

Facteurs de contrôle de la production de N₂O par dénitrification.

Bilans des émissions à l'échelle du bassin

Josette Garnier¹, Emmanuelle Mounier¹, Anun Martinez¹, Annet Laverman¹, Jennifer Martin¹, Catherine Cremer¹, Mathieu Sebilo², Karine Lot², Gilles Billen¹, Marie Silvestre¹, Céline Amsaleg¹, Mohamed Herbal¹, Guillaume Vilain¹, Jaufrey Chollet¹

¹UPMC, UMR Sisyphe 7619, CNRS, Boite 123, 4 place Jussieu 75005 Paris

²UPMC, UMR BioEmco 7618, CNRS, Boite 130, 4 place Jussieu 75005 Paris

1. Introduction.....	3
2. Sites d'étude – Matériel et méthodes	3
2.1. Sites d'études et stratégies d'échantillonnage	3
2.2. Matériel	5
2.2.1 Les réacteurs	5
2.2.2 Les Batches	6
2.3. Analyses.....	7
2.3.1 Analyses des formes de l'azote	7
2.3.2 Calcul de la production de N ₂ O dans les expériences	7
2.3.3 Les techniques de biologie moléculaire	7
3. Résultats	8
3.1. Dénitrification et émissions de N₂O en conditions contrôlées.....	8
3.1.1 Effet du nitrate.....	8
3.1.2 Effet du carbone	11
3.1.3 Rôle de la température et du pH.....	12
3.2. Variations spatiales et temporelles des concentrations en N₂O de l'eau	12
3.2.1 Variations temporelles	12
3.2.2 Variations spatiales	13
3.3. Distribution des concentrations et composition isotopique des nitrates.....	14
3.4. Variation du potentiel de dénitrification.....	15
3.4.1 Détermination.....	15
3.4.2 Variations de la dénitrification potentielle et de la production de N ₂ O.....	16
3.5. Pratiques agricoles et émissions de N₂O.....	17
3.5.1 Distribution de la concentration de N ₂ O dans l'eau en fonction de l'occupation des terres. Bilan des surfaces en eau	17
3.5.2 Bilan de N ₂ O des terres agricoles.....	17
3.5.3 Bilan d'azote dans le bassin	18
3.6. Caractérisation des communautés bactériennes dénitrifiantes.....	19
4. Conclusions et perspectives	20
5. Références	22

Résumé

Il a été montré que l'excès anthropique du transfert fluvial d'azote vers l'océan ne représente en moyenne que 25% du total des apports nets d'azote d'origine humaine aux surfaces continentales. La plus grande part des 75% restant est transformée dans le continuum sol, zone humide, rivière, estuaire par des processus microbiologiques, nitrification et dénitrification. La dénitrification aboutissant à l'émission de N_2 constitue une élimination. Toutefois le N_2O dont on connaît le rôle comme gaz à effet de serre est un produit intermédiaire de cette dénitrification et nous avons entrepris d'en comprendre les facteurs de contrôle et d'en quantifier les émissions dans les milieux, avec une perspective de modélisation. Le bassin de la Seine constitue un cas exemplaire d'un bassin fortement anthropisé, siège d'une agriculture très productive et d'une mégapole parmi les plus peuplées d'Europe conduisant à des apports diffus et ponctuels d'azote très important.

Des expériences en laboratoire ont été menées en réacteurs à flux continu sur des sédiments non déstructurés ou en batchs sur des sédiments mis en suspension afin d'analyser le rôle du nitrate, carbone, pH, et température sur la dénitrification et les émissions de N_2O associées.

Des campagnes de terrains ont été réalisées à l'échelle du bassin de la Seine, à environ 70 stations, en saisons hivernales (mars 2006, février 2007) et estivales (juin 2006, juin 2007) pour appréhender les variations des formes de l'azote inorganiques dissoutes et celles du N_2O en fonction -outre la saison- de l'ordre et de l'occupation du sol dans le bassin, en amont du point de prélèvement. Le fractionnement isotopique du nitrate a été également analysé pour approfondir nos connaissances de la dénitrification.

Enfin en se basant sur des coefficients d'émission de N_2O issus de la littérature, il a été possible de calculer un bilan des émissions à l'échelle du bassin de la Seine en tenant compte de l'utilisation des terres. Les émissions sont estimées dans une large gamme de 3000 à 30000 TN- N_2O /an, le chiffre le plus bas étant proche d'une estimation précédente calculée selon l'IPCC en considérant les apports fertilisants. Ces travaux confirment que les émissions de N_2O par les sols agricoles sont plus élevées que les émissions aux interfaces eau-air des surfaces en eau ; ils montrent aussi que le N_2O dissous dans l'eau des rivières des têtes de bassins est influencé par la proportion des grandes cultures, surtout en été.

1. Introduction

Le N_2O , au même titre que le gaz carbonique (CO_2) ou le méthane (CH_4), est un gaz à effet de serre, et contribue donc au réchauffement climatique global. Il est impliqué également dans la destruction de la couche d'ozone, ce qui justifie une attention particulière aux mécanismes responsables de ses émissions. 20 % des gaz à effet de serre proviennent de l'agriculture, et en France 56 % sont liés au N_2O contre 11 % et 33 % pour le CO_2 et le CH_4 respectivement. Les deux processus de dénitrification et de nitrification (la nitrification dénitrifiante en particulier) sont à l'origine d'une production importante d'oxyde nitreux (N_2O). Le réseau hydrographique de la Seine, des têtes de bassins à l'estuaire, offre un cas d'étude idéal pour l'étude des perturbations du cycle de l'azote par l'activité humaine à l'échelle régionale.

Alors que le processus de nitrification a dominé dans la colonne d'eau de l'axe principal du fleuve à l'aval de Paris, avant le traitement de la nitrification en stations d'épuration (Brion & Billen, 1998 ; Brion et al., 2000 ; Cébron et al., 2003, 2005 ; Garnier et al., 2001, 2006), la dénitrification est le processus dominant dans les zones riveraines des petits cours d'eau (Billen & Garnier, 1999, Sebilo et al., 2003) et dans les sédiments des grands cours d'eau régulés (ordre 5-7) et de leurs annexes hydrauliques (barrages réservoirs, Garnier et al., 1999).

Un objectif des travaux menés au cours de l'année 2007, prenant appui sur ceux de 2006, est de déterminer les cinétiques de production de N_2O par la dénitrification en conditions expérimentales contrôlées afin d'établir un module associant les émissions de N_2O à la dénitrification (cf. Thouvenot et al., 2007 ; soumis). Nous avons aussi mesuré les concentrations de N_2O dans les cours d'eau, résultants i) de sa production aux interfaces, ii) de sa ventilation en fonction de l'ordre des cours d'eau et de sa production par les sédiments des fonds de rivières. Un autre objectif a été d'établir le bilan d'azote à l'échelle du bassin et de quantifier les émissions de N_2O associées à différentes occupations des sols (forêts, prairies, terres arables). La démarche, celle que nous avons utilisée depuis plus de 15 ans dans le cadre du programme PIREN-Seine, allie les observations de terrains, l'expérimentation en laboratoire et la modélisation.

2. Sites d'étude – Matériel et méthodes

2.1. Sites d'études et stratégies d'échantillonnage

Des prélèvements ont été effectués à l'échelle du Bassin de la Seine en périodes hivernale et estivale en 2006 et 2007, en 70 à 80 stations choisies pour être représentatives de l'ensemble des ordres des rivières (de 1 à 7) et de l'occupation des sols (Figure 1).

Ces stations sont réparties sur les bassins de la Marne, de l'Oise, de l'Eure, de l'Yonne et de Seine Amont, ainsi que sur les grands axes de ces rivières et sur la Basse Seine, de Paris à Poses (Figure 1).

Outre les prélèvements à des périodes clé à l'échelle du bassin, un échantillonnage mensuel a été réalisé sur le bassin du Grand Morin et à l'exutoire de la Marne pour appréhender les variations saisonnières de manière plus fine. Le bassin du Grand Morin est dominé par les grandes cultures (Tableau 1).

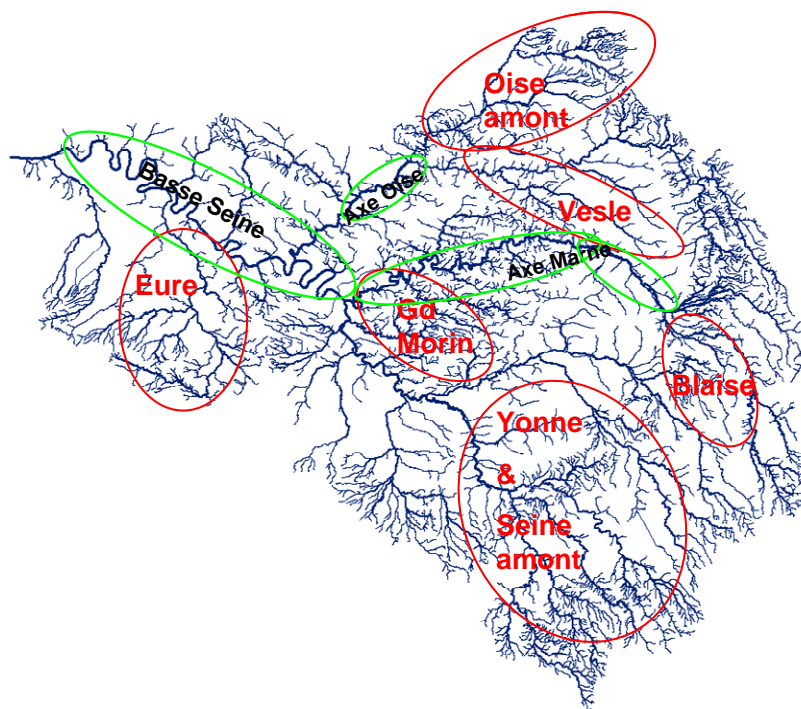


Figure 1. Zone échantillonnées dans le réseau hydrographique de la Seine

Le logiciel AI-Préshume (cf Silvestre et al., 2008 ; RA PIREN 2007) a été spécialement conçu pour décrire les bassins à l'amont de chacune des stations de prélèvement identifiées par leur coordonnées géographiques.

Tableau 1. Caractéristiques des stations du Grand Morin (ordre de Strahler, superficie, population, densité de population, et pourcentage de l'occupation du sols en terme de terres arables prairies et forêts.

	ordre	Surface	Population	Densité	Terres arables	Prairies	Forêts
stations		km ²	Nbre Hab	Hab/km ²	%	%	%
Source	1	16			98.0	0.0	0.0
Melarchez	1	16			98.0	0.0	0.0
La Loge	1	10			46.0	0.0	52.0
Avenelles	2	45	3,465	77.00	80.4	0.0	15.0
Theil	3	106	8,804	83.10	77.7	0.7	18.9
Tresmes	4	1,059	63,083	59.60	75.6	1.6	15.5
St Maurice	6	12822	2092010	163.2	53.7	8.2	26.0

AI:Préshume se base sur la densité de pop communale et l'extrapolle aux bassins versants élémentaires. méthode qui ne convient pas pour les petits bassins comme la Source, Melarchez et La Loge,

En même temps que sont mesurées sur le terrain les variables classiques (oxygène, pH, température), qui peuvent éventuellement renseigner sur la pertinence des stations choisies (pollution par exemple), de l'eau est prélevée aux différentes stations avec un seau ou une bouteille. Un échantillon de 100 ml destiné à l'analyse du N₂O dissous dans l'eau est stocké immédiatement dans des flacons de verre, traité au chlorure mercurique afin de stopper toute activité bactérienne puis scellé hermétiquement jusqu'à l'analyse en chromatographie en phase gazeuse.

