

## Fixation biologique de l'azote dans trois types de sols de rizières de Côte d'Ivoire\*

PAR

G. RINAUDO

Centre O.R.S.T.O.M. de Dakar, BP 1386, Sénégal

### I. — INTRODUCTION

Le riz a été cultivé très longtemps avec des rendements satisfaisants sans qu'il soit nécessaire d'apporter des engrais azotés. De nombreux auteurs ont associé cette remarquable propriété des sols de rizières à l'activité fixatrice des Cyanophycées (DE et MANDAL, 1956 ; SINGH, 1961 ; WATANABE, 1965). Il paraît probable toutefois que les Cyanophycées ne soient pas les seuls micro-organismes fixateurs qui contribuent à maintenir la fertilité de ces sols à un niveau élevé. Des études récentes ont en effet démontré l'existence dans la rhizosphère du riz d'une fixation de  $N_2$  hautement significative sur le plan écologique (ISHIZAWA *et al.*, 1970 ; RINAUDO, 1970 ; YOSHIDA et ANCAJAS, 1971).

La présente étude a été réalisée sur trois rizières de Côte d'Ivoire situées respectivement à Dabou, Abengourou et Yamoussokro, représentatives de trois types de sol :

- grandes vallées alluviales de Basse Côte d'Ivoire (Dabou),
- bas-fonds de moyenne Côte d'Ivoire sur schistes (Abengourou),
- bas-fonds de moyenne Côte d'Ivoire sur granites (Yamoussokro).

### II. — CARACTÉRISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DES SOLS

Les principales caractéristiques de l'horizon de surface de chacun des trois sols, ont été mentionnées dans le tableau I. Un certain nombre d'observations peuvent en être faites :

\* Résumé de la thèse de Docteur-Ingénieur, présentée le 18 décembre 1970, à la Faculté des Sciences de Montpellier.

Reçu le 13 mars 1973.

— *Dabou* : la texture de ce sol est très argileuse (90 % d'éléments inférieurs à 20  $\mu$ ), mais grâce à une forte teneur en matière organique, structure et perméabilité sont satisfaisantes. Les teneurs en N, P et K sont élevées. Ce sol est bien pourvu en bases échangeables.

— *Abengourou* : les propriétés physiques de ce sol sont assez bonnes (texture argilo-limono-sableuse, structure et perméabilité moyennes). Malgré une teneur en matière organique élevée, la somme des bases échangeables est médiocre. Les teneurs en N et P sont bonnes, mais on observe une carence en K.

— *Yamousso Kro* : la texture de ce sol est équilibrée (argilo-sablo-limoneuse), la structure moyenne, mais la perméabilité un peu forte. Les teneurs en matière organique et N sont médiocres à faibles. La somme des bases échangeables est élevée.

*Remarque* : le pH mesuré pour des échantillons préalablement séchés à l'air est très acide pour les sols de Dabou et d'Abengourou, moyennement acide pour celui de Yamousso Kro. *In situ*, les valeurs mesurées sont relativement proches de la neutralité (cf. : « étude préliminaire »).

TABLEAU I

## Caractéristiques physico-chimiques des sols

	Dabou (0 - 5 cm)	Abengourou (0 - 5 cm)	Yamousso Kro (0 - 5 cm)
Argile %.....	63,0	23,8	26,7
Limon fin %.....	29,9	23,2	13,1
Limon grossier %.....	2,0	15,0	14,5
Sable fin %.....	1,0	17,5	28,5
Sable grossier %.....	0,5	10,5	15,5
Instabilité structurale.....	2,20	1,09	1,28
Perméabilité cm/h.....	3,54	3,44	10,71
Mat. org. %.....	8,10	5,47	3,17
Carbone $\text{‰}$ .....	46,96	31,74	17,80
Azote $\text{‰}$ .....	2,84	2,30	1,51
C/N.....	16,4	13,8	11,8
$\text{P}_2\text{O}_5$ total $\text{‰}$ .....	1,00	0,70	1,13
$\text{P}_2\text{O}_5$ assim. Olsen.....	0,09	0,17	0,09
K <sup>+</sup> total (még.), még. par 100 g.....	6,82	1,95	2,49
K <sup>+</sup> échang. (még.), még. par 100 g.....	0,43	0,08	0,42
S.....	12,12	4,12	8,35
T.....	42,0	34,1	71,7
pH-eau (1/2,5).....	4,1	4,2	5,8

