivant les quantités inscrites dans le protocole fourni. Cette solution est stockée à l'abri de la lumière. Des tubes PCR de 0.5 mL sont ensuite préparés contenant 199.5  $\mu$ L de la solution réactive et 1  $\mu$ L de l'extrait d'ADN à doser. Un blanco est également préparé en remplaçant l'extrait d'ADN par 1  $\mu$ L d'eau distillée exempte de DNase/RNase (Invitrogen). Les tubes sont laissés à incuber 5 minutes dans l'obscurité avant le dosage dans la machine. Une fois le dosage réalisé, tous les extraits sont amenés par dilution à une concentration de 10 ng d'ADN par  $\mu$ L .

### 2.6.3. Quantification de l'abondance des gènes par qPCR et traitement des résultats

Les qPCR ont été réalisées sur un appareil QuantStudio 3, permettant d'importer le programme correspondant au type de qPCR choisi et de gènes ciblés (Krause et al., 2017). Le logiciel permettant de créer les programmes et de traiter les résultats est Design and Analysis 2. Chaque programme comporte une phase de dénaturation, une phase de qPCR proprement dite répétée un certain nombre de cycles et une phase permettant l'élaboration de la courbe de dénaturation ("Melting curve"). Le détail de ces conditions (Cycles, températures, nombre de répétitions, ...) est visible aux annexes 8 à 12 et provient de Krause et al. (2017). La courbe de dénaturation permet notamment de s'assurer de la bonne spécificité de la qPCR, en accord avec le gène ciblé. Si un réplicat s'écarte du pic de la courbe, il est probablement à écarter. En effet, une courbe de dénaturation typique donne lieu à un pic unique d'amplification. Les courbes de dénaturation obtenues sont visibles aux annexes 2 à 6.

Pour préparer la plaque à passer dans la machine QuantStudio 3, plusieurs produits ont été nécessaires : le mix SYBR (KAPA SYBR FAST, Sigma-Aldrich), la paire d'amorces (primers) adaptés au gène ciblé (Table 3), l'eau exempte de DNase/RNase, les extraits d'ADN à 10 ng/μL sélectionnés ainsi que les plasmides correspondant au gène et qui permettent de construire la droite de calibration. Tous ces produits doivent être conservés dans la glace durant la manipulation. Tout d'abord, un mastermix est créé contenant les quantités suivantes pour un échantillon : 5 μL de mix SYBR, 1 μL de chaque primer et 2 μL d'eau, ce qui amène à 9 μL pour un puits. Sur la plaque (MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate, ThermoFisher), les puits sont tous remplis par 9 μL de ce mastermix. Ensuite, 1 μL de l'échantillon à analyser (ADN ou plasmide pour la droite de calibration) est ajouté sur le bord du puits, sans que celui-ci ne soit en contact avec le fond. Afin d'obtenir une courbe de calibration correcte, une gamme de plasmides est créée par dilution successives par 10, allant d'une concentration de  $10^7$  à  $10^3$  copies par μL. Chaque échantillon (plasmides et extraits d'ADN ciblés) est répliqué 3 fois sur la plaque. La figure 7 montre un exemple de plaque, chaque plaque comportant la triple gamme de plasmides servant à la droite de calibration. Une fois remplie, la plaque est recouverte d'un film plastique adapté (MicroAmp Optical Adhesive Film, ThermoFisher), puis centrifugée 1 min à 3000 rpm. Elle est alors prête à passer dans la QuantStudio 3.

Gène ciblé	Primer	Séquence du primer (5'-3')
16S rRNA Bactérien	341F	CCTACGGGAGGCAGCAG
	534R	ATTACCGCGGCTGCTGGCA
amoA bactérien	amoA1F	GGGGTTTCTACTGGTGGT
	amoA2R	CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC
amoA archéen	amo19F	ATGGTCTGGCTWAGACG
	CrenamoA616r48x R	GCCATCCABCKRTANGTCCA
nirK	nirK876C	ATYGGCGGVCAAYGGCGA
	nirK1040	GCCTCGATCAGRTRRTGGTT
nirS	nirScd3af	AACGYSAAGGARACSGG
	R3cd	GASTTCGGRTGSGTCTTGA

Table 3 – Liste des gènes ciblés associés à leurs amorces (primers) et à la séquence correspondante aux amorces.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10 <sup>7</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>7</sup>	Sample 1	Sample 1	Sample 1	Sample 9	Sample 9	Sample 9	Sample 17	Sample 17	Sample 17
B	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	Sample 2	Sample 2	Sample 2	Sample 10	Sample 10	Sample 10	Sample 18	Sample 18	Sample 18
C	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	Sample 3	Sample 3	Sample 3	Sample 11	Sample 11	Sample 11	Sample 19	Sample 19	Sample 19
D	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	Sample 4	Sample 4	Sample 4	Sample 12	Sample 12	Sample 12	Sample 20	Sample 20	Sample 20
E	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	Sample 5	Sample 5	Sample 5	Sample 13	Sample 13	Sample 13	Sample 21	Sample 21	Sample 21
F	Blanc	Blanc	Blanc	Sample 6	Sample 6	Sample 6	Sample 14	Sample 14	Sample 14	Sample 22	Sample 22	Sample 22
G				Sample 7	Sample 7	Sample 7	Sample 15	Sample 15	Sample 15	Sample 23	Sample 23	Sample 23
H				Sample 8	Sample 8	Sample 8	Sample 16	Sample 16	Sample 16	Sample 24	Sample 24	Sample 24

Figure 7 - Exemple de schéma d'une plaque qPCR. La plaque comprend la triple gamme de plasmides permettant la calibration (colonnes 1 à 3) ainsi que les échantillons 1 à 24 en triplicats (colonnes 4 à 12).

Après obtention du fichier de résultat, les valeurs de Cq sont importées pour être traitées. Le Cq (quantification cycle) représente le nombre de cycles de PCR nécessaire afin de détecter le signal de l'amplification fluorescente émise par l'échantillon (Ruiz-Villalba et al., 2021). Plus un échantillon est concentré en copies d'un gène, plus le Cq est faible. En construisant la droite de calibration à l'aide des échantillons de plasmides aux concentrations connues, il est ainsi possible de déduire directement le nombre de copies d'un gène par échantillon à partir du Cq mesuré. La droite de calibration est construite en utilisant le logarithme en base 10 de la concentration (exprimée en nombre de copies par  $\mu\text{L}$ , allant de  $10^7$  à  $10^3$ ) et les valeurs de Cq. Les valeurs de Cq des échantillons permettent donc d'obtenir la valeur (en log base 10 puis en valeur réelle) de la concentration en nombre de copies par  $\mu\text{L}$  des échantillons ( $C_{in}$ ). La formule pour exprimer la concentration d'un gène par gramme de sol sec ( $C_{sol}$ ) est la suivante :

$$C_{sol} = C_{in} \cdot \frac{f}{m_{sec}}$$

Où :

- $f$  est le facteur de dilution qui correspond à la concentration initiale d'ADN mesurée après l'extraction (en  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ), divisée par 10 (la concentration, en  $\text{ng}/\mu\text{L}$ , à laquelle tous les extraits ont été amenés). Voir annexe 7.
- $m_{sec}$  est la masse de sol sec obtenue en multipliant la masse de sol humide pesée avant l'extraction (environ 0.25 g) par la teneur en matière sèche du sol exprimée sur une échelle de 0 à 1. Voir annexe 7.

Cette équation donne donc bien la concentration d'un gène donné dans un échantillon de sol, exprimée en nombre de copies par gramme de sol sec.

## 2.7. Analyse statistique

### 2.7.1. Traitement statistique des flux

Comme les flux ne présentent pas une distribution normale dans l'espace (de Klein et al., 2020), les flux moyens de  $\text{N}_2\text{O}$  et de  $\text{CO}_2$  pour chaque cycle et l'écart-type associé ont été calculés en utilisant une procédure non paramétrique de ré-échantillonnage (i.e. « bootstrapping » avec échantillonnage aléatoire avec remise de taille égale au nombre de chambres, répété 10 000 fois) conformément à (Delespesse, 2021). Il en va de même pour calculer la moyenne et l'écart-type des flux sur l'ensemble de la campagne pour comparer les deux modalités.



## 2.7.2. Analyse de la variance

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R et de l'extension Rstudio. L'analyse de la variance (ANOVA) a été l'outil statistique utilisé dans le cadre de ce travail afin de mettre en évidence des différences significatives de données entre plusieurs facteurs. Deux conditions sont requises avant de procéder à cette analyse. Tout d'abord, la vérification de la normalité des données. Pour cela, le test de Shapiro-Wilk a été effectué préalablement pour chaque série de données à traiter. L'hypothèse nulle de ce test ( $p > 0.05$ ) est la normalité d'une population. Lorsque des populations ne suivaient pas cette distribution normale, une transformation logarithmique en base 10 a été réalisée, puis les données retestées par le test de Shapiro-Wilk. La deuxième condition est l'égalité des variances (homoscédasticité) entre les populations. Celle-ci est vérifiée par le test de Levene, dont l'hypothèse nulle est l'égalité des variances entre populations.

Pour les variables pédoclimatiques et les teneurs en  $\text{NO}_3^-$  et  $\text{NH}_4^+$ , l'ANOVA était réalisée selon le facteur "Traitement du sol", avec les deux modalités CT et RT. Pour les Flux de  $\text{N}_2\text{O}$  et de  $\text{CO}_2$ , l'ANOVA était réalisée avec deux facteurs, le traitement du sol mais également la date de prélèvement afin de tester l'effet de la date de prélèvement sur les émissions.

Dans l'analyse biomoléculaire, le facteur "Traitement du sol" a aussi été utilisé afin de déceler des différences de populations entre CT et RT. De plus, une ANOVA a également été menée suivant un facteur "Moment" à deux modalités : avant (12 et 16 juin) ou après (21,23,25 et 30 juin) l'irrigation et les précipitations. Enfin, pour mettre en évidence des variations de populations uniquement aux dates du 21 ou 23 juin (pics d'émissions), une ANOVA était réalisée en séparant les mesures entre le "contrôle" (12 et 16 juin) et la date ciblée.

Dans la suite de ce travail, les différences significatives mises en évidence entre des groupes de données seront notées suivant la convention suivante : \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  et \*\*\*  $p < 0.001$  (ns signifiant non significatif).

## 2.7.3. Coefficients de corrélation linéaire de Pearson

Les coefficients de corrélations linéaire de Pearson ont également été calculés entre l'ensemble des facteurs : flux de  $\text{N}_2\text{O}$  et  $\text{CO}_2$ , teneur en eau, en  $\text{O}_2$ , et en  $\text{NO}_3^-$ , populations microbiologiques et précipitations. Le coefficient de corrélation est défini selon l'équation suivante :

$$r = \frac{\text{Cov}(X, Y)}{\sigma_x \cdot \sigma_y}$$

Où  $\text{Cov}(X, Y)$  est la matrice de covariance entre les variables  $X$  et  $Y$  et  $\sigma_x \cdot \sigma_y$  le produit des écarts-type de chaque variable.

## 3. RESULTATS

### 3.1. Evolution temporelle des variables pédoclimatiques

La figure 8 montre l'évolution des variables pédoclimatiques mesurées en continu par les différents capteurs du 23 mai au 30 juin 2023. Deux faibles épisodes de pluie ont été mesurés, le premier le 20 juin et le second le 22 juin. Lors de ces deux épisodes, les cumuls ont été de 2.2 mm et 7.8 mm de précipitations, respectivement. Il est probable que ces cumuls aient été sous-évalués par l'appareil de mesure (pluviomètre à auget basculant). En effet, les mesures de la station voisine de Lonzée (réseau ICOS, annexe 1) renseignent des valeurs plus élevées (5.3 mm par exemple pour le cumul du 20 juin et plus de 20 mm pour le cumul du 23 juin). A ces deux épisodes de précipitations, il faut ajouter les deux irrigations manuelles de 20 mm chacune, la première les 5 et 6 juin et la seconde durant la journée du 20 juin. La température moyenne de l'air était de 21.4 °C sur toute la période de mesure et de 23.4°C sur la période du 12 au 30 juin.

La température du sol a augmenté progressivement durant toute la période de mesure, suivant la même allure sur CT et RT. Cependant, elle était toujours légèrement supérieure sur CT par rapport à RT aux trois profondeurs (5cm, 15cm et 25cm). Les températures moyennes du sol sur CT du 23 mai au 30 juin sont ainsi de 21.9°C, 21°C et 20.5°C à 5cm, 15cm et 25cm respectivement, et de 21.3°C, 20.4°C et 20°C sur RT. La température du sol est ainsi en moyenne significativement (\*\*\*) plus élevée sur CT d'environ 3% par rapport à RT pour les trois horizons. Il est enfin à noter que les fluctuations journalières sont plus élevées dans l'horizon de surface et diminuent avec la profondeur.

La teneur en eau moyenne du sol sur l'ensemble de la période de mesure a suivi les mêmes tendances sur CT et RT, à savoir des teneurs stables diminuant légèrement avec le temps et la sécheresse, jusqu'au deux épisodes de pluie des 20 et 22 juin. Ceux-ci ont provoqué une augmentation nette de la teneur en eau dans les trois horizons et sur les deux modalités, contrairement au test d'irrigation de la semaine du 6 juin qui n'avait provoqué d'augmentation que sur les dix premiers centimètres du sol.

Une nette différence des valeurs absolues s'observe entre les deux modalités de travail du sol. Les teneurs en eau moyennes du 23 mai au 30 juin à 5, 15 et 25 cm étaient de 26.4, 28.9 et 37.5 % sur CT. Sur RT, ces valeurs étaient de 29.4, 32.6 et 33.2 %. Sur les sondes à 5 et 15 cm, horizons où se déroulent la majorité des processus microbiologiques (Hiel et al., 2018), la teneur en eau sur RT était en moyenne supérieure (\*\*\*) de 11.4 et 12.6 % respectivement par rapport à CT. En revanche, à 25 cm, les valeurs étaient en moyenne supérieures (\*\*\*) de 12.8 % sur CT.

Les teneurs en eau maximales atteintes le 22 juin à 5, 15 et 25 cm étaient de 34.3, 32.6 et 38.2 % respectivement sur CT et de 37.1, 36.1 et 35.2 % sur RT. L'écart entre CT et RT était donc plus restreint juste après la précipitation.

Parallèlement à la teneur en eau, la teneur en oxygène (O<sub>2</sub>) est restée stable sur les trois horizons jusqu'aux épisodes de pluie du 20 et 22 juin, ayant provoqué la baisse subite de la concentration en O<sub>2</sub> du sol. Les teneurs moyennes en oxygène à 5, 15 et 25 cm étaient de 20.2, 17.9 et 19.7 % sur CT. Sur RT, ces valeurs étaient de 19.4, 17.9 et 21.1 %. Le taux d'oxygène moyen est donc supérieur (\*\*\*) sur l'horizon de surface sur CT et supérieur (\*\*\*) sur l'horizon 20-30 cm sur RT. Il n'y avait pas de différence (ns) en ce qui concerne les teneurs de l'horizon intermédiaire. Les teneurs minimales observées après le deuxième épisode de pluie du 22 juin étaient de 16.6, 13.4 et 13.4 % sur CT et de 17.5, 15.8 et 17.3 % sur RT. La parcelle CT présentait donc des teneurs moyennes en oxygène toujours plus faibles juste après la pluie.



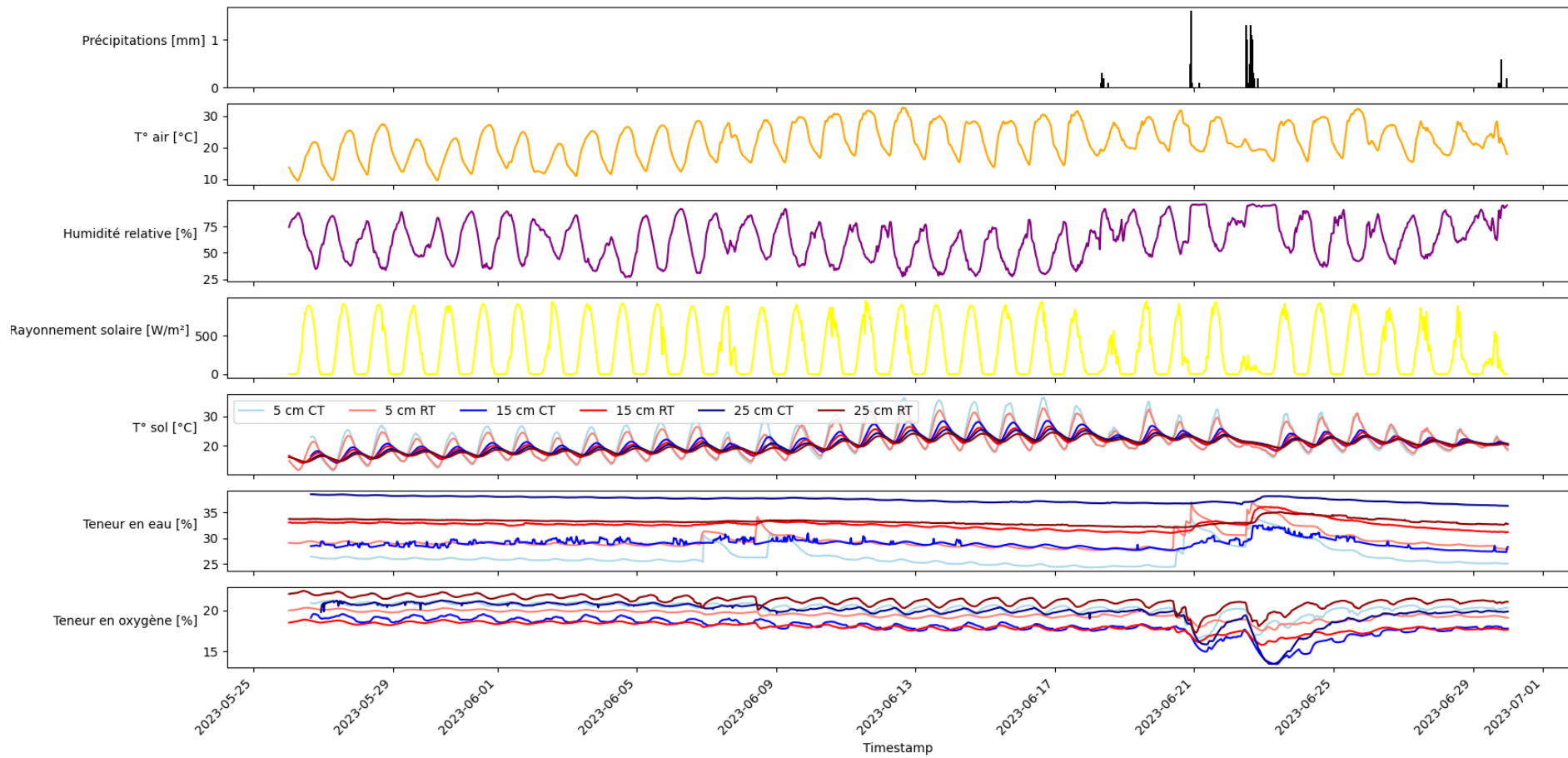


Figure 8 – Evolution temporelle des variables pédoclimatiques mesurées : précipitations [mm],  $T^\circ$  de l'air [ $^\circ\text{C}$ ], humidité relative [%], rayonnement solaire [ $\text{W}/\text{m}^2$ ],  $T^\circ$  du sol [ $^\circ\text{C}$ ], teneur en eau du sol [%], teneur en  $\text{O}_2$  du sol [%]. Auteur de la figure : Antoine André.

