

Evaluation de la dénitrification par la mesure de l'activité oxyde nitreux réductase Etude complémentaire

Jean-Louis GARCIA

Laboratoire de Microbiologie du Sol,
O.R.S.T.O.M., B.P. 1386, Dakar, Sénégal

RÉSUMÉ

Les conditions de mesure de la vitesse de réduction du N_2O utilisée comme moyen d'estimation de l'intensité de la dénitrification ont été précisées pour un sol de rizière. Grâce au chloramphénicol, il a été possible de confirmer l'existence de deux activités distinctes : l'activité initiale due à l'oxyde nitreux-réductase présente dans l'échantillon de sol au moment du prélèvement et l'activité potentielle due à l'oxyde nitreux-réductase induite par le substrat respiratoire après une latence de 4 à 6 h. Pour une même quantité de N_2O , l'activité est proportionnelle à la quantité de sol, et pour un même poids de sol, elle est fonction de la concentration en N_2O ; pour accroître la sensibilité de la mesure, il est recommandé de se placer à $Vm/2$ ce qui permet de n'utiliser que le sixième du gaz requis pour Vm .

L'activité liée à l'enzyme induite dans un sol saturé se maintient pendant un mois et demi à son niveau initial. Lorsque ce sol est soumis à plusieurs dessiccations suivies de réhumidifications, l'activité augmente d'abord puis diminue rapidement. Les mesures effectuées après induction de l'activité dans le sol, mettent en évidence un accroissement important de celle-ci puis une diminution qui résulte partiellement de l'épuisement du N_2O au cours de l'incubation. Ces résultats montrent que l'activité mesurée après une longue période d'incubation ne représente qu'une faible fraction de l'activité réelle induite dans le sol à un moment donné par l'accumulation maximum du substrat respiratoire. Parmi plusieurs substrats carbonés ajoutés au sol, seul le succinate a eu un effet favorable, tous les autres ont inhibé l'activité.

La distribution des mesures effectuées dans une rizière suit une loi normale et 10 mesures sont généralement suffisantes pour obtenir une estimation satisfaisante de la moyenne.

MOTS CLÉS : Dénitrification - activité oxyde nitreux - réductase - technique.

ABSTRACT

The method for measuring the rate of N_2O reduction in rice paddy soil as a means for estimating the intensity of denitrification, is completed. Using the method with chloramphenicol we have confirmed the existence of two distinct activities : the nitrous oxide reductase activity initially pre-

sent when the sample was taken and the potential nitrous oxide reductase activity induced by the respiratory substrate after a lag of 4 to 6 hrs. With a fixed amount of N_2O the activity is proportional to the amount of soil, and for a given weight of soil it is a function of the N_2O concentration; to increase the sensibility of measurement, it is advisable to use a N_2O concentration that gives $Vm/2$ (only one-sixth as much gas is needed as for Vm).

The activity of enzyme induced in saturated soil maintains its initial level for a month and a half. If the soil undergoes several cycles of dessiccation and rehumidification, the activity increases at first and then declines rapidly. Measurements made after induction of activity in the soil show that there is a large increase in activity followed by a decrease resulting partially from N_2O depletion. These results show that activity measured after a long incubation represents only a small fraction of the actual activity induced in the soil by the maximum accumulation of respiratory substrate. Of several carbon substrates added to the soil only succinate had a favorable effect, the others all inhibiting the activity.

KEY WORDS : Denitrification - nitrous oxide reductase activity - technics.

INTRODUCTION

L'étude de la séquence des produits formés au cours de la dénitrification dans des sols de rizière du Sénégal, a permis de mettre en évidence une étroite corrélation entre les vitesses de formation et de réduction du N_2O et la vitesse de réduction de NO_3^- (Garcia, 1973). Ceci a conduit à l'élaboration d'une nouvelle méthode d'estimation de la dénitrification basée sur la mesure de la vitesse de réduction de N_2O (Garcia, 1974). Cette méthode a permis de démontrer l'effet rhizosphère très nettement positif du riz sur la dénitrification (Garcia, 1975 a) et a été appliquée au champ (Garcia, 1975 b).

