

SÉQUENCE DES PRODUITS
FORMÉS AU COURS DE LA DÉNITRIFICATION
DANS LES SOLS DE RIZIÈRES DU SÉNÉGAL

par J.-L. Garcia

ORSTOM, Laboratoire de Microbiologie du Sol, B. P. 1386, Dakar, Sénégal

SUMMARY

SEQUENTIAL PRODUCTS OF DENITRIFICATION
IN SENEGALESE PADDY SOILS

A study of the sequential products of denitrification, *in vitro*, in paddy soils from Senegal was undertaken by gas chromatography. The following results were obtained: 1) nitrate reduction rate was positively correlated with the organic carbon of the soil; 2) only a small quantity of nitrite was formed, probably because of the acidity of the soil; 3) nitric oxide production was observed in 16 of the 30 soils studied; the quantity produced was substantial in only 4 of these; the maximum amount of NO was very significantly related, directly with the maximum amount of nitrite and indirectly with the pH of the submerged soils; 4) the rate of formation and of reduction of nitrous oxide were directly related with the rate of nitrate reduction and with the soil organic carbon content; 5) in some soils during denitrification, it was possible to demonstrate apparent and temporary losses of nitrogen: the nitrate which had disappeared could not be completely recovered in the form of NO_2^- , NO, N_2O or of N_2 .

KEY-WORDS: Denitrification, Soil, Nitrogen; Senegal, Paddy soils, Sequential products.

INTRODUCTION

Les pertes d'azote dans les sols par dénitrification ont été, depuis longtemps, l'objet de très nombreuses études. Les méthodes d'évaluation de l'activité dénitrifiante sont basées sur la mesure de la vitesse de disparition

Manuscrit reçu le 6 avril 1973, accepté le 5 octobre 1973.

20 MARS 1974
O. R. S. T. O. M.

Collection de Référence
n° 6728 Biofols

du nitrate ou sur l'emploi de la technique respirométrique de Warburg, de la chromatographie en phase gazeuse ou de la spectrométrie de masse avec ^{15}N . Ces deux dernières techniques ont permis à plusieurs auteurs d'étudier la séquence des produits gazeux formés au cours de la dénitrification [5, 7, 10, 11, 20, 25, 31].

Les produits majeurs sont l'azote et le protoxyde d'azote; N_2O prédomine aux bas pH et n'est décelable qu'en faible quantité aux pH faiblement alcalins [20, 31]. Un troisième gaz, l'oxyde nitrique, a été décelé dans certains cas [5, 20, 31], mais sa formation a été attribuée à une réduction chimique du nitrite, premier intermédiaire de la dénitrification. Cependant, plusieurs auteurs ont démontré l'existence d'une production biochimique de NO par des cellules ou par des extraits enzymatiques de bactéries en cultures pures [3, 12, 18, 19, 21, 29, 30]. Dans les sols [5, 20, 31], comme dans le cas des organismes isolés [6, 8, 16, 17, 29], le NO produit est ultérieurement réduit et certains auteurs le considèrent comme un intermédiaire de la dénitrification.

Mais cette hypothèse n'est pas admise par tous. Il en est de même pour le N_2O , bien que Nommik [20] ait démontré, à l'aide de l'isotope ^{15}N , que dans les sols, la réduction des nitrates en N_2 passait obligatoirement par le N_2O . Cependant, il semblerait que ce gaz ne constitue pas un intermédiaire dans le cas de toutes les espèces bactériennes [1, 13, 14, 22, 24].

Comme d'autres auteurs [7, 15, 26, 28], nous avons utilisé la chromatographie en phase gazeuse pour l'étude de la séquence des produits formés au cours de la dénitrification *in vitro*, d'une série de sols de rizières du Sénégal.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les 30 sols de rizières du Sénégal, utilisés pour cette étude (tableau I), sont décrits par ailleurs [9]. Cinquante grammes de sol, amenés à l'humidité équivalente par une solution de KNO_3 contenant $100 \mu\text{g}$ de $\text{N} - \text{NO}_3^-$ par gramme de sol sec, sont mis en incubation à 30°C , sous atmosphère d'hélium (He N45, Sté l'Air Liquide) à plusieurs répétitions, dans des flacons sérum de 500 ml dans lesquels la faible épaisseur de sol facilite les échanges gazeux. Un vide poussé et répété est effectué pour éliminer O_2 .

Une première série de flacons sert au dosage chimique des nitrates (méthode à l'acide 2-4 phénol-disulfonique) et des nitrites (méthode de Griess-Ilosvey modifiée); ces méthodes ont été décrites en détail par Bremner [4].