### 3.2. Evolution des teneurs en azote minéral, pH, COT et N total du sol

Le tableau 4 et la figure 9 présentent l'évolution des concentrations en  $\text{NO}_3^-$ . Les teneurs en  $\text{NO}_3^-$  résiduels avant la fertilisation étaient faibles sur les deux parcelles (P7 et P12), soit 5 kg N- $\text{NO}_3^-$ /ha sur CT et 2 kg N- $\text{NO}_3^-$ /ha sur RT. Les valeurs moyennes prises le 23 mai à l'installation des dispositifs de mesure (20 jours après la fertilisation du 3 mai) étaient de 86 kg N- $\text{NO}_3^-$  /ha sur CT et 49 kg N- $\text{NO}_3^-$  /ha sur RT.

Sur CT, la teneur en  $\text{NO}_3^-$  a augmenté jusqu'à une valeur de 183 kg N- $\text{NO}_3^-$  /ha le 12 juin, puis est descendue le 14 juin à 130 kg N- $\text{NO}_3^-$  /ha. La concentration est ensuite remontée à 180 kg N- $\text{NO}_3^-$  /ha le 21 juin, avant de descendre à nouveau le 25 juin à 105 kg N- $\text{NO}_3^-$  /ha et remonter finalement le 30 juin à 163 kg N- $\text{NO}_3^-$  /ha. Sur RT, la même tendance à l'augmentation jusqu'au 12 juin est visible, atteignant 70.5 kg N- $\text{NO}_3^-$  /ha. Une baisse est ensuite survenue le 16 juin à 46 kg N- $\text{NO}_3^-$  /ha. La concentration est ensuite restée relativement stable avant une forte augmentation le 30 juin où elle a atteint 85 kg N- $\text{NO}_3^-$  /ha.

La concentration moyenne en nitrates sur l'ensemble des dates d'échantillonnage était 130.6 % supérieure (\*\*\*) sur CT par rapport à RT.

	24-04-23	23-05-23	01-06-23	12-06-23	14-06-23	16-06-23	21-06-23	23-06-23	25-06-23	30-06-23
CT	5 ± 0	86 ± 0	108 ± 5.5	183 ± 21.6	130 ± 22	139 ± 47.9	180 ± 47.7	126 ± 50.5	105 ± 49	163 ± 30.3
RT	2 ± 0	49 ± 0	57 ± 5.5	71 ± 5.1	78 ± 9.6	46 ± 8.3	55 ± 6	47 ± 12.6	42 ± 6.7	85 ± 15.7

Table 4 - Evolution temporelle des teneurs en N- $\text{NO}_3^-$  (moyenne ± écart-type, n=4) sur CT et RT.

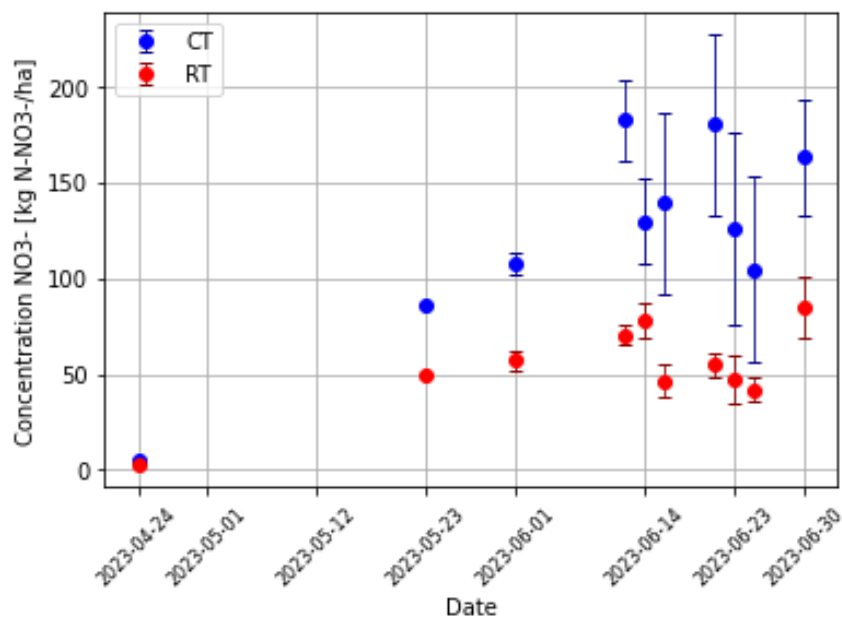


Figure 9 - Evolution temporelle des teneurs en N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (moyenne ± écart-type, n=4) sur CT et RT.

Le tableau 5 et la figure 10 présentent l'évolution des teneurs en ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) dans le sol. Les teneurs résiduelles en NH<sub>4</sub><sup>+</sup> le 24 avril étaient sous la limite de détection du laboratoire et ont donc été fixées à 0 kg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/ha. Les concentrations ont ensuite suivi exactement la même tendance. Trois semaines après la fertilisation, le 23 mai, les valeurs étaient de 32.1 kg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/ha sur CT et 12.7 kg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/ha sur RT. Le 1er juin, la concentration a diminué pour atteindre 6.88 kg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/ha sur CT et 0.95 kg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/ha sur RT, avant de croître à nouveau jusqu'à 12.7 kg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/ha sur CT et 5.04 kg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/ha sur RT le 23 juin, après les épisodes de précipitation. Cette augmentation de la teneur en NH<sub>4</sub><sup>+</sup> après les précipitations était bien significative (\*\*\*) pour les deux modalités. Enfin, une diminution a commencé le 25 juin avec des valeurs de 6.96 kg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/ha et 2.56 kg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/ha sur CT et RT, respectivement. Ici également, les valeurs étaient différentes sur les deux modalités avec une valeur moyenne de la concentration plus élevée de 176 % (\*\*\*) sur CT par rapport à RT.

	24-04-23	23-05-23	01-06-23	23-06-23	25-06-23
CT	0	32.1 ± 0	6.88 ± 1.82	12.7 ± 3.05	6.96 ± 3.17
RT	0	12.7 ± 0	0.95 ± 0.58	5.04 ± 0.29	2.56 ± 0.58

Table 5 - Evolution temporelle des teneurs en N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (moyenne ± écart-type, n=4) sur CT et RT.

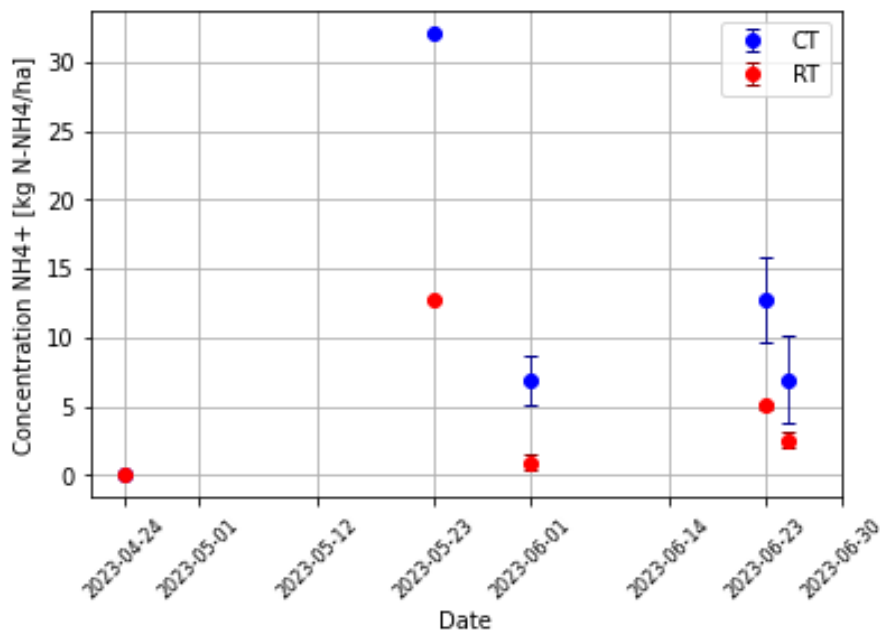


Figure 10 - Evolution temporelle des teneurs en  $N-NH_4^+$  (moyenne  $\pm$  écart-type,  $n=4$ ) sur CT et RT.

La figure 11 présente l'évolution des teneurs en carbone organique total du sol. La teneur moyenne sur RT (16.13 g/kg sol sec  $\pm$  1.62,  $n=6$ ) est 36.3 % supérieure (\*\*) à celle sur CT (11.83 g/kg sol sec  $\pm$  1.14,  $n=6$ ). La teneur en carbone organique a progressivement augmenté sur RT alors qu'elle est restée stable tout le long de la période de mesure sur CT.

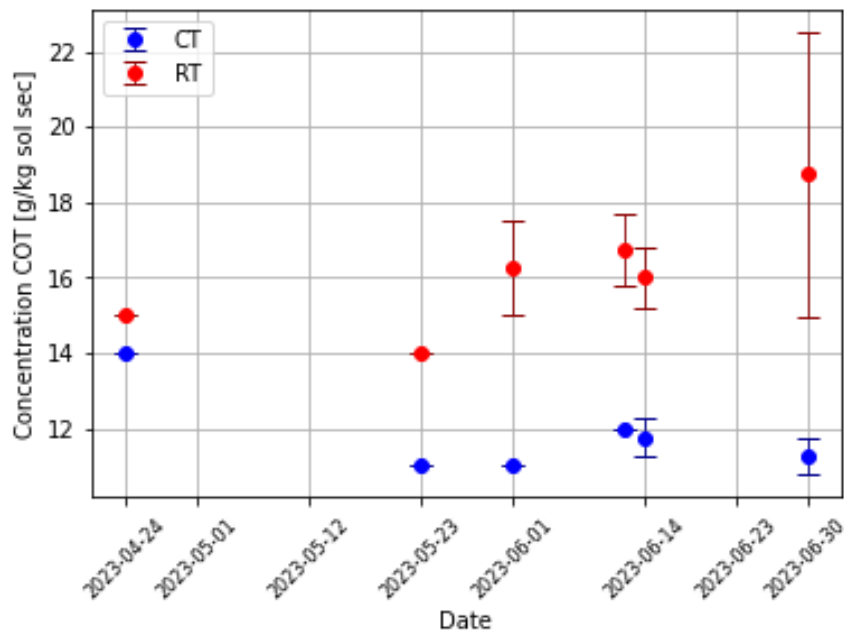


Figure 11 - Evolution temporelle des teneurs en COT (moyenne  $\pm$  écart-type si plusieurs échantillons) sur CT et RT.



La figure 12 présente l'évolution des teneurs en azote total du sol. La teneur en N total moyenne sur la période sur RT ( $14.38 \text{ g/kg sol sec} \pm 0.41$ ,  $n=6$ ) est 25% supérieure à celle sur CT ( $11.5 \text{ g/kg sol sec} \pm 0.20$ ,  $n=6$ ). Les teneurs ont notamment baissé entre la première mesure et la seconde après fertilisation, avant de présenter une légère tendance à la hausse sur RT et des petites fluctuations non significatives sur CT.

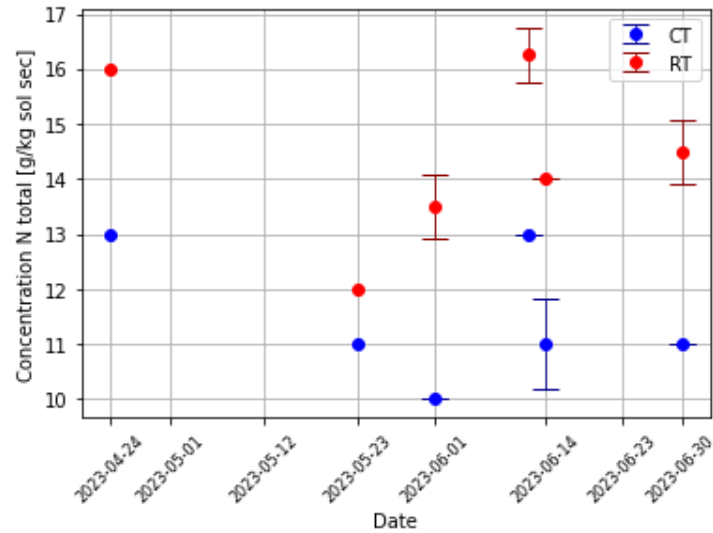


Figure 12 – Evolution temporelle des teneurs en azote total dans le sol (moyenne  $\pm$  écart-type si plusieurs échantillons) sur CT et RT.

La figure 13 présente l'évolution du pH dans le sol. La valeur sur CT le 24 avril est manquante. Le pH moyen sur RT ( $6.70 \pm 0.17$ ,  $n=6$ ) est légèrement plus élevé (\*) et donc moins acide que sur CT ( $6.38 \pm 0.32$ ,  $n=6$ ). Le sol s'est progressivement acidifié après la fertilisation et le semis sur les deux modalités.

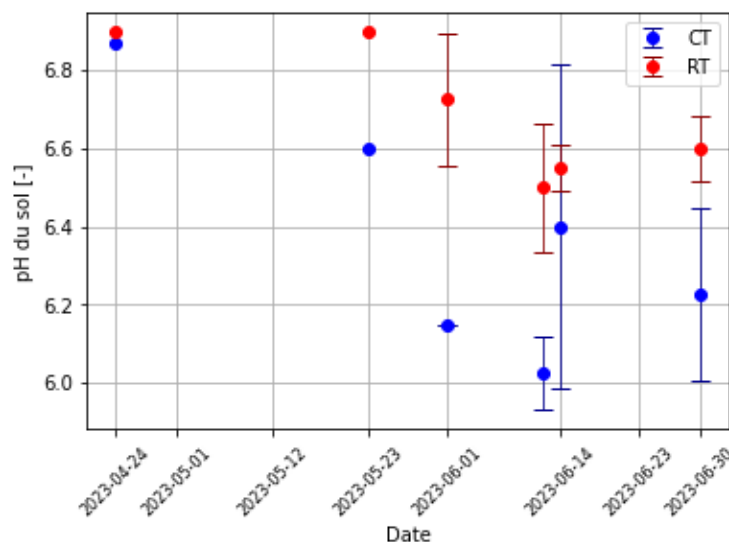


Figure 13 - Evolution temporelle du pH (moyenne  $\pm$  écart-type si plusieurs échantillons) sur CT et RT.

### 3.3. Flux de N<sub>2</sub>O et CO<sub>2</sub>

Les figures 14 et 15 présentent l'évolution des flux moyens de N<sub>2</sub>O et CO<sub>2</sub> calculés sur des périodes de 4 heures pendant toute la durée de l'essai, du 26 mai au 30 juin 2023. Sur cette période, 1728 demi-heures de flux ont été collectées. Les demi-heures concernées par des problèmes techniques et d'herméticité, ainsi que les séries temporelles présentant un comportement erratique, représentent 115 et 279 demi-heures pour CT et RT respectivement. Ces chiffres correspondent à environ 6 et 16% des demi-heures collectées et dont les mesures ont été écartées.

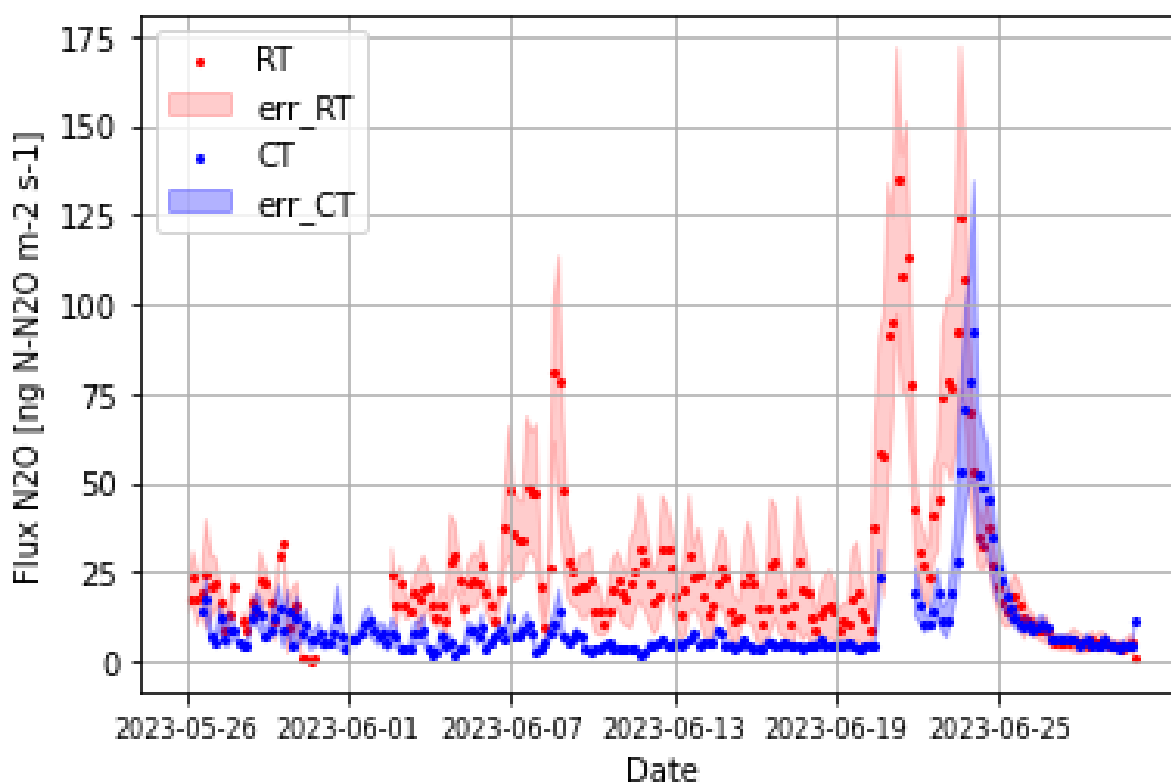


Figure 14 - Evolution temporelle des flux moyens de N<sub>2</sub>O calculés sur des périodes de 4h (moyenne ± erreur standard, n=8) sur CT et RT.

