

VALIDITÉ DE L'ESTIMATION DE LA FIXATION BIOLOGIQUE DE L'AZOTE DANS LA RHIZOSPHERE PAR LA MÉTHODE DE RÉDUCTION DE L'ACÉTYLÈNE (*)

par G. RINAUDO (**) et Y. DOMMERGUES

(Centre de Pédologie du C.N.R.S., Vandœuvre-lès-Nancy, France)

SUMMARY

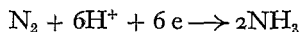
THE VALIDITY OF ACETYLENE REDUCTION METHOD FOR THE DETERMINATION OF NITROGEN FIXATION IN RICE RHIZOSPHERE

An experimental study of the quantitative relationship between acetylene reduction and of nitrogen fixation in the rhizosphere of rice grown in 3 different tropical soils shows molar ratios « C₂H₄ : reduced N₂ » of 2.64 ; 2.74 ; 3.14, respectively. If, in the application of the acetylene reduction method, a molar ratio of 3 is assumed, quantitative determinations of nitrogen fixation by this method and by the Kjeldahl method are of the same order of magnitude, provided the number of estimations is sufficient to establish the graphs of acetylene reduction rate and of nitrogen fixation rate, as a function of plant age. The integration of this curve provides an estimate of the nitrogen fixed during the experiment.

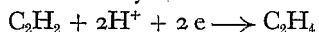
Key words: Rhizosphere of rice. Nitrogen fixation. Acetylene reduction.

INTRODUCTION

La méthode de réduction de l'acétylène est de plus en plus utilisée pour estimer la fixation biologique de l'azote dans des systèmes simples (extraits acellulaires, cultures pures de bactéries ou cyanophycées) ou des systèmes plus complexes (nodules de légumineuses et non-légumineuses, sols, eaux). On sait que cette estimation est fondée sur l'existence d'une relation quantitative constante entre la réaction de réduction de l'azote moléculaire :



et la réaction de réduction de l'acétylène :



Puisque la réduction d'une molécule d'azote exige 6 électrons et la réduction d'une molécule d'acétylène en exige seulement 2, le rapport molaire

(*) Manuscrit reçu le 16 octobre 1970.

(**) Adresse actuelle : O.R.S.T.O.M., B.P. 1386, Dakar, Sénégal.

16 NOV. 1971

Collection de Référence

n° 5065 Bio Soils

théorique C_2H_4/N_2 réduit est de 3 : 1. Mais l'expérience montre que, si ce rapport est souvent de l'ordre de 3 ou 4, notamment dans le cas de systèmes simples (Bergersen [1], Dilworth [3]), il peut être plus élevé, même dans le cas de systèmes simples tels que des extraits acellulaires bruts d'*Azotobacter vinelandii*, où ce rapport atteint 6,0 (Fisher et Brill [4]). Dans les systèmes complexes, tels que le sol, des rapports beaucoup plus élevés ont été signalés [2]. Il apparaît donc indispensable, surtout dans le cas des sols, de vérifier la valeur du rapport molaire C_2H_4/N_2 réduit dans les conditions expérimentales où l'on se place. Le but de la présente note est précisément d'examiner le cas complexe de la fixation d'azote au niveau de la rhizosphère du riz dans différents types de sols tropicaux.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les expériences ont été conduites avec le riz IR8 cultivé dans trois sols alluviaux ivoiriens décrits par ailleurs [7]. Pendant toute la durée de l'expérience, les sols ont été maintenus sous une lame d'eau (engorgement) et à l'abri de la lumière pour éviter le développement des algues; la photopériode a été de 14 heures et l'intensité lumineuse d'environ 20 000 lux.

Pour chacun des sols, le dispositif expérimental comportait deux traitements :

a) Microcolonnes de sol de 12 × 120 mm ensemencées avec une graine de riz prégermée (*sol rhizosphérique*) ;

b) Microcolonnes de sol de 12 × 120 mm non ensemencées (*sol non rhizosphérique*).

Le nombre de microcolonnes était suffisant pour permettre le sacrifice de 5 d'entre elles à chacune des 6 dates d'observation (3^e ou 4^e, 7^e ou 8^e, 14^e, 21^e, 28^e, 35^e jour), afin de déterminer la vitesse de fixation de l'azote par la méthode de réduction de l'acétylène.

La méthode adoptée est celle de Stewart et coll. [9] et Hardy et coll. [5] modifiée en ce qui concerne la composition du mélange gazeux; nous avons en effet remplacé le mélange oxygène-argon-acétylène par un mélange renfermant seulement argon et acétylène (A : 0,9 atm.; C_2H_2 : 0,1 atm.), des expériences préliminaires ayant montré la supériorité de ce mélange pour l'étude du sol rhizosphérique.