NB : En 2007, deux échantillons ont été prélevés pour les gaz, l'échantillon supplémentaire étant destiné à l'analyse du méthane (CH₄), analyses qui n'ont pas été encore réalisées.

Prélèvements d'eau. Pour chaque station, de l'eau (5 à 10 L) est ramenée au laboratoire pour i) l'analyse de la matière en suspension -MES-, du carbone organique particulaire -COP-, (filtration sur des filtres Whatman GF/F pré-grillés à 500 °C et pré-pesés) et de l'ADN (membranes PVDF de 0,22 µm) pour caractériser les populations microbienne, ii) la mesure des formes dissoutes inorganiques de l'azote (NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+), de la concentration du N_2O dissous et iii) la mesure de la composition isotopique (^{15}N et ^{18}O) des nitrates.

Prélèvements de sédiment. Des sédiments ont été régulièrement prélevés avec un petit carottier (cf Garnier et al., 2007) à la station de Tresmes du Grand Morin, pour la réalisation des expériences de dénitrification et d'émission de N_2O en réacteurs ou en batchs (Tableau 2).

Lors de campagne estivale de l'été 2007, des sédiments pour y déterminer par des expériences en batchs, le potentiel de dénitrification et les émissions de N_2O associés. Le carbone organique biodégradable (dissous et particulaire) a également été déterminé sur ces échantillons, sur lesquels une recherche des communautés des bactéries dénitrifiantes sera aussi effectuée.

Tableau 2. Caractéristiques de la colonne d'eau et des sédiments des prélèvements de Tresmes destinés aux expériences en réacteurs.

	T °C	pH	O ₂ mg/l	NO ₃ ⁻ mgN/l	NO ₂ ⁻ mgN/l	NH ₄ ⁺ mgN/l	MES mg/l	N ₂ O µgN/l	Oganic carbon mg/g	Organic matter %	Total Nitrogen mg/g	C/N	NO ₃ ⁻ µgN/g	NO ₂ ⁻ µgN/g	NH ₄ ⁺ µgN/g	moisture %
December 2005	6.6	7.3	10.4	7.71	0.13	0.36	3.6	0.23	8.3	14.4	0.3	24.1	0.24	> 0,01	11.90	30.9
April 2006	12.8	8.1	9.5	6.63	0.13	0.42	4.0	1.86	8.7	15.0	0.6	14.7	0.08	0.08	4.43	31.8
July 2006	22.0	7.6	6.9	6.18	0.13	0.00	3.7	1.55	6.9	11.9	0.4	17.9	0.78	0.09	6.63	31.6
01 August 2006	18.4	7.7	7.4	7.31	0.10	0.04	2.2		14.8	25.6	0.4	37.5	1.07	0.00	5.35	30.2
28 August 2006	15.5	7.6	9.8	8.14	0.20	0.17	2.5		14.8	25.6	0.4	37.5	118.61	0.03	4.88	27.5
06 November 2006	8.7	8.0	7.5	7.31	0.22	0.35	2.9		5.8	10.1	0.4	15.3	2.36	0.04	4.64	38.3
28 November 2006	10.6	7.5	7.6	10.70	0.15	1.02	13.8	1.38	33.3	57.5	3.1	10.8	7.20	0.00	87.20	52.8
January 2007				13.13	0.04	0.39	27.0		12.3	21.2	0.8	15.7	5.31	0.08	6.50	45.9
March 2007	9.5	8.0	11.1	8.14	0.06	0.41	6.7	0.66	11.4	19.7	0.7	15.5	1.15	0.02	2.40	40.0
11 April 2007	16.5	7.9	9.3	6.68	0.25	0.40	5.0	0.74	5.7	9.8	0.3	19.5	0.04	6.50	6.30	22.1
17 April 2007	16.5	7.9	9.3	6.68	0.25	0.40	5.0	0.74	5.7	9.8	0.3	19.5	0.52	0.04	12.00	22.1
24 April 2007	16.5	7.9	9.3	6.68	0.25	0.40	5.0	0.74	5.4	9.3	0.4	15.0	0.05	0.29	4.97	24.8

2.2. Matériel

2.2.1 Les réacteurs

Les échantillons transportés au laboratoire dans le carottier, sont montée en réacteurs à l'arrivée au laboratoire puis placées dans le réfrigérateur jusqu'au lancement de l'expérience (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**).

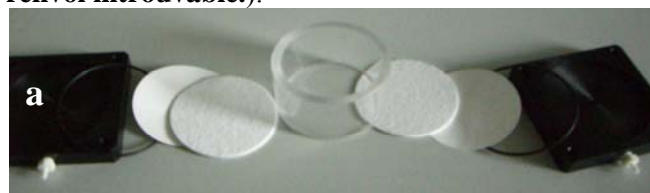


Figure 2. Photos du dispositif de prélèvements du sédiment et d'un réacteur a) Carottier. b) Réacteur avant montage. c) Réacteur monté. d) système complet. (Laverman et al. 2006)

Pour chaque traitement, des échantillons liquides sont prélevés pour des intervalles réguliers dans des flacons hermétiques (2 heures environ) pendant une soixantaine d'heures pour que les conditions stationnaires dans le réacteur soient bien établies (soit au total environ 25 échantillons). A la fin de l'expérience, les flacons sont agités 5 minutes et 5 ml d'atmosphère sont prélevés à l'aide d'une seringue étanche aux gaz puis injectés dans des flacons de 5 ml, hermétiquement clos par un septum et sous vide (Venjects). Ce prélèvement destiné à la détermination du N_2O , est conservé jusqu'à analyse au chromatographe en phase gazeuse. L'échantillon liquide du flacon à pénicilline est conservé en totalité, congelé à $-20^{\circ}C$ jusqu'à l'analyse des formes dissoutes de l'azote.

Au début et à la fin de l'expérience en réacteur, des échantillons de sédiments sont prélevés : 3 fois 0.5 mg pour les analyses par les outils de la biologie moléculaire, 5 g pour l'extraction au KCl et une dizaine de gramme pour le taux d'humidité et la perte au feu. Le reste est congelé pour les autres analyses (granulométrie, carbone, azote, etc.).

Les études en réacteurs sont réalisées selon Laverman et al. (2006) avec un débit de pompe d'environ 8.4 ml/h, le volume des réacteurs étant de 41.54 cm³. Les réacteurs sont alimentés en continu pendant 2 à 3 jours, période pendant laquelle les prélèvements sont effectués à la sortie pendant 1h30 dans un tube de 15 ml. 2 prélèvements par jour sont effectués pour analyser le N_2O . Ces expériences relatives à la dénitrification sont effectuées en anaérobiose en triplicat.

L'influence du nitrate sur le taux de dénitrification et la production de N_2O a été testée sur plusieurs séries de réacteurs dans une gamme de nitrate ajouté de 1 à 200 mgN/l. Le rôle du carbone a été exploré dans une gamme de carbone ajouté sous forme d'acétate de 2 à 30 mg C/L, la concentration en nitrate était maintenue saturante à 60 mg N/L.

2.2.2 Les Batches

Le potentiel de dénitrification et la production de N_2O associée ont été déterminés selon la Figure 3, sur des sédiments de Tresmes, pour explorer le rôle de la température et du pH.

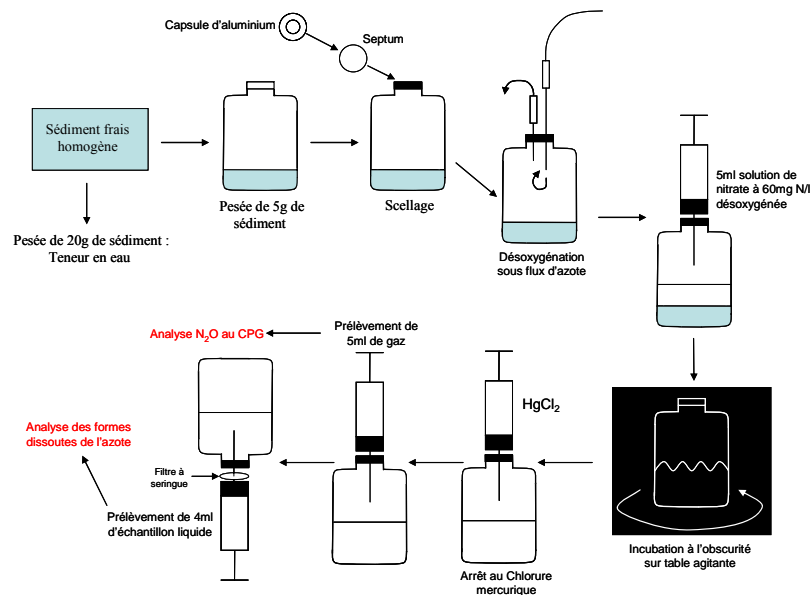


Figure 3. Schéma d'expérimentation en batch pour déterminer la dénitrification potentielle et la production associée de N_2O .

Les potentiels de dénitrification ont aussi été déterminés sur des sédiments des rivières échantillonnées à l'échelle du bassin en juillet 2007, afin d'appréhender la variabilité spatiale.

2.3. Analyses

2.3.1 Analyses des formes de l'azote

Les concentrations en nitrate sont déterminées après une réduction du nitrate en nitrite: 1 ml d'échantillon est passé sur une colonne de cadmium spongieux, dans un tampon basique. La totalité du nitrite (nitrite + nitrate réduit) est alors dosée par la coloration de Griess-Ilosway, à 540 nm au spectrophotomètre (Keenay & Nelson, 1982). Le nitrite de l'échantillon est analysé sans réduction. La concentration en nitrate est donc calculée par différence.

L'ammonium est dosé par spectrophotométrie par la méthode du bleu d'indophénol (Slavyck & Isaac, 1972).

Le N₂O produit lors de la dénitrification est dosé par un Chromatographe en Phase Gazeuse (CPG) à capture d'électron (Perichrome). La calibration est réalisée à chaque nouvelle utilisation de l'appareil.

Pour la mesure de dénitrification (batches ou réacteurs), les concentrations de N₂O sont déterminées directement en injectant dans le chromatographe, un volume de gaz connu dans l'atmosphère du flacon (head space). Pour calculer le N₂O total produit pendant l'expérience, il faut tenir compte également de la quantité de N₂O dissous dans le flacon (5 ml de liquide).

La concentration du N₂O dans l'eau des rivières est mesurée de la même manière, mais après un dégazage de l'échantillon d'eau (conditionné sans bulle d'air).