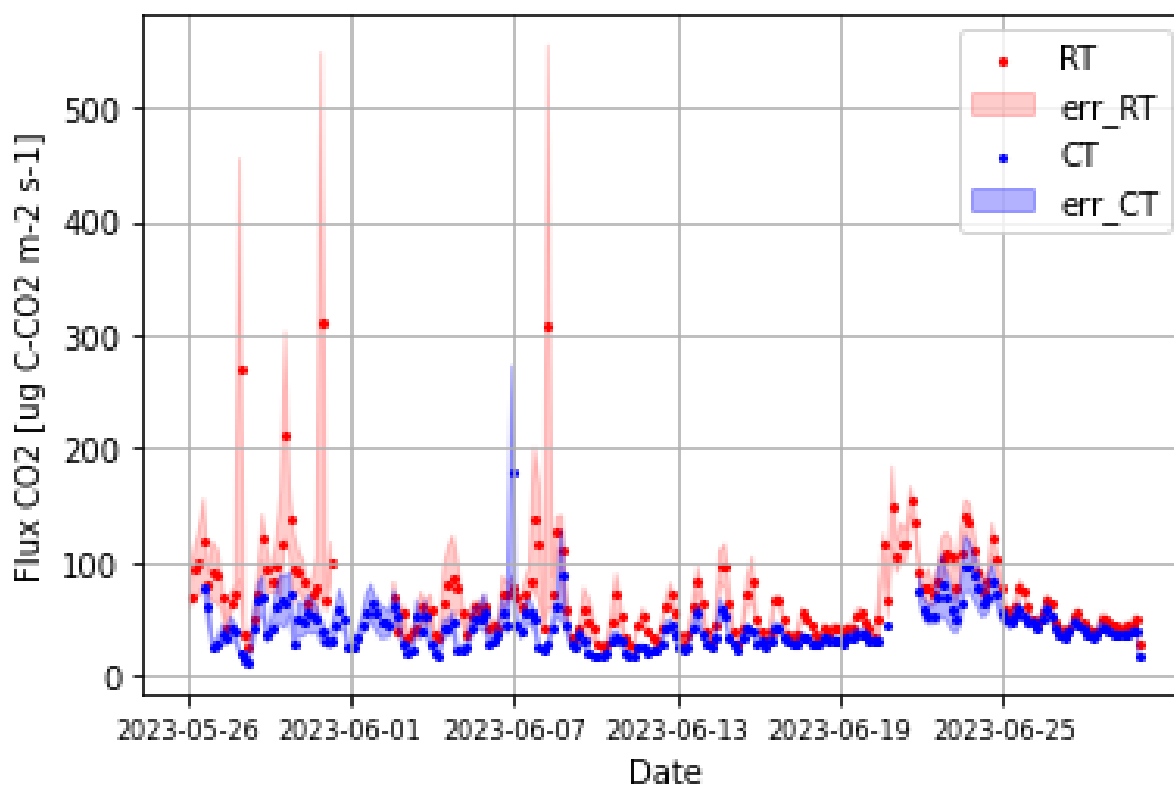


Figure 15 - Evolution temporelle des flux moyens de CO<sub>2</sub> calculés sur des périodes de 4h (moyenne ± erreur standard, n=8) sur CT et RT.

Sur CT, aucune mesure n'a été prise du 20 juin à 18h jusqu'au 21 juin à 22h. Pour les deux modalités, une forte variabilité intra-parcellaire était présente entre les huit chambres. Ce travail ne s'étend pas cependant à l'étude de cette variabilité et traite uniquement des valeurs moyennes calculées entre les huit chambres pour chaque parcelle. Pour plus d'informations concernant l'étude de cette variabilité, se référer au travail de fin d'études effectué en parallèle par Antoine André.

Trois pics d'émission de N<sub>2</sub>O ont eu lieu sur la parcelle RT : un premier du 6 juin au 8 juin (flux moyen sur cette période de  $42.5 \pm 6.1$  ng N-N<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, flux maximum à 81 ng N-N<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) suivant l'irrigation de la semaine du 6 juin, un second pic du 20 juin à 10h jusqu'au 22 juin à 2 h environ suivant l'irrigation démarrée au matin du 20 juin (flux moyen sur cette période de  $77 \pm 10.3$  ng N-N<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, maximum à 134.4 ng N-N<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) et un dernier pic du 22 juin à 14h au 24 juin à 6h environ, suivant l'épisode de pluie du 22 juin (flux moyen sur cette période de  $72.4 \pm 8.4$  ng N-N<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, maximum à 124 ng N-N<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>).

Un seul pic d'émission a été mis en évidence sur la parcelle CT, allant du 23 juin à 6h au 24 juin à 22h environ (flux moyen sur cette période de  $49.8 \pm 6.9$  ng N-N<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, maximum à 91.9 ng N-N<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). L'analyse de la variance a mis en évidence un effet hautement significatif (\*\*\*) de la modalité "travail du sol" ainsi que de la date sur les émissions moyennes de N<sub>2</sub>O. Le flux moyen sur toute la durée des mesures était de  $12.5 \pm 4.1$  ng N-N<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> sur CT et de  $25.9 \pm 10.4$  ng N-N<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> sur RT.

En ce qui concerne les émissions de CO<sub>2</sub>, l'analyse s'est principalement portée sur les dates entre le 10 et le 30 juin, afin de les mettre en relation avec les paramètres microbiologiques. Les flux ont suivi un cycle journalier en phase avec la température, augmentant la journée et diminuant la nuit avec la baisse des températures. Un double pic d'émission a été observé sur RT. Celui-ci a eu lieu à partir du 20 juin à 10h jusqu'au 24 juin vers 18h, avec un creux situé le 22 juin avant les précipitations. La diminution des flux s'est faite ici plus progressivement que pour les pics de N<sub>2</sub>O. Sur cette période, le flux moyen était de  $102.1 \pm 5 \mu\text{g C-CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , avec un maximum à  $153.3 \mu\text{g C-CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ .

Sur la parcelle CT affectée par la panne de mesure du 20 au 21 juin, un pic de flux est apparu du 22 juin vers 14h jusqu'au 24 juin vers 22h (flux moyen de  $72.5 \pm 3.7 \mu\text{g C-CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , avec un maximum à  $97.7 \mu\text{g C-CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), même s'il s'agissait d'un pic moins marqué que sur RT.

Le flux moyen sur toute la période de mesure du 26 mai au 30 juin était de  $49.3 \pm 9.3 \mu\text{g C-CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  sur CT et de  $67.6 \pm 13.8 \mu\text{g C-CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  sur RT. Tout comme pour les flux de N<sub>2</sub>O, les valeurs moyennes étaient plus élevées (\*\*\*) sur RT.

La figure 16 représente l'évolution des flux moyens quotidiens de N<sub>2</sub>O et CO<sub>2</sub> du 12 au 30 juin, couvrant ainsi les six dates des échantillons utilisés pour l'analyse biomoléculaire (qPCR). Ce sont ces valeurs qui ont été utilisées afin de mettre en relation les flux de N<sub>2</sub>O et CO<sub>2</sub> et les autres facteurs, notamment l'abondance des différents gènes mesurés.

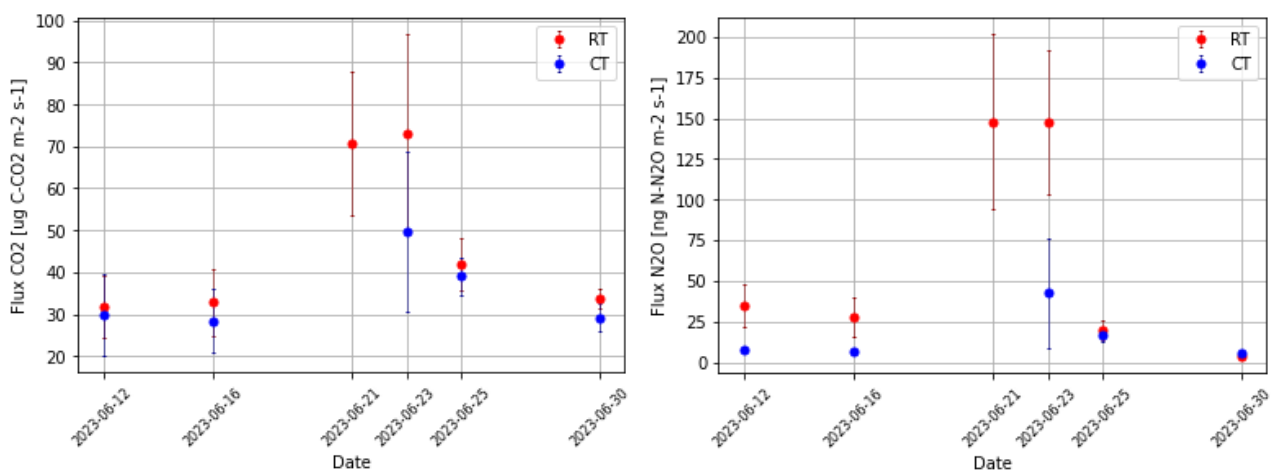


Figure 16 - Evolution temporelle des flux moyens quotidiens de N<sub>2</sub>O (gauche) et CO<sub>2</sub> (droite) (moyenne journalière  $\pm$  écart-type, n=6) aux six dates étudiées sur CT et RT.

### 3.4. Evolution de l'abondance des gènes ciblés

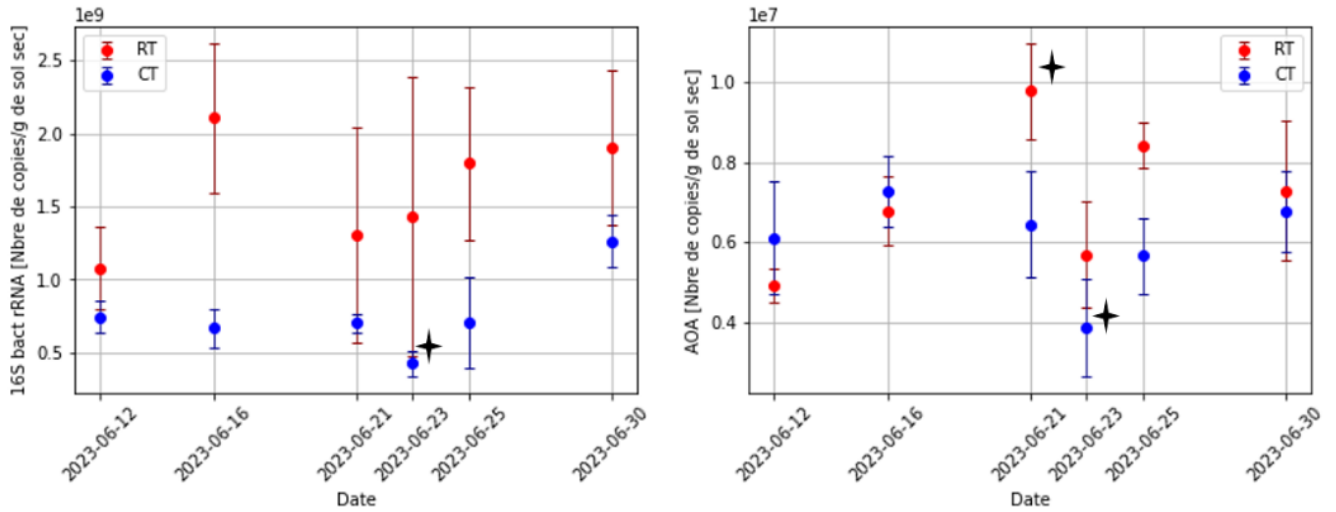


Figure 17 - Evolution temporelle de l'abondance du gène 16S rRNA bactérien (gauche) et du gène *amoA* archéen (droite) (moyenne  $\pm$  écart-type,  $n=4$ ) sur CT et RT. Échelle de l'axe Y : nombre de copies du gène par gramme de sol sec, multiplié par un facteur  $10^x$  (indiqué dans le coin supérieur gauche). Etoile noire : différence significative au 21 ou 23/06 par rapport au contrôle.

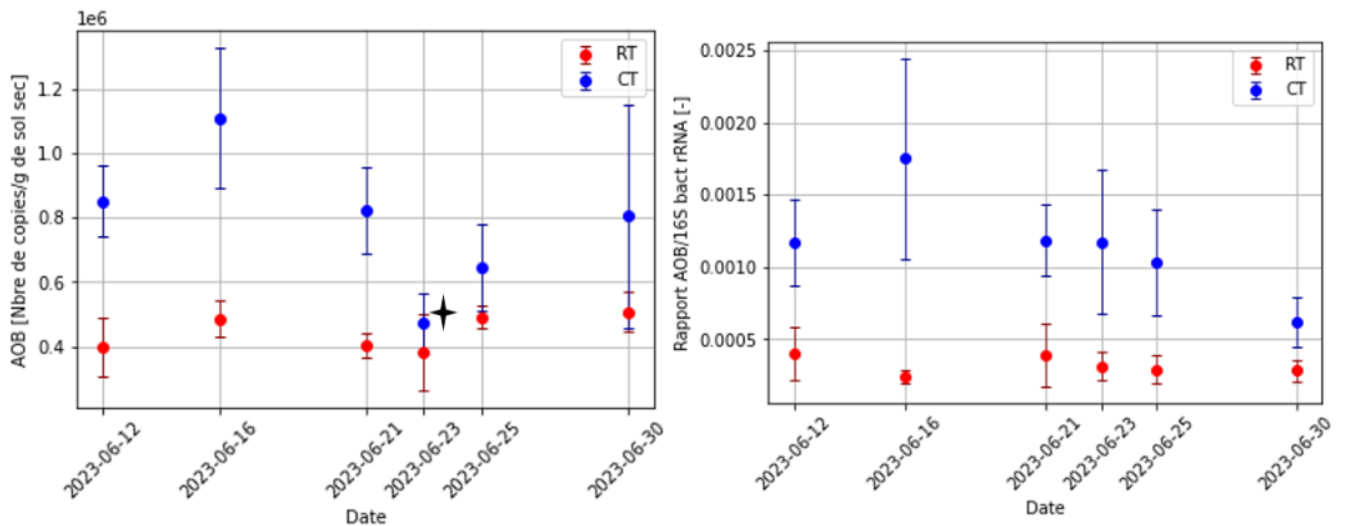


Figure 18 - Evolution temporelle de l'abondance du gène *amoA* bactérien (gauche) ainsi que du rapport *amoA* bactérien/16S rRNA bactérien (droite) (moyenne  $\pm$  écart-type,  $n=4$ ) sur CT et RT. Échelle de l'axe Y sur le graphe de gauche : nombre de copies du gène par gramme de sol sec, multiplié par un facteur  $10^x$  (indiqué dans le coin supérieur gauche). Etoile noire : différence significative au 21 ou 23/06 par rapport au contrôle.

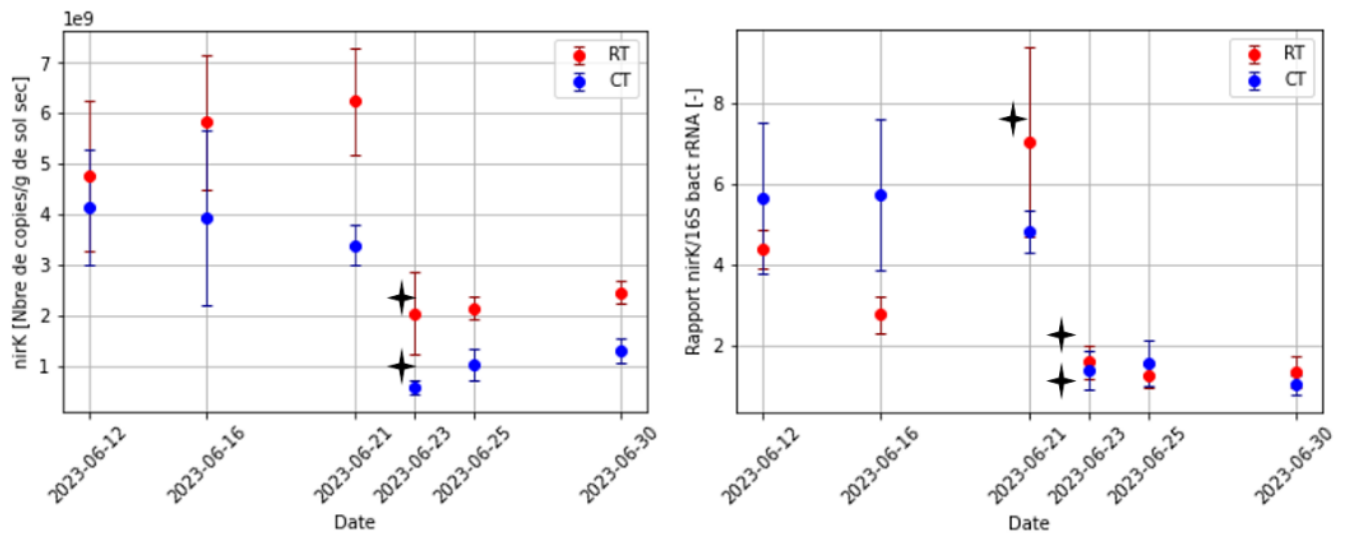


Figure 19 - Evolution temporelle de l'abondance du gène *nirK* (gauche) ainsi que du rapport *nirK*/16S rRNA bactérien (droite) (moyenne  $\pm$  écart-type,  $n=4$ ) sur CT et RT. Échelle de l'axe Y sur le graphe de gauche : nombre de copies du gène par gramme de sol sec, multiplié par un facteur  $10^X$  (indiqué dans le coin supérieur gauche). Etoile noire : différence significative au 21 ou 23/06 par rapport au contrôle.

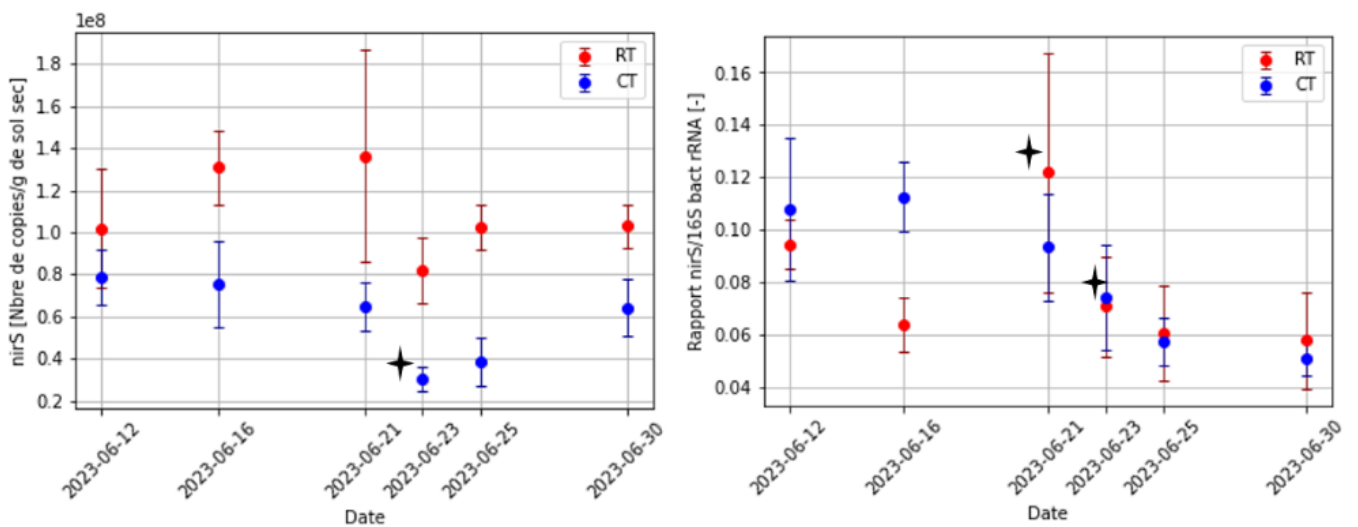


Figure 20 - Evolution temporelle de l'abondance du gène *nirS* (gauche) ainsi que du rapport *nirS*/16S rRNA bactérien (droite) (moyenne  $\pm$  écart-type,  $n=4$ ) sur CT et RT. Échelle de l'axe Y sur le graphe de gauche : nombre de copies du gène par gramme de sol sec, multiplié par un facteur  $10^X$  (indiqué dans le coin supérieur gauche). Etoile noire : différence significative au 21 ou 23/06 par rapport au contrôle.