Le *sol rhizosphérique* n'est autre que le sol contenu dans les microcolonnes (tubes en pyrex) où le riz a poussé; en fait, c'est l'ensemble « plant de riz et sol des microcolonnes » que l'on soumet au test de l'acétylène.

Le *sol non rhizosphérique* est constitué par le sol contenu dans les microcolonnes où l'on n'a pas semé de riz.

Chaque échantillon de sol rhizosphérique ou non rhizosphérique est placé dans une fiole serum de 140 ml fermée par un bouchon de caoutchouc étanche avec virole; dans chaque fiole, on fait le vide et l'on introduit le mélange gazeux argon-acétylène. Les flacons sont incubés à l'obscurité à 28° C et les dosages sont effectués après 4, 7 et 24 h d'incubation, de façon à construire, dans chaque cas, la courbe de réduction de l'acétylène en fonction du temps, cette courbe comprenant une phase de latence et une phase linéaire. L'expérience a montré que trois dosages suffisaient en fait pour établir la courbe.

La vitesse de fixation de l'azote a été déduite de la vitesse de réduction de l'acétylène correspondant à la phase linéaire de production d'éthylène lors de l'incubation sous acétylène [6] en se fondant sur le rapport molaire théorique C_2H_4/N_2 réduit, de 3 : 1.

Une expérience préliminaire ayant montré qu'il n'y a pas de différence significative entre la vitesse de réduction de l'acétylène déterminée après la période d'éclairement et la vitesse déterminée après une période d'obscurité (tableau I), on a systématiquement mesuré cette vitesse après la période d'éclairement.

L'estimation de la fixation de l'azote dans la rhizosphère par la méthode Kjeldahl a consisté à doser au 35^e jour l'azote total dans le système « sol rhizosphérique + plante » et dans le système « sol non rhizosphérique », et à faire

TABLEAU I. — Vitesse de réduction de l'acétylène déterminée après une période d'éclairement (L) ou après une période d'obscurité (O)

SOL DE DABOU		SOL D'ABENGOUROU		SOL DE YAMOOUSSOKRO	
L	O	L	O	L	O
14,7	20,2	4,5	8,5	9,4	11,2
16,1	18,6	7,0	6,3	11,2	10,1
14,6	16,8	5,9	4,1	15,6	13,5
19,3	14,3	9,2	5,2	7,8	8,9
18,8	16,6	8,6	6,2	11,4	10,0
14,7	17,1	6,3	7,3	12,3	8,2
16,4	17,3	6,9	6,3	11,3	10,3

La vitesse de réduction de l'acétylène est exprimée en nmoles C_2H_4/g sol/h.

Les moyennes sont inscrites en italique.

la différence entre ces deux données. Des précautions d'échantillonnage particulières ont été prises pour améliorer la reproductibilité de la méthode Kjeldahl ([7, 8] et Rouquerol; communication personnelle).

Tous les résultats sont exprimés en fonction du poids de sol sec à l'étuve.

RÉSULTATS

1° MÉTHODE DE RÉDUCTION DE L'ACÉTYLÈNE.

Les vitesses de fixation journalière de l'azote déterminées par cette méthode, correspondant pour chacun des trois sols aux différents âges des plants de riz, sont reportées au tableau II, 3^e colonne. A titre d'exemple, on a construit la courbe des vitesses de fixation en fonction de l'âge du riz

TABLEAU II. — Vitesse de fixation de l'azote dans la rhizosphère du riz cultivé dans trois sols ivoiriens (méthode de réduction de l'acétylène).

	AGE DE LA PLANTE (j)	VITESSE DE RÉDUCTION DE L'ACÉTYLÈNE (nmoles C_2H_4 /g sol/h)	VITESSE DE FIXATION DE L'AZOTE (μg N/g sol/j)
Sol de Dabou	4	1,5	0,34
	7	6,7	1,50
	14	16,5	3,70
	21	25,0	5,60
	28	32,5	7,27
	35	21,0	4,70
Sol d'Abengourou	3	0,1	0,02
	7	0,3	0,07
	14	7,1	1,59
	21	9,9	2,22
	28	10,9	2,44
	35	8,5	1,90
Sol de Yamoussokro	4	0,6	0,13
	8	6,2	1,39
	14	11,2	2,51
	21	18,0	4,03
	28	13,2	2,95
	35	11,2	2,51

Pour transformer la vitesse de réduction de l'acétylène en vitesse de fixation de l'azote, on a adopté le rapport molaire théorique C_2H_4/N_2 réduit de 3 : 1.