### III. — ÉTUDE PRÉLIMINAIRE

Les sols de rizières sont essentiellement caractérisés par des alternances de submersions et de ressuyages, qui se répercutent sur leur équilibre biologique.

Afin d'apprécier les perturbations provoquées par les modifications du régime hydrique, nous avons suivi *in situ* ou à partir de sols fraîchement prélevés, l'évolution d'un certain nombre de paramètres à des intervalles de temps réguliers au cours du cycle de culture. Les observations que nous avons faites peuvent être résumées ainsi :

#### 1. Variations du pH et du rH *in situ*.

Le régime hydrique a un effet très marqué sur l'évolution du pH et du rH : la submersion provoque une élévation du pH et une chute du rH ; l'exondation entraîne les effets inverses. Dans l'horizon de surface, les valeurs extrêmes observées au cours du cycle de culture ont été les suivantes :

	pH		rH	
	submersion	exondation	submersion	exondation
Dabou .....	6,20	4,50	13,5	29,0
Abengourou .....	6,60	5,60	18,0	29,0
Yamoussokro .....	7,00	6,20	17,0	22,5

La submersion a donc pour effet de porter le pH des sols à des valeurs relativement proches de la neutralité ce qui favorise la fixation de N<sub>2</sub>. Il est probable d'autre part, que l'établissement de conditions semi-anaérobies soit propice à ce processus qui, du point de vue biochimique, est anaérobie (BURRIS, 1969).

#### 2. Activité déshydrogénasique.

La mesure de l'activité déshydrogénasique est essentiellement le reflet de la teneur du sol en substrats carbonés facilement métabolisables ; il s'agit en fait d'une méthode de mesure globale de l'activité respiratoire (CASIDA, 1968).

Les résultats obtenus montrent que cette activité (exprimée ici en  $\mu\text{l}$  d'hydrogène transférés en 24 heures par g de carbone) est susceptible de variations importantes sous l'effet des pratiques culturales : elle passe par exemple dans le sol de Dabou de 450  $\mu\text{l}$  H par g de carbone avant le labour, à 3 700  $\mu\text{l}$  H par g de carbone après la mise en eau (Fig. 1).

#### 3. Fixation de N<sub>2</sub>.

Les numérations de germes fixateurs qui ont été effectuées sur les trois sols, permettent de penser que la fixation de N<sub>2</sub> est surtout le fait des Clostridium et des Cyanophycées dont les densités sont fortes dans les trois sols (de l'ordre de 10<sup>8</sup> par g de sol). Les densités en Azotobacter ne sont élevées que pour le sol de Yamoussokro (de l'ordre de 10<sup>5</sup> par g de sol), en relation probablement avec un pH voisin de la neutralité. L'espèce dominante est alors *A. chroococcum*. Aux pH plus bas (Dabou et Abengourou), les densités en Azotobacter sont plus réduites (de

l'ordre de  $10^3$  par g de sol) et l'on trouve essentiellement *A. beijerinckii*. Une étude complémentaire sur milieu de pH contrôlé, a montré qu'*A. beijerinckii* est encore actif à pH 5,5 alors que la croissance d'*A. chroococcum* est nulle aux pH inférieurs à 6.