La deuxième série de flacons est utilisée pour l'analyse périodique de l'atmosphère des sols à l'aide d'un chromatographe à détection par conductibilité thermique, Varian Aerograph 90P4, dont les conditions d'utilisation sont les suivantes : colonne interne $10' \times 1/4''$ ($L = 3,048 \text{ m}$, $\sigma = 6,35 \text{ mm}$) en inox, remplie avec du Porapak Q100/120 mesh; température de la colonne, 80° ; température de l'injecteur, 110° ; température du détecteur, 250° ; intensité des filaments, 200 mA; gaz vecteur, hélium N45 (Sté l'Air Liquide); débit du gaz vecteur, 60 ml/min; colonne externe, $10' \times 1/4''$ en inox, remplie avec un tamis moléculaire 5/A; température ambiante, 22° environ; volume injecté, 0,7 ml par vanne d'injection automatique; enregistreur Varian Aerograph A25; déroulement, 50 cm/h. La calibration a été faite avec des gaz purs (N_2 , O_2 , CO_2 , NO et N_2O) de la Sté l'Air Liquide..

TABLEAU I. — Caractéristiques physicochimiques des 30 sols de rizières du Sénégal étudiés.

N°	Sols (localité)	Texture	M. O. ‰	N-NO ₃ ⁻ (ppm)	Cl ⁻ (m.éq./100 g)	pH		Nombre initial de bactéries dénitrifiantes par g de sol sec
						initial	après 1 semaine	
1	Boutolat	Sable limoneux	6,49	0	0	5,2	6,2	140
2	Bignona	Argile	47,38	0	3,73	4,3	4,9	30 000
4	Medina	Limon argileux	154,95	0	23,01	4,3	4,7	17 000
6	Kamobeul	Limon sableux	12,94	2,4	0	5,2	5,7	3 500
7	Loudia	Sable limoneux	35,82	3,0	0	5,3	6,45	7 000
8	Oussouye	Limon sableux	25,84	3,2	0	5,5	6,8	170 000
9	Dar-Salam	Limon argileux	26,69	0,8	41,85	4,6	4,95	1 100
10	Djibelor	Limon argilo-sableux	56,79	6,6	0	5,3	6,0	95 000
11	Djibelor	Limon	40,13	0	4,13	5,4	5,8	17 500
12	Djibelor	Limon sableux	20,33	0,6	0	4,8	5,4	25 000
13	Niaguissse	Limon argileux	26,52	0	1,58	4,6	5,1	13 000
14	Sibink	Limon sableux	15,90	1,2	0	4,6	5,7	4 000
15	Goudomp	Limon sableux	15,99	5,7	0,80	4,7	5,4	3 000
16	Bambato	Limon sableux	35,89	0	0	5,6	6,35	8 000
17	Tanaff	Limon argileux	42,33	0	0	5,0	6,3	30 000
18	Diango	Limon argileux	31,31	4,0	1,16	4,8	5,3	95 000
19	Bounkilinn	Argile	39,37	0	0,96	4,5	4,3	9 000
20	Kaolack	Limon fin	12,30	9,8	1,82	5,6	6,0	9 000
21	Enanpor	Limon argilo-sableux	27,55	0	13,47	5,4	5,6	2 500
23	Thiaroye	Limon argilo-sableux	31,79	41,8	5,37	4,6	4,75	9 500
24	Djibelor	Limon argileux	68,00	0	0	4,3	5,4	35 000
25	Ross-Bethio	Argile	22,98	0,5	1,24	4,6	5,6	140 000
26	Boundoum	Argile	23,24	0	0,95	6,3	6,2	250 000
27	Ntiagar	Limon argileux	12,03	0	0,62	5,4	6,0	155 000
28	Keur-Diallo	Limon argileux	11,35	0	0	6,8	6,65	220 000
30	Richard-Toll	Limon argileux	15,20	0	0	5,4	6,1	25 000
31	Richard-Toll	Limon argileux	15,60	0	0	5,7	7,1	250 000
32	Richard-Toll	Limon argileux	17,10	0	0	5,9	6,9	70 000
33	Richard-Toll	Limon argileux	18,30	0	0	5,2	6,4	175 000
34	Richard-Toll	Limon argileux	20,60	0	0	5,5	6,3	250 000

M. O. = matière organique ; m. éq. = milli-équivalent.

L'emploi de la vanne d'injection automatique calibrée est avantageux car il supprime toute mesure de pression, le volume injecté étant une fraction bien définie du volume total de la fiole de mesure. De plus, nous avons opéré avec une surpression d'hélium dans les flacons sérum, d'environ 15 cm de mercure de façon à réduire la perte de volume à chaque injection pour qu'elle soit négligeable.

Les résultats ont été analysés à l'aide du test de corrélation des rangs de Spearman [27].