2.3.2 Calcul de la concentration de N₂O dans les expériences

A partir de la surface du pic de N₂O gazeux, la quantité de N-N₂O dégagé, exprimée en µg par gramme de sédiment sec est calculée selon la formule, qui tient compte à la fois de la quantité retrouvée dans la phase gazeuse du flacon et de celle dissoute dans les 5 ml de la phase liquide :

$$\left[(K \times 0,6937 \cdot S \times \frac{2,22 \cdot 10^{-6}}{C} \times RT) \cdot \frac{V_1}{1000} + (0,6937 S \times \frac{2,22 \cdot 10^{-6}}{C} \cdot \frac{V_g}{1000}) \right] \times 2M \times 10^6 \times \frac{1/m}{\frac{100-H}{H}}$$

N-N₂O dans la phase liquide N-N₂O dans la phase gazeuse

où :

k : coefficient de solubilité du N₂O dans l'eau à 22°C , soit 2,7 . 10⁻² mol.l⁻¹.atm⁻¹

S: surface du pic de N₂O mesuré

C : surface du pic de calibration

R : constante des gaz parfaits : 0,08 en atm.l.K⁻¹

T : température en °K : 293°K

V₁: volume d'eau dans le flacon : 5 ml

V_g: volume de gaz dans le flacon : 25 ml

M : masse molaire de l'azote : 14 g.mol⁻¹

m : masse de sédiment frais : 5g

H : humidité du sédiment : en %

2.3.3 Les techniques de biologie moléculaire

L'extraction des ADN à partir des sédiments *in situ* et des sédiments issus des réacteurs après expérience est réalisée à l'aide du kit UltraClean Soil DNA Isolation Kit utilisé conformément au protocole fourni par le fabricant et en répétant une deuxième fois l'étape finale d'éluion. Aucune étape de purification n'est nécessaire et l'ADN est immédiatement utilisable en PCR. La qualité de l'extraction est observée et quantifiée par migration sur un gel d'agarose. La quantification se fait grâce au marqueur de taille de concentration connue qui co-migre. L'extraction de l'ADN recueilli sur les filtres en nitrocellulose se fait selon un protocole dérivé de celui présenté par Harry et al. (1999), une étape de purification étant ici nécessaire (kits Wizard[®] SV Genomic DNA Purification de

Promega). L'ADN est ensuite testé par PCR sur le MyCycler de Biorad avec 2.5 µl d'ADN non dilué dans un volume final de 12.5 µl avec les amorces spécifique du gène *nirK*.

Amplification d'ADN par réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Les amorces choisies (*oligonucléotides permettant d'amplifier le gène ciblé*) ont été présentées dans le précédent rapport PIREN (Garnier et al., 2007). L'amplification par PCR et la détection de fragments d'intérêt par PCR est réalisée sur 50 ng d'ADN cible. Le mélange réactionnel contient 1 ml d'oligonucléotides à 50 µM, 2 ml de MgCl₂ à 15 mM, 0.25 ml d'un mélange de désoxyribonucléotide triphosphate à 5 µM chacun, 2 ml de BSA à 5 mg/ml, 0.75 unité de Taq polymérase (Promega Corporation) et 5 µl du tampon fourni avec la Taq dans un volume final de 25 µl.

Les conditions d'amplification doivent être soigneusement déterminées. Nous ne présenterons dans ce rapport que les travaux sur le gène *nirK*, pour lequel l'amplification consiste en une première étape de dénaturation de 2 minutes à 95°C puis 30 cycles composés d'une étape de dénaturation de 30 secondes à 95°C, une étape d'hybridation de 20 sec à 58°C et une étape d'élongation d'une minute à 72°C; enfin une étape d'élongation finale de 3 minutes à 72°C puis la mise à 4°C.

Une partie des produits de PCR (5 µl) est ensuite déposé sur un gel d'agarose pour vérification de l'intensité et de la taille des produits d'amplification, avant le dépôt sur le gel de DGGE.

La DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis). Cette technique de séparation électrophorétique basée sur la différence de comportement de fragments d'ADN double brin de séquences différentes lors de leur dénaturation (Muyzer et al., 1993) conduit à l'apparition de profils complexes, illustrant la complexité de la communauté bactérienne. Les images à haute résolution des gels DGGE sont alors numérisées et analysées à l'aide du logiciel Quantity One (Bio-Rad). Les empreintes moléculaires du gène *nirK* sont analysées avec le logiciel Gelcompare (Applied Maths) qui permet de les comparer en termes de présence ou absence de bandes dans les différentes pistes, chaque piste correspondant à un dépôt.

3. Résultats

3.1. Dénitrification et des émissions de N₂O en conditions contrôlées

La dénitrification a été étudiée avec une variété de méthodes (voir la revue par Groffman et al. 2006), telles que la technique d'inhibition à l'acétylène inhibition technique, celle de l'appariement isotopique, de la production de N₂. Pour des études de dénitrification de sédiment de rivières de Inwood et al. (2007) a utilisé une méthode enzymatique alors que Baeseman et al. (2006) a mesuré un potentiel de dénitrification, des méthodes qui modifient la structure du sédiment et sans doute la réponse en termes de dénitrification. Il existe des travaux montrant qu'une homogénéisation du sédiment (incubations de sédiment déstructuré) peut conduire à de plus grandes valeurs que des incubations de sédiments intacts (Laverman et al 2006, Pallud and Van Cappellen. 2006).

Nous avons ici cherché à étudier les facteurs de contrôle de la dénitrification en utilisant des réacteurs à flux continu sur des sédiments non déstructurés. Mais, comme cette technique est assez lourde, nous avons aussi utilisé les batchs pour répondre rapidement à certaines questions concernant plus la forme des réponses que la mesure absolue des activités

3.1.1 Effet du nitrate

Un exemple typique de résultats obtenus en réacteurs sont présentés à la Figure 4. Les concentrations en nitrate à la sortie du réacteur (Figure 4) atteignent des valeurs relativement stables après 6 heures, valeurs utilisées pour calculer le taux de réduction du NO₃⁻ (équation 1).

Les concentrations en NO₂⁻, N₂O et NH₄⁺ à la sortie sont généralement très basses (**Figure 4**). Le **Tableau 3** présente les taux de production de NO₂⁻, N₂O et de NH₄⁺ et leur importance par rapport au taux de réduction du NO₃. Une production de nitrite est souvent observée variant entre 0.9 et 16.8 %

de la réduction du NO_3^- . Le taux d'ammonium émis varie entre 1 et 10% de la réduction du NO_3^- (avec une exception à 30%) selon les traitements et la saison. La production d'oxyde nitreux (N_2O) est de 0 à 0.2 % par rapport à la réduction du NO_3^-

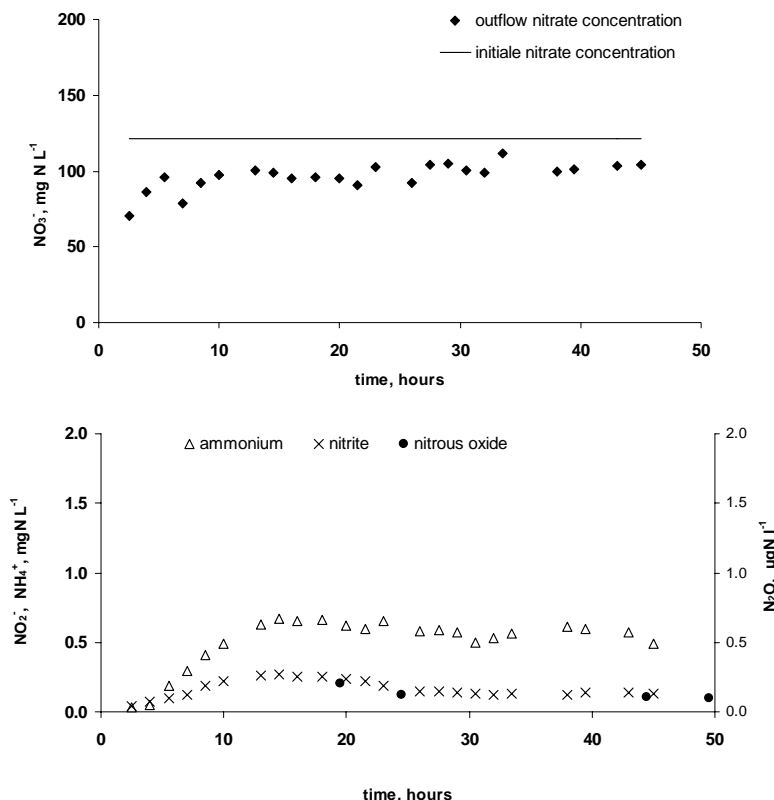


Figure 4. Représentation des concentrations des formes de l'azote à la sortie du réacteur en fonction du temps d'incubation du sédiment non déstructuré. Les expériences montrées sont celles réalisées un réacteur contenant du sédiment de la couche 0-3 cm, collecté à Tresmes en mars 2007 (taux de dilution 7 ml h^{-1} et 10 mg N l^{-1} de NO_3^- dans la nourriture).

L'exploration du taux de dénitrification en fonction des concentrations en NO_3^- a été réalisée pour déterminer la cinétique du taux de dénitrification et de production de N_2O et de déterminer les paramètres. La réduction du nitrate suit une équation de Michaelis-Menten et permet donc de calculer les valeurs de V_m et de K_m , vitesse maximale de dénitrification et constante de demi-saturation respectivement : V_m varie de 1.4 à $3.9 \mu\text{gN g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ($3 \mu\text{gN g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ en moyenne) et K_m entre $11.8 \text{ mg N-NO}_3^- \text{ l}^{-1}$ et $31.3 \text{ mg N-NO}_3^- \text{ l}^{-1}$ ($25 \text{ mg N-NO}_3^- \text{ l}^{-1}$ en moyenne), (Figure 5). Les valeurs de K_m sont élevées, l'affinité pour le substrat est donc faible, ce qui signifie que le maximum de dénitrification sera observé dans des milieux riches, comme les zones sous-racinaires ou les sorties de drains agricoles (Mounier et al. *soumis*).

Tableau 3. Taux de production de nitrite, ammonium et oxyde nitreux pour les différentes expériences menées en réacteurs. Les concentrations en nitrate à l'entrée des réacteurs sont indiquées. N RR: Taux de réduction du nitrate « reduction rate »; Ni PR: Taux de production du nitrite -production rate-; APR: Taux de production de l'ammonim; N₂O PR: taux de production du N₂O. Pourcentage par rapport au taux de réduction du nitrate i) de la production du nitrite de l'ammonium et du N₂O.