La vitesse de réduction de l'acétylène dans les sols non rhizosphériques est négligeable : 0,007 à 0,0064 nmoles C_2H_4 /g sol/h pour le sol de Dabou ; 0,002 à 0,057 nmoles C_2H_4 /g sol/h pour le sol d'Abengourou ; 0,014 à 0,057 nmoles C_2H_4 /g sol/h pour le sol de Yamoussokro.

Chaque chiffre correspond à la moyenne de 5 mesures.

dans le cas du sol de Yamoussokro (fig. 1) ; la fixation d'azote rhizosphérique en 35 jours, est représentée graphiquement par la surface hachurée verticalement (soit 82,1 μg N/g de sol).

2° MÉTHODE KJELDAHL.

Les valeurs de fixation d'azote en 35 jours figurent, pour chaque sol, au tableau III, 4^e colonne. A partir de ces valeurs, on a calculé la vitesse moyenne de fixation journalière (5^e colonne).

On a reporté sur la figure 1 la valeur de la vitesse moyenne correspondant au sol de Yamoussokro ; la fixation d'azote en 35 jours est représentée graphiquement par la surface hachurée horizontalement (soit 90,0 μg N/g de sol).

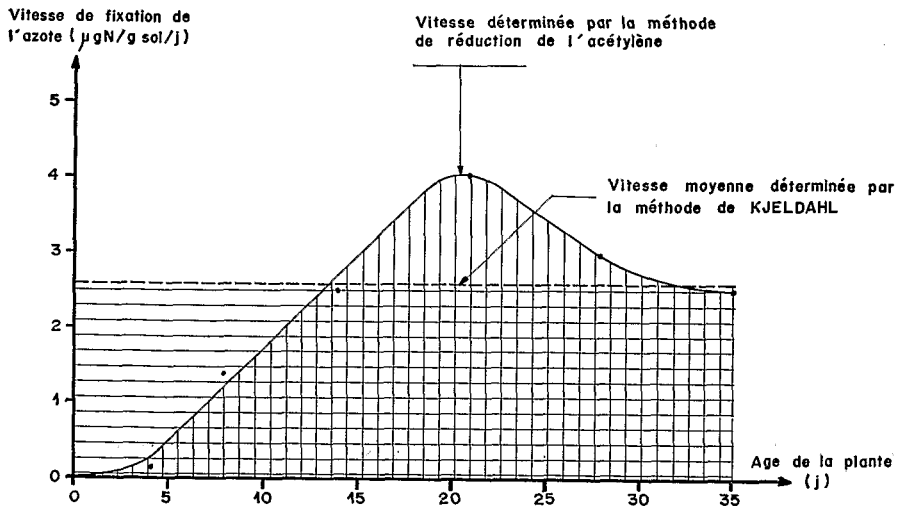


FIG. 1. — Mesure de l'activité fixatrice d'azote dans la rhizosphère du riz (sol de Yamoussokro).

TABLEAU III. — Fixation de l'azote dans la rhizosphère de plants de riz âgés de 35 jours dans trois sols ivoiriens (méthode de Kjeldahl).

	TENEUR EN AZOTE DES MICROCOLONNES AU 35 ^e JOUR (mg N/microcolonne)		FIXATION DE L'AZOTE DANS LA RHIZOSPHERE		
	non plantées (sol non rhizos- phérique)	plantées (sol rhizos- phérique + plante)	en mg N par microcolonne en 35 jours	en µg N par g de sol en 35 jours	en µg N par g de sol et par jour
Sol de Dabou	17,50	18,43	0,93	164,0	4,69
Sol d'Abengourou	16,45	16,75	0,30	49,8	1,42
Sol de Yamoussokro ..	12,02	12,70	0,68	90,0	2,57

CONCLUSION

1° Il ressort du tableau IV que les résultats obtenus par la méthode Kjeldahl et les résultats obtenus par la méthode de réduction de l'acétylène (avec estimation de la fixation fondée sur le rapport molaire théorique C_2H_4/N_2 réduit de 3 : 1) sont très voisins, ce qui prouve que l'adoption du rapport molaire de 3 : 1 est justifiée dans le cas du système expérimental considéré (rhizosphère du riz). L'estimation de la fixation d'azote par la méthode de réduction de l'acétylène est donc parfaitement valable.

TABLEAU IV. — Fixation de l'azote en 35 jours dans la rhizosphère du riz déterminée par la méthode de réduction de l'acétylène et par la méthode Kjeldahl ($\mu\text{g N/g sol}$).