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Deux sortes de séquence pourraient avoir lieu dans les 30 sols de rizières étudiés : NO₃⁻ → NO₂⁻ → N₂O → N₂ et NO₃⁻ → NO₂⁻ → NO → N₂O → N₂. La première séquence aurait lieu dans 14 sols, la deuxième dans les 16 autres. Parmi ces derniers, 4 sols ont produit plus de 25 ppm de N — NO, la pro-

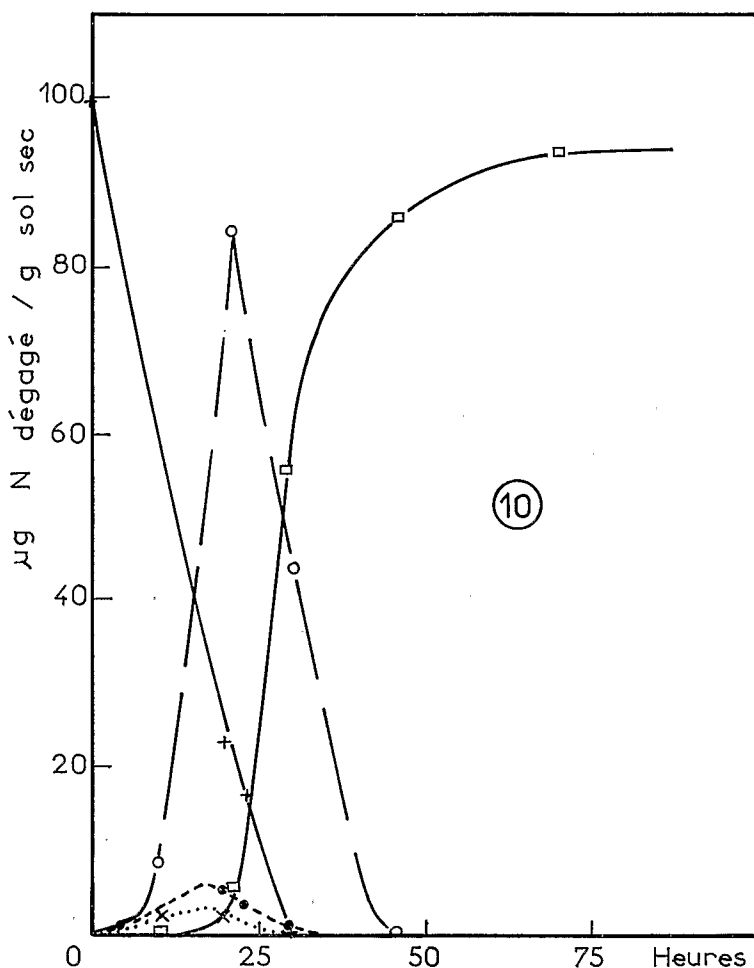


Fig. 1. — Séquence des produits formés au cours de la dénitrification dans le sol de rizière n° 10. Quantité de N formé en µg/g de sol sec après apport de 100 µg de N - NO₃⁻ sous forme de KNO₃ et incubation anaérobie à 30° à humidité équivalente.

+ — + N - NO₃⁻, × × N - NO,
 ● - - - ● N - NO₂⁻, ○ - - - ○ N - N₂O,
 □ — □ N - N₂.

duction étant très faible dans les autres sols. Dans tous les cas, le NO formé a été réduit ultérieurement, ainsi que le N₂O, et le gaz final a toujours été N₂ (fig. 1, fig. 2 et fig. 3).

I. — RÉDUCTION DU NITRATE

Le dosage du nitrate au cours de sa disparition nous a permis d'établir la vitesse de réduction de N - NO₃⁻ (tableau II). En attribuant le rang 1 à

la vitesse maximum et à la plus forte teneur en carbone organique des sols, il apparaît une corrélation positive hautement significative entre ces deux variables (tableau III). Ceci confirme le résultat obtenu par ailleurs avec les mêmes sols à l'aide de la technique respirométrique [9].

II. — FORMATION DU NITRITE

L'accumulation de nitrite est très faible dans ces sols. Le maximum de $N - NO_2^-$ mesuré n'a pas excédé 20 % de $N - NO_3^-$ présent au départ