	Inflow nitrate concentration mgN l ⁻¹	N RR µgN g ⁻¹ h ⁻¹	Ni PR	APR ngN g ⁻¹ h ⁻¹	N ₂ O PR	%Ni PR	%A PR	% N ₂ O PR
December 2005	5.8	0.3	7.7	-36.5	0.4	2.6	0.0	0.14
	15.8	1.2	17.0	64.5	0.6	1.4	5.4	0.05
	47.7	1.1	25.7	99.0	0.6	2.4	9.2	0.06
April 2006	8.0	0.6	47.2	178.0	nd	8.0	30.2	nd
	30.3	1.0	14.5	59.6	nd	1.5	6.0	nd
	67.1	2.8	24.8	83.5	nd	0.9	3.0	nd
July 2006	11.8	0.3	17.6	170.9	0.1	5.3	51.4	0.02
	19.3	1.2	195.4	251.0	nd	16.8	21.6	nd
	39.6	1.8	89.0	83.3	nd	5.0	4.7	nd
November 2006 *	7.3	0.7	15.0	29.0	0.2	2.3	4.3	0.03
	17.6	0.4	24.5	17.6	0.2	5.5	4.0	0.04
	46.9	1.9	41.5	35.5	3.2	2.1	1.8	0.16
	83.2	2.9	72.9	59.4	2.7	2.5	2.1	0.09
March 2007 *	9.1	0.3	4.0	29.6	0.2	1.3	9.7	0.05
	24.1	1.2	24.1	56.8	0.2	2.0	4.6	0.02
	55.8	1.6	40.2	36.2	0.2	2.6	2.3	0.01
	105.6	2.8	57.8	80.6	0.2	2.0	2.9	0.01
	145.8	5.1	96.4	70.3	0.2	1.9	1.4	0.00

* indicate the experiment made on triplicat. For April 2006 and some samples of July 2006 no nitrous oxide were observed.

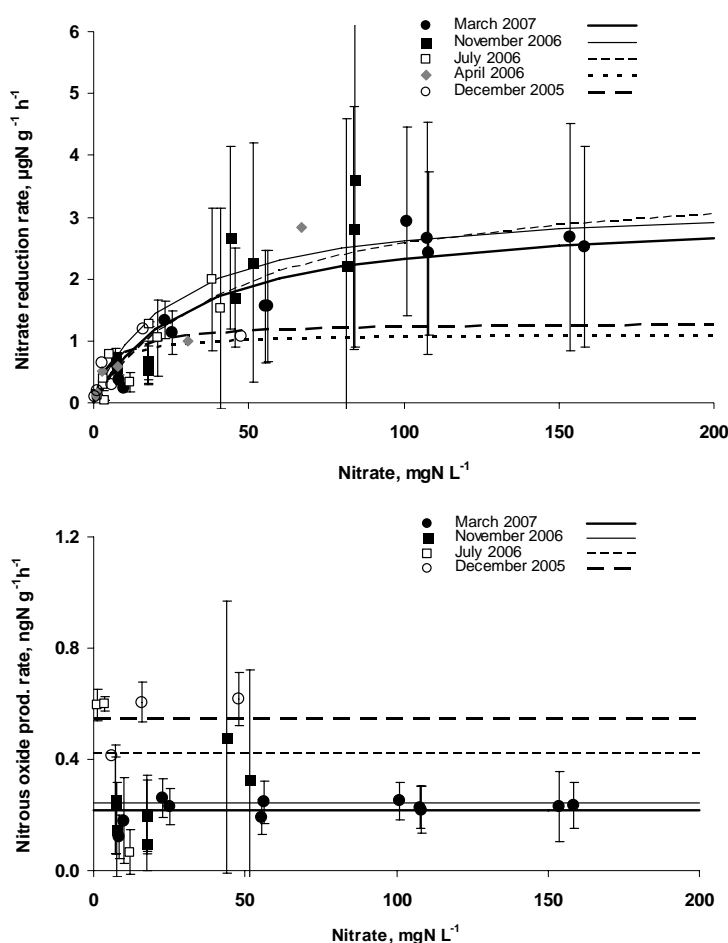


Figure 5. Variation, pour les différentes expériences en réacteurs, du taux de réduction du nitrate (en haut) et du taux de production du N₂O (en bas), dans un gradient de nitrate.

Le taux de production du N_2O ne suit pas en revanche une cinétique michaélienne, mais reste plutôt constant à $0.28 \text{ ng N g}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Il est toutefois important de noter la grande variabilité pour des valeurs de concentrations en nitrate inférieures à 50 mgN-NO_3^- , ce qui est souvent le cas dans les écosystèmes aquatiques du bassin de la Seine.

Dans ces conditions expérimentales de dénitrification la production de N_2O est extrêmement faible, de l'ordre de 0.01% par rapport à la réduction du nitrate.

3.1.2 Effet du carbone

Alors que les réacteurs ont été alimentés avec une concentration saturante en nitrate (60 mg N L^{-1}), du carbone a été ajouté sous forme d'acétate de sodium (2, 5, 10, 20 et 30 mg/L).

Les données peuvent s'ajuster à une courbe cinétique de type Michaélienne, avec un taux maximum de dénitrification V_m variant de 4.3 à $7.8 \text{ } \mu\text{gN g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ($6.1 \text{ } \mu\text{gN g}^{-1} \text{ h}^{-1}$), soit environ 2 fois plus élevé que celui obtenu sans ajout (cf V_m pour le gradient de nitrate, un V_m d'environ $3 \text{ } \mu\text{gN g}^{-1} \text{ h}^{-1}$),

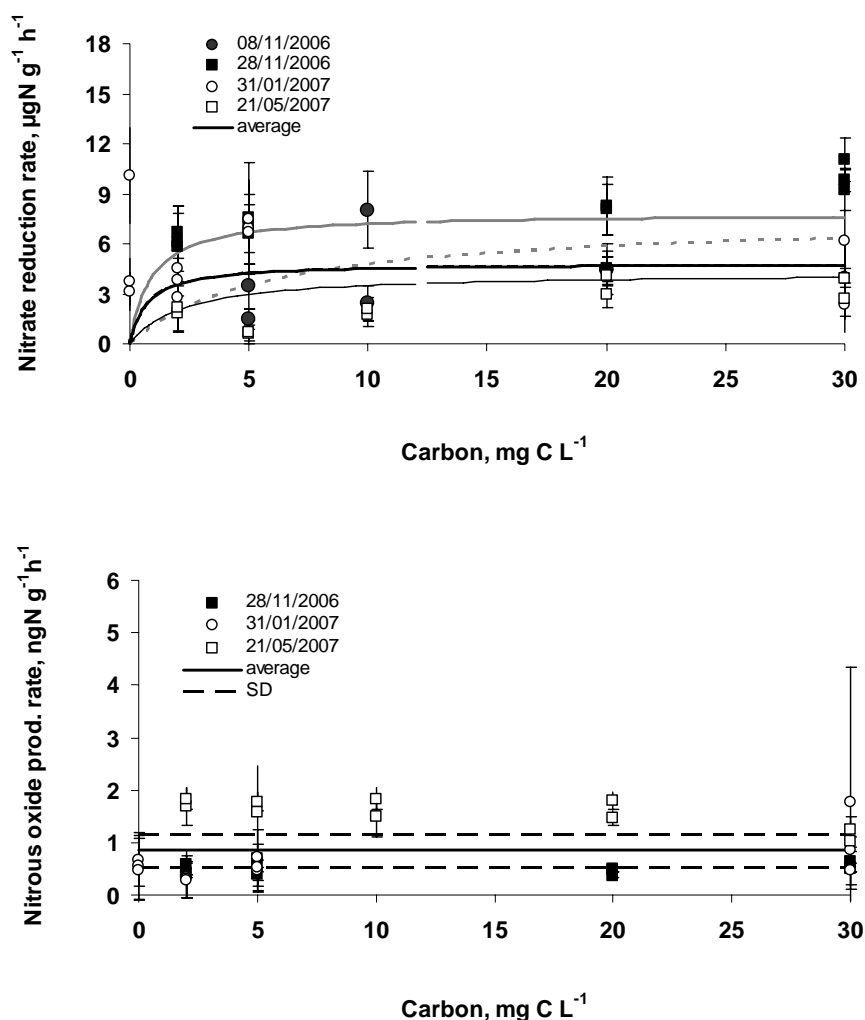


Figure 6. Variation, pour les différentes expériences en réacteurs, du taux de réduction du nitrate (en haut) et du taux de production du N_2O (en bas) dans un gradient de concentration en carbone, les concentrations en nitrate étant saturantes.

La constante de demi-saturation K_m en carbone varie entre 0.7 et 5.8 mgC l⁻¹ dissous ajouté. Les teneurs en carbone des sédiments sont de l'ordre de 8.4 mg g⁻¹ dont moins de 10% sont biodégradables (Figure 6).

La production de N₂O est relativement stable dans un gradient de carbone, et de nouveau très faible (environ 0.84 ngN-N₂O g⁻¹ h⁻¹, soit de l'ordre de 0.015 % par rapport à la réduction du nitrate).

Une faible production de N₂O dans des conditions relativement favorables de dénitrification confirmerait que la production de produits intermédiaires comme le N₂O serait le fait de conditions non optimales comme nous l'avons montré pour la nitrification (eau de Seine et STEPs, Cébron et al., 2005) et pour la dénitrification (STEPs, Tallec et al., 2006 ; 2007).

3.1.3 Rôle de la température et du pH

Des expériences en batchs ont été réalisées pour appréhender le rôle de la température sur le potentiel de dénitrification et de la production de N₂O. A ce stade, il n'apparaît pas de relation claire, le potentiel de dénitrification variant entre 2.1 et 3.6 µgN g⁻¹ h⁻¹ pour une gamme de température entre 11°C et 35 °C, valeurs du même ordre que celles du V_m obtenue en fonction de la concentration en nitrate. Au cours du temps, les concentrations en N₂O augmentent dans les batchs au cours de la première heure puis diminuent. En considérant les valeurs obtenues au cours de cette première heure, la production de N₂O est en moyenne de 33 ngN g⁻¹ h⁻¹, ce qui conduit à une production en N₂O de 1.2 % en moyenne par rapport au nitrate réduit. Cette production est consommée au cours de l'incubation. Notons que le pourcentage de production initiale en N₂O dans les batchs est environ 10 fois plus important que celui obtenu dans les réacteurs, ce qui indique peut être l'existence d'une certaine consommation du N₂O dans les réacteurs.

L'influence du pH a aussi été explorée de manière préliminaire entre 3 et 11 unités pH, et les variations sont de 20 % au maximum, montrant que les populations bactériennes dénitrifiantes peuvent s'adapter à une large gamme de conditions (Stres et al. 2007). La production en N₂O de 0.7 % en moyenne par rapport au nitrate réduit, du même ordre que les valeurs mentionnées ci-dessus et plus élevée que celle obtenue en réacteur.

3.2. Variations spatiales et temporelles des concentrations en N₂O de l'eau

3.2.1 Variations temporelles

Les concentrations de N₂O dans l'eau ont été mesurées à l'exutoire de la Marne (à St Maurice) depuis 1999, ce qui nous permet de montrer que les valeurs sont largement au dessus de la sursaturation, qu'il existe des variations saisonnières parfois très marquées, en année sèche notamment (cf 2002 et 2003), (Figure 7). Au cours des deux dernières années, une tendance aux plus faibles concentrations en N₂O apparaît ; outre les conditions hydrologiques, nous devons examiner d'autres facteurs tels que les teneurs en carbone des sédiments pour interpréter cette tendance.