Les figures 17 à 20 présentent l'évolution de l'abondance des différents gènes quantifiés par qPCR, exprimée en nombre de copies du gène par gramme de sol sec. Les courbes de dénaturation obtenues sont visibles aux annexes 2 à 6. L'analyse statistique s'est d'abord concentrée sur la comparaison entre les concentrations précédant l'irrigation du 20 juin et les concentrations après cette date. Les valeurs pour les 12 et 16 juin sont donc les valeurs de contrôle, tandis que les quatre dates suivantes représentent la modalité après précipitations. Sur CT, les résultats montrent une diminution de l'abondance des gènes *amoA* bactérien (\*\*), *nirK* (\*\*\*) et *nirS* (\*\*) ainsi que des rapports de ces gènes avec le *16S rRNA* bactérien. Les concentrations du *16S rRNA* bactérien ainsi que du *amoA* archéen ne présentent pas de différence significative après les précipitations. Sur RT, seul le gène *amoA* archéen (\*) présente une augmentation significative après les précipitations. Tous les autres gènes et rapports ne présentent pas de variations significatives.

Ensuite, l'analyse des résultats du 21 juin et 23 juin pris séparément en comparaison aux dates de contrôle renseigne des résultats supplémentaires. Les étoiles noires sur les graphiques indiquent une valeur significativement différente à cette date en comparaison aux valeurs de contrôle. Sur CT, aucune variation n'a lieu le 21 juin alors que l'abondance de tous les gènes est en diminution le 23 juin, à l'exception du rapport *amoA* bactérien/*16S* bactérien. Sur RT en revanche, la concentration de *amoA* archéen (\*\*\*) ainsi que les rapports *nirK*/*16S* bactérien (\*\*) et *nirS*/*16S* bactérien (\*) sont en augmentation le 21 juin. L'abondance de *nirK* (\*\*) et son rapport *nirK*/*16S* bactérien (\*\*) sont inférieurs au contrôle le 23 juin.

Enfin, en analysant les moyennes sur toute la période de mesure, les concentrations des gènes suivants sont plus élevées sur RT : *16S* bactérien (\*\*\*), *amoA* archéen (\*\*), *nirK* (\*\*\*) et *nirS* (\*\*\*). A l'inverse, l'abondance de *amoA* bactérien (\*\*\*) et le rapport *amoA* bactérien/*16S* bactérien (\*\*\*) sont supérieurs sur CT.

### 3.5. Relations entre les flux et les autres facteurs d'influence

L'analyse de la variance de chaque facteur sur les flux de N<sub>2</sub>O a été réalisée. Les flux de N<sub>2</sub>O ainsi que ceux de CO<sub>2</sub> ont été normalisés grâce à la transformation en logarithme en base 10. Toutes les variables reprises dans cette analyse suivent la même distribution temporelle, à savoir les moyennes journalières des six dates sélectionnées (12, 16, 21, 23, 25 et 30 juin). Les données du 21 juin ont cependant été supprimées de l'analyse sur CT en raison de l'absence de données de flux de N<sub>2</sub>O et CO<sub>2</sub>. En complément, les coefficients de corrélation linéaire de Pearson ont été calculés entre le logarithme en base 10 des flux de N<sub>2</sub>O et tous les facteurs d'influence. Les résultats de ces deux analyses (analyse de la variance et corrélation linéaire) sont repris dans la table 6. Les figures 21 et 22 représentent l'intensité et le signe de l'ensemble des coefficients de corrélation linéaire entre chaque facteurs pris deux à deux.

	RT	CT
<i>16S rRNA bactérien</i>	-0.32 ns	-0.65 **
<i>amoA bactérien</i>	-0.53 **	-0.65 **
<i>amoA archéen</i>	0.05 ns	-0.74 ***
<i>nirK</i>	0.33 ns	-0.55 *
<i>nirS</i>	0.06 ns	-0.75 ***
<i>amoA bactérien/16S bactérien</i>	0.22 ns	0.03 ns
<i>nirK/16S bactérien</i>	0.51 *	-0.40 ns
<i>nirS/16S bactérien</i>	0.46 *	-0.20 ns
Log <sub>10</sub> (fCO <sub>2</sub> )	0.81 ***	0.96 ***
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (0-10 cm)	-0.60 **	-0.62 **
O <sub>2</sub> (5 cm)	-0.70 ***	-0.91 ***
O <sub>2</sub> (15 cm)	-0.72 ***	-0.98 ***
O <sub>2</sub> (25 cm)	-0.81 ***	-0.95 ***
VWC (5cm)	0.86 ***	0.98 ***
VWC (15cm)	0.74 ***	0.97 ***
VWC (25cm)	0.39 ns	0.85 ***
Pluie (cm)	0.56 **	0.81 ***

Table 6 : Coefficient de corrélation linéaire de Pearson (*r*) du logarithme en base 10 des flux de N<sub>2</sub>O en fonction des facteurs supposés d'influence sur CT et RT. Les seuils de signification obtenus par l'analyse de la variance de chaque facteur pris séparément sont : \**p*<0.05, \*\**p*<0.01, \*\*\**p*<0.001 (ns : non significatif)



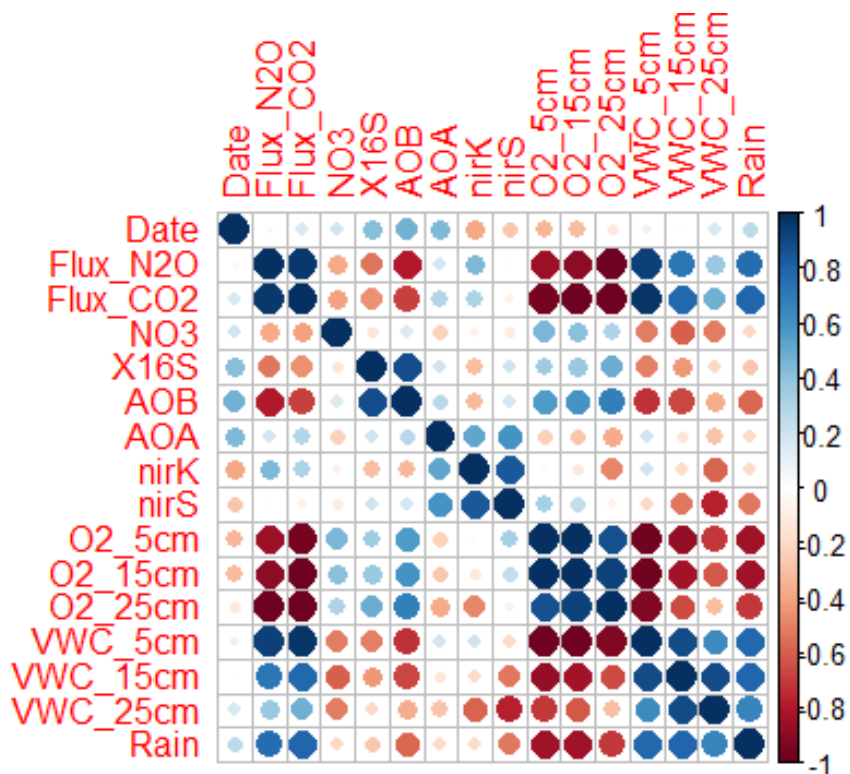


Figure 21 – Matrice de corrélation des différents facteurs sur CT. La couleur indique le signe du coefficient de corrélation linéaire de Pearson tandis que la taille du cercle indique l'importance du coefficient.

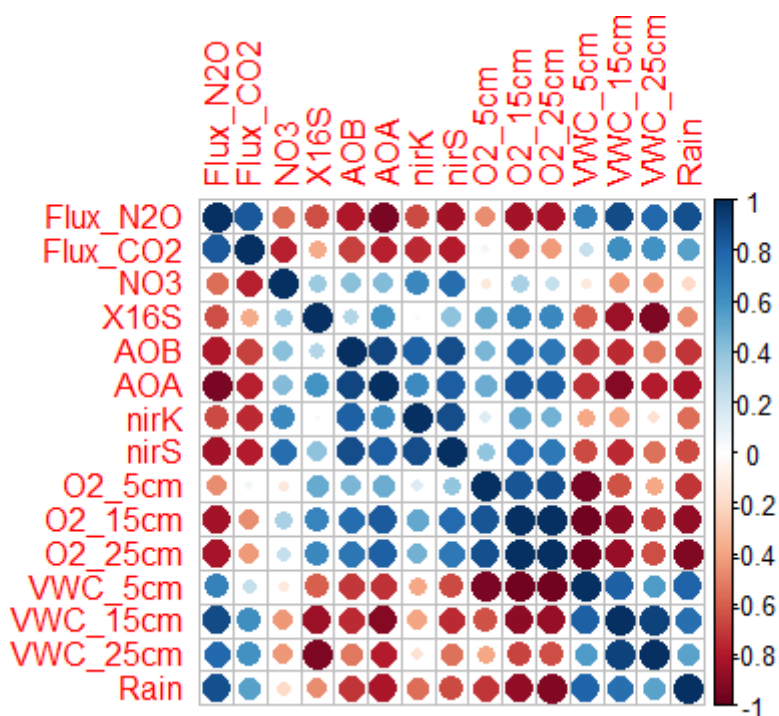


Figure 22 – Matrice de corrélation des différents facteurs sur CT. La couleur indique le signe du coefficient de corrélation linéaire de Pearson tandis que la taille du cercle indique l'importance du coefficient.

Sur RT comme sur CT, les flux de N<sub>2</sub>O étaient fortement corrélés positivement aux flux de CO<sub>2</sub> et corrélés négativement à la teneur en O<sub>2</sub> du sol dans les trois horizons. La teneur en eau volumétrique expliquait fortement la variabilité de N<sub>2</sub>O sur les trois horizons sur CT, alors qu'elle était non significative dans le troisième horizon sur RT. Le cumul des pluies était également fortement corrélé aux flux de N<sub>2</sub>O sur les deux parcelles. La concentration en NO<sub>3</sub><sup>-</sup> était corrélée négativement sur RT et CT aux flux de N<sub>2</sub>O.

En ce qui concerne les teneurs des gènes étudiés, les deux modalités CT et RT ne présentent pas le même comportement. Sur RT, les trois facteurs causant une variabilité significative des flux de N<sub>2</sub>O étaient la concentration en *amoA bactérien* (-) et les rapports *nirK/16S bact* et *nirS/16S bact* (+). Sur CT, cinq facteurs sont mis en évidence : *16S bactérien*, *amoA bactérien*, *amoA archéen*, *nirK* et *nirS*, tous possédant un coefficient de corrélation négatif. Aucune influence significative des rapports *nirK/16S bact* et *nirS/16S bact* n'est présente sur CT, contrairement à RT.

## 4. DISCUSSION

### 4.1. Rôle des pratiques agricoles sur les émissions de gaz à effet de serre et sur les microorganismes du sol

Suite à l'analyse des flux moyens sur l'ensemble de la période de mesure, la parcelle RT semble émettre plus de N<sub>2</sub>O que la parcelle CT (Figure 14), confirmant l'hypothèse 1 (§1.3). Cette observation fait écho à un certain nombre d'études dans la littérature (Abdalla et al., 2013; Huang et al., 2018; Mei et al., 2018; Shakoor et al., 2021; Yue et al., 2023). Cependant, d'autres sources ne vont pas dans ce sens et n'observent pas de différence (Krauss et al., 2017b; van Kessel et al., 2013), et des flux plus élevés sur CT sont parfois même observés (Ussiri et Lal, 2012). Plusieurs facteurs permettent d'expliquer les flux supérieurs sur RT dans le cadre de ce travail.

#### 4.1.1. Modification du comportement hydrique du sol

Tout d'abord, la teneur en eau du sol était en moyenne supérieure sur RT par rapport à CT sur les horizons 0-10 cm et 10-20 cm, horizons où se déroulent la majorité des processus microbiologiques (Figure 8). Une teneur en eau plus élevée favorise les processus anoxiques tels que la dénitrification, qui serait donc en moyenne plus intense sur RT. Cependant, cette différence de teneur en eau entre parcelles est moins marquée juste après les précipitations, aux moments des pics d'émissions de N<sub>2</sub>O. La différence de teneur en eau peut donc expliquer en partie les flux supérieurs sur RT avant les précipitations, mais pas au moment des pics d'émission. Il faut également considérer qu'il peut exister un délai entre l'atteinte de conditions favorables aux processus de production de N<sub>2</sub>O dans le sol et flux en surface, délai pouvant dépendre du type de travail du sol (Lognoul et al., 2019)

#### 4.1.2. Redistribution de la matière organique du sol

Le facteur « incorporation des résidus » pourtant commun pour les deux modalités ne crée pas exactement les mêmes conditions sur CT-In et RT-In. Les résidus culturaux ne sont pas incorporés à la même profondeur et au même moment (cf. itinéraires techniques). Sur RT, le travail du sol secondaire enfuit les résidus à 10 cm maximum et a été réalisé juste avant le semis du maïs. En revanche, sur CT, le passage de la charrue lors du travail du sol primaire enfuit les résidus jusqu'à 25 cm et a été réalisé avant l'hiver pour détruire la CIPAN (janvier 2023). La présence de plus de matière organique dans la couche superficielle sur RT pourrait également expliquer les flux de N<sub>2</sub>O supérieurs (Qiu et al., 2015). Dans certains cas néanmoins, le travail du sol réduit peut conduire à une meilleure stabilisation de l'azote dans le sol, réduisant alors les émissions de N<sub>2</sub>O (Lazcano et al., 2021). L'hypothèse du taux de matière organique supérieur dans l'horizon 0-10 sur RT est vérifié par les concentrations en COT et N total, plus élevées sur RT que sur CT (Figures 11 et 12). De plus, les flux de CO<sub>2</sub> moyens sont également supérieurs sur RT (Figure 15), ce qui traduit certainement une minéralisation plus importante de la matière organique et une activité des microorganismes stimulée par la présence de matière organique en surface sur la modalité de travail du sol réduit. L'activité microbiologique globale supérieure sur RT entraîne alors également plus d'émissions de N<sub>2</sub>O.

### 4.1.3. Azote minéral dans le sol

Le suivi des concentrations en  $\text{NO}_3^-$  et  $\text{NH}_4^+$  sur les deux parcelles apporte également plusieurs pistes de réflexion concernant la différence des flux sur les deux parcelles. Les concentrations moyennes en azote minéral sous les deux formes sont inférieures sur RT (Figures 9 et 10). A première vue, cette observation semble contradictoire avec l'observation d'émissions plus importantes sur RT. Cependant, le taux de nitrates moindre sur RT, alors que la fertilisation a amené les mêmes concentrations sur toutes les parcelles, peut amener à penser que la dénitrification a été plus intense sur RT que sur CT juste après la fertilisation. Les nitrates auraient alors été plus vite consommés par ce processus. Cela ne peut toutefois pas expliquer la différence importante observée, la part d'azote apporté par la fertilisation perdu sous la forme de  $\text{N}_2\text{O}$  étant plutôt de l'ordre de 1% annuellement (Velthof et Oenema, 1995) en Belgique. Il a également manqué des points de mesure afin de mieux comprendre l'évolution des teneurs après la fertilisation. La fertilisation du 3 mai a été directement suivie d'importantes précipitations (cumul d'environ 75 mm entre le 3 et le 22 mai à Lonzée, voir annexe 1), avant l'installation du dispositif de mesure. Des flux importants, suite à la nitrification et la dénitrification, se sont donc certainement produits à cette période comme le montrent les émissions de  $\text{N}_2\text{O}$  capturées par la tour d'«eddy covariance» du site ICOS de Lonzée sur une culture de pomme de terre installée et fertilisée le 4 mai, suivie par François Boland. Ensuite, le taux en nitrates a augmenté sur CT et RT, signe que la nitrification aurait été le processus principal jusqu'au pic d'émission du 21 juin. Cette hypothèse est supportée par l'influence de la concentration en nitrates sur les émissions de  $\text{N}_2\text{O}$ , mise en avant par l'analyse statistique entre le 12 et 30 juin montrant une corrélation négative pour CT et RT (Table 6). Ce résultat est commun à Dong et al. (2018). La baisse de concentration en nitrates à ces instants se traduisait par des augmentations significatives des émissions de  $\text{N}_2\text{O}$ .

Une réflexion doit cependant être menée quant aux teneurs en azote minéral observées. L'apport de la fertilisation était de 120 kg d'azote (60 kg de  $\text{NO}_3^-$  et 60 kg de  $\text{NH}_4^+$ ) à l'hectare. Les teneurs mesurées sont donc à première vue anormalement élevées. L'hypothèse pourrait être une minéralisation importante de la matière organique, une erreur systématique des mesures ou une erreur durant la fertilisation.

### 4.1.4. Influence des modalités de travail du sol sur les pics d'émission

A la suite de l'irrigation du 20 juin simulant une précipitation de 20 mm ainsi que des précipitations ayant immédiatement suivi, la teneur en eau du sol a augmenté de manière importante sur les deux modalités. A l'inverse, le taux en  $\text{O}_2$  dans le sol a lui baissé, les pores du sol se remplissant peu à peu d'eau. Une augmentation significative des flux de  $\text{N}_2\text{O}$  a pu être observée à la suite de ces événements, aussi bien sur CT que sur RT (Figure 14). Cette observation était attendue, un pic d'émission étant souvent observé à la suite d'une précipitation dans un sol agricole fertilisé.

Deux hypothèses expliquent ce phénomène. Tout d'abord, la stimulation de certains processus microbiologiques à l'origine des émissions de  $N_2O$ , par la réduction brusque de la teneur en  $O_2$  et l'augmentation de la teneur en eau. L'évolution des processus sur les deux modalités n'est cependant pas identique, comme le montrent les résultats de l'analyse biomoléculaire discutés ci-dessous (Partie 4.2.). Un léger décalage temporel entre les deux pics de CT et RT du 23 juin est également visible, le pic de RT apparaissant légèrement avant celui sur CT. Lognoul et al. (2017) ont également observé ce phénomène sur la même parcelle par le passé et faisaient l'hypothèse d'un temps nécessaire pour réactiver les processus microbiologiques. La dénitrification étant normalement le processus majeur dans un sol humide et étant donné que les teneurs en eau sont toujours supérieures sur RT, l'augmentation significative de la dénitrification pourrait avoir débuté plus tôt sur RT. Une autre hypothèse expliquant la différence de timing entre les pics sur CT et RT est la localisation des populations microbiologiques les plus actives. En effet, les résidus culturaux apportant la matière organique nécessaire à l'activité biologique sont enfouis plus profondément sur CT. Il est possible que cette localisation plus profonde des résidus entraîne un temps de réponse plus long des communautés microbiologiques à l'augmentation de la teneur en eau (Lognoul et al., 2019).

La deuxième hypothèse expliquant ces pics d'émissions, qui vient compléter celle de l'augmentation des processus microbiologiques relarguant du  $N_2O$ , est celle d'un dégazage physique des pores du sol (Waldo et al., 2019). L'irrigation de 20 mm de pluie de façon assez brute a en effet probablement conduit à l'évacuation rapide des gaz présents dans les pores du sol, sous l'effet de l'eau s'infiltrant dans le sol (McGill et al., 2018; Song et al., 2022; Xu et al., 2018).