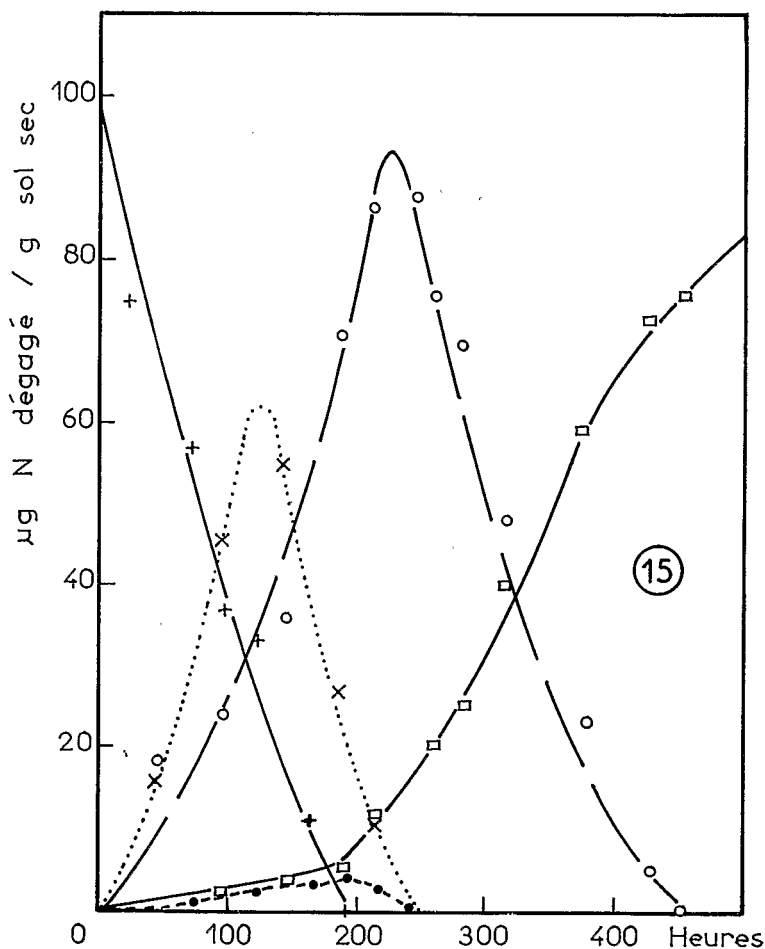


FIG. 2. — Séquence des produits formés au cours de la dénitrification dans le sol de rizière n° 15. Quantité de N formé en µg/g de sol sec après apport de 100 µg de $N - NO_3^-$ sous forme de KNO_3 et incubation anaérobie à 30° à humidité équivalente.

+ — + $N - NO_3^-$, × × $N - NO$,
 ● - - - ● $N - NO_2^-$, o - - - o $N - N_2O$,
 □ — □ $N - N_2$.

(sol n° 23) et dans 6 autres sols, seules des traces ont été décelées. Ceci pourrait résulter du fait que les sols étudiés sont acides. En effet, d'après Cooper et Smith [7], l'accumulation de nitrite aurait lieu dans les sols basiques par suite de la faible vitesse de réduction du nitrite.

III. — FORMATION ET RÉDUCTION DE L'OXYDE NITRIQUE

La formation de NO a été décelée dans 16 sols. Pour 12 d'entre eux, la quantité maximum mesurée ne dépassait pas 11,5 ppm de N — NO

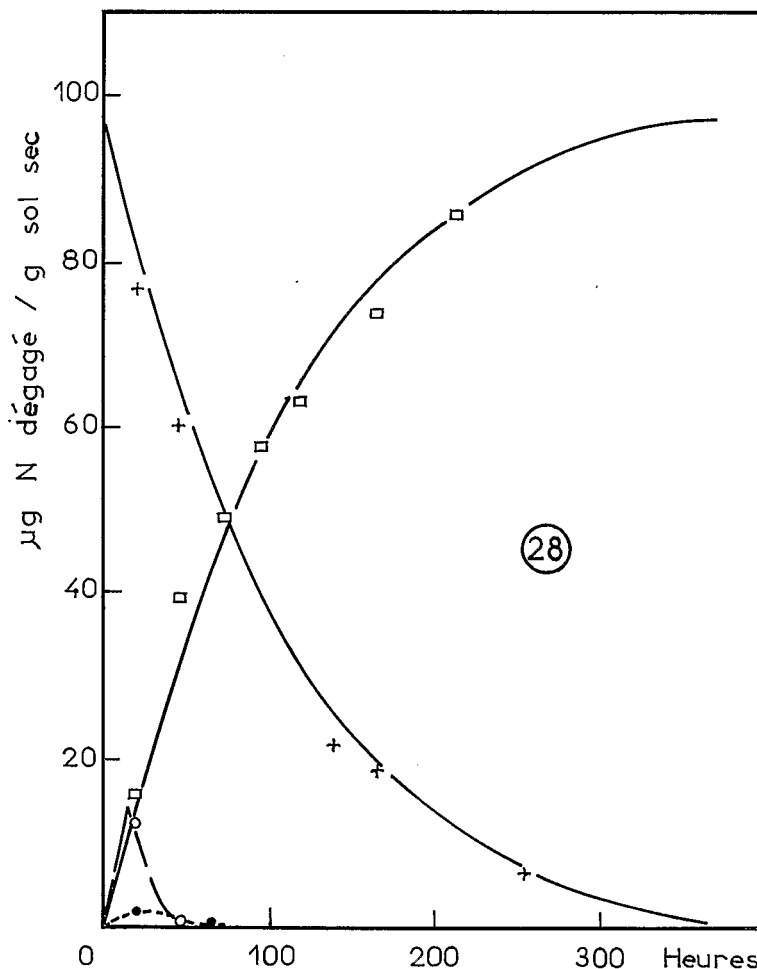


FIG. 3. — Séquence des produits formés au cours de la dénitrification dans le sol de rizière n° 28. Quantité de N formé en µg/g de sol sec après apport de 100 µg de N — NO₃⁻ sous forme de KNO₃ et incubation anaérobie à 30° à humidité équivalente.

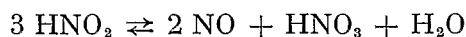
+ — + N — NO₃⁻, x ····· x N — NO,
 • - - - • N — NO₂⁻, o - - - o N — N₂O,
 □ — □ N — N₂.