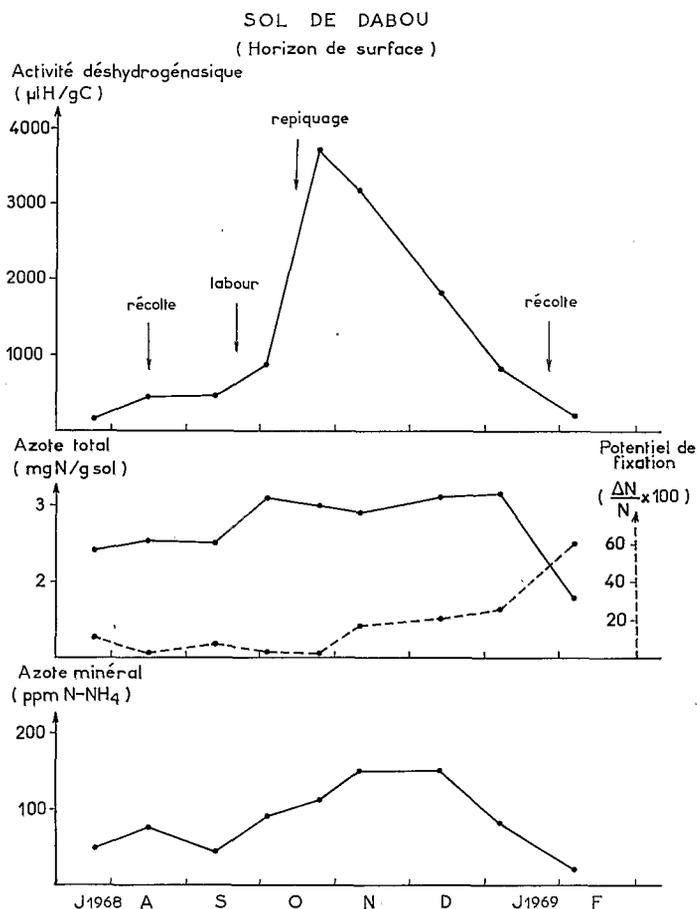


FIG. 1. — Variations saisonnières de l'activité respiratoire, de l'azote total, du potentiel de fixation et de l'azote minéral, au cours d'un cycle de culture (juillet 1968 - février 1969).

Les résultats obtenus par les méthodes de numération ne sont pas sans intérêt. Toutefois ils ne renseignent ni sur la fréquence de toutes les espèces fixatrices, ni sur leur état d'activité dans les conditions naturelles. C'est pourquoi ROUQUEROL (1964) chercha à apprécier par une autre voie une certaine potentialité de fixation du sol, en provoquant une stimulation de l'activité des microorganismes fixateurs aux dépens des réserves propres au sol, par un changement brusque des conditions physiques (dispersion du sol dans de l'eau). Les résultats obtenus par cette technique sur les sols de Côte d'Ivoire (Fig. 1), sont analogues à ceux de ROUQUEROL :

la teneur en azote total (N) et l'activité fixatrice potentielle  $\left(\frac{\Delta N \times 100}{N}\right)$  varient en sens inverse (on a exprimé les variations  $\Delta N$  de la teneur en azote total des sols en % de leur teneur initiale en azote). On observe d'autre part un certain parallélisme entre les variations des teneurs en azote total et en azote ammoniacal (Fig. 1). L'évolution de l'activité fixatrice potentielle pourrait donc s'expliquer par un effet inhibiteur de l'azote ammoniacal sur la fixation de  $N_2$ .

#### IV. — ÉTUDE EXPÉRIMENTALE DE LA FIXATION NETTE D'AZOTE DANS DES SYSTÈMES « SOL SANS PLANTE » PAR LA MÉTHODE DE KJELDAHL

Dans le sol, les différentes transformations de l'azote se déroulent simultanément. Par la détermination de l'azote total on ne peut donc qu'apprécier l'effet *net* des processus qui tendent à enrichir ou appauvrir le sol en azote.

##### A. — MÉTHODOLOGIE

La technique utilisée consiste à placer un échantillon de sol dans des conditions relativement proches des conditions de terrain, et à déterminer les variations  $\Delta N$  de la teneur en azote total de cet échantillon pendant un intervalle de temps assez long.