La méthode consiste à déterminer la vitesse de consommation du N_2O par des mesures effectuées dans la

phase gazeuse des flacons contenant le sol saturé d'eau et maintenus à 37°C. La vitesse mesurée pendant les six premières heures permet d'estimer l'activité dénitrifiante initiale du sol, tandis que la vitesse mesurée ultérieurement représente l'activité dénitrifiante potentielle.

La présente étude a pour but de préciser les conditions d'utilisation de la méthode pour l'estimation de la dénitrification dans les sols de rizière.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le sol employé a été prélevé dans une rizière de la vallée du fleuve Sénégal (Boundoum Nord), séché à l'air et tamisé à 2 mm; ses principales caractéristiques sont décrites dans le tableau I. Le sol saturé d'eau est placé dans des flacons sérum de 250 ml (sauf cas particulier mentionné) en position allongée pour permettre un étalement important de l'échantillon de sol. On réalise l'anaérobiose par un vide poussé suivi d'un remplissage à l'hélium N45 (Sté l'Air Liquide, Paris), opérations qui sont répétées 3 fois. Du krypton N35 est ajouté dans tous les cas comme étalon interne.

D'autre part, dans le but d'établir la loi de répartition statistique des mesures, 50 prélèvements de sol ont été effectués dans une parcelle de la station expérimentale de Djibélor en Casamance. Les caractéristiques du sol de la parcelle sont indiquées au tableau I.

Pour suivre la réduction du N_2O dans l'atmosphère des flacons, des mesures sont effectuées à l'aide d'un chromatographe à détection par conductibilité thermique VARIAN AEROGRAPH 90 P4 couplé à un enregistreur VARIAN A25, dans les conditions d'utilisation décrites par ailleurs (Garcia, 1974). Les injections d'échantillons de l'atmosphère des flacons sont réalisées à l'aide d'une vanne semi-automatique dont l'utilisation a été décrite ainsi que le calcul des résultats (Garcia, 1975 b). Les valeurs exprimées correspondent à 5 répétitions.

RÉSULTATS

1. ACTION DU CHLORAMPHÉNICOL

50 g de sol additionnés de 50 ml d'eau sont pré-incubés en anaérobiose à 30° en agitation, dans des flacons sérum de 500 ml, en présence de 500 ppm de $N-N_2O$ pendant 48 h, en présence ou en l'absence de chloramphénicol (2 mg). Au bout de ce laps de temps, l'atmosphère des flacons est renouvelée et l'incubation poursuivie pendant 26 h en présence de 20 ml de N_2O et 10 m de krypton pour la détermination de l'activité oxyde nitreux-réductase. Dans une deuxième série de flacons, l'incubation de 26 h est effectuée immédiatement après humectation du sol.

Les différents traitements ont été les suivants : (1) sol non préincubé; (2) sol non préincubé, détermination de l'activité effectuée avec chloramphénicol; (3) sol préincubé; (4) sol préincubé, détermination de l'activité effectuée avec chloramphénicol; (5) sol préincubé avec chloramphénicol.

Les résultats des mesures sont rapportés à la figure 1. Le sol préincubé avec chloramphénicol et N_2O et le sol non préincubé mais dont l'activité est déterminée en présence de chloramphénicol ont une activité oxyde nitreux-réductase nulle. Dans le sol préincubé avec N_2O et dont l'activité oxyde nitreux-réductase est déterminée en présence de chloramphénicol, cette dernière est voisine de celle qui est mesurée directement après humectation, en l'absence de chloramphénicol. Dans ce dernier cas, une latence de 4 h environ est observée.