TABLEAU II. — Mesures de la dénitrification dans 30 sols de rizières du Sénégal.

N°	Sols (localité)	Vitesse de réduction du	Quantité maximale de	Quantité maximale de	Quantité maximale de	Vitesse de formation du	Vitesse de réduction du	Quantité maximale de N non détecté
		N — NO ₃ ⁻ (ppm/h)	N — NO ₂ ⁻ (ppm)	N — NO (ppm)	N — N ₂ O (ppm)	N — N ₂ O (ppm/h)	N — N ₂ O (ppm/h)	(ppm)
1	Boutolat	0,33	0	1,25	66	0,35	0,25	21
2	Bignona	1,82	1,5	0	84	0,76	0,19	25
4	Medina	2,00	1,0	3,5	75	1,25	0,53	38
6	Kamobeul	0,58	4,5	11,5	86	0,31	0,29	33
7	Loudia	2,02	1,0	0	83	2,37	1,38	8
8	Oussouye	2,19	4,0	1,0	87	1,58	4,35	25
9	Dar-Salam	2,00	0	0	68	1,23	1,13	10
10	Djibelor	3,55	6,5	1,5	85	4,05	3,40	35
11	Djibelor	0,69	2,0	0	60	0,43	2,40	26
12	Djibelor	0,41	4,0	6,5	83	0,20	0,32	18
13	Niaguise	1,37	1,0	1,5	77	0,59	0,57	37
14	Sibink	1,00	7,5	30,0	90	0,53	0,84	38
15	Goudomp	0,55	5,0	63,0	93	0,41	0,41	0
16	Bambato	1,39	3,5	0	73	1,12	0,52	9
17	Tanaff	1,66	3,5	2,5	80	1,60	1,78	14
18	Diango	0,61	2,0	2,0	80	0,57	0,73	9
19	Bounkilim	1,05	10,5	26,0	74	0,57	0,43	7
20	Kaolack	0,15	2,5	0	41	0,27	0,15	5
21	Enanpor	0,18	0	0	67	0,18	0,20	0
23	Thiaroye	0,88	28,0	73,0	115	0,38	0,77	0
24	Djibelor	3,33	0	1,5	68	2,26	4,53	35
25	Ross-Bethio	0,91	2,5	3,0	86	1,37	1,43	0
26	Boundoum	1,66	16,0	1,5	29	0,64	0,14	50
27	Ntiagar	0,14	12,0	0	38	0,19	0,16	0
28	Keur Diallo	0,33	1,5	0	19	1,52	0,57	0
30	Richard-Toll	0,33	1,5	0	61	0,20	0,22	35
31	Richard-Toll	0,91	2,5	0	55	0,84	1,10	18
32	Richard-Toll	0,41	1,0	0	84	0,76	0,14	0
33	Richard-Toll	0,83	0	0	37	0,47	0,34	8
34	Richard-Toll	0,70	0	0	25	0,47	0,13	0

(tableau II) ; les 4 autres sols [n° 14, n° 15 (fig. 2), n° 19 et n° 23] ont produit une quantité de N — NO respectivement égale à 30, 60, 26 et 52 % de N — NO₃⁻ initial.

La production de NO dans les sols a été attribuée jusqu'à présent à une décomposition chimique du nitrite en milieu acide :



En effet, elle se produit encore dans les sols stérilisés, auxquels a été ajouté du nitrite. Selon Allison [2], cette réaction peut être occasionnellement importante dans les sols acides de faible capacité d'échange. Nommik [20] n'a observé de production de NO que dans le cas de sols acides et faiblement humides, les quantités mesurées étant très faibles. Ceci résulterait du fait que le nitrite ne s'accumule pas dans le sol où il est rapidement réduit en N₂O et N₂, lorsqu'on ajoute des quantités modérées de nitrate. Reuss et Smith [23] rapportent que plusieurs auteurs considèrent la formation chimique de NO comme négligeable dans les sols acides par suite de l'absence d'accumulation du nitrite.

Il existe une corrélation inverse hautement significative entre la quantité maximale de NO formé et le pH après une semaine de submersion, ainsi qu'une corrélation positive hautement significative entre les quantités maximales de NO et de nitrite formés (tableau III). Ces résultats sont en accord avec l'hypothèse d'une production de NO par réaction chimique. Cependant, en apportant du nitrate ou du nitrite, dans les mêmes conditions que précédemment (100 ppm), aux sols n° 14, n° 15, n° 19 et n° 23, saturés en eau puis stérilisés pendant 30 min à 120°, nous n'avons pas décelé de NO après plusieurs jours d'incubation à 30°.

TABLEAU III. — Résultats du test de corrélation des rangs de Spearman.