##### 1. Dispositif expérimental pour l'étude des facteurs humidité et éclaircissement.

L'expérimentation a été réalisée sur des échantillons de sols placés dans des béchers de 50 ml à raison de 20 g de sol sec par bécher, et soumis à diverses conditions d'incubation (S : submersion constante ; H : 4 cycles successifs exondation-submersion ; C-O : capacité au champ-obscurité ; C-L : capacité au champ-lumière ; S-O : submersion-obscurité ; S-L : submersion-lumière).

Les mesures ont été effectuées après 28 jours d'incubation à 28° C par la méthode de Kjeldahl : le contenu de chaque bécher a été mis en suspension dans un volume total de 50 ml d'eau distillée, et les dosages ont été faits à partir de 5 ml de suspension.

##### 2. Dispositif expérimental pour l'étude des facteurs substrats énergétiques et azote ammoniacal.

L'apport de divers substrats énergétiques (glucose, pailles ou racines) a été combiné avec des additions complémentaires d'azote ammoniacal.

Les essais ont été faits à la fois sur des sols placés dans des conditions de submersion et sur des suspensions de sol (5 g de sol dans 200 ml d'eau). Dans ce cas, les analyses d'azote ont eu lieu après une semaine d'incubation à 28° C.

*Remarque* : chaque traitement a donné lieu à 3 répétitions. A partir de chaque échantillon ont été faites 4 analyses d'azote, soit au total 12 répétitions par traitement. La précision des mesures est ainsi de l'ordre de 1 %.

## B. — RÉSULTATS

Afin de faciliter l'interprétation des résultats obtenus, ne seront mentionnées sous forme de schéma, que les variations en azote total ( $\Delta N$ ).

## 1. Influences des facteurs humidité et lumière.

L'analyse des résultats obtenus (Fig. 2), nous permet de faire trois observations essentielles :

- la submersion stimule l'activité fixatrice,
- les fixations *nettes* les plus fortes sont obtenues en associant submersion et lumière. Ceci montre le rôle des Cyanophycées fixatrices dans l'enrichissement du sol en azote,

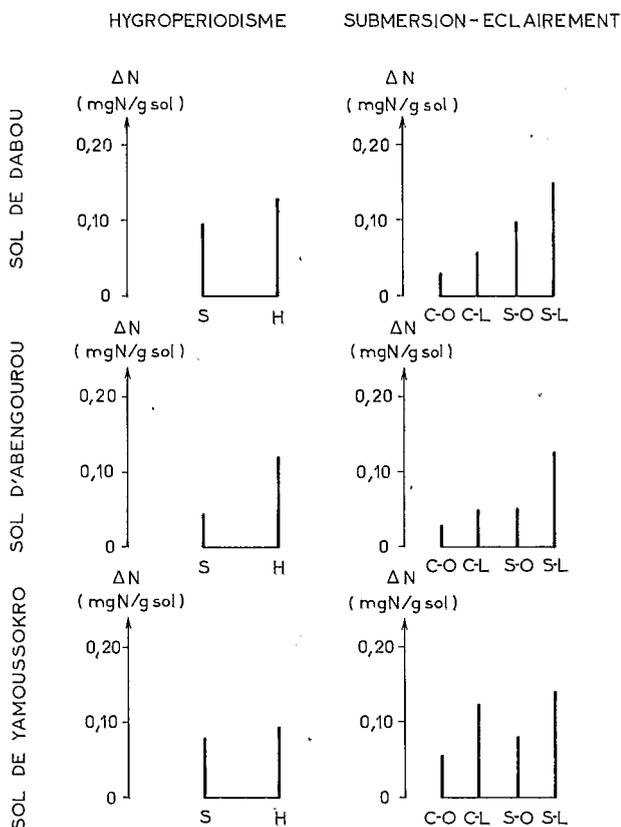


FIG. 2. — Influence des facteurs hygropériodisme, submersion et lumière, sur la fixation *nette* de  $N_2$  dans des systèmes « sol sans plante », exprimée par la variation  $\Delta N$  de la teneur en azote du sol (S : submersion constante ; H : 4 cycles successifs exondation submersion ; C-O : capacité au champ-obscurité ; CL : capacité au champ-lumière ; S-O : submersion-obscurité ; S-L : submersion-lumière).