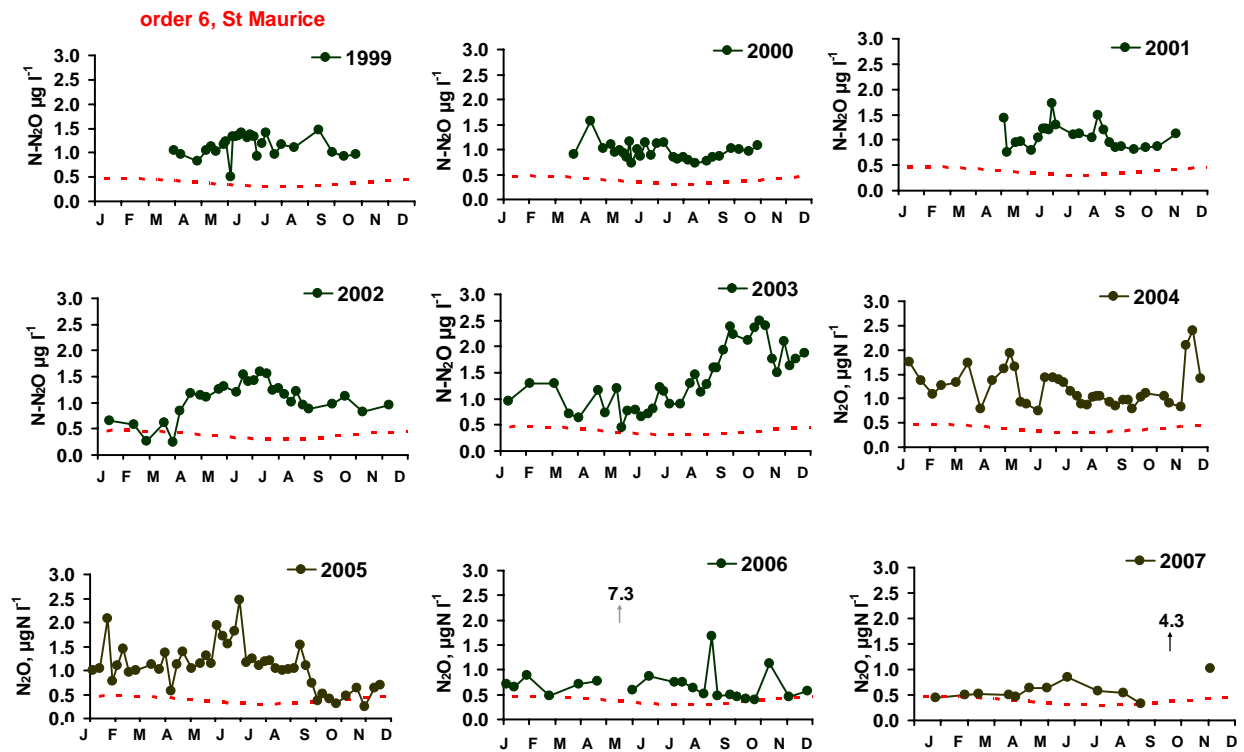


Figure 7. Variations saisonnières des concentrations en N_2O , à l'exutoire de la Marne (St Maurice) de 1999 à 2007.

3.2.2 Variations spatiales

Les concentrations en N_2O mesurées à deux périodes, hivernales et estivales, aux 80 stations échantillonnées (cf Figure 1) montrent bien une différence saisonnière à toutes les échelles spatiales, des petites rivières d'ordre 1, aux grands axes (Figure 8).

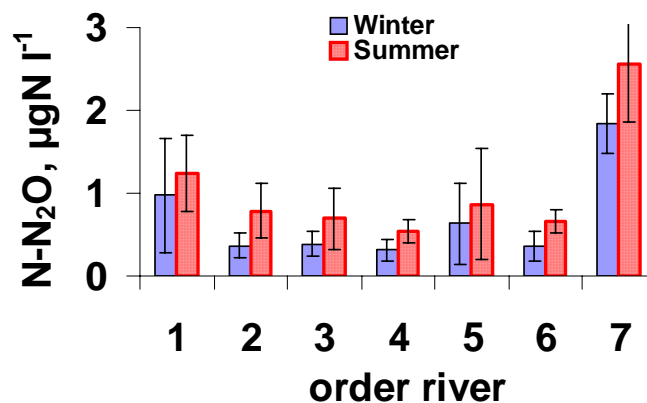


Figure 8. Distribution des concentrations en N_2O dans l'eau aux différents ordres de rivières (de 1 à 7) en hiver (mars 2006, février 2007, 137 données) et en été (juillet 2006 et 2007, 157 données).

Quelque soit la saison, il apparaît que les plus fortes concentrations sont observées aux petits ordres et dans les plus grands axes (Figure 8). Si l'on peut expliquer l'augmentation des concentrations à l'aval par l'importance d'une activité dénitrifiante *in-stream* (et nitrifiante, cf. Garnier et al., 2006, 2007) en raison de l'impact domestique croissant, les fortes concentrations en N_2O en amont pourraient être plus liées à l'héritage du N_2O produit dans les sols et les zones ripariennes, puis à la ventilation progressive lors du parcours des eaux vers l'aval. Toutefois, l'existence d'une production in-situ, dans des zones privilégiées anoxiques et riches en carbone (accumulation de la végétation riveraine) n'est pas exclue dans les petits cours d'eau.

3.3. Distribution des concentrations et composition isotopique des nitrates

L'observation de concentrations en nitrate plus faibles dans les petits cours d'eau que dans les aquifères ou les eaux sous-racinaires qui les alimentent a depuis longtemps permis de soupçonner l'existence d'un processus riparien éliminant une fraction importante des nitrates agricoles avant qu'ils ne rejoignent les eaux de surface (Billen & Garnier, 1999). La biogéochimie isotopique permet de montrer clairement que la dénitrification riparienne est responsable de ce phénomène (Sebilo et al., 2003 ; Sebilo et al., 2006).

Lors des campagnes snap-shot réalisées sur une petite centaine de stations du réseau hydrographique de la Seine, comprenant des cours d'eau d'ordre 1 à 7, la concentration en nitrate a été mesurée et mise en relation avec l'occupation du sol du bassin versant. La mesure de la composition isotopique naturelle du nitrate a aussi été réalisée dans le but d'obtenir une information supplémentaire, de type intégrative, sur le processus de dénitrification qui les affecte.

Les cours d'eau drainant de petits bassins forestiers sont caractérisés par des concentrations en nitrates faibles, mais aussi par de faibles valeurs de leur $\delta^{15}N-NO_3$, proche de la composition isotopique de la matière organique des sols forestiers. Celle-ci reflète celle des sources primaires dont cette matière organique (et les nitrates lessivés) sont dérivés, à savoir (la fixation d'azote atmosphérique et le dépôt atmosphérique de nitrate).

Les eaux souterraines ou sous-racinaires des bassins agricoles présentent par contre des concentrations sensiblement plus élevées, avec des compositions isotopiques sensiblement plus élevées que les celles des bassins forestiers. Ici encore, cette composition isotopique est proche de celle de la matière organique des sols agricoles. Celle-ci est significativement plus élevée que celle des engrais azotes inorganiques, dérivés industriellement de l'azote atmosphérique et dont le $\delta^{15}N$ est voisin de 0. Cet enrichissement isotopique de la matière organique du sol, et par suite, des nitrates lessivés, témoigne de l'importance des processus de pertes gazeuses qui caractérisent l'agriculture (dénitrification et volatilisation d'ammonium). Un modèle simplifié de la dynamique de l'azote des sols a permis de montrer qu'un enrichissement de l'ordre de 1% du $\delta^{15}N$ des sols correspond à une dénitrification de l'ordre de 10 kgN/ha/an (Sebilo et al, comm. pers).

Les eaux de surface drainant des bassins mixtes (agricoles et forestiers) montrent une large gamme de concentrations en nitrates, grossièrement corrélées avec la proportion de surface occupée par les terres arables (Figure 9a). Les concentrations nitriques semblent généralement plus faibles en été qu'en hiver.

Pour beaucoup d'échantillons, particulièrement en été, les compositions isotopiques des nitrates s'écartent significativement de la courbe théorique de dilution qui caractériserait le simple mélange d'une eau agricole et d'une eau forestière. Ce signal témoigne d'un processus de dénitrification. Il a été montré que la dénitrification benthique, n'est pas fractionnante vis-à-vis des nitrates de la colonne d'eau (Sebilo et al., 2003).

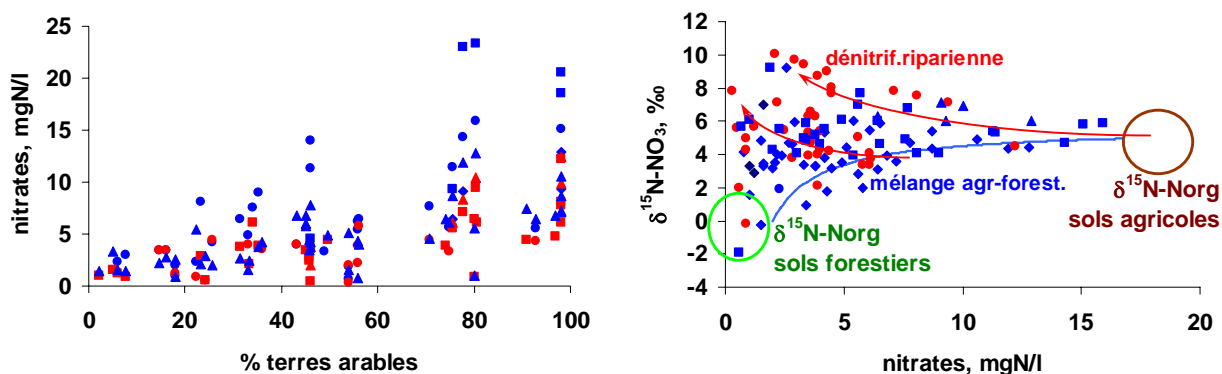


Figure 9. a) Concentration en nitrate en fonction de la surface du bassin versant amont occupée par les terres arables, lors des campagnes hivernales (en bleu) et estivales (en rouge). B) Relation entre la composition isotopique de l'azote nitrique et la concentration en nitrates en situations hivernales et estivales. La courbe attendue du simple mélange d'une eau forestière et d'une au agricole est représentée en bleu. Les points situés au dessus de cette courbe de mélange témoignent d'un processus de dénitrification.

Il s'agit donc plutôt de la signature du processus de dénitrification riparienne affectant les nitrates lessivés avant même qu'ils ne rejoignent les cours d'eau. Il y a donc là aussi une indication semi-quantitative sur l'importance du processus de dénitrification dans les zones humides riveraines. L'hétérogénéité des systèmes concernés rend cependant impossible d'en déduire une estimation de l'importance quantitative de ce processus.