Ces résultats montrent qu'une activité oxyde nitreux-réductase peut être induite dans le sol en présence de N_2O , et que cette induction est empêchée par le chloramphénicol. Ce dernier remplit donc également dans le sol sa fonction d'inhibiteur des synthèses protéiques. L'induction peut être provoquée au moyen d'une incubation préalable à la détermination de l'activité, mais elle peut également avoir lieu au cours de la détermination après un temps suffisant. Il est donc

TABLEAU I
DESCRIPTION DES SOLS

Sol	pH	N ‰	C ‰	Argile %
Boundoum Nord	5,3	1,40	18,00	48,30
Djibélor	5,3	1,92	17,56	25,32

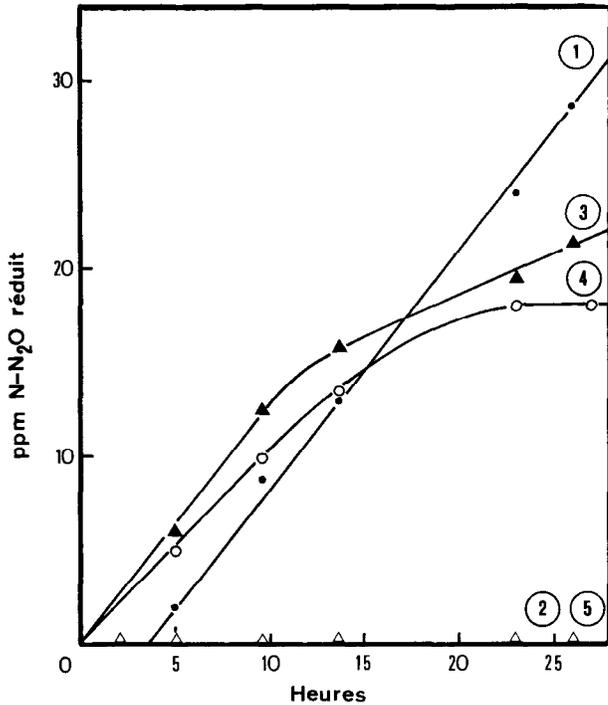


Fig. 1. — Action du chloramphénicol sur l'activité oxyde nitreux-réductase d'un sol de rizière. (1) sol non préincubé; (2) sol non préincubé, mesure effectuée en présence de chloramphénicol; (3) sol préincubé avec N_2O ; (4) sol préincubé avec N_2O , mesure effectuée en présence de chloramphénicol; (5) sol préincubé avec N_2O et chloramphénicol.

possible de mesurer par cette méthode une activité initiale si elle est présente dans le sol au moment du prélèvement, puis une activité potentielle induite par le substrat respiratoire.

2. INFLUENCE DE LA QUANTITÉ DE SOL ET DE LA CONCENTRATION EN N_2O

Une quantité de sol de 1,3 kg répartie par fractions de 100 g en flacons sérum de 500 ml, saturées d'eau, maintenues en anaérobiose à 37° en présence de 1500 ppm de $N-N_2O$, est séchée à l'air après une semaine d'incubation puis tamisée à 2 mm. Des échantillons de 5, 10, 20 et 40 g du sol ainsi traité sont saturés d'eau puis maintenus en présence de 50, 100, 200 ou 400 ppm de $N-N_2O$ et 2 ml de krypton, en anaérobiose à 37° pendant 24 h.

On effectue ensuite les analyses de l'atmosphère pour déterminer l'activité oxyde nitreux-réductase. Les résultats (fig. 2) montrent que pour une même concentration en N_2O , l'activité est proportionnelle à la quantité de