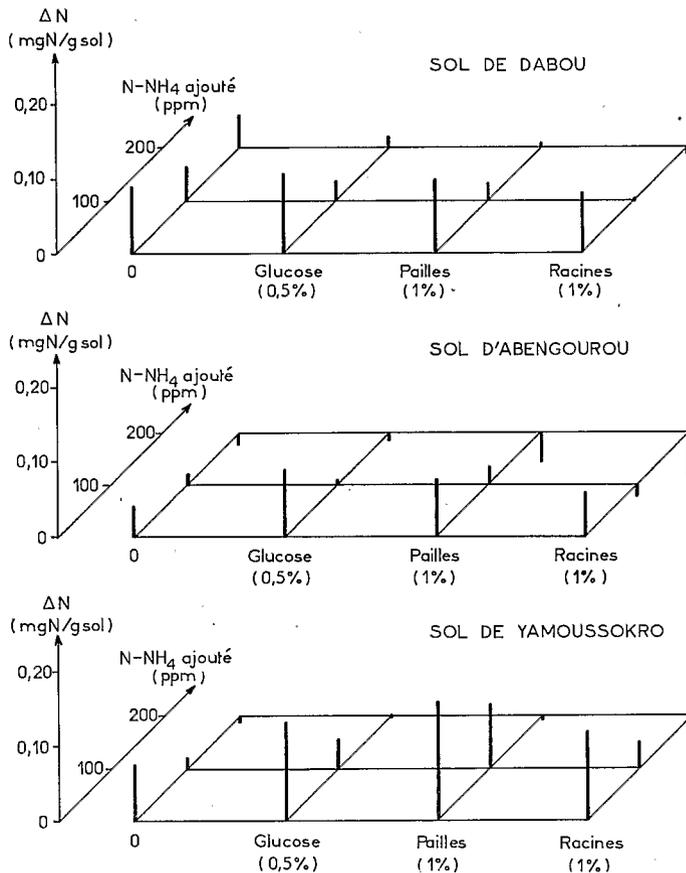


FIG. 3. — Influence des apports de substrats énergétiques (glucose, pailles, racines) et d'azote ammoniacal, sur la fixation *nette* de  $N_2$  dans des systèmes « sol sans plante », exprimée par la variation  $\Delta N$  de la teneur en azote du sol (les concentrations sont exprimées par rapport au poids de sol sec).

— l'hydropériodisme stimule davantage l'activité fixatrice qu'une submersion constante, ce qui s'explique probablement par une libération plus intense des substrats énergétiques à partir de la matière organique du sol.

## 2. Influence des facteurs substrats énergétiques et azote ammoniacal.

Les résultats obtenus à partir de sols (Fig. 3) ou de suspensions de sols (Fig. 4), montrent que :

- sans apport d'azote ammoniacal, les gains dus à la fixation de  $N_2$  sont appréciables même sans enrichissement en substances énergétiques ;
- quand on apporte de l'azote ammoniacal ces gains sont plus faibles ;
- le bilan des gains dus à la fixation de  $N_2$  et des pertes dues à la déni-

trification est négatif en présence de substrats énergétiques, quand la fixation de  $N_2$  est bloquée par de fortes concentrations en azote ammoniacal ;

— le sol de Dabou paraît être le moins sensible à l'effet inhibiteur de l'azote ammoniacal ce qui pourrait s'expliquer par le fait que les concentra-