	MÉTHODE DE RÉDUCTION DE L'ACÉTYLÈNE	MÉTHODE DE KJELDAHL
Sol de Dabou	144,0	164,0
Sol d'Abengourou	52,1	49,8
Sol de Yamoussokro	82,1	90,0

On a fondé l'estimation de la fixation d'azote sur le rapport molaire théorique $\text{C}_2\text{H}_4/\text{N}_2$ réduit de 3 : 1.

Elle présente de plus sur la méthode Kjeldahl l'avantage de permettre l'évaluation précise de la fixation d'azote pour des laps de temps très courts, alors que la méthode Kjeldahl est difficilement applicable dans ces conditions, car la différence observée entre la teneur en azote du système « sol rhizosphérique + plante » et celle du système « sol non rhizosphérique » est trop faible pour être décelée avec précision.

Pour faciliter la comparaison de nos résultats avec ceux publiés par ailleurs (Dilworth [3]), nous les avons exprimés en fonction des rapports molaires calculés (tableau V).

TABLEAU V. — Rapports molaires $\text{C}_2\text{H}_4/\text{N}_2$ réduit calculés à partir des données expérimentales.

	FIXATION DE L'AZOTE EN 35 JOURS		RAPPORT MOLAIRE CALCULÉ
	Méthode de réduction de l'acétylène (nmoles $\text{C}_2\text{H}_4/\text{g sol}/35 \text{ j}$)	Méthode de Kjeldahl (nmoles $\text{N/g sol}/35 \text{ j}$)	
Sol de Dabou	15 420	5 860	2,64
Sol d'Abengourou ..	5 580	1 780	3,14
Sol de Yamoussokro.	8 790	3 210	2,74

2° La présente étude montre d'autre part la nécessité de mesurer la vitesse de réduction de l'acétylène à des intervalles de temps assez rapprochés pour tracer la courbe de fixation de l'azote en fonction de l'âge de la plante, courbe à partir de laquelle on calcule par intégration la fixation pendant la période considérée.

RÉSUMÉ

L'estimation de la fixation biologique de l'azote dans la rhizosphère du riz par la méthode de réduction de l'acétylène, fondée sur l'emploi du rapport molaire théorique C_2H_4/N_2 réduit de 3 : 1, donne sensiblement les mêmes résultats que la méthode conventionnelle (Kjeldahl), à condition d'effectuer un nombre suffisant de mesures pour tracer la courbe des vitesses de fixation d'azote en fonction de l'âge de la plante, courbe à partir de laquelle on calcule par intégration la fixation de l'azote pendant le temps considéré.

Mots clés : Rhizosphère. Fixation de N. Méthode de réduction de l'acétylène.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BERGERSEN (F. J.). The quantitative relationship between nitrogen fixation and the acetylene-reduction assay. *Aust. J. biol. Sci.*, 1970, 23, 1015-1026.
- [2] BROUZES (R.), MAYFIELD (C. I.) and KNOWLES (R.). Effect of oxygen partial pressure on nitrogen fixation and acetylene reduction in a sandy loam soil amended with glucose. *Plant and soil*, 1971 (sous presse).
- [3] DILWORTH (M. J.). The acetylene reduction method for measuring biological nitrogen fixation. *Rhizobium Newsletter*, 1970, 15, 1, 7-15.
- [4] FISHER (R. J.) and BRILL (W. J.). Mutants of *Azotobacter vinelandii* unable to fix nitrogen. *Biochem. Biophys. Acta*, 1969, 184, 99-105.
- [5] HARDY (R. W. F.), HOLSTEN (R. D.), JACKSON (E. K.) and BURNS (R. C.). The acetylene-ethylene assay for N_2 fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiol.*, 1968, 43, 1185-1207.
- [6] PAUL (E. A.), MYERS (R. J. K.) and RICE (W. A.). Nitrogen fixation in grassland and associated cultivated ecosystems. *Plant and Soil*, 1971 (sous presse).
- [7] RINAUDO (G.), BALANDREAU (J.) and DOMMERMUES (Y.). Algal and bacterial non-symbiotic nitrogen fixation in paddy soils. *Plant and Soil*, 1971 (sous presse).
- [8] ROUQUEROL (T.). Variations dans le pouvoir fixateur des sols de rizières de Camargue. Remarques sur la technique employée et analyse des résultats. *Ann. Inst. Pasteur*, 1965, 109, 293-300.
- [9] STEWART (W. D. P.), FITZGERALD (G. P.) and BURRIS (R. H.). *In situ* studies on N_2 fixation using the acetylene reduction technique. *Proc. nat. Acad. Sci., U.S.A.*, 1967, 58, 2071-2078.