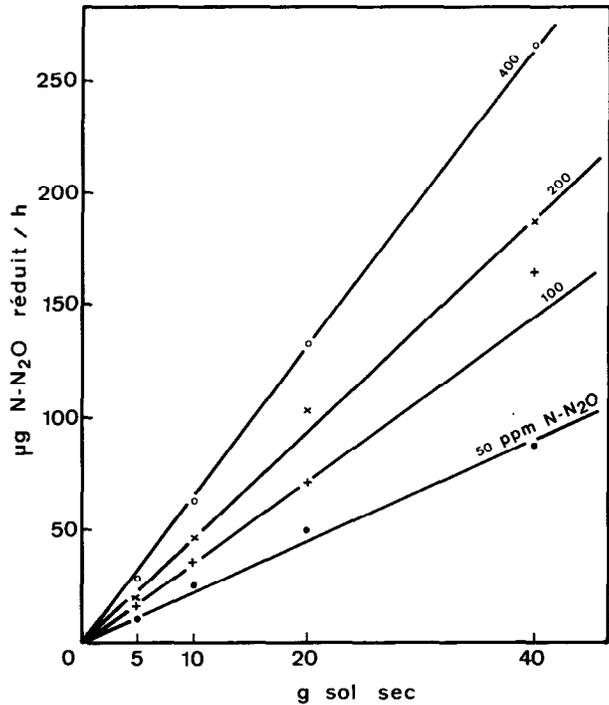


Fig. 2. — Influence de la quantité de sol et de la concentration en N_2O sur l'activité oxyde nitreux-réductase d'un sol de rizière.

sol, et que pour une même quantité de sol, cette activité est fonction de la concentration en N_2O . Rappelons que la vitesse maximum V_m est obtenue avec 1 500 ppm de $N-N_2O$, c'est-à-dire environ 10 % de N_2O dans la phase gazeuse du flacon de mesure (Garcia, 1974).

3. PERSISTANCE DE L'ACTIVITÉ OXYDE NITREUX-RÉDUCTASE INDUITE DANS LE SOL

30 g de sol sont saturés d'eau et mis en incubation en anaérobiose en présence de 2,5 ml de N_2O à 37° pendant 48 h, puis on renouvelle l'atmosphère des flacons par un vide poussé suivi d'un gazage à l'hélium, opérations qui sont répétées 3 fois. On maintient ensuite les flacons à 37° pendant 6 h en présence de 2,5 ml de N_2O et 1 ml de krypton pour déterminer l'activité oxyde nitreux-réductase induite pendant la préincubation. Les flacons sont ensuite séparés en deux lots de 5 flacons chacun et incubés à 30°. Les flacons du premier lot sont débouchés pour permettre le dessèchement du sol.

Tous les 15 j, pendant trois mois, les flacons desséchés sont rehumidifiés puis on effectue une mesure de l'acti-

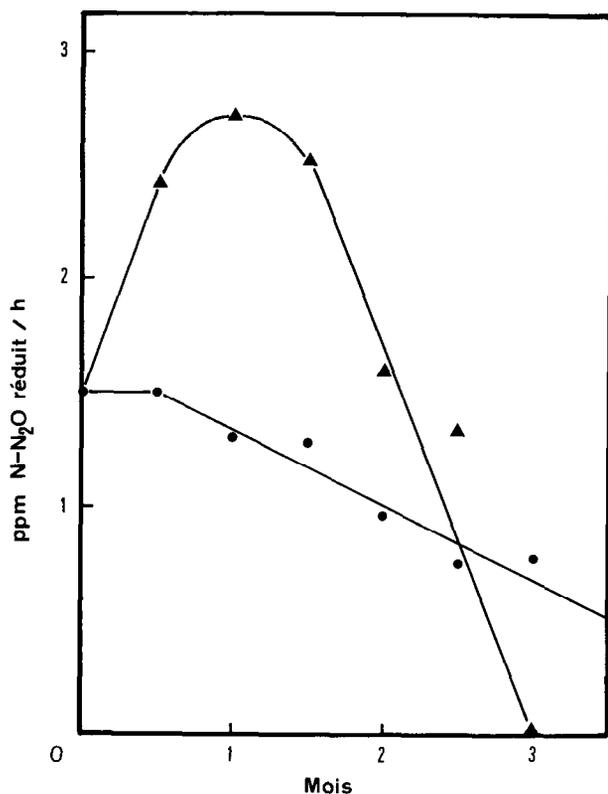


Fig. 3. — Persistence de l'activité oxyde nitreux-réductase induite dans un sol de rizière. — sol maintenu saturé en anaérobiose; +—+ sol séché après chaque mesure d'activité.

tivité oxyde nitreux-réductase initiale de la même façon que précédemment. Les mêmes conditions de mesure sont également appliquées aux flacons conservés bouchés.