#### 4.1.5. Influence des modalités de travail du sol sur les populations microbiologiques

Les différences en termes de communautés et d'activité de microorganismes ont été mises en évidence grâce à deux mesures de base : les émissions de  $CO_2$ , considérées comme représentatives de l'intensité de la minéralisation de la matière organique dans le sol par les microorganismes, et l'abondance du gène de l'ARN ribosomal 16S bactérien, permettant de quantifier les populations de bactéries totales, actives ou non, en faisant l'hypothèse qu'une augmentation des populations traduit une augmentation de leur activité.

Les émissions de CO<sub>2</sub> moyennes sur RT sur toute la durée des mesures étaient supérieures à celles sur CT (Figure 15). L'activité de minéralisation y était donc significativement plus importante en moyenne. Cette activité microbiologique stimulée peut aussi s'expliquer par une meilleure accessibilité à la matière organique pour les microorganismes sur RT dans la couche superficielle du sol et un taux élevé de carbone organique dans le sol provoquant notamment des émissions de CO<sub>2</sub> supérieures (Polyakov et Lal, 2008).

En ce qui concerne l'abondance du gène *16S rRNA* bactérien, elle était significativement supérieure sur RT durant la période étudiée (du 12 au 30 juin) (Figure 17). Durant cette période comprenant les pics d'émissions de N<sub>2</sub>O, les communautés de bactéries étaient donc plus nombreuses sur RT par rapport à CT, validant l'hypothèse 2 (§1.3) pour les bactéries uniquement. Cette mesure renseigne uniquement la quantité totale de bactéries du sol, et ne donne aucune information sur les populations d'archées ou de champignons. Dans le cadre d'une étude plus complète, les gènes *16S rRNA* archéen et *18S rRNA* des champignons devraient aussi être quantifiés.

## 4.2. Dynamique des populations de microorganismes durant les émissions de N<sub>2</sub>O

### 4.2.1. Abondance moyenne des gènes marqueurs

En analysant tout d'abord l'entièreté de la période étudiée du 12 au 30 juin, plusieurs différences entre CT et RT ont été mises en évidence. Outre l'abondance du 16S bactérien, les concentrations moyennes en nombre de copies par masse de sol des gènes *amoA* archéen, *nirK* et *nirS* sont supérieures sur RT (Figures 17, 19 et 20). Les taux des gènes *nirK* et *nirS*, marqueurs de la première étape de la dénitrification, confirment donc une dénitrification plus intense sur la parcelle RT. L'abondance du gène *amoA* archéen est légèrement plus élevée sur RT, mais cette observation ne se base que sur la valeur moyenne sur toute la période de mesure et cette tendance n'apparaît qu'après l'irrigation. Avant le 20 juin, aucune différence significative n'est présente, le taux d'*amoA* archéen étant même légèrement supérieur sur CT. Il semblerait donc que l'augmentation de la teneur en eau du sol provoque sur RT la stimulation de la nitrification par les archées sur une période de cinq jours (Figure 17, droite). Ce résultat s'oppose notamment à ceux de Nicol et al. (2008) qui mettent en évidence une augmentation de *amoA* archéen avec un pH plus acide, mais pas avec la teneur en eau. Or, le pH dans ce travail était plus élevé sur RT (Figure 13). Si une baisse du pH a bien été observée après l'irrigation, elle n'était pas exclusive à RT et n'explique pas la différence d'abondance de l'*amoA* archéen entre les deux modalités de travail du sol.

Toujours en analysant les moyennes sur la période entière, l'abondance du gène *amoA* bactérien ainsi que le rapport *amoA* bactérien/*16S rRNA* bactérien sont nettement supérieurs sur CT (Figure 18). Ceci signifie que la nitrification effectuée par les bactéries est toujours supérieure sur la parcelle CT, mais aussi que la nitrification semble prendre une proportion plus importante dans l'ensemble des processus bactériens sur la parcelle en travail du sol conventionnel. Toutefois, l'irrigation a causé une diminution significative de l'abondance de l' *amoA* bactérien sur CT (Figure 18, gauche), là où elle est restée stable (mais toujours inférieure) sur RT. Cette observation va à l'encontre d'une précédente étude sur la même parcelle (Theodorakopoulos et al., 2017), qui constatait un pic d'abondance de l'*amoA* bactérien après la pluie. Cette opposition peut s'expliquer par les différences de conditions des deux études. Contrairement à Theodorakopoulos et al. (2017), la saison ici étudiée a été très chaude et sans pluie. L'irrigation sur un sol très sec n'a causé qu'une brève saturation des pores du sol, avant que l'eau ne soit transférée vers les horizons plus profonds également très secs ou vers l'atmosphère par évaporation. Toutefois, la conclusion sur cette étude est que la teneur en eau supérieure semble stimuler la nitrification par les archées sur RT, alors qu'elle inhiberait ce même processus pour les bactéries sur CT.

L'hypothèse 3 (§1.3) est donc seulement confirmée en partie : l'abondance moyenne des archées nitrifiantes et des communautés dénitrifiantes est supérieure sur RT, mais les bactéries nitrifiantes sont plus abondantes sur CT.

#### 4.2.2. Variation de l'abondance des gènes durant les pics d'émissions

En se penchant ensuite plus particulièrement sur l'abondance des gènes aux dates correspondant aux pics d'émissions (21 et 23 juin) en comparaison aux deux dates de contrôle (12 et 16 juin), des hypothèses peuvent être avancées sur le comportement à court terme des microorganismes après l'irrigation. Sur RT, un jour après l'irrigation du 20 juin, en plus de la teneur en *amoA* archéal déjà discutée ci-dessus, les rapports *nirK/16S* bactérien et *nirS/16S* bactérien sont en augmentation (Figures 19 et 20). L'importance de la dénitrification dans les processus microbiens pourrait ainsi être stimulée à court terme après l'irrigation sur RT. Dès le 23 juin, soit 3 jours après l'irrigation, tous les taux sont revenus à hauteur des valeurs de contrôle, *nirK* et *nirK/16S* bactérien étant même en baisse (Figure 19). Un regard critique est cependant porté sur les résultats concernant *nirK* et *nirS*. L'analyse ayant été séparée en deux plaques de qPCR (12,16 et 21 juin vs 23, 25 et 30 juin), la baisse subite des concentrations de ces deux gènes pose question. Malgré la courbe de calibration propre à chaque plaque, la possibilité de résultats erronés sur la deuxième plaque est à prendre en compte. Une baisse aussi subite de la dénitrification, alors que des précipitations ont eu lieu le 22 juin, est surprenante et contredit certains résultats présents dans la littérature (Ball et al., 1999; Flechard et al., 2005; Horák et al., 2020). Sur CT, aucune variation significative d'abondance des gènes n'a eu lieu le 21 juin. Par contre, tous ces paramètres sont en baisse le 23 juin, à l'exception de *amoA* bactérien/*16S* bactérien (Figure 18). En termes d'abondance, les communautés nitrifiantes et dénitrifiantes sont donc toutes en baisse sur CT au moment du pic d'émission, lorsque la teneur en eau augmente. L'origine microbiologique des émissions supérieures de N<sub>2</sub>O lors du pic est donc probablement à chercher en termes d'activité de ces organismes, plutôt qu'en termes d'abondance.

L'hypothèse 4 (§1.3) est valable pour RT : on observe une augmentation significative des populations dénitrifiantes sur RT après la pluie, corrélée à un pic d'émission de N<sub>2</sub>O. Sur CT, l'hypothèse 4 n'est par contre pas acceptée : l'abondance des populations ne varie pas, voire diminue lors du pic d'émission de N<sub>2</sub>O.

### 4.2.3. Corrélations entre flux et abondance des gènes

L'analyse de la variance de chaque gène sur les flux de N<sub>2</sub>O a complété cette étude. Sur RT, les rapports *nirK/16S* et *nirS/16S* sont corrélés positivement aux flux et les influencent donc significativement (Table 6). Ceci confirme que les flux plus élevés de N<sub>2</sub>O sont observés lorsque la part de dénitrification parmi les processus totaux augmente chez les bactéries du sol en labour réduit. L'effet inverse est présent pour l'*amoA* bactérien, les flux augmentant lorsque les populations totales de bactéries nitrifiantes diminuent. Sur CT, la corrélation est négative pour toutes les abondances de gènes étudiés, mais pas les rapports entre *nirK*, *nirS*, *amoA* bactérien et le *16S rRNA* bactérien (Table 6). L'analyse est plus complexe sur CT, l'abondance de tous les gènes marqueurs des processus émettant du N<sub>2</sub>O étant corrélée négativement avec les flux. Les rapports entre l'abondance des gènes marqueurs et le 16S ne varient pas et témoignent de la stabilité de la répartition des processus de nitrification/dénitrification chez les bactéries sur CT.

## 4.3. Perspectives

Ce travail s'est concentré sur la mesure de l'abondance des différentes communautés de microorganismes nitrifiants et dénitrifiants. Lors d'une éventuelle campagne future visant à caractériser l'activité de ces microorganismes, un éventail plus large de manipulations pourrait être réalisé. En particulier, la quantification de l'ARN microbien pourrait permettre de mettre en évidence les communautés actives contrairement à l'ADN, qui ne permet que de mesurer l'abondance des communautés. L'activité de minéralisation pourrait être quantifiée grâce, par exemple, au Tea bag index (Duddigan et al., 2020; Keuskamp et al., 2013), dont la mise en place sur l'essai a échoué cette année. Une approche expérimentale en laboratoire pourrait également être envisagée, permettant une mesure plus localisée des flux et des communautés de microorganismes sous-jacentes. Dans ce travail, les échantillons de sol ont été prélevés dans des zones dédiées, à plusieurs mètres des chambres de mesure des flux. Or, la variabilité spatiale des flux de N<sub>2</sub>O est très importante et pourrait avoir affecté la robustesse des relations mises en évidence.



## 5. CONTRIBUTION PERSONNELLE

J'ai réalisé la mise en place du dispositif de mesure automatique des flux sur l'essai avec Antoine André et François Boland. Pour les besoins de nos travaux respectifs, nous avons, Antoine et moi, réfléchi et mis en place le protocole du système d'arrosage. Nous avons passé un certain nombre d'heures à réaliser l'arrosage des zones identifiées, entièrement à la main. J'ai principalement réalisé la collecte des échantillons de sol et géré leur stockage/conditionnement en vue des analyses d'azote minéral et de populations de microorganismes. J'ai mené un test de dosage de l'azote minéral afin de comparer les méthodes de dosage entre le laboratoire de La Hulpe (CPAR) et le protocole utilisé dans les laboratoires du bâtiment de biologie végétale (Plant Sciences). Suite à ce test, révélant une surestimation quasi systématique des teneurs en azote minéral par le protocole de dosage du labo de Plant Sciences, j'ai choisi d'effectuer le dosage auprès du CPAR. Au préalable, j'ai réalisé l'extraction de l'azote de la matrice du sol avec le protocole du laboratoire de Plant Sciences (décrit dans ce travail pour congeler les échantillons avant leur analyse). Ceci nous permettait de réaliser plus d'échantillons et de les faire analyser à posteriori aux dates présentant le plus d'intérêt pour les besoins de l'étude. Il en va de même pour les analyses microbiennes, j'ai choisi de récolter des échantillons de sol en excès à de nombreuses dates, afin de choisir les dates les plus pertinentes dans l'étude de l'évolution des populations microbiologiques, notamment en fonction de la date des pics d'émission. Le nombre d'échantillons pour les qPCR était en effet limité en termes de coûts de réactifs et d'utilisation de la machine. J'ai réalisé l'ensemble des manipulations d'extractions d'ADN, dosage d'ADN et qPCR.

## 6. CONCLUSION

L'objectif de ce travail était d'étudier l'influence du travail du sol différencié sur les populations microbiologiques responsables des processus d'émissions de N<sub>2</sub>O en grande culture, ainsi que d'étudier la dynamique des populations de microorganismes durant les pics d'émissions N<sub>2</sub>O. Un dispositif de chambres de mesure à fermeture automatisée a permis la mesure des flux de N<sub>2</sub>O et CO<sub>2</sub> sur RT et CT. L'extraction de l'ADN des microorganismes et la qPCR ont permis de quantifier l'abondance des populations.

Le travail du sol réduit, par rapport au travail conventionnel, a conduit à la modifications des propriétés du sol, telles que l'augmentation de la teneur en eau et la diminution du taux d'O<sub>2</sub> dans les 20 premiers centimètres du sol, un pH et un taux en COT plus élevés dans l'horizon superficiel ainsi qu'un enfouissement moins profond des résidus culturaux. Ces modifications ont notamment influé sur les populations nitrifiantes et dénitrifiantes de microorganismes et ont provoqué des émissions moyennes de N<sub>2</sub>O plus élevées de 107.2% sur RT en comparaison à CT sur la période de mesure ( $12.5 \pm 4.1$  ng N-N<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> sur CT et  $25.9 \pm 10.4$  ng N-N<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> sur RT). Les émissions de CO<sub>2</sub> ont également été légèrement plus élevées sur RT et ont été fortement corrélés positivement aux flux de N<sub>2</sub>O sur les deux modalités. Le pic d'émission de N<sub>2</sub>O attendu après la phase irrigation/précipitations a été supérieur sur RT et a montré une réponse plus rapide. Les modifications de propriétés du sol sur RT ont également entraîné une activité de minéralisation de la matière organique par les microorganismes plus élevée. De plus, les populations totales de bactéries sur la fenêtre temporelle observée ont été plus nombreuses en travail du sol réduit.

Sur RT, les populations totales de bactéries (*16S rRNA* bactérien) ainsi que les populations dénitrifiantes totales (*nirK* et *nirS*) étaient toujours plus élevées. L'augmentation de la teneur en eau a provoqué la stimulation des populations nitrifiantes archéennes (*amoA* archéen) sur RT, où leur abondance a dépassé celle sur CT. Sur CT, les populations totales de bactéries nitrifiantes étaient toujours plus élevées. L'augmentation de la teneur en eau a cependant provoqué la baisse des populations bactériennes nitrifiantes.

De plus, l'augmentation relative des populations bactériennes dénitrifiantes par rapport aux populations de bactéries totales (*nirK/16S* bactérien et *nirS/16S* bactérien) sur RT a été corrélée positivement aux flux de N<sub>2</sub>O lors du pic d'émission sur RT survenant après l'augmentation de la teneur en eau du sol. La même observation a eu lieu pour les populations nitrifiantes archéennes. Ces paramètres pourraient présenter un intérêt dans l'étude de la modélisation des pics d'émissions de N<sub>2</sub>O. Sur CT, l'abondance de toutes les populations étudiées a baissé lors du pic d'émission, alors que les rapports entre populations bactériennes nitrifiantes et dénitrifiantes n'ont pas varié. L'étude de l'activité des populations, par le biais de l'extraction de l'ARN ou de l'activité enzymatique, pourrait permettre de mieux comprendre la dynamique microbiologique amenant aux pics d'émissions de N<sub>2</sub>O sur CT.

Les résultats mettent en évidence des différences certaines en termes de populations bactériennes et archéennes entre CT et RT, que ce soit sur la période entière de l'essai ou un moment des pics d'émissions de gaz à effet de serre. Ces différences ont été impactées par les modifications des paramètres du sol tels que teneur en eau, en oxygène, en matière organique, en  $\text{NO}_3^-$ , en  $\text{NH}_4^+$  ou en pH apportées par le traitement du sol. Une étude plus approfondie de la dynamique des populations microbiologiques est à envisager, en utilisant des indicateurs d'activité et de quantification de l'expression de l'ensemble des gènes codant les différentes enzymes du cycle de l'azote.

## 7. BIBLIOGRAPHIE

- Abalos, D., Recous, S., Butterbach-Bahl, K., De Notaris, C., Rittl, T. F., Topp, C. F. E., Petersen, S. O., Hansen, S., Bleken, M. A., Rees, R. M., & Olesen, J. E. (2022). A review and meta-analysis of mitigation measures for nitrous oxide emissions from crop residues. *Science of The Total Environment*, 828, 154388. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154388>
- Abdalla, M., Osborne, B., Lanigan, G., Forristal, D., Williams, M., Smith, P., & Jones, M. B. (2013). Conservation tillage systems : A review of its consequences for greenhouse gas emissions. *Soil Use and Management*, 29(2), 199-209. <https://doi.org/10.1111/sum.12030>
- Angers, D. A., & Eriksen-Hamel, N. S. (2008). Full-Inversion Tillage and Organic Carbon Distribution in Soil Profiles : A Meta-Analysis. *Soil Science Society of America Journal*, 72(5), 1370-1374. <https://doi.org/10.2136/sssaj2007.0342>
- Babrauskas, V., & Leggett, D. (2020). Thermal decomposition of ammonium nitrate. *Fire and Materials*, 44(2), 250-268. <https://doi.org/10.1002/fam.2797>
- Ball, B. C., Scott, A., & Parker, J. P. (1999). Field N<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub> fluxes in relation to tillage, compaction and soil quality in Scotland. *Soil and Tillage Research*, 53(1), 29-39. [https://doi.org/10.1016/S0167-1987\(99\)00074-4](https://doi.org/10.1016/S0167-1987(99)00074-4)
- Bateman, E. J., & Baggs, E. M. (2005). Contributions of nitrification and denitrification to N<sub>2</sub>O emissions from soils at different water-filled pore space. *Biology and Fertility of Soils*, 41(6), 379-388. <https://doi.org/10.1007/s00374-005-0858-3>
- Biberdzic, M., Barac, S., Lalevic, D., Djikic, A., Prodanovic, D., Rajicic, V., Biberdzic, M., Barac, S., Lalevic, D., Djikic, A., Prodanovic, D., & Rajicic, V. (2020). Influence of soil tillage system on soil compaction and winter wheat yield. *Chilean journal of agricultural research*, 80(1), 80-89. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392020000100080>
- Boeckx, P., Van Nieuland, K., & Van Cleemput, O. (2011). Short-term effect of tillage intensity on N<sub>2</sub>O and CO<sub>2</sub> emissions. *Agronomy for Sustainable Development*, 31(3), 453-461. <https://doi.org/10.1007/s13593-011-0001-9>