3.4. Variation du potentiel de dénitrification

3.4.1 Détermination

Le potentiel de dénitrification est déterminé par la pente de consommation du nitrate en fonction du temps dans des conditions saturantes en nitrate, à une température de 20°C, et en anaérobiose sous agitation. La production du NO_2 et du N_2O est calculée de la même façon (Figure 10). Les mesures sont réalisées en triplicat au temps 0, 30 mn, 1h, 2h et 4 heures.

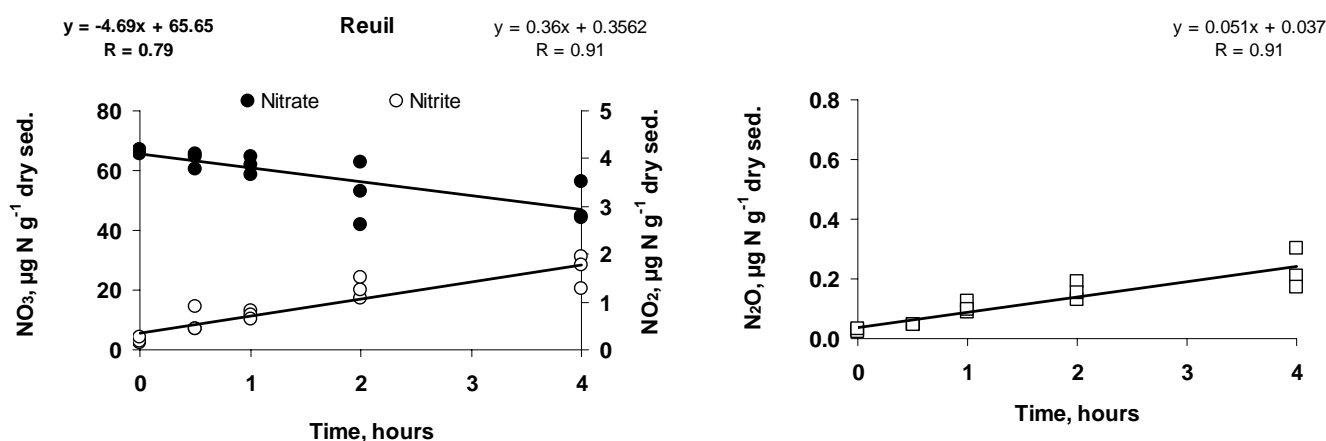


Figure 10. Variations dans les batchs a) de la concentration en nitrate (NO_3) et nitrite (N_2O) en fonction du temps b) de la concentration en oxyde nitreux (N_2O). Exemple d'un échantillon de sédiment provenant de Reuil au début du secteur canalisé de la Marne. La pente de la droite représente le taux de disparition ou d'apparition de l'élément.

Outre l'étude de la capacité des sédiments de rivière à dénitrifier, rappelons que l'objectif est de mieux caractériser la production de N_2O qui en découle.

3.4.2 Variations de la dénitrification potentielle et de la production de N_2O .

Les calculs du potentiel de dénitrification et de la production associée de N_2O ont été réalisés pour près d'une soixantaine d'échantillons prélevés au printemps et surtout en été 2007; il s'agit des échantillons des sédiments de petites rivières d'amont de Paris, de l'axe de la Marne et de ceux de sous-bassins de l'Oise de la Marne, de l'Eure, de l'Yonne, ainsi que des sédiments de la basse Seine (cf Figure 1).

L'analyse des différents résultats obtenus après l'incubation en batch, a donc permis de calculer le potentiel de dénitrification et de quantifier les émissions de N_2O qui lui sont associées (environ 25 échantillons de sédiment restent encore à analyser pour le N_2O (soit encore près de 400 mesures au chromatographe en phase gazeuse).

Le potentiel de dénitrification représenté en fonction de l'ordre des rivières montre que les valeurs s'accroissent d'amont en aval, et sont plus élevées dans les grandes rivières dont les sédiments sont plus riches en matière organique (Figure 11). Notons que les sols, représentés à l'ordre 1 sur la Figure 11, montrent des valeurs de dénitrification potentielle relativement plus élevées. Les valeurs obtenues en 1996 avec le même protocole, mais sans détermination de la production en N_2O associée (Sanchez, 1997), s'intègrent bien dans les données actuelles. C'est évidemment dans la basse Seine à l'ordre 8 après la confluence de la Seine et de l'Oise et les stations d'épurations parisiennes que les valeurs sont maximales, les teneurs en carbone des sédiments atteignant alors 10-15 %.

Les valeurs de production de N_2O sont aussi plus élevées dans les grandes rivières, en relation avec le potentiel de dénitrification et les teneurs en matière organique. Toutefois les sédiments des rivières amont (ordre 1 et 2) semblent parfois montrer une production de N_2O importante, qui n'est plus parallèle aux valeurs du potentiel de dénitrification. Cette tendance à l'amont devrait être confirmée ou infirmée avec les 400 mesures de N_2O qui restent à analyser et ces valeurs devront être interprétées en fonction des analyses des teneurs en carbone du sédiment qui restent aussi à réaliser.

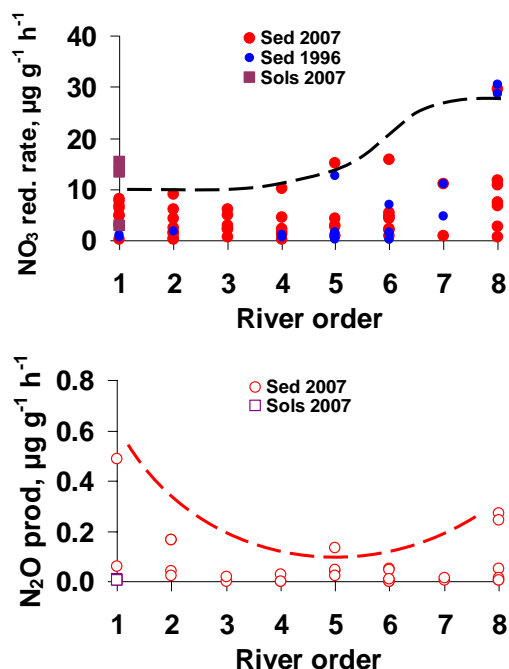


Figure 11. Potentiel de dénitrification (a) et de la production de N_2O (b) en microgrammes par gramme de sédiment sec par heure ($\mu g N/g sed sec/h$) en fonction de l'ordre des rivières selon l'ordination de Strahler (1957).

Malgré l'amélioration des traitements en stations d'épuration, les rejets d'effluents urbains encore chargés en matière organique, entraînent dans les grandes rivières profondes une anoxie des sédiments favorable à une dénitrification accompagnée d'une émission de N_2O . On peut observer sur la Figure 11, que ce potentiel de dénitrification atteint son maximum à Poissy, situé directement en aval de la station d'épuration d'Achères. Les secteurs intermédiaires moins profonds et mieux oxygénés et moins soumis à la pression des rejets domestiques ont une dénitrification et production de N_2O limitée.

3.5. Pratiques agricoles et émissions de N_2O

3.5.1 Distribution de la concentration de N_2O dans l'eau en fonction de l'occupation des terres. Bilan des surfaces en eau

Afin de ne pas brouiller le signal par les ordres supérieurs, pour lesquels la distribution de l'occupation des terres tend vers celle de l'ensemble du bassin (52.5 % à l'exutoire du bassin à Poses), les concentrations en nitrate et en N_2O ont été considérées pour les petits ordres de 1 à 3 et portées en fonction du pourcentage des terres arables (Figure 12).

De manière attendue, les concentrations en nitrate augmentent avec l'augmentation de la proportion des terres agricoles et plus en hiver, période de lessivage des sols nus, qu'en été. La relation des concentrations de N_2O augmente aussi avec le pourcentage des terres agricoles, mais plus en été qu'en hiver, sans doute quand les processus biologiques sont plus importants, et en particulier la dénitrification. La concentration en N_2O est toujours au dessus de la saturation en été.

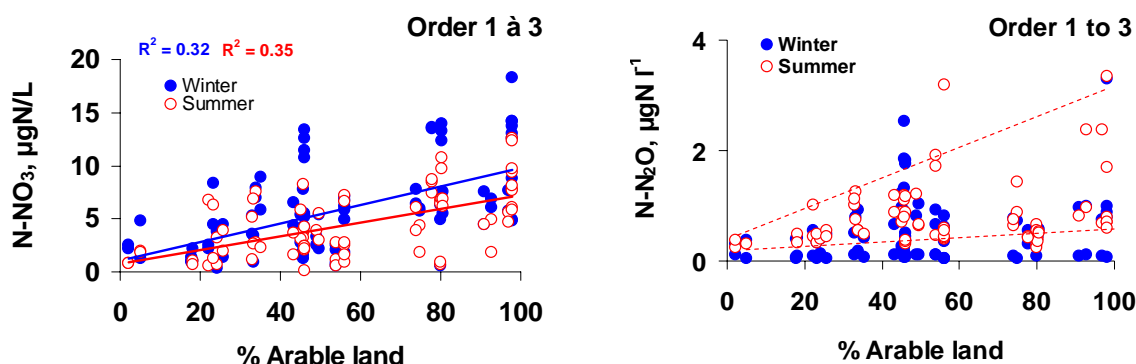


Figure 12. Relation entre les concentrations en nitrate et N_2O en fonction du % de terres arables en amont du point de prélèvements.

En considérant sur la base de la sursaturation dans l'eau que les émissions à l'interface eau-air varient de 1.2 to 2.2 mg N- N_2O m⁻² d⁻¹, on peut considérer qu'à l'échelle de tout le réseau hydrographique (310 10⁶ m², Guerrini et al. 1998), l'émission journalière représente 370 à 680 kg N- N_2O (Garnier et al. 2006).

3.5.2 Bilan de N_2O des terres agricoles

Une synthèse a été effectuée des données de la littérature relatives aux taux d'émission annuels de N- N_2O par les surfaces agricoles (prairies fertilisées ou non, pâturées ou non, et cultures, maïs, surtout) et forestières (cf. Velthof et al. 1996, Van Cleemput et al., 1994; Dambreville et al., 2007). En considérant les valeurs minimum des taux cités, et la répartition des terres arables, prairies et forêts dans le bassin de la Seine (respectivement 3.45.10⁶, 0.64.10⁶, 1.66.10⁶ ha), on peut estimer que les émissions directes par les sols du bassin représentent entre 3000 et 30000 T N- N_2O an⁻¹ (50 à 500 kg N- N_2O km⁻² an⁻¹) pour l'ensemble du bassin.

L'estimation maximale effectuée précédemment à partir des fertilisants appliqués sur les terres cultivées en utilisant les coefficients préconisés par l'IPCC (2000), (cf Garnier *et al.*, 2006) est dans la basse gamme des émissions nouvellement estimées en tenant compte des émissions en fonction de l'usage du sol et non plus en tenant compte des fertilisations.

Cette synthèse montre une grande variabilité des taux d'émissions pour diverses conditions environnementales, de telle sorte que ces estimations doivent encore être considérées avec précaution. De nombreuses études en cours dans de grands programmes européens (NitroEurope par exemple, <http://www.nitroeuropa.eu/>), devraient à terme permettre de préciser ces valeurs.