Les résultats des mesures (fig. 3) montrent que l'activité oxyde nitreux-réductase qui correspond initialement à 1,5 ppm de N-N₂O réduit/h, diminue très lentement dans le sol maintenu humide alors que dans le sol périodiquement séché puis rehumidifié pour la mesure, l'activité présente un maximum (2,7 ppm N-N₂O réduit/h) au bout d'un mois puis diminue. Elle atteint le niveau initial après 2 mois puis disparaît après 3 mois.

4. INFLUENCE DE LA DURÉE DE LA PRÉINCUBATION SUR L'ACTIVITÉ OXYDE NITREUX-RÉDUCTASE INITIALE

Des échantillons de 30 g de sol sont saturés d'eau et mis en incubation en anaérobiose à 37° en présence de 2,5 ml de N₂O pendant 48 h. Toutes les 3 h, on effectue

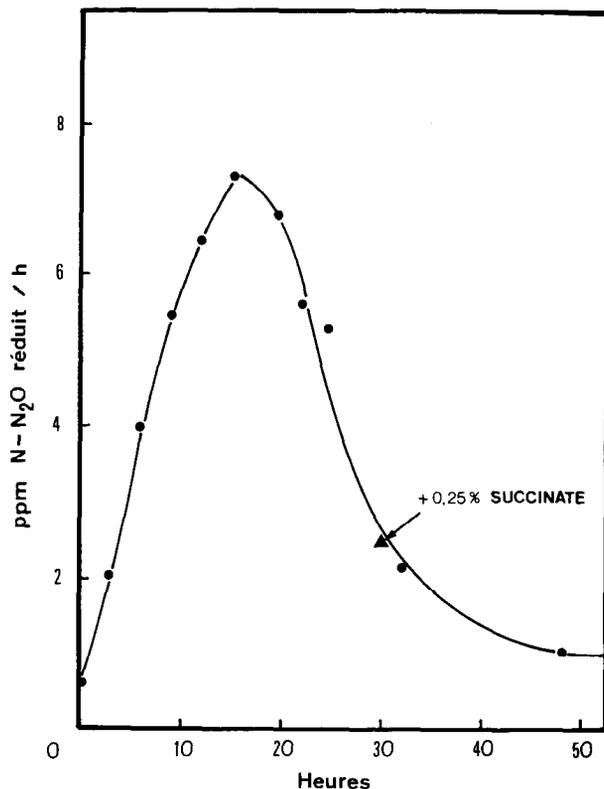


Fig. 4. — Influence de la durée d'incubation d'un sol de rizière avec N₂O, sur l'activité oxyde nitreux-réductase initiale.

une mesure de l'activité oxyde nitreux-réductase initiale à 37°, dans 5 flacons prélevés dans le lot. Pour cela on renouvelle l'atmosphère d'hélium et on ajoute 2,5 ml de N₂O et 1 ml de krypton.

Les résultats des mesures (fig. 4) montrent que l'activité initiale augmente régulièrement pendant les 15 premières heures puis diminue. Elle est, après 48 h d'incubation, égale au double de la valeur initiale (1 ppm N-N₂O réduit/h).

5. INFLUENCE DE L'ADDITION D'UN SUBSTRAT CARBONÉ

Des échantillons de 30 g de sol sont saturés avec des solutions de glucose ou de succinate de sodium dont les concentrations sont telles que les quantités dans le sol soient de 0,25, 0,50, 0,75, 1 ou 2 %, exprimées par rapport au poids sec de sol. On incube en anaérobiose à 37° pendant 5 j en présence de 10 ml de N₂O. Après ce laps de temps, on renouvelle l'atmosphère des flacons qui sont à nouveau incubés en anaérobiose à 37° pendant 24 h après addition de 5 ml de N₂O et 2 ml