- Bremner, J. M., Blackmer, A. M., & Waring, S. A. (1980). Formation of nitrous oxide and dinitrogen by chemical decomposition of hydroxylamine in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 12(3), 263-269. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(80\)90072-3](https://doi.org/10.1016/0038-0717(80)90072-3)
- Butterbach-Bahl, K., Baggs, E. M., Dannenmann, M., Kiese, R., & Zechmeister-Boltenstern, S. (2013). Nitrous oxide emissions from soils : How well do we understand the processes and their controls? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368(1621), 20130122. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0122>
- Cavigelli, M. A., & Robertson, G. P. (2001). Role of denitrifier diversity in rates of nitrous oxide consumption in a terrestrial ecosystem. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(3), 297-310. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00141-3](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00141-3)
- Chapuis-Lardy, L., Wrage, N., Metay, A., Chotte, J.-L., & Bernoux, M. (2007). Soils, a sink for N<sub>2</sub>O? A review. *Global Change Biology*, 13(1), 1-17. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2006.01280.x>
- Curaqueo, G., Acevedo, E., Cornejo, P., Seguel, A., Rubio, R., & Borie, F. (2010). TILLAGE EFFECT ON SOIL ORGANIC MATTER, MYCORRHIZAL HYPHAE AND AGGREGATES IN A MEDITERRANEAN AGROECOSYSTEM. *Revista de la ciencia del suelo y nutrición vegetal*, 10(1), 12-21. <https://doi.org/10.4067/S0718-27912010000100002>
- Davidson, E. A. (2009). The contribution of manure and fertilizer nitrogen to atmospheric nitrous oxide since 1860. *Nature Geoscience*, 2(9), Article 9. <https://doi.org/10.1038/ngeo608>
- Davidson, E. A., Keller, M., Erickson, H. E., Verchot, L. V., & Veldkamp, E. (2000). Testing a Conceptual Model of Soil Emissions of Nitrous and Nitric Oxides : Using two functions based on soil nitrogen availability and soil water content, the hole-in-the-pipe model characterizes a large fraction of the observed variation of nitric oxide and nitrous oxide emissions from soils. *BioScience*, 50(8), 667-680. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2000\)050\[0667:TACMOS\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2000)050[0667:TACMOS]2.0.CO;2)
- de Klein, C. A. M., Alfaro, M. A., Giltrap, D., Topp, C. F. E., Simon, P. L., Noble, A. D. L., & van der Weerden, T. J. (2020). Global Research Alliance N<sub>2</sub>O chamber methodology guidelines : Statistical considerations, emission factor calculation, and data reporting. *Journal of Environmental Quality*, 49(5), 1156-1167. <https://doi.org/10.1002/jeq2.20127>

- Delespesse, M., (2021). *Mesure des flux de N<sub>2</sub>O d'un sol agricole : Dynamique des émissions et impact du travail du sol sur le bilan saisonnier*. <https://matheo.uliege.be/handle/2268.2/13141>
- Denier van der Gon, H., & Bleeker, A. (2005). Indirect N<sub>2</sub>O emission due to atmospheric N deposition for the Netherlands. *Atmospheric Environment*, 39(32), 5827-5838. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2005.06.019>
- Di, H. J., Cameron, K. C., Sherlock, R. R., Shen, J.-P., He, J.-Z., & Winefield, C. S. (2010). Nitrous oxide emissions from grazed grassland as affected by a nitrification inhibitor, dicyandiamide, and relationships with ammonia-oxidizing bacteria and archaea. *Journal of Soils and Sediments*, 10(5), 943-954. <https://doi.org/10.1007/s11368-009-0174-x>
- Domeignoz-Horta, L. A., Philippot, L., Peyrard, C., Bru, D., Breuil, M.-C., Bizouard, F., Justes, E., Mary, B., Léonard, J., & Spor, A. (2018). Peaks of in situ N<sub>2</sub>O emissions are influenced by N<sub>2</sub>O-producing and reducing microbial communities across arable soils. *Global Change Biology*, 24(1), 360-370. <https://doi.org/10.1111/gcb.13853>
- Dong, Z., Zhu, B., Jiang, Y., Tang, J., Liu, W., & Hu, L. (2018). Seasonal N<sub>2</sub>O emissions respond differently to environmental and microbial factors after fertilization in wheat–maize agroecosystem. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 112(2), 215-229. <https://doi.org/10.1007/s10705-018-9940-8>
- Duddigan, S., Shaw, L. J., Alexander, P. D., & Collins, C. D. (2020). Chemical Underpinning of the Tea Bag Index: An Examination of the Decomposition of Tea Leaves. *Applied and Environmental Soil Science*, 2020, e6085180. <https://doi.org/10.1155/2020/6085180>
- Flechard, C. R., Nef<sup>TEL</sup>, A., Jocher, M., Ammann, C., & Fuhrer, J. (2005). Bi-directional soil/atmosphere N<sub>2</sub>O exchange over two mown grassland systems with contrasting management practices. *Global Change Biology*, 11(12), 2114-2127. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2005.01056.x>
- 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>

- Fu, Q., Xi, R., Zhu, J., Hu, H., Xing, Z., & Zuo, J. (2020). The relative contribution of ammonia oxidizing bacteria and archaea to N<sub>2</sub>O emission from two paddy soils with different fertilizer N sources: A microcosm study. *Geoderma*, 375, 114486. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2020.114486>
- Gubry-Rangin, C., Nicol, G. W., & Prosser, J. I. (2010). Archaea rather than bacteria control nitrification in two agricultural acidic soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 74(3), 566-574. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00971.x>
- Gui, H., Gao, Y., Wang, Z., Shi, L., Yan, K., & Xu, J. (2021). Arbuscular mycorrhizal fungi potentially regulate N<sub>2</sub>O emissions from agricultural soils via altered expression of denitrification genes. *Science of The Total Environment*, 774, 145133. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145133>
- Han, H., Chen, C., Bai, M., Xu, T., Yang, H., Shi, A., Ding, G., & Li, J. (2020). Abundance and diversity of denitrifying bacterial communities associated with N<sub>2</sub>O emission under long-term organic farming. *European Journal of Soil Biology*, 97, 103153. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2020.103153>
- Harter, J., Krause, H.-M., Schuettler, S., Ruser, R., Fromme, M., Scholten, T., Kappler, A., & Behrens, S. (2014). Linking N<sub>2</sub>O emissions from biochar-amended soil to the structure and function of the N-cycling microbial community. *The ISME Journal*, 8(3), Article 3. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.160>
- He, J., He, Y., Gao, W., Chen, Y., Ma, G., Ji, R., & Liu, X. (2022). Soil depth and agricultural irrigation activities drive variation in microbial abundance and nitrogen cycling. *CATENA*, 219, 106596. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2022.106596>
- Henry, S., Bru, D., Stres, B., Hallet, S., & Philippot, L. (2006). Quantitative Detection of the nosZ Gene, Encoding Nitrous Oxide Reductase, and Comparison of the Abundances of 16S rRNA, narG, nirK, and nosZ Genes in Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(8), 5181-5189. <https://doi.org/10.1128/AEM.00231-06>
- Hiel, M.-P., Barbieux, S., Pierreux, J., Olivier, C., Lobet, G., Roisin, C., Garré, S., Colinet, G., Bodson, B., & Dumont, B. (2018). Impact of crop residue management on crop production and soil chemistry after seven years of crop rotation in temperate climate, loamy soils. *PeerJ*, 6, e4836. <https://doi.org/10.7717/peerj.4836>

- Hiscock, K. M., Bateman, A. S., Mühlherr, I. H., Fukada, T., & Dennis, P. F. (2003). Indirect Emissions of Nitrous Oxide from Regional Aquifers in the United Kingdom. *Environmental Science & Technology*, 37(16), 3507-3512. <https://doi.org/10.1021/es020216w>
- Horák, J., Igaz, D., Aydın, E., Šimanský, V., Buchkina, N., & Balashov, E. (2020). Changes in direct CO<sub>2</sub> and N<sub>2</sub>O emissions from a loam Haplic Luvisol under conventional moldboard and reduced tillage during growing season and post-harvest period of red clover. *Journal of Hydrology and Hydromechanics*, 68, 271-278. <https://doi.org/10.2478/johh-2020-0023>
- Horn, R., & Peth, S. (2009). Soil structure formation and management effects on gas emission. *Biologia*, 64(3), 449-453. <https://doi.org/10.2478/s11756-009-0089-4>
- Hu, L., Dong, Z., Wang, Z., Xiao, L., & Zhu, B. (2022). The contributions of ammonia oxidizing bacteria and archaea to nitrification-dependent N<sub>2</sub>O emission in alkaline and neutral purple soils. *Scientific Reports*, 12(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-23084-1>
- Huang, Y., Ren, W., Wang, L., Hui, D., Grove, J. H., Yang, X., Tao, B., & Goff, B. (2018). Greenhouse gas emissions and crop yield in no-tillage systems : A meta-analysis. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 268, 144-153. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2018.09.002>
- Hutchinson, G. L., & Mosier, A. R. (1981). Improved Soil Cover Method for Field Measurement of Nitrous Oxide Fluxes. *Soil Science Society of America Journal*, 45(2), 311-316. <https://doi.org/10.2136/sssaj1981.03615995004500020017x>
- Huynh, H. T., Hufnagel, J., Wurbs, A., & Bellingrath-Kimura, S. D. (2019). Influences of soil tillage, irrigation and crop rotation on maize biomass yield in a 9-year field study in Müncheberg, Germany. *Field Crops Research*, 241, 107565. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2019.107565>
- Jakab, G., Madarász, B., Masoudi, M., Karlik, M., Király, C., Zacháry, D., Filep, T., Dekemati, I., Centeri, C., Al-Graiti, T., & Szalai, Z. (2023). Soil organic matter gain by reduced tillage intensity : Storage, pools, and chemical composition. *Soil and Tillage Research*, 226, 105584. <https://doi.org/10.1016/j.still.2022.105584>
- Johnson, M. D., & Lowery, B. (1985). Effect of Three Conservation Tillage Practices on Soil Temperature and Thermal Properties. *Soil Science Society of America Journal*, 49(6), 1547-1552. <https://doi.org/10.2136/sssaj1985.03615995004900060043x>



- Keuskamp, J. A., Dingemans, B. J. J., Lehtinen, T., Sarneel, J. M., & Hefting, M. M. (2013). Tea Bag Index : A novel approach to collect uniform decomposition data across ecosystems. *Methods in Ecology and Evolution*, 4(11), 1070-1075. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12097>
- Komissarov, M. A., & Klik, A. (2020). The Impact of No-Till, Conservation, and Conventional Tillage Systems on Erosion and Soil Properties in Lower Austria. *Eurasian Soil Science*, 53(4), 503-511. <https://doi.org/10.1134/S1064229320040079>
- Kool, D. M., Dolfing, J., Wrage, N., & Van Groenigen, J. W. (2011). Nitrifier denitrification as a distinct and significant source of nitrous oxide from soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 43(1), 174-178. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.09.030>
- Krause, H.-M., Thonar, C., Eschenbach, W., Well, R., Mäder, P., Behrens, S., Kappler, A., & Gattinger, A. (2017). Long term farming systems affect soils potential for N<sub>2</sub>O production and reduction processes under denitrifying conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, 114, 31-41. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.06.025>
- Krauss, M., Krause, H.-M., Spangler, S., Kandeler, E., Behrens, S., Kappler, A., Mäder, P., & Gattinger, A. (2017a). Tillage system affects fertilizer-induced nitrous oxide emissions. *Biology and Fertility of Soils*, 53(1), 49-59. <https://doi.org/10.1007/s00374-016-1152-2>
- Krauss, M., Ruser, R., Müller, T., Hansen, S., Mäder, P., & Gattinger, A. (2017b). Impact of reduced tillage on greenhouse gas emissions and soil carbon stocks in an organic grass-clover ley—Winter wheat cropping sequence. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 239, 324-333. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.01.029>
- Kravchenko, A. N., & Robertson, G. P. (2015). Statistical Challenges in Analyses of Chamber-Based Soil CO<sub>2</sub> and N<sub>2</sub>O Emissions Data. *Soil Science Society of America Journal*, 79(1), 200-211. <https://doi.org/10.2136/sssaj2014.08.0325>
- Kutzbach, L., Schneider, J., Sachs, T., Giebels, M., Nykänen, H., Shurpali, N. J., Martikainen, P. J., Alm, J., & Wilmking, M. (2007). CO<sub>2</sub> flux determination by closed-chamber methods can be seriously biased by inappropriate application of linear regression. *Biogeosciences*, 4(6), 1005-1025. <https://doi.org/10.5194/bg-4-1005-2007>
- Kuypers, M. M. M., Marchant, H. K., & Kartal, B. (2018). The microbial nitrogen-cycling network. *Nature Reviews Microbiology*, 16(5), Article 5. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2018.9>

- Laborde, D., Mamun, A., Martin, W., Piñeiro, V., & Vos, R. (2021). Agricultural subsidies and global greenhouse gas emissions. *Nature Communications*, *12*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22703-1>
- Lazcano, C., Zhu-Barker, X., & Decock, C. (2021). Effects of Organic Fertilizers on the Soil Microorganisms Responsible for N<sub>2</sub>O Emissions : A Review. *Microorganisms*, *9*(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9050983>
- Lipiec, J., Kuś, J., Słowińska-Jurkiewicz, A., & Nosalewicz, A. (2006). Soil porosity and water infiltration as influenced by tillage methods. *Soil and Tillage Research*, *89*(2), 210-220. <https://doi.org/10.1016/j.still.2005.07.012>
- Liu, J., Hou, H., & Zhang, W. (2023). Fungi contribute more to N<sub>2</sub>O emissions than bacteria in two paddy soils with different textures. *European Journal of Soil Biology*, *115*, 103476. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2023.103476>
- Lognoul, M., Debaq, A., De Ligne, A., Dumont, B., Manise, T., Bodson, B., Heinesch, B., & Aubinet, M. (2019). N<sub>2</sub>O flux short-term response to temperature and topsoil disturbance in a fertilized crop : An eddy covariance campaign. *Agricultural and Forest Meteorology*, *271*, 193-206. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2019.02.033>
- Lognoul, M., Theodorakopoulos, N., Hiel, M.-P., Regaert, D., Broux, F., Heinesch, B., Bodson, B., Vandenbol, M., & Aubinet, M. (2017). Impact of tillage on greenhouse gas emissions by an agricultural crop and dynamics of N<sub>2</sub>O fluxes : Insights from automated closed chamber measurements. *Soil and Tillage Research*, *167*, 80-89. <https://doi.org/10.1016/j.still.2016.11.008>
- Matthias, A. D., Blackmer, A. M., & Bremner, J. M. (1980). A Simple Chamber Technique for Field Measurement of Emissions of Nitrous Oxide from Soils. *Journal of Environmental Quality*, *9*(2), 251-256. <https://doi.org/10.2134/jeq1980.00472425000900020017x>
- McGill, B. M., Hamilton, S. K., Millar, N., & Robertson, G. P. (2018). The greenhouse gas cost of agricultural intensification with groundwater irrigation in a Midwest U.S. row cropping system. *Global Change Biology*, *24*(12), 5948-5960. <https://doi.org/10.1111/gcb.14472>
- Mei, K., Wang, Z., Huang, H., Zhang, C., Shang, X., Dahlgren, R. A., Zhang, M., & Xia, F. (2018). Stimulation of N<sub>2</sub>O emission by conservation tillage management in agricultural lands : A

- meta-analysis. *Soil and Tillage Research*, 182, 86-93.  
<https://doi.org/10.1016/j.still.2018.05.006>
- Meurer, K. H. E., Haddaway, N. R., Bolinder, M. A., & Kätterer, T. (2018). Tillage intensity affects total SOC stocks in boreo-temperate regions only in the topsoil—A systematic review using an ESM approach. *Earth-Science Reviews*, 177, 613-622.  
<https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2017.12.015>
- Miranda, K. M., Espey, M. G., & Wink, D. A. (2001). A Rapid, Simple Spectrophotometric Method for Simultaneous Detection of Nitrate and Nitrite. *Nitric Oxide*, 5(1), 62-71.  
<https://doi.org/10.1006/niox.2000.0319>
- Monsefi, A., Norouzi Masir, M., & Izadi, Y. (2022). The effects of tillage systems and weed control methods on some physical and chemical properties in corn-wheat crop rotation. *Journal of Agricultural Engineering Soil Science and Agricultural Mechanization, (Scientific Journal of Agriculture)*, 45(2). <https://doi.org/10.22055/agen.2022.41147.1635>
- Montzka, S. A., Dlugokencky, E. J., & Butler, J. H. (2011). Non-CO<sub>2</sub> greenhouse gases and climate change. *Nature*, 476(7358), Article 7358. <https://doi.org/10.1038/nature10322>
- Nelson, D. w., & Sommers, L. e. (1983). Total Carbon, Organic Carbon, and Organic Matter. In *Methods of Soil Analysis* (p. 539-579). John Wiley & Sons, Ltd.  
<https://doi.org/10.2134/agronmonogr9.2.2ed.c29>
- Nicol, G. W., Leininger, S., Schleper, C., & Prosser, J. I. (2008). The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria. *Environmental Microbiology*, 10(11), 2966-2978. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01701.x>
- Ogle, S. M., Alsaker, C., Baldock, J., Bernoux, M., Breidt, F. J., McConkey, B., Regina, K., & Vazquez-Amabile, G. G. (2019). Climate and Soil Characteristics Determine Where No-Till Management Can Store Carbon in Soils and Mitigate Greenhouse Gas Emissions. *Scientific Reports*, 9(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47861-7>
- Oorts, K., Bossuyt, H., Labreuche, J., Merckx, R., & Nicolardot, B. (2007). Carbon and nitrogen stocks in relation to organic matter fractions, aggregation and pore size distribution in no-tillage and conventional tillage in northern France. *European Journal of Soil Science*, 58(1), 248-259. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.2006.00832.x>

- Parkin, T. B., Venterea, R. T., & Hargreaves, S. K. (2012). Calculating the Detection Limits of Chamber-based Soil Greenhouse Gas Flux Measurements. *Journal of Environmental Quality*, *41*(3), 705-715. <https://doi.org/10.2134/jeq2011.0394>
- Patton, C. J., & Crouch, S. R. (1977). Spectrophotometric and kinetics investigation of the Berthelot reaction for the determination of ammonia. *Analytical Chemistry*, *49*(3), 464-469. <https://doi.org/10.1021/ac50011a034>
- Philippot, L., Andert, J., Jones, C. M., Bru, D., & Hallin, S. (2011). Importance of denitrifiers lacking the genes encoding the nitrous oxide reductase for N<sub>2</sub>O emissions from soil. *Global Change Biology*, *17*(3), 1497-1504. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2010.02334.x>
- Polyakov, V. O., & Lal, R. (2008). Soil organic matter and CO<sub>2</sub> emission as affected by water erosion on field runoff plots. *Geoderma*, *143*(1), 216-222. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2007.11.005>
- Prosser, J. I., Hink, L., Gubry-Rangin, C., & Nicol, G. W. (2020). Nitrous oxide production by ammonia oxidizers : Physiological diversity, niche differentiation and potential mitigation strategies. *Global Change Biology*, *26*(1), 103-118. <https://doi.org/10.1111/gcb.14877>
- Qiu, Q., Wu, L., Ouyang, Z., Li, B., Xu, Y., Wu, S., & Gregorich, E. G. (2015). Effects of plant-derived dissolved organic matter (DOM) on soil CO<sub>2</sub> and N<sub>2</sub>O emissions and soil carbon and nitrogen sequestrations. *Applied Soil Ecology*, *96*, 122-130. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.07.016>
- Ravishankara, A. R., Daniel, J. S., & Portmann, R. W. (2009). Nitrous Oxide (N<sub>2</sub>O) : The Dominant Ozone-Depleting Substance Emitted in the 21st Century. *Science*, *326*(5949), 123-125. <https://doi.org/10.1126/science.1176985>
- Regan, K., Kammann, C., Hartung, K., Lenhart, K., Müller, C., Philippot, L., Kandeler, E., & Marhan, S. (2011). Can differences in microbial abundances help explain enhanced N<sub>2</sub>O emissions in a permanent grassland under elevated atmospheric CO<sub>2</sub>? *Global Change Biology*, *17*(10), 3176-3186. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2011.02470.x>
- Ruiz-Villalba, A., Ruijter, J. M., & van den Hoff, M. J. B. (2021). Use and Misuse of C<sub>q</sub> in qPCR Data Analysis and Reporting. *Life*, *11*(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/life11060496>
- Schaufler, G., Kitzler, B., Schindlbacher, A., Skiba, U., Sutton, M. A., & Zechmeister-Boltenstern, S. (2010). Greenhouse gas emissions from European soils under different land use : Effects