	Vitesse de réduction du $N - NO_3^-$	Vitesse de réduction du $N - N_2O$	Teneur en carbone organique	pH après 1 semaine de submersion	Conductivité	Nombre de bactéries dénitrifiantes	Quantité maximale de $N - NO_2^-$
Vitesse de réduction du $N - NO_3^-$		P	P	A	A	A	
Quantité maximale de $N - NO_2^-$				A	A		
Quantité maximale de $N - NO$				N			P
Vitesse de formation de $N - N_2O$	P	P	P		A	A	
Quantité maximale de $N - N_2O$			A	N			
Vitesse de réduction de $N - N_2O$	P		P	A	A	A	
Perte maximale momentanée de N			A	A			

P = corrélation positive hautement significative ; N = corrélation négative hautement significative ; A = absence de corrélation ; case blanche : test de corrélation non calculé.

Dans tous les cas où nous avons observé la formation de NO, ce composé est ultérieurement réduit puisqu'il disparaît toujours de la phase gazeuse en donnant du N_2O et du N_2 . Plusieurs auteurs ont, en effet, démontré l'existence d'une NO-réductase chez diverses bactéries dénitrifiantes [6, 8, 17, 29].

IV. — FORMATION ET RÉDUCTION DE L'OXYDE NITREUX

Dans le cas des 30 sols étudiés, nous avons toujours constaté l'accumulation de quantités plus ou moins grandes de N_2O . Une corrélation inverse et hautement significative a été trouvée entre la quantité maximale de N_2O formé et le pH initial des sols. Ceci confirme les observations de Nommik [20] ainsi que celles de Wijler et Delwiche [31], établissant que la production de N_2O est maximale dans les sols acides et minimale dans les sols faiblement basiques. Le sol n° 10, par exemple, avec un pH initial de 5,3, a produit 85 ppm de N — N_2O (fig. 1), tandis que le sol n° 28, avec un pH initial de 6,8, n'en a donné que 19 ppm (fig. 3).

La vitesse de formation de N_2O (tableau II) présente une corrélation positive hautement significative avec la vitesse de réduction de NO_3^- et avec la teneur des sols en carbone organique. Elle ne présente pas de corrélation avec le pH après une semaine de submersion, avec la teneur des sols en chlorures ou avec le nombre initial de bactéries dénitrifiantes (tableau I).

La réduction ultérieure de N_2O en N_2 se produit dans tous les cas, et le plus souvent, la vitesse de réduction est voisine de la vitesse de formation. En effet, nous avons trouvé une corrélation positive hautement significative entre ces deux données. La vitesse de réduction de N_2O présente également une corrélation positive hautement significative avec la vitesse de réduction de NO_3^- et avec la teneur des sols en carbone organique. Cette observation suggère la possibilité d'une estimation de la dénitrification fondée sur l'étude de la réduction de N_2O . Selon Nommik [20], cette réduction ne commencerait pas avant que la majeure partie du nitrate ait été réduit. Quand N_2O commence à apparaître, dans le cas de la plupart des 30 sols étudiés, la teneur en NO_3^- est au plus égale au quart de la quantité initiale. Par ailleurs, quand la réduction apparente de N_2O débute, N_2 est présent en faible quantité, avec un maximum de 37 ppm dans le cas du sol n° 33. Cet azote peut provenir d'une réduction de N_2O au cours de sa formation, ou d'une réduction du nitrate ne passant pas par le stade de N_2O . Actuellement, il n'est pas possible d'écarter cette seconde éventualité.

V. — PERTE APPARENTE D'AZOTE
AU COURS DE LA DÉNITRIFICATION

Plusieurs auteurs ont signalé que la disparition de l'azote nitrique n'était pas toujours suivie de l'apparition d'une quantité équivalente d'un autre composé azoté. Verhoeven, cité par Nommik [20] attribue la perte apparente à la dissolution du N_2O formé. Par contre, selon Nommik [20], cette perte momentanée ne pourrait s'expliquer que par la formation d'un ou plusieurs composés intermédiaires, non décelables à l'analyse, car, en fin d'expérience, on retrouve toujours la presque totalité de l'azote initial sous forme de N_2 .