3.5.3 Bilan d'azote dans le bassin

Le bilan d'azote a été réalisé pour le bassin agricole et pour le système hydrologique pour deux années 2001, humide et 2003, sèche. Les bilans entrée-sortie du système agricole montre un défaut de bilan de 875 à 2551 kg N km⁻² an⁻¹, dont entre 50 et 500 kg N km⁻² an⁻¹ seraient donc du N₂O.

NB : on peut considérer que la précision du bilan est de l'ordre de 10-20%, les chiffres donnés ici à l'unité sont destinés à permettre de reconstituer la démarche des calculs.

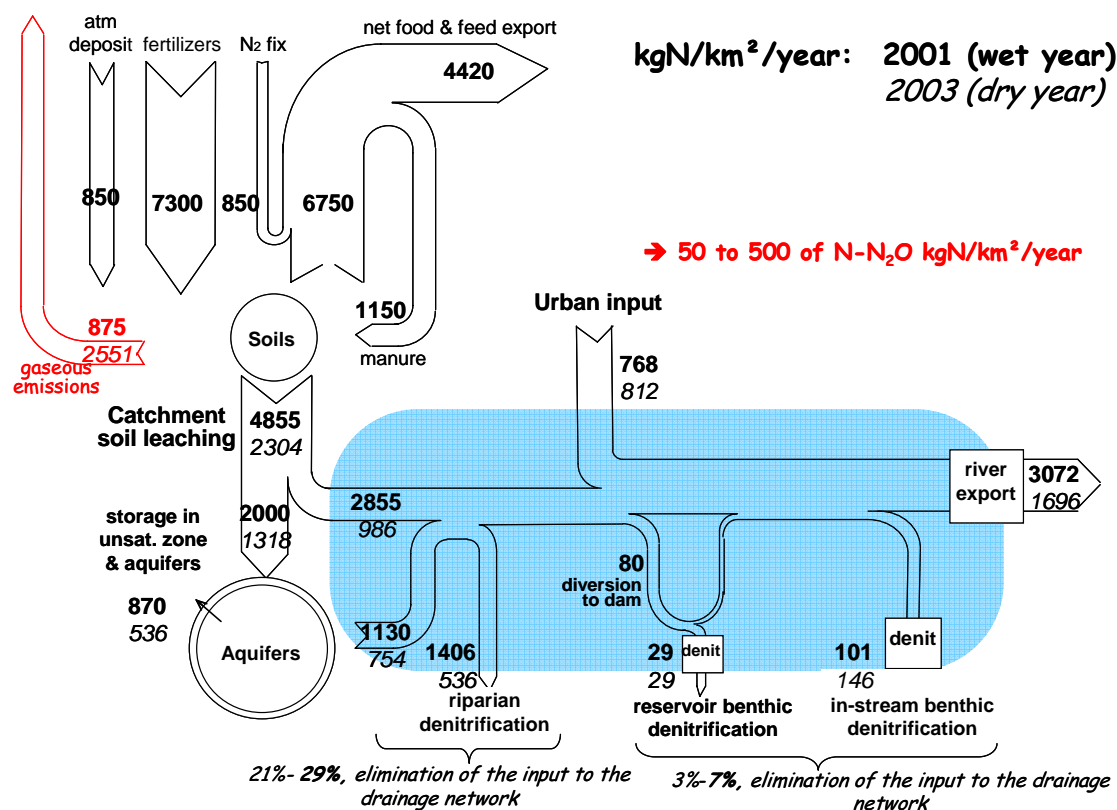


Figure 13. Bilan des émissions d'azote à l'échelle du bassin pour une année humide (2001) et une année sèche (2003).

Le bilan du système hydrographique permet de mettre en évidence un stockage dans les nappes, soit une augmentation de 875 à 2550 kg N km⁻² an⁻¹, en supposant que les nappes du bassin de la Seine ne dénitrifie pas (peu de carbone biodégradable, bonne oxygénation), ce qui n'est pas forcément le cas partout (cf. en Bretagne).

En considérant la somme des apports au réseau hydrographique via les eaux de surface et les eaux phréatiques et les pertes liées à la dénitrification, il apparaît que de 21 à 29 % de l'azote sont éliminés

dans les zones ripariennes alors que seulement 3 à 7 % serait éliminés dans le réseau lui-même (sédiments des réservoirs et des cours d'eau), (Figure 13).

Si l'on compare les estimations des émissions de N₂O du réseau hydrographique avec l'azote éliminé dans ce même réseau, il apparaît que les émissions de N₂O représenteraient entre 1 et 4 % de la dénitrification. Les expériences de dénitrification potentielle conduisent à un pourcentage moyen de production de N-N₂O par rapport à la réduction du nitrate de 1.5 %, avec des valeurs extrêmes de 0 à 15 %.

En supposant un pourcentage identique pour la dénitrification riparienne, les émissions de N₂O dans le réseau hydrographique et ses zones ripariennes seraient de l'ordre de 10 à 20 kgN-N₂O km⁻² an⁻¹, valeurs qu'il faut alors comparer à la production de N₂O des terres agricoles qu'on a estimée dans la gamme de 50 à 500 kg N-N₂O km⁻² an⁻¹.

Ces calculs imprécis montrent l'intérêt évident à resserrer les gammes des estimations par la poursuite de la synthèse des données de la littérature et par l'acquisition de nouvelles données.

3.6. Caractérisation des communautés bactériennes dénitrifiantes

Les empreintes moléculaires du gène *nirK* sur gel DGGE montrées ici pour les échantillons d'eaux de deux dates (Figure 14) sont suffisamment bien marquées pour être analysées avec le logiciel Gelcompare (Applied Maths) qui permet de les comparer en termes de présence ou absence de bandes dans les différentes pistes. Notons ici la migration du marqueur M, qu'il nous a fallu construire. Nous pouvons comparer au moins deux gels pour chacune des trois campagnes et construire un dendrogramme qui révèle 2 groupes (encadrés en traits pleins et pointillés) indiquant que les différences des communautés « *nirK* » sont plus importantes en fonction des saisons (mai et octobre se regroupant logiquement dans la saison estivale) qu'en fonction des sites (ordre des rivières (Figure 15)).

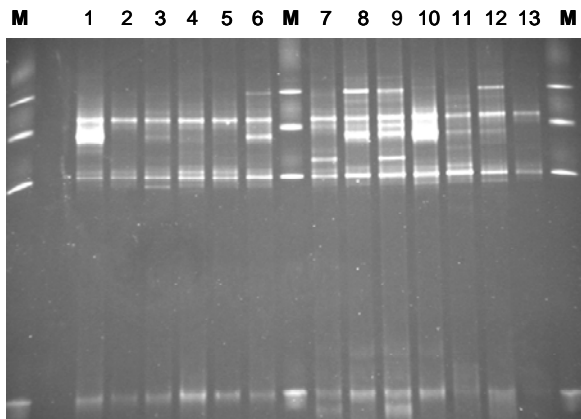


Figure 14. Photo d'un gel DGGE du gène *nirK* (amplicon *nirKCF-nirKCR*) sur un gradient de 40 à 80 % (16h de migration à 100V chauffé à 60 °C) pour les échantillons de 2 des 3 campagnes étudiées.

M : Marqueur de migration
Eaux du 30 mai 2006 #1 Melarchez, 2 La Source, 3 La Loge, 4 Avenelles, 5 Choqueuse, 6 Theil :
Eaux du 10 octobre 2006 #7 Tresme, 8 Melarchez, 9 La Source, 10 La Loge, 11 Avenelles, 12 Goins, 13 Theil.

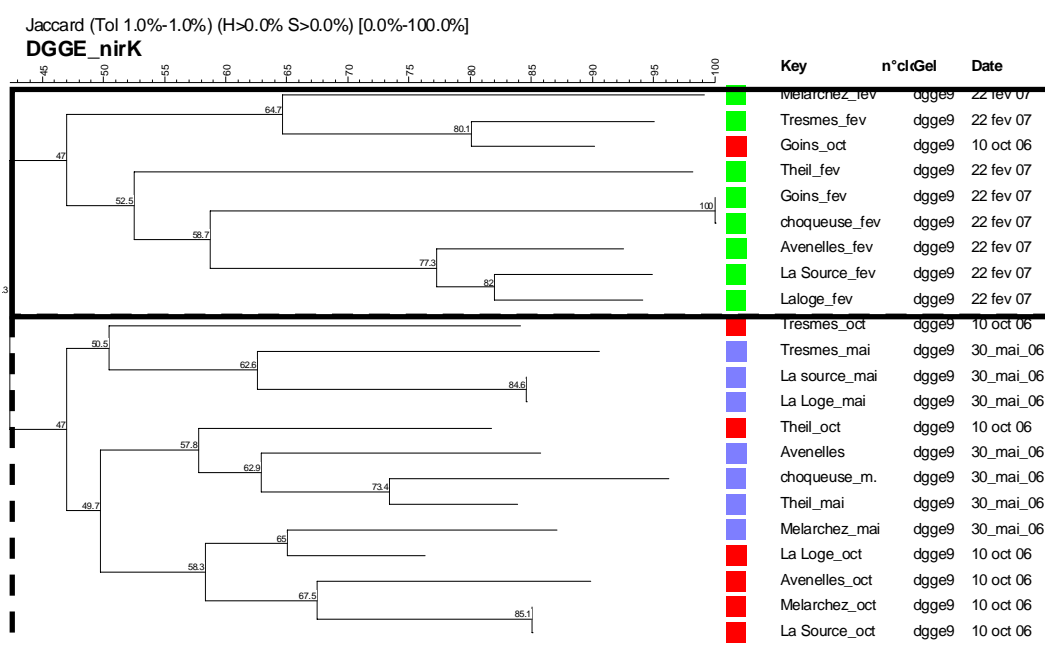


Figure 15. Dendrogramme issu de la comparaison d'un gel DGGE du gène nirK par cluster analysis par la méthode des neighbor joining avec indice de Jaccard pour les échantillons d'eau des 3 campagnes étudiées.

Les carrés de couleur correspondent aux différentes dates : bleu pour mai 2006, rouge pour octobre 2006 et vert pour février 2007.

4. Conclusions et perspectives

Nous avons désormais un jeu de données important pour quantifier le N₂O dans le réseau hydrographique. Il apparaît clairement une variation saisonnière, une variation en fonction de l'ordre ainsi qu'une variation en fonction de l'occupation des terres. A l'échelle du bassin agricole, de manière plus complète que le bilan établi à partir des fertilisants (Garnier et al., 2006), une étude des émissions de N₂O sur la base de l'occupation du sol permet d'affiner ce bilan et de le spatialiser. Le logiciel AI-PresHum sera développé pour automatiser cette spatialisation et établir une cartographie actuelle et prospective en fonction des modifications de l'utilisation des terres.