- of soil moisture and temperature. *European Journal of Soil Science*, 61(5), 683-696.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.2010.01277.x>
- Schloss, P. D., Hay, A. G., Wilson, D. B., Gossett, J. M., & Walker, L. P. (2005). Quantifying bacterial population dynamics in compost using 16S rRNA gene probes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66(4), 457-463. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1727-y>
- Schmidt, E. L., & Belser, L. w. (1994). Autotrophic Nitrifying Bacteria. In *Methods of Soil Analysis* (p. 159-177). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.2136/sssabookser5.2.c10>
- Schulze, E. D., Luyssaert, S., Ciais, P., Freibauer, A., Janssens, I. A., Soussana, J. F., Smith, P., Grace, J., Levin, I., Thiruchittampalam, B., Heimann, M., Dolman, A. J., Valentini, R., Bousquet, P., Peylin, P., Peters, W., Rödenbeck, C., Etiope, G., Vuichard, N., ... Gash, J. H. (2009). Importance of methane and nitrous oxide for Europe's terrestrial greenhouse-gas balance. *Nature Geoscience*, 2(12), Article 12. <https://doi.org/10.1038/ngeo686>
- Seta, A. K., Blevins, R. L., Frye, W. W., & Barfield, B. J. (1993). Reducing Soil Erosion and Agricultural Chemical Losses with Conservation Tillage. *Journal of Environmental Quality*, 22(4), 661-665. <https://doi.org/10.2134/jeq1993.00472425002200040004x>
- Shakoor, A., Shahbaz, M., Farooq, T. H., Sahar, N. E., Shahzad, S. M., Altaf, M. M., & Ashraf, M. (2021). A global meta-analysis of greenhouse gases emission and crop yield under no-tillage as compared to conventional tillage. *Science of The Total Environment*, 750, 142299. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142299>
- Signor, D., & Cerri, C. E. P. (2013). Nitrous oxide emissions in agricultural soils : A review. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 43, 322-338. <https://doi.org/10.1590/S1983-40632013000300014>
- Song, X., Wei, H., Rees, R. M., & Ju, X. (2022). Soil oxygen depletion and corresponding nitrous oxide production at hot moments in an agricultural soil. *Environmental Pollution*, 292, 118345. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118345>
- Stahl, D. A., & de la Torre, J. R. (2012). Physiology and Diversity of Ammonia-Oxidizing Archaea. *Annual Review of Microbiology*, 66(1), 83-101. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150128>
- 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>

- Stocker, T. F., Qin, D., Plattner, G.-K., Tignor, M. M. B., Allen, S. K., Boschung, J., Nauels, A., Xia, Y., Bex, V., & Midgley, P. M. (2014). *Climate Change 2013 : The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of IPCC the Intergovernmental Panel on Climate Change*. In T. Stocker, D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex, & P. Midgley (Éds.), *Stocker, T. F.; Qin, D.; Plattner, G.-K.; Tignor, M. M. B.; Allen, S. K.; Boschung, J.; Nauels, A.; Xia, Y.; Bex, V.; Midgley, P. M. (éds.) (2014). Climate Change 2013 : The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of IPCC the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge : Cambridge University Press 10.1017/CBO9781107415324 <http://dx.doi.org/10.1017/CBO9781107415324>. Cambridge University Press. https://boris.unibe.ch/71452/*
- Strudley, M. W., Green, T. R., & Ascough, J. C. (2008). Tillage effects on soil hydraulic properties in space and time : State of the science. *Soil and Tillage Research*, 99(1), 4-48. <https://doi.org/10.1016/j.still.2008.01.007>
- Suleau, M., Debacq, A., Dehaes, V., & Aubinet, M. (2009). Wind velocity perturbation of soil respiration measurements using closed dynamic chambers. *European Journal of Soil Science*, 60(4), 515-524. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.2009.01141.x>
- Syakila, A., & Kroeze, C. (2011). The global nitrous oxide budget revisited. *Greenhouse Gas Measurement and Management*, 1(1), 17-26. <https://doi.org/10.3763/ghgmm.2010.0007>
- Syswerda, S. P., Basso, B., Hamilton, S. K., Tausig, J. B., & Robertson, G. P. (2012). Long-term nitrate loss along an agricultural intensity gradient in the Upper Midwest USA. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 149, 10-19. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2011.12.007>
- Theodorakopoulos, N., Lognoul, M., Degruene, F., Broux, F., Regaert, D., Muys, C., Heinesch, B., Bodson, B., Aubinet, M., & Vandenbol, M. (2017). Increased expression of bacterial amoA during an N2O emission peak in an agricultural field. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 236, 212-220. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2016.12.002>
- Thompson, R. L., Lassaletta, L., Patra, P. K., Wilson, C., Wells, K. C., Gressent, A., Koffi, E. N., Chipperfield, M. P., Winiwarter, W., Davidson, E. A., Tian, H., & Canadell, J. G. (2019). Acceleration of global N2O emissions seen from two decades of atmospheric inversion. *Nature Climate Change*, 9(12), Article 12. <https://doi.org/10.1038/s41558-019-0613-7>

- Tringe, S. G., & Hugenholtz, P. (2008). A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. *Current Opinion in Microbiology*, *11*(5), 442-446. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.09.011>
- Tzanakakis, V. A., Taylor, A. E., Bakken, L. R., Bottomley, P. J., Myrold, D. D., & Dörsch, P. (2019). Relative activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria determine nitrification-dependent N<sub>2</sub>O emissions in Oregon forest soils. *Soil Biology and Biochemistry*, *139*, 107612. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2019.107612>
- Ussiri, D. A. N., Lal, R., & Jarecki, M. K. (2009). Nitrous oxide and methane emissions from long-term tillage under a continuous corn cropping system in Ohio. *Soil and Tillage Research*, *104*(2), 247-255. <https://doi.org/10.1016/j.still.2009.03.001>
- Ussiri, D., & Lal, R. (2012). *Soil Emission of Nitrous Oxide and its Mitigation*. Springer Science & Business Media.
- Vangeli, S., Posse, G., Beget, M. E., Otero Estrada, E., Valdetaro, R. A., Oricchio, P., Kandus, M., & Di Bella, C. M. (2022). Effects of fertilizer type on nitrous oxide emission and ammonia volatilization in wheat and maize crops. *Soil Use and Management*, *38*(4), 1519-1531. <https://doi.org/10.1111/sum.12788>
- van Kessel, C., Venterea, R., Six, J., Adviento-Borbe, M. A., Linnquist, B., & van Groenigen, K. J. (2013). Climate, duration, and N placement determine N<sub>2</sub>O emissions in reduced tillage systems: A meta-analysis. *Global Change Biology*, *19*(1), 33-44. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2012.02779.x>
- van Spanning, R. J. M., Richardson, D. J., & Ferguson, S. J. (2007). Chapter 1—Introduction to the Biochemistry and Molecular Biology of Denitrification. In H. Bothe, S. J. Ferguson, & W. E. Newton (Éds.), *Biology of the Nitrogen Cycle* (p. 3-20). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-044452857-5.50002-3>
- Velthof, G. I., & Oenema, O. (1995). Nitrous oxide fluxes from grassland in the Netherlands: II. Effects of soil type, nitrogen fertilizer application and grazing. *European Journal of Soil Science*, *46*(4), 541-549. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.1995.tb01350.x>
- Venterea, R. T., Petersen, S. O., de Klein, C. A. M., Pedersen, A. R., Noble, A. D. L., Rees, R. M., Gamble, J. D., & Parkin, T. B. (2020). Global Research Alliance N<sub>2</sub>O chamber methodology guidelines: Flux calculations. *Journal of Environmental Quality*, *49*(5), 1141-1155. <https://doi.org/10.1002/jeq2.20118>

- Vieten, B., Conen, F., Seth, B., & Alewell, C. (2008). The fate of N<sub>2</sub>O consumed in soils. *Biogeosciences*, 5(1), 129-132. <https://doi.org/10.5194/bg-5-129-2008>
- Waldo, S., Russell, E. S., Kostyanovsky, K., Pressley, S. N., O'Keefe, P. T., Huggins, D. R., Stöckle, C. O., Pan, W. L., & Lamb, B. K. (2019). N<sub>2</sub>O Emissions From Two Agroecosystems : High Spatial Variability and Long Pulses Observed Using Static Chambers and the Flux-Gradient Technique. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, 124(7), 1887-1904. <https://doi.org/10.1029/2019JG005032>
- Wang, C., Amon, B., Schulz, K., & Mehdi, B. (2021). Factors That Influence Nitrous Oxide Emissions from Agricultural Soils as Well as Their Representation in Simulation Models : A Review. *Agronomy*, 11(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/agronomy11040770>
- Wang, J., Chadwick, D. R., Cheng, Y., & Yan, X. (2018). Global analysis of agricultural soil denitrification in response to fertilizer nitrogen. *Science of The Total Environment*, 616-617, 908-917. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.229>
- Wey, H., Hunkeler, D., Bischoff, W.-A., & Bünemann, E. K. (2021). Field-scale monitoring of nitrate leaching in agriculture : Assessment of three methods. *Environmental Monitoring and Assessment*, 194(1), 4. <https://doi.org/10.1007/s10661-021-09605-x>
- Wrage, N., Velthof, G. L., van Beusichem, M. L., & Oenema, O. (2001). Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(12), 1723-1732. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(01\)00096-7](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(01)00096-7)
- Wrage-Mönnig, N., Horn, M. A., Well, R., Müller, C., Velthof, G., & Oenema, O. (2018). The role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide revisited. *Soil Biology and Biochemistry*, 123, A3-A16. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.03.020>
- Xu, J., Wei, Q., Yang, S., Liao, L., Qi, Z., & Wang, W. (2018). Soil degassing during watering : An overlooked soil N<sub>2</sub>O emission process. *Environmental Pollution*, 242, 257-263. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.06.103>
- Yue, K., Fornara, D. A., Heděnc, P., Wu, Q., Peng, Y., Peng, X., Ni, X., Wu, F., & Peñuelas, J. (2023). No tillage decreases GHG emissions with no crop yield tradeoff at the global scale. *Soil and Tillage Research*, 228, 105643. <https://doi.org/10.1016/j.still.2023.105643>
- Zhang, H., Fang, Y., Chen, Y., Li, Y., Lin, Y., Wu, J., Cai, Y., & Chang, S. X. (2022). Enhanced soil potential N<sub>2</sub>O emissions by land-use change are linked to AOB-amoA and nirK gene

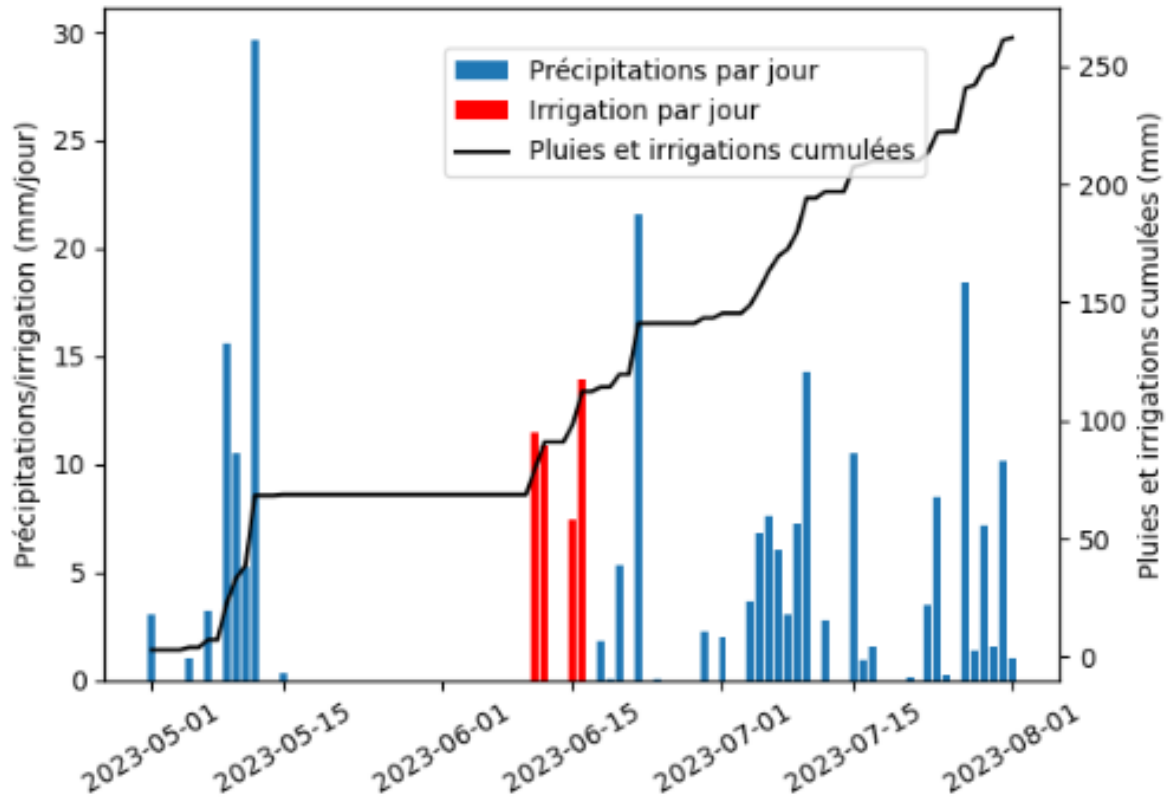


abundances and denitrifying enzyme activity in subtropics. *Science of The Total Environment*, 850, 158032. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158032>

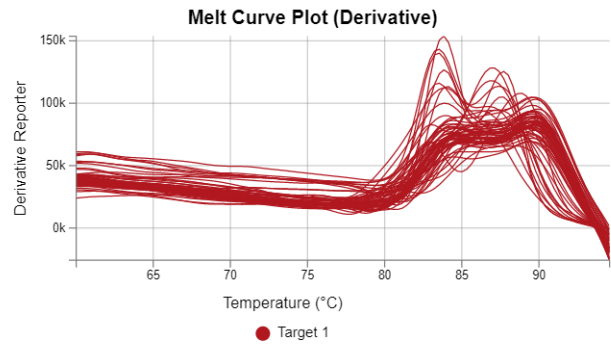
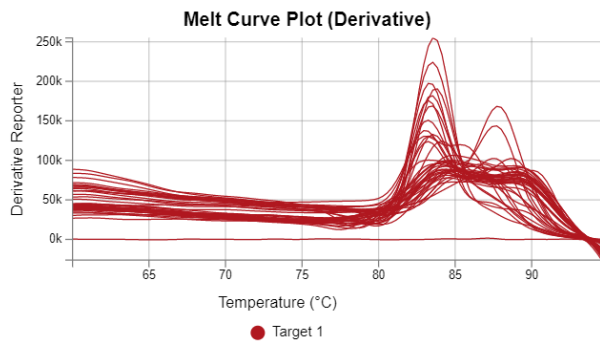
Zhang, J., Müller, C., & Cai, Z. (2015). Heterotrophic nitrification of organic N and its contribution to nitrous oxide emissions in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 84, 199-209. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.02.028>

Zhang, L., Jing, Y., Chen, C., Xiang, Y., Rezaei Rashti, M., Li, Y., Deng, Q., & Zhang, R. (2021). Effects of biochar application on soil nitrogen transformation, microbial functional genes, enzyme activity, and plant nitrogen uptake : A meta-analysis of field studies. *GCB Bioenergy*, 13(12), 1859-1873. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12898>

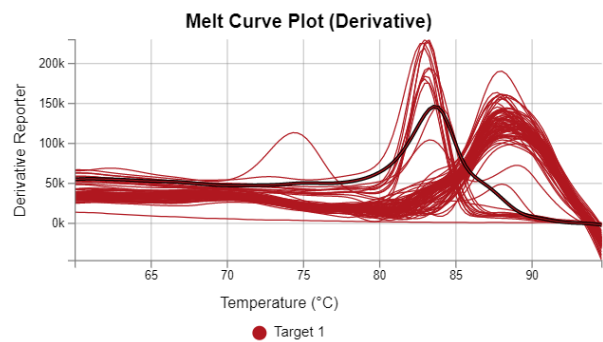
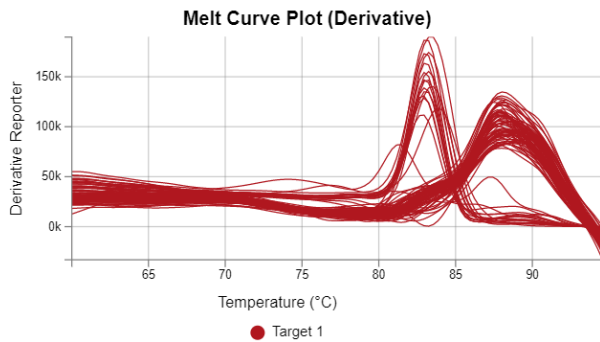
## 8. ANNEXES



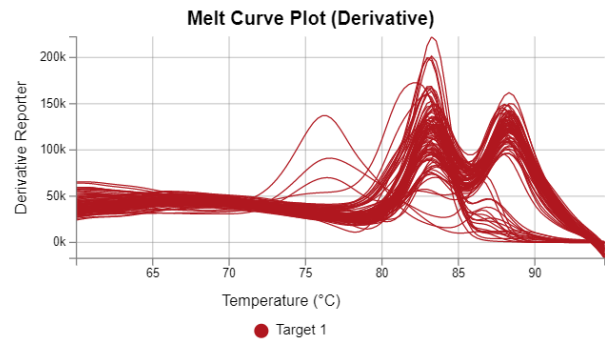
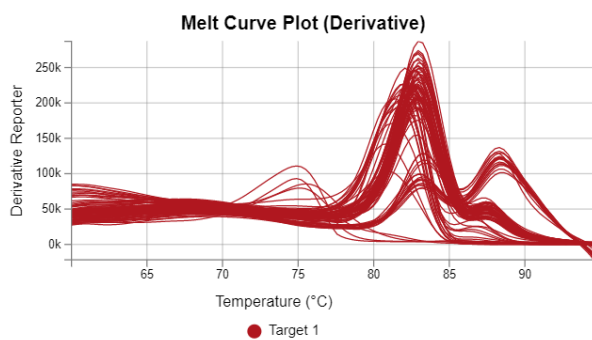
Annexe 1 : *Précipitations journalières et cumulées à Lonzée sur la période du 01/05/2023 au 01/08/2023 exprimées en mm.*



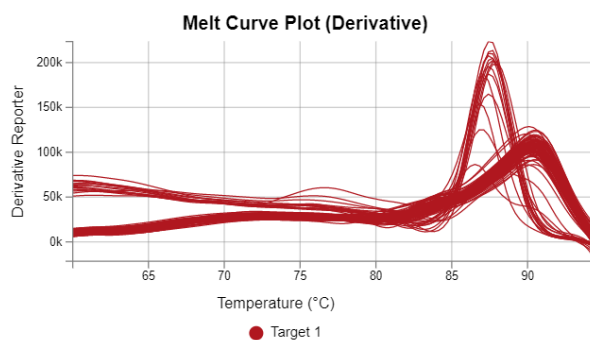
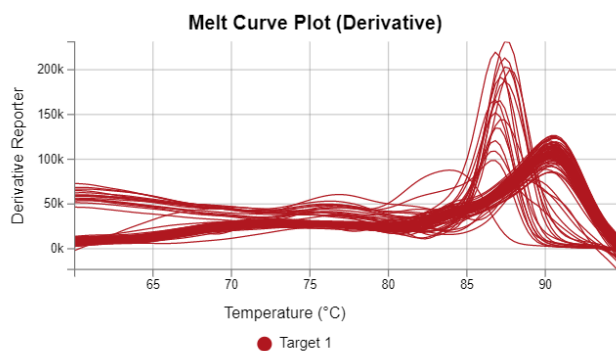
Annexe 2 : Comparaison des courbes de dénaturation pour le gène *16S rRNA* bactérien, échantillons 1 à 24 (12, 16 et 21 juin, gauche) et 25 à 48 (23, 25 et 30 juin, droite).