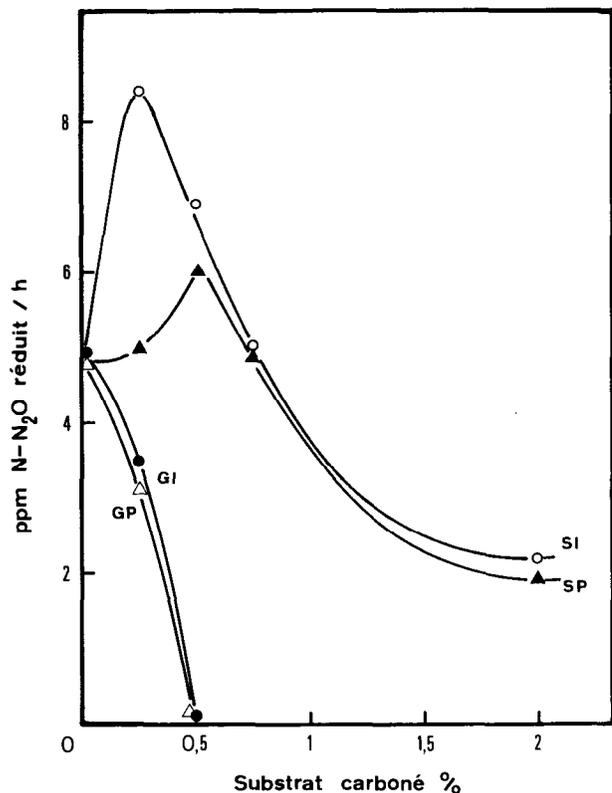


Fig. 5. — Influence de l'addition d'un substrat carboné sur l'activité oxyde nitreux-réductase d'un sol de rizière. S = succinate; G = glucose; I = activité initiale; P = activité potentielle.

de krypton pour la mesure des activités initiale et potentielle.

Les résultats des mesures (fig. 5) montrent un très net effet dépressif du glucose sur l'activité oxyde nitreux-réductase qui est nulle en présence de 0,50 % de glucose. Par contre la présence d'une teneur en succinate de 0,25 % conduit presque au doublement de l'activité initiale puis au-delà d'une teneur de 1 %, les activités initiale et potentielle diminuent sans toutefois s'annuler comme dans le cas du glucose. D'autres substrats tels que saccharose, mannitol, acétate, lactate et pyruvate ont pour effet la disparition de l'activité, dès la teneur 0,25 %.

6. LOI STATISTIQUE DE RÉPARTITION DES MESURES OBTENUES PAR LA MÉTHODE DE RÉDUCTION DE N₂O

Dans le but de définir la loi de répartition statistique des mesures obtenues par la méthode de réduction de N₂O suivant la technique habituelle (Garcia, 1975 b),

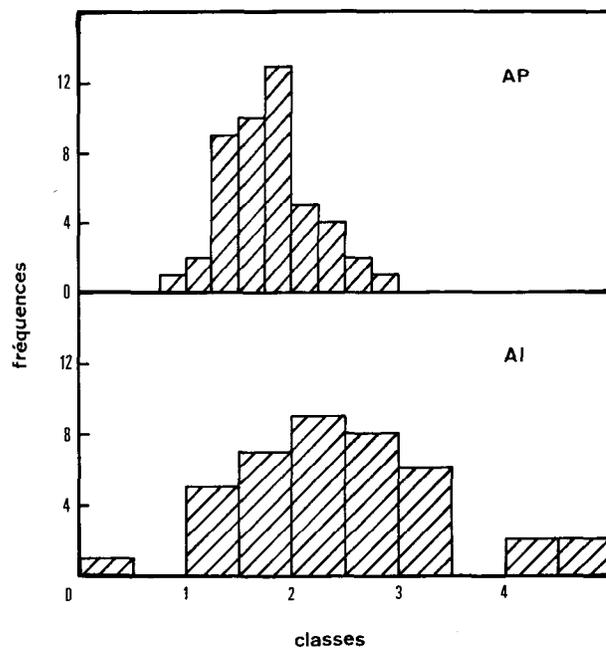


Fig. 6. — Histogramme de répartition des mesures des activités dénitrifiantes initiales (AI) et potentielles (AP) pour l'essai au champ.