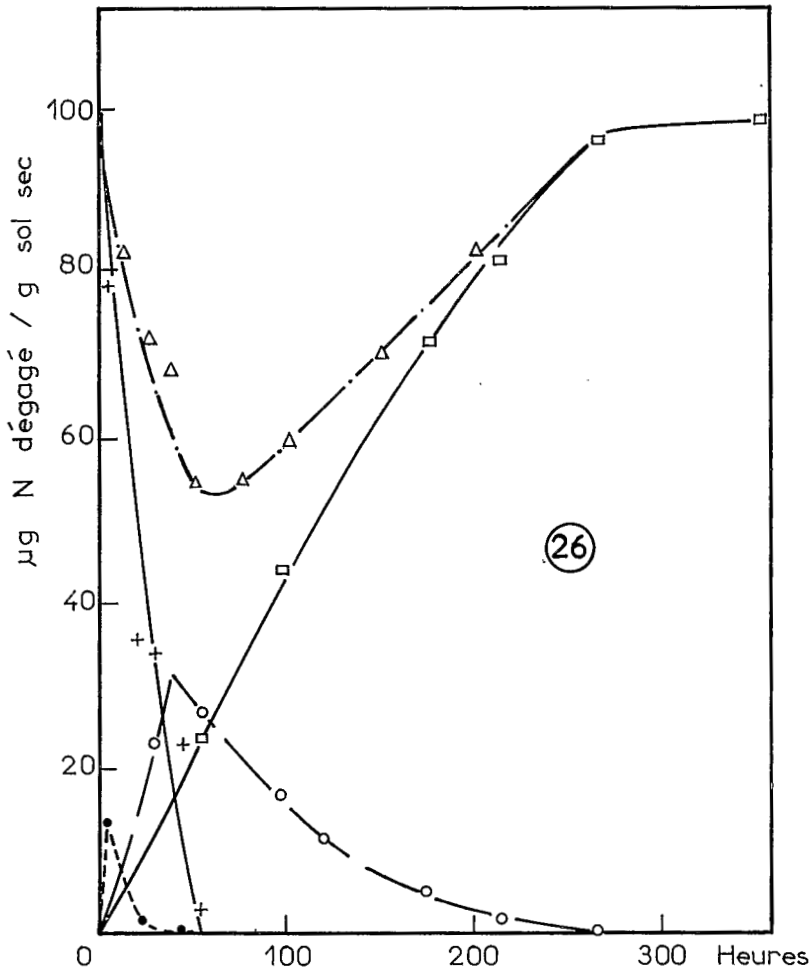


FIG. 4. — Perte apparente et momentanée d'azote au cours de la dénitrification dans le sol de rizière n° 26. Quantité de N formé en $\mu\text{g/g}$ de sol sec après apport de $100 \mu\text{g}$ de $\text{N} - \text{NO}_3^-$ sous forme de KNO_3 et incubation anaérobie à 30° à humidité équivalente.

+ — + $\text{N} - \text{NO}_3^-$,	× ····· × $\text{N} - \text{NO}$,
• - - - • $\text{N} - \text{NO}_2^-$,	○ - - - ○ $\text{N} - \text{N}_2\text{O}$,
□ — □ $\text{N} - \text{N}_2$,	Δ - · - · Δ perte apparente momentanée de N.

Nous avons fait la même observation pour 22 des 30 sols étudiés (tableau II), avec un maximum de 50 % de l'azote initial momentanément non décelable pour le sol n° 26 (fig. 4). Aucune corrélation n'a pu être mise en évidence entre la perte apparente d'azote, le pH ou le Eh après une semaine de submersion et les teneurs des sols en carbone organique et en argile (tableau III).

RÉSUMÉ

L'étude de la séquence des produits formés au cours de la dénitrification *in vitro* d'un lot d'échantillons de sols de rizières du Sénégal, a permis de mettre en évidence les faits suivants : 1) la vitesse de réduction de NO_3^- présente une corrélation positive hautement significative avec la teneur des sols en carbone organique ; 2) par suite vraisemblablement de l'acidité des sols étudiés, la quantité de NO_2^- décelée est nulle ou faible ; 3) une production de NO a été observée dans 16 sols sur 30 ; elle a été importante pour 4 sols seulement. La quantité maximale de NO mesurée présente une corrélation hautement significative, positive avec la quantité maximale de NO_2^- mesurée et une corrélation inverse avec le pH des sols submergés ; 4) les vitesses de formation et de réduction de N_2O présentent une corrélation positive hautement significative avec la vitesse de réduction de NO_3^- et la teneur des sols en carbone organique ; 5) les bilans font apparaître une perte apparente et momentanée d'azote pour certains sols au cours de la dénitrification.

MOTS-CLÉS : Dénitrification, Sol, Azote ; Sénégal, Rizière, Séquence des produits.

REMERCIEMENTS

L'auteur exprime ses remerciements à MM. M. Mouraret et F. Pichinoty pour les conseils qu'ils lui ont prodigués ainsi qu'à MM. W. Sy et M. N'Dao pour leur assistance technique.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ALLEN, M. B. & van NIEL, C. B., Experiments on bacterial denitrification. *J. Bact.*, 1952, 64, 397-412.
- [2] ALLISON, F. E., Losses of gaseous nitrogen from soils by chemical mechanisms involving nitrous acid and nitrites. *Soil Sci.*, 1963, 96, 404-409.
- [3] BAALSRUD, K. & BAALSRUD, K. S., Studies on *Thiobacillus denitrificans*. *Arch. Mikrobiol.*, 1954, 20, 34-62.
- [4] BREMNER, J. M., Methods of soils analysis, in « Inorganic forms of nitrogen » (part 2) (C. A. Black), Amer. Soc. Agron. Inc. Publ., Madison, 1965.
- [5] CADY, F. B. & BARTHOLOMEW, W. V., Sequential products of anaerobic denitrification in Norfolk soil material. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 1960, 24, 477-482.
- [6] CHUNG, C. W. & NAJJAR, V. A., Cofactor requirements for enzymatic denitrification. II. Nitric oxide reductase. *J. biol. Chem.*, 1956, 218, 627-632.
- [7] COOPER, G. S. & SMITH, R. L., Sequence of products formed during denitrification in some western soils. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 1963, 27, 659-662.
- [8] FEWSON, C. A. & NICHOLAS, D. J. D., Utilization of nitric oxide by microorganisms and higher plants. *Biochem. J.*, 1960, 188, 794-796.
- [9] GARCIA, J.-L., RAIMBAULT, M., JACQ, V., RINAUDO, G. & ROGER, P., Activités microbiennes dans les sols de rizières du Sénégal : relations avec les caractéristiques physico-chimiques et influence de la rhizosphère. *Rev. Ecol. Biol. Sol*, 1973 (sous presse).