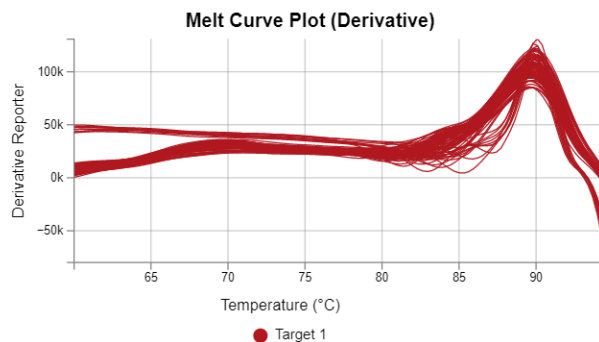
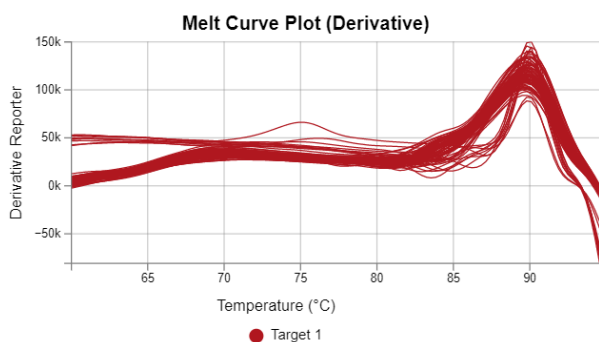
Annexe 3 : Comparaison des courbes de dénaturation pour le gène *amoA* bactérien, échantillons 1 à 24 (12, 16 et 21 juin, gauche) et 25 à 48 (23, 25 et 30 juin, droite).



Annexe 4 : Comparaison des courbes de dénaturation pour le gène *amoA* archéen, échantillons 1 à 24 (12, 16 et 21 juin, gauche) et 25 à 48 (23, 25 et 30 juin, droite).



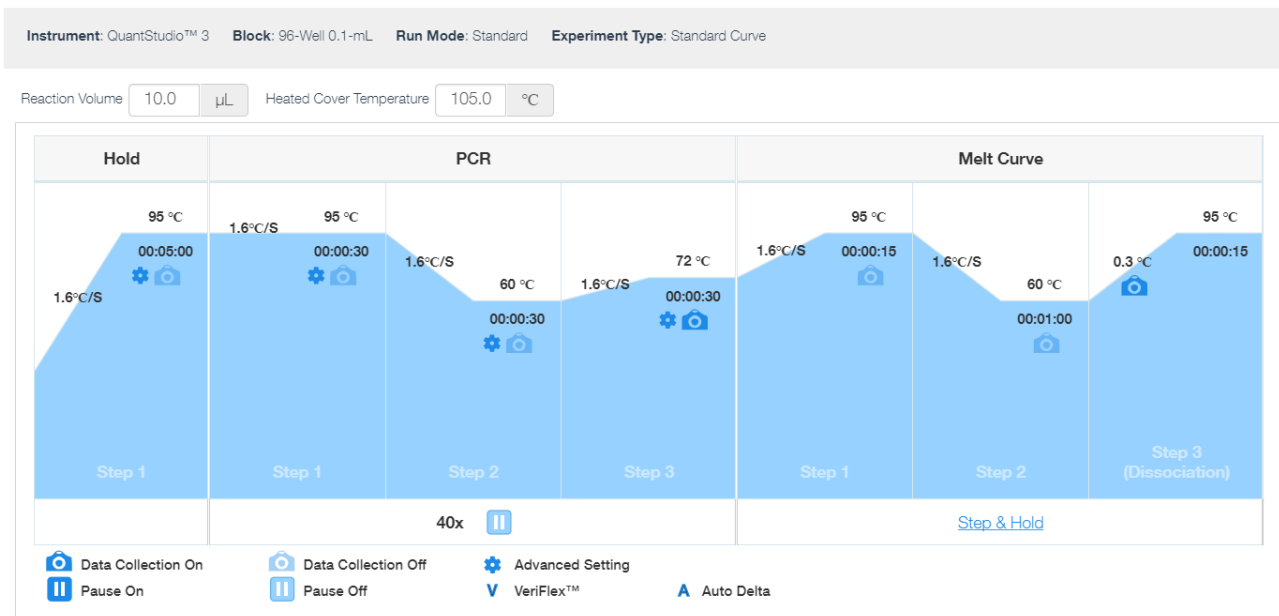
Annexe 5 : Comparaison des courbes de dénaturation pour le gène *nirK*, échantillons 1 à 24 (12, 16 et 21 juin, gauche) et 25 à 48 (23, 25 et 30 juin, droite).



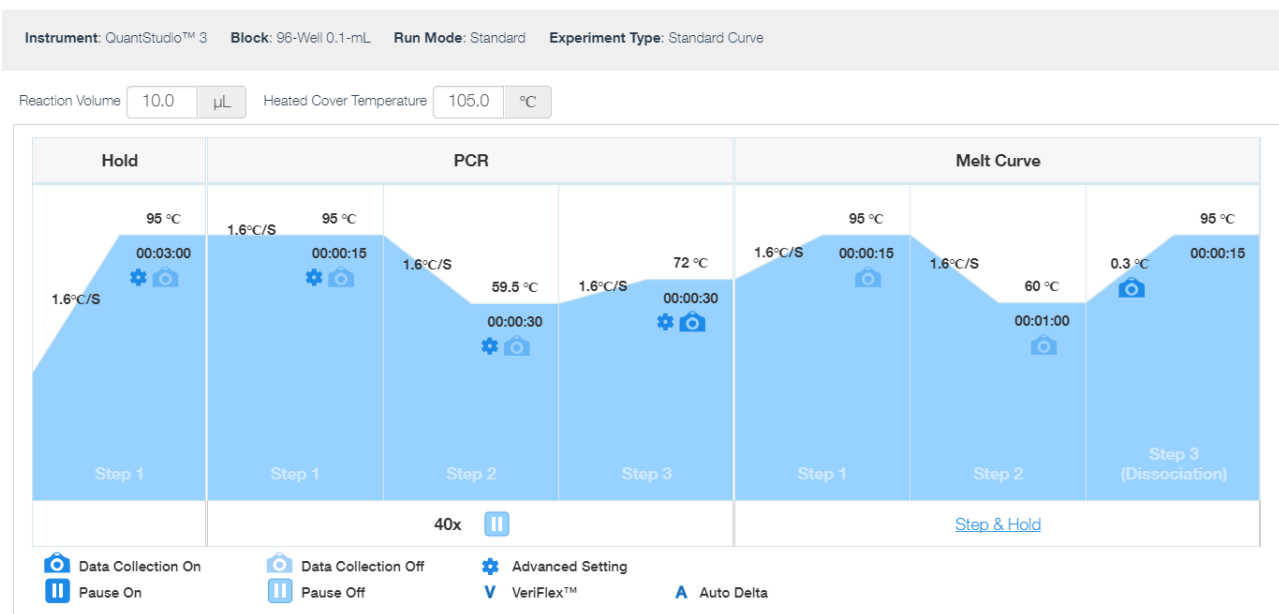
Annexe 6 : Comparaison des courbes de dénaturation pour le gène *nirS*, échantillons 1 à 24 (12, 16 et 21 juin, gauche) et 25 à 48 (23, 25 et 30 juin, droite).

Date	Name	Samples ID	Initial DNA concentration (ng.uL-1)	Dilution factor	Wet Soil (g)
12-06-23	CT1	1	81	8.1	0.25
	CT2	2	75	7.5	0.247
	CT3	3	63	6.3	0.255
	CT4	4	88	8.8	0.24
	RT1	5	87	8.7	0.254
	RT2	6	83	8.3	0.25
	RT3	7	110	11	0.247
	RT4	8	96	9.6	0.268
16-06-23	CT1	9	81	8.1	0.248
	CT2	10	63	6.3	0.252
	CT3	11	60	6	0.258
	CT4	12	62	6.2	0.259
	RT1	13	115	11.5	0.246
	RT2	14	110	11	0.251
	RT3	15	88	8.8	0.249
	RT4	16	93	9.3	0.267
21-06-23	CT1	17	59	5.9	0.28
	CT2	18	55	5.5	0.262
	CT3	19	52	5.2	0.257
	CT4	20	53	5.3	0.247
	RT1	21	78	7.8	0.256
	RT2	22	83	8.3	0.256
	RT3	23	78	7.8	0.255
	RT4	24	75	7.5	0.256
23-06-23	CT1	25	41	4.1	0.263
	CT2	26	44	4.4	0.253
	CT3	27	37	3.7	0.272
	CT4	28	42	4.2	0.263
	RT1	29	75	7.5	0.255
	RT2	30	68	6.8	0.259
	RT3	31	74	7.4	0.274
	RT4	32	102	10.2	0.246
25-06-23	CT1	33	40	4	0.253
	CT2	34	38	3.8	0.28
	CT3	35	52	5.2	0.246
	CT4	36	64	6.4	0.272
	RT1	37	106	10.6	0.244
	RT2	38	82	8.2	0.269
	RT3	39	92	9.2	0.241
	RT4	40	99	9.9	0.282
30-06-23	CT1	41	75	7.5	0.249
	CT2	42	59	5.9	0.255
	CT3	43	51	5.1	0.266
	CT4	44	44	4.4	0.244
	RT1	45	81	8.1	0.257
	RT2	46	79	7.9	0.254
	RT3	47	69	6.9	0.253
	RT4	48	70	7	0.251

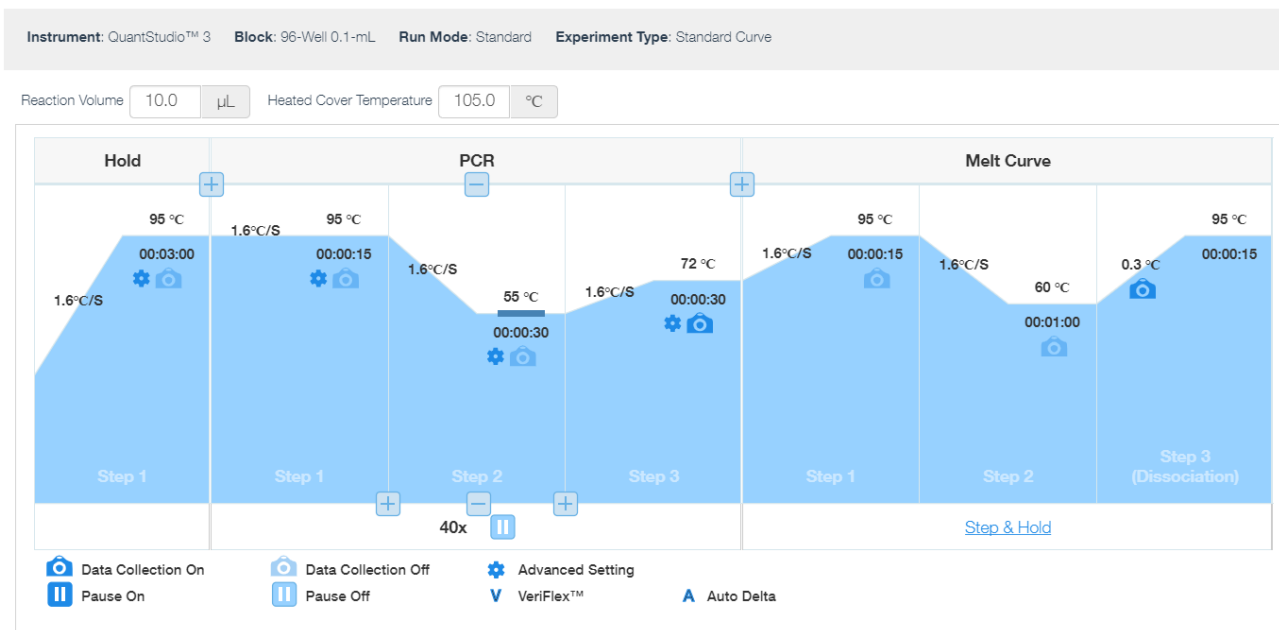
Annexe 7 : Tableau récapitulatif des échantillons utilisé pour l'analyse biomoléculaire. Indique la concentration d'ADN de chaque échantillon dans un sol humide et le facteur de dilution nécessaire afin de porter chaque extrait à la concentration de 10 ng d'ADN/ $\mu$ L.



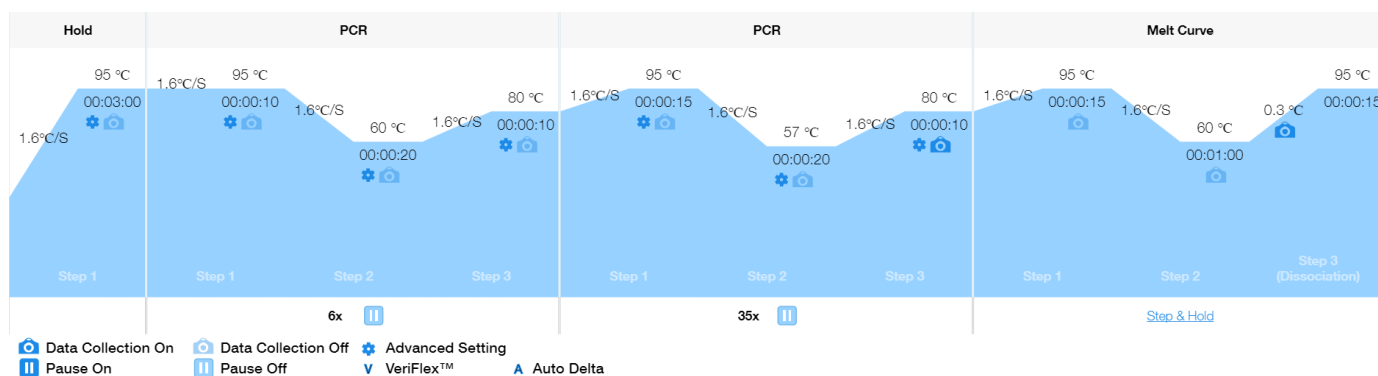
Annexe 8 : Programme de qPCR pour le gène 16S rRNA bactérien sur le logiciel Design and Analysis 2.



Annexe 9 : Programme de qPCR pour le gène amoA bactérien sur le logiciel Design and Analysis 2.

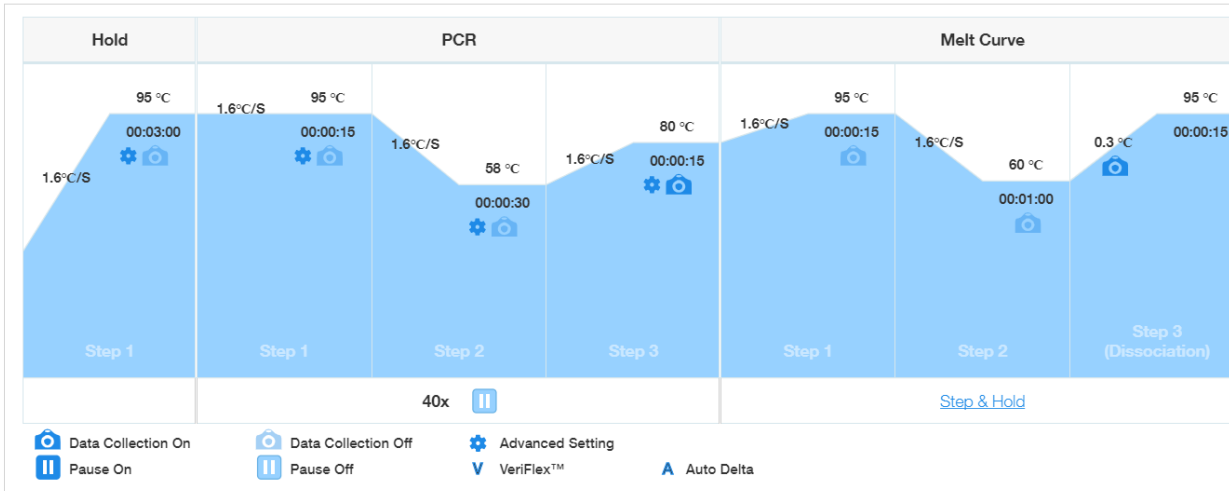


Annexe 10 : Programme de qPCR pour le gène amoA archéen sur le logiciel Design and Analysis 2.



Annexe 11 : Programme de qPCR pour le gène nirK sur le logiciel Design and Analysis 2.

Reaction Volume 10.0 µL Heated Cover Temperature 105.0 °C



Annexe 12 : Programme de qPCR pour le gène nirS sur le logiciel Design and Analysis 2.

« ANNEXE II

Transformation d'une unité exprimée en mg N-NO<sub>3</sub> /l en une unité exprimée en kg N-NO<sub>3</sub>/ha

$$N(\text{kgN} - \text{NO}_3 / \text{ha}) = \frac{C \times \left( V + \frac{(100 - MS) \times m}{100} \right) \times d \times P \times (100 - Cc)}{MS \times m \times 10}$$

Avec

C = concentration massique en N-NO<sub>3</sub> dans l'extrait de sol en mg/l

V = volume de solution d'extraction en ml

MS = teneur en matière sèche de sol brut exprimée en pourcent

m = masse de sol brut en g

d = densité sèche = valeurs standard de poids spécifique apparent sur sol sec par couche, soit, 1,35 t/m<sup>3</sup> pour la couche supérieure (0-30 cm), 1,5 t/m<sup>3</sup> pour les autres couches (30-60 cm et 60-90 cm) en terre arable et 1,3 t/m<sup>3</sup> en prairie.

P = profondeur de l'horizon en cm

Cc = le pourcentage de charge caillouteuse extrait de la carte numérique des sols de Wallonie

Annexe 13 : Transformation d'une unité exprimée en mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L (ou mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L) en une unité exprimée en kg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/ha (ou kg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/ha). Arrêté ministériel du 13 février 2013 portant certaines dispositions d'exécution relatives aux techniques de mesure de l'azote potentiellement lessivable et au "survey surfaces agricoles" en application du chapitre IV de la partie réglementaire du Code de l'Environnement constituant le Code de l'Eau