50 répétitions ont été réalisées dans une parcelle de la station expérimentale de Djibélor en Casamance. Les prélèvements ont été effectués dans la rhizosphère d'un riz de un mois et demi, 3 semaines après un épandage d'urée.

Les histogrammes de répartition des résultats des mesures sont compatibles avec une loi normale (fig. 6). La vérification de la normalité (fig. 7) consistant à porter les fréquences cumulées relatives sur un graphique à ordonnées en échelle gaussienne (MONJALLON, 1961), donne un résultat acceptable confirmé par le fait que 95 % des données sont comprises dans l'intervalle $m \pm 2s$ (m = moyenne arithmétique, s = écart-type).

DISCUSSION

Dans un sol qui n'a pas été le siège d'une dénitrification récente, la réduction de N₂O ne se produit qu'après une latence de plusieurs heures. Dans le cas contraire, elle intervient dès le début de l'incubation et peut être amplifiée après plusieurs heures. L'accroissement d'activité, comme cela est montré par l'effet du chloramphénicol, résulte de la synthèse *de novo* d'enzyme induite par le substrat respiratoire, lorsque le niveau de carbone organique assimilable est suffisant.

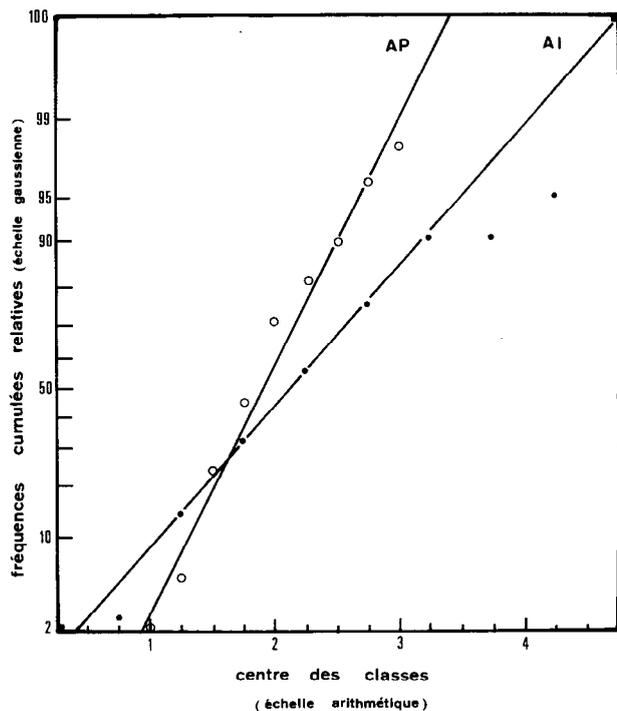


Fig. 7. — Fréquence cumulée relative des mesures des activités dénitrifiantes initiales (AI) et potentielles (AP) pour l'essai au champ.

La réduction de N₂O est proportionnelle à la quantité de sol mais il faut veiller à ce que l'épaisseur de celui-ci ne limite pas la diffusion du gaz. C'est pourquoi on ne doit pas dépasser 50 g de sol dans les flacons serum de 250 ml placés en position horizontale (Garcia, 1974). Pour une quantité de sol donnée, la vitesse de réduction de N₂O est fonction de sa concentration. Il a été montré qu'elle est maximum pour une concentration de N₂O égale à environ 10 % de la phase gazeuse (Garcia, 1974). Cependant pour accroître la sensibilité de la méthode, il est préférable de n'utiliser que le sixième de cette concentration. La vitesse de réduction est alors diminuée de moitié mais les pics mesurés sur le chromatogramme sont beaucoup moins hauts, ce qui permet de détecter plus facilement de faibles activités.

Dans le sol maintenu humide, l'activité oxyde nitreux-réductase mesurée périodiquement ne diminue que lentement; elle est sensiblement constante au cours des premières semaines. Par contre, lorsque le sol est soumis à des humectations et dessiccations répétées, l'activité mesurée immédiatement après la rehumectation croît après les deux premières humectations puis diminue très rapidement par suite probablement d'un épuisement des substrats carbonés libérés par les humectations et dessiccations successives.