Sur le plan expérimental, nous avons établi les cinétiques qui relient la dénitrification et les émissions de N₂O à leurs facteurs de contrôle (le nitrate et carbone à ce stade). Un gros travail est mis en œuvre avec des outils de biologie moléculaire pour caractériser les populations microbiennes dénitrifiantes, mais doit encore être poursuivi pour décrire les communautés bactériennes en liaison avec leur fonction dénitrifiante et les contraintes de l'environnement mentionnées ci-dessus (saison, ordre, occupation du sol).

L'étude des facteurs de contrôle de la dénitrification et des émissions de N₂O dans des conditions contrôlées va à court terme permettre d'introduire la cinétique de production gazeuse dans la démarche de modélisation, et ainsi d'appréhender le changement d'échelle nécessaire. Le taux de dénitrification en fonction des facteurs de contrôle est décrit par des lois de Michaëlis-Menten. Les constantes de demi-saturation du taux de dénitrification par rapport au nitrate et au carbone sont relativement élevées

(de l'ordre de 25 mgN/L et 6 mgC/L respectivement), ce qui montre une faible affinité pour le substrat.

Les cinétiques qui relient la production de N₂O à ces mêmes facteurs de contrôle ne montrent pas de variations. Dans un gradient de nitrate ou de carbone ajoutés en réacteurs, la production de N₂O reste stable et très faible, ce qui tend à montrer que les conditions de dénitrification sont optimales et conduisent à la formation de N₂, sans produits intermédiaires comme le N₂O. Il apparaît toutefois qu'aux plus faibles valeurs de substrats (nitrate ou carbone, dans la zone de limitation en dessous de la valeur du K_s, la proportion de la production de N₂O par rapport à la dénitrification est la plus élevée. Notons que ce sont ces conditions qui sont les plus fréquentes dans l'environnement.

L'ensemble des investigations menées à l'échelle du bassin de la Seine permet de quantifier les circulations et les transformations de l'azote de manière sectorisée sous forme d'un bilan. L'activité agricole (fertilisation, production, exportation) domine le bilan d'azote. Les rejets domestiques constituent également un poste important. Alors qu'une partie du flux d'azote sous-racinaire est stockée dans les aquifères (il s'agit alors d'une rétention temporaire), les flux d'azote parvenant au réseau hydrographique sont éliminés sous formes gazeuses, en saison humide -2001- et sèche -2003- respectivement de 21 à 29 % dans les zones ripariennes et de 3 à 7 % dans les sédiments des rivières et des réservoirs. Alors que l'élimination riparienne de l'azote domine nécessairement dans les bassins amont, l'élimination benthique s'accroît en aval, avec l'augmentation des apports en carbone et l'accroissement de la profondeur et au total de l'anoxie. La dénitrification benthique est estimée à environ 10-20 % des pertes totales (comprenant donc l'élimination riparienne d'azote) dont environ 1.5 % pourrait émis sous forme de N₂O.

A ce stade, il apparaît que les émissions de N₂O par le réseau hydrographique lui-même, comprenant ses zones ripariennes (10 à 20 kgN-N₂O km⁻² an⁻¹), ne sont pas négligeables par rapport à celle des terres agricoles du bassin si l'on considère la basse gamme de l'estimation (50-500 kg N-N₂O km⁻² an⁻¹).

Ces estimations s'affinent progressivement avec l'apport des mesures biogéochimiques et microbiologiques en laboratoire et sur le terrain. En laboratoire, outre les effets de la température et du pH qui restent à préciser, il est nécessaire d'explorer le niveau de l'oxygénation pour mettre en évidence le seuil au-delà duquel la dénitrification incomplète est à l'origine de produits intermédiaires (thèse de Taghreed Suleman). Toutefois, le continuum « *parcelles agricoles-zone humide-rivière* » reste inconnu des points de vue de son fonctionnement hydrologique et biogéochimique, et c'est dans ce sens que les travaux vont désormais être orientés pendant les 3 prochaines années (Thèse de Guillaume Vilain). Une perspective importante est également d'introduire les émissions de N₂O par la dénitrification dans le modèle Seneque/Riverstrahler comme nous l'avons fait pour la nitrification (Garnier et al., 2006).

5. Références

- Baeseman J.L., R.L. Smith & J. Silverstein (2006). Denitrification Potential in Stream Sediments Impacted by Acid Mine Drainage: Effects of pH, Various Electron Donors, and Iron. *Microb. Ecol.* 51, 232–241. DOI: 10.1007/s00248-005-5155-z
- Billen G. & Garnier J. (1999). Nitrogen transfers through the Seine drainage network: a budget based on the application of the Riverstrahler model. *Hydrobiologia*, 410: 139-150.
- Brion N. & Billen G. (1998). Une réévaluation de la méthode d'incorporation de $^{14}\text{HCO}_3$ pour mesurer la nitrification autotrophe et son application pour estimer les biomasses de bactéries nitrifiantes. *Rev. Sci. Eau* 11, 283-302.
- Brion, N., G. Billen, et al. (2000). "Distribution of nitrifying activity in the Seine river (France) from Paris to the estuary." *Estuaries* 23: 669-682.
- Cébron A, Berthe T & Garnier J (2003) Nitrification and nitrifying bacteria in the lower Seine River and estuary. *Applied Envir. Microb.*, 69: 7091-7100
- Cébron A., Garnier J. & Billen G. (2005). Nitrous oxide production and nitrification kinetics by bacteria communities naturally present in river water (the lower Seine, France). *Aquat. Microb. Ecol.*, 41: 25–38.
- Dambreville C., Morvan T., Germon J.-C., 2007. N₂O emission in maize-crops fertilized with pig slurry, matured pig manure or ammonium nitrate in Brittany, *Agric. Ecosyst. Environ.* (2007), doi:10.1016/j.agee.2007.06.001
- Inwood, S.E., Tank, J.L. & Bernot, M.J. 2007. Factors controlling sediment denitrification in midwestern streams of varying land use. *Microb. Ecol.*, 53(2), 247-258.
- Garnier J., Cébron A., Tallec G., Billen G., Sebilo M., Martinez A., 2006. Nitrogen behaviour and nitrous oxide emission in the tidal Seine River estuary (France) as influenced by human activities in the upstream watershed. *Biogeochemistry*, 77: 305 – 326
- Garnier J., Mounier E., Laverman A., Amsaleg C., Martinez A., Herbal M. & Geoffroy T. (2007). Dénitrification et production de N₂O dans le bassin de la Seine. Approches expérimentales et in situ dans les bassins amont. RA 2006, PIREN-Seine. cd-rom, 23p
- Guerrini M-C, Mouchel J-M, Meybeck M, Penven M J, Hubert G & Muxard T (1998) Le bassin de la Seine : la confrontation du rural et de l'urbain. Chapitre 1. In: La Seine en son bassin. Fonctionnement écologique d'un système fluvial anthropisé (Meybeck M., De Marsily G & Fustec F. eds). Elsevier, Paris. p 29-75
- Groffman, P.M., Altabet M.A., Hlke J.K.B., Butterbach-Bahl K., David M.B. Firestone E M.K., Giblin A.E., Kana T.M., Nielsen L.P. & Voytek M.A. (2006). Methods for measuring denitrification: diverse approaches to a difficult problem. *Ecological Applications*, 16(6), 2006, pp. 2091–2122
- Keeney, D. R. and D. W. Nelson (1982). "Nitrogen-inorganic forms in : Page A.L., Miller R.H., Keeney D.R. (eds.) *Methods of soil analysis. Part 2 - Chemical and microbiological properties.*" *Agronomy* 9: 643-698.
- Laverman, A.M., Van Cappellen, P., van Rotterdam-Los, D., Pallud, C., Abell, J. (2006) Potential rates and pathways of microbial nitrate reduction in coastal sediments. *FEMS Microbiology Ecology* 58(2), 179-192.
- Mounier E. Laverman A., Garnier J, Roose-Amsaleg C. (2008, soumis). Kinetics of denitrification and nitrous oxide production in river sediments (the Seine, France). *Aquatic Sci.*
- Pallud & Van Cappellen. 2006. Pallud, C. and Van Cappellen, P. 2006. Kinetics of microbial sulfate reduction in 7 estuarine sediments. *Geochem. Cosmochim. Acta.* 70 : 1148–1162

- Roose-Amsaleg C.L., E. Garnier-Sillam, M. Harry, 2001. Extraction and Purification of microbial DNA from soil and environment samples, *Applied Soil. Ecology* , 18 : 47-60.
- Sanchez N., 1997. Le processus de dénitrification dans les sédiments du barrage-réservoir de la Marne. Etude de sa cinétique et modélisation. Doctoral thesis Université P. & M. Curie, Paris 6, 180 p.
- Sebilo, M., Billen, G., Grably, M., Mariotti, A. (2003). Isotopic composition of nitrate-nitrogen as a marker of riparian and benthic denitrification at the scale of the whole Seine River system. *Biogeochemistry*, 63: 35-51.
- Sebilo M., Billen G., Mayer B., Billiou D., Grably M., Garnier J., Mariotti A., 2006. Assessing nitrification and denitrification in the Seine River and Estuary using chemical and isotopic techniques. *Ecosystems*, 9: 564–577.
- Silvestre M. & Billen G (2008). AIPRESHUME - Atlas Interactif des Pressions Humaines. RA PIREN-Seine 2007.CD-Room. 9 pages.
- Slavyck G & McIsaac JJ (1972) Comparison of two automated ammonium methods in a region of coastal upwelling. *Deep Sea Res.* 19: 1-4
- Strahler A.H. (1957). Quantitative analysis of watershed geomorphology. *Geophys. Union Trans.* 38: 913-920
- Stres B, José Bonete M., Martínez-Espinosa R-M, Mahne I. & Bothe H. Chapter 24 - Organisms of the Nitrogen Cycle Under Extreme Conditions: Low Temperature, Salinity, pH Value and Water Stress; *Biology of the Nitrogen Cycle* , 2007, Pages 369-379
- Talleg G., Garnier J., Billen G., Gousailles M. (2006). Nitrous oxide emissions from secondary activated sludge in nitrifying conditions of urban wastewater treatment plants: effect of oxygenation level. *Water Research*, 40: 2972 - 2980.
- Talleg G., Rousselot O., Garnier J. & Gousailles M. (2007). Emissions d'oxyde nitreux lors du traitement de l'azote des eaux usées de l'agglomération parisienne: état actuel et prévisions. *Sciences Eau*. in press (*Revue des Sciences de l'Eau*).
- Thouvenot M, Billen G, Garnier J (2007). Modelling nutrient exchange at the sediment – water interface of River Systems. *J. Hydrol.* 341: 55-78.
- Thouvenot- Korppoo M, Billen G, Garnier J (2008, soumis). Modelling benthic denitrification processes over a whole drainage network. *J. Hydrol.*
- Velthof G. L., Brader A. B. , Oenema O, 1996. Seasonal variations in nitrous oxide losses from managed grasslands in The Netherlands. *Phmt and Soil* 181: 263-274,
- Van Cleemput O, Vermoesen A, de Groot C-J & van Ryckeghem K. (1994). Nitrous oxide emission out of grassland. *Environ Monit. Assess* 31: 145–152