- [10] GUIRAUD, G. & BERLIER, Y., Détermination quantitative et isotopique, par spectrométrie de masse, des composés gazeux produits dans la dénitrification. *Chim. anal.*, 1970, 52, 53-56.
- [11] HAUCK, R. D. & MELSTED, S. W., Some aspects of the problem of evaluating denitrification in soils. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 1956, 20, 361-364.
- [12] IWASAKI, H., MATSUBAYACHI, R. & MORI, T., Studies on denitrification. II. Production of nitric oxide and its utilization in the N-N linkage formation by denitrifying bacteria. *J. Biochem (Tokyo)*, 1956, 43, 295-305.
- [13] KLUYVER, A. J. & VERHOEVEN, W., Studies on true dissimilatory nitrate reduction. II. The mechanism of denitrification. *Antonie v. Leeuwenhoek*, 1954, 20, 241-262.
- [14] MATSUBARA, T. & MORI, T., Denitrification. IX. Nitrous oxide, its production and its nitrogen reduction. *J. Biochem. (Tokyo)*, 1968, 64, 863-871.
- [15] MEEK, B. D., GRASS, L. B. & MACKENZIE, A. J., Applied nitrogen losses in relation to oxygen status of soils. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 1969, 33, 575-578.
- [16] MIYATA, M., Denitrification. IV. Electron-donating system in the reduction of nitric oxide and nitrate. *J. Biochem. (Tokyo)*, 1971, 70, 205-213.
- [17] MIYATA, M., MATSUBARA, T. & MORI, T., Studies on denitrification. XI. Some properties of nitric oxide reductase. *J. Biochem. (Tokyo)*, 1969, 66, 759-765.
- [18] MIYATA, M. & MORI, T., Studies on denitrification. VIII. Nitric oxide production by the denitrifying reaction with TMPPD. *J. Biochem. (Tokyo)*, 1968, 64, 849-861.
- [19] NAJJAR, V. A. & ALLEN, M. B., Formation of nitrogen, nitrous oxide and nitric oxide by extracts of denitrifying factors. *J. biol. Chem.*, 1954, 206, 209-214.
- [20] NOMMIK, H., Investigations on denitrification. *Acta agr. scand.*, 1956, 6, 195-228.
- [21] PICHINOTY, F., La dénitrification bactérienne. I. Utilisation des amines aromatiques comme donneuses d'électrons dans la réduction du nitrite. *Arch. Mikrobiol.*, 1969, 69, 314-329.
- [22] PICHINOTY, F. & d'ORNANO, L., Recherches sur la réduction du protoxyde d'azote par *Micrococcus denitrificans*. *Ann. Inst. Pasteur*, 1961, 101, 418-426.
- [23] REUSS, J. O. & SMITH, R. L., Chemical reactions of nitrites in acid soils. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 1965, 29, 267-270.
- [24] SACKS, L. E. & BARKER, H. A., Substrate oxidation and nitrous oxide utilization in denitrification. *J. Bact.*, 1952, 64, 247-252.
- [25] SCHWARTZBECK, R. A., MCGREGOR, J. M. & SCHMIDT, E. L., Gaseous nitrogen losses from nitrogen fertilized soils measured with infrared and mass spectroscopy. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 1961, 25, 186-189.
- [26] SMITH, D. H. & CLARK, F. E., Some useful techniques and accessories for adaptation of the gas chromatograph to soil nitrogen studies. *Soil. Sci. Soc. Amer. Proc.*, 1960, 24, 111-115.
- [27] SPEARMAN, C., The proof and measurement of association between two things. *Ann. J. Psych.*, 1904, 15, 72-101.
- [28] TACKETT, J. L., Theory and application of gas chromatography in soil aeration research. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 1968, 32, 346-350.
- [29] VERHOEVEN, W., Studies on true dissimilatory nitrate reduction. V. Nitric oxide production and consumption by micro-organisms. *Antonie v. Leeuwenhoek*, 1956, 22, 385-406.
- [30] WALKER, G. C. & NICHOLAS, D. J. D., Nitrite reductase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochim. Biophys. Acta (Amst.)*, 1961, 49, 350-360.
- [31] WIJLER, J. & DELWICHE, C. C., Investigations on the denitrifying process in soil. *Plant a. Soil*, 1954, 5, 155-169.