En suivant l'activité oxyde nitreux-réductase dans un sol au cours d'une incubation avec N₂O, on constate

TABLEAU II
RESULTATS DU TEST STATISTIQUE DE REPARTITION DES MESURES
OBTENUES PAR LA METHODE DE REDUCTION DE N₂O APPLIQUEE AU CHAMP

		Activité initiale AI	Activité potentielle AP
Effectif	n	39	47
Moyenne ppm N réduit/h	m	2,49	1,78
Variance	s ²	0,818	0,176
Ecart-type	s	0,29	0,12
% des mesures comprises dans l'intervalle m ± 2 s	$\frac{ts}{\sqrt{n}}$	97,5 %	96 %
Précision de m pour 40 mesures	V	11,6 %	6,74 %
Précision de m pour 10 mesures	2 V	23,6 %	13,5 %

qu'elle atteint rapidement une valeur très élevée puis diminue très vite. Cette diminution d'activité semble correspondre à la disparition du substrat respiratoire de la phase gazeuse des flacons; en effet, un apport de carbone pendant cette période n'entraîne aucune modification d'activité (fig. 4). Par contre, lorsqu'on rajoute du N_2O dans les flacons pendant cette même période, plusieurs heures après sa totale disparition et que l'on poursuit l'incubation pendant quelques heures, l'activité mesurée est à nouveau accrue. L'activité initiale mesurée après une longue période d'incubation pourrait donc n'être qu'une petite fraction de l'activité réelle induite dans le sol à un moment donné par la présence de composés oxydés de l'azote dont le N_2O . En effet, l'accumulation de N_2O a lieu pendant la dénitrification dans les sols acides (Garcia, 1973), ce qui est le cas de la plupart des sols de rizière du Sénégal. Par l'utilisation de cette méthode *in situ*, il est donc possible de savoir si le sol a été le siège d'une récente dénitrification mais l'intensité réelle de cette dernière ne peut être évaluée.

Dans le sol étudié, parmi une série de glucides et d'acides organiques testés, seul le succinate a montré un effet positif sur l'activité oxyde nitreux-réductase en doublant l'activité potentielle du sol; les autres substrats ont tous eu un effet dépressif. Aucune explication valable n'a pu être avancée.

Enfin, la distribution des mesures obtenues par l'application de la méthode au champ suit une loi Normale. En effectuant 10 répétitions pour chaque mesure, on obtient une évaluation satisfaisante de la moyenne, l'intervalle de confiance étant de l'ordre de 15 à 20 %.

CONCLUSION

Une dénitrification dont le sol de rizière a été le siège récemment peut être mise en évidence par la mesure d'une activité oxyde nitreux-réductase. La méthode élaborée peut se révéler très utile pour tester les inhibiteurs de nitrification ou les engrais réputés libérer lentement l'azote. Elle pourrait également permettre d'évaluer indirectement une densité de population après induction de l'oxyde nitreux-réductase au moyen d'une préincubation du sol en présence de N_2O .

Manuscrit reçu au Service des Publications le 11 mai 1977

BIBLIOGRAPHIE

- GARCIA (J.-L.), 1973. — Séquence des produits formés au cours de la dénitrification dans les sols de rizières du Sénégal. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 124B : 351-362.
- GARCIA (J.-L.), 1974. — Réduction de l'oxyde nitreux dans les sols de rizières du Sénégal : mesure de l'activité dénitrifiante. *Soil Biol. Biochem.*, 6 : 79-84.
- GARCIA (J.-L.), 1975 a. — Effet rhizosphère du riz sur la dénitrification. *Soil Biol. Biochem.*, 7 : 139-141.
- GARCIA (J.-L.), 1975 b. — Evaluation de la dénitrification dans les rizières par la méthode de réduction de N_2O . *Soil Biol. Biochem.*, 7 : 251-256.
- MONJALLON (A.), 1961. — Introduction à la méthode statistique, pp. 137-138, Vuibert éd., Paris.