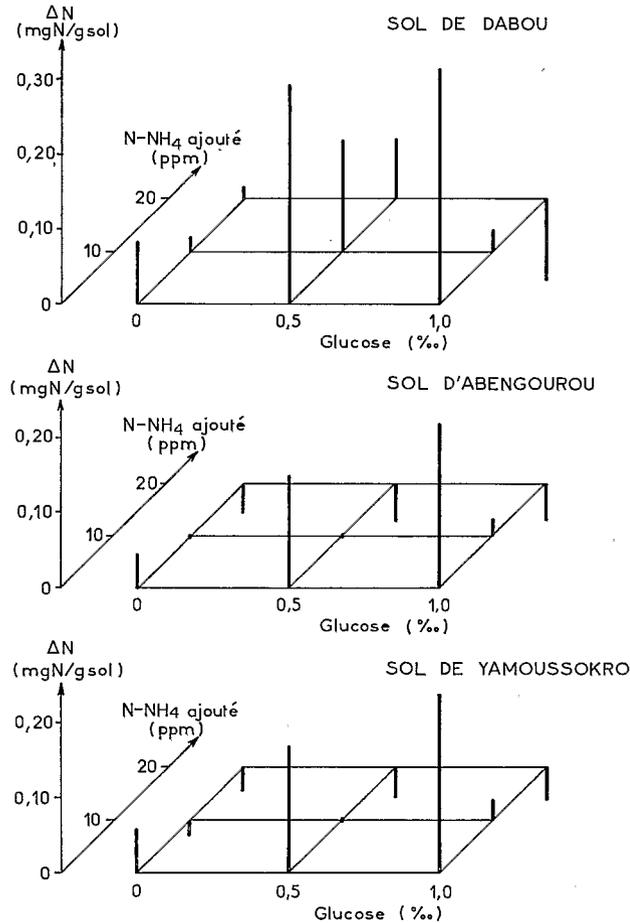


FIG. 4. — Influence des apports de substrat énergétique (glucose) et d'azote ammoniacal, sur la fixation nette de  $N_2$  dans des suspensions de sol, exprimée par la variation  $\Delta N$  de la teneur en azote du sol (les concentrations sont exprimées par rapport au volume total).

tions en cet élément généralement observées *in situ* dans ce sol sont les plus fortes (de l'ordre de 100 ppm contre 50 à 70 ppm pour les sols de Yamoussokro et Abengourou) ;

— les pailles constituent un meilleur substrat énergétique que les racines.

Cette première partie de l'étude expérimentale apporte un certain nombre de précisions aux observations faites lors de l'étude préliminaire. Toutefois

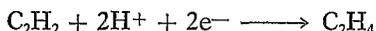
nous n'avons opéré jusqu'ici que sur le sol seul. L'étude de la fixation de  $N_2$  dans l'écosystème sol-plante a été rendue possible par l'utilisation de la méthode de réduction de l'acétylène.

## V. — ÉTUDE EXPÉRIMENTALE DE LA FIXATION BRUTE D'AZOTE DANS DES SYSTÈMES « SOL SANS PLANTE » OU DES SYSTÈMES « SOL-PLANTE » PAR LA MÉTHODE DE RÉDUCTION DE L'ACÉTYLÈNE

L'estimation de la fixation biologique de  $N_2$  par la méthode de réduction de l'acétylène est fondée sur l'existence d'une relation quantitative entre la réaction de réduction de l'azote moléculaire :



et la réaction de réduction de l'acétylène :



La réduction d'une molécule d'azote exigeant 6 électrons et la réduction d'une molécule d'acétylène en exigeant seulement 2, le rapport molaire théorique «  $C_2H_4 : N_2$  réduit » est de 3. Mais l'expérience montre que si ce rapport est souvent de l'ordre de 3 avec des extraits acellulaires de microorganismes, il peut être très différent de cette valeur dans le cas de cellules intactes (BERGERSEN, 1970) ou de systèmes plus complexes tels que le sol (BROUZES *et al.*, 1971). Il est donc indispensable de vérifier la valeur du rapport molaire «  $C_2H_4 : N_2$  réduit » dans les conditions expérimentales où l'on se place.

*Remarque* : conformément à la suggestion de HARDY *et al.* (1972), nous ferons suivre les valeurs de fixation de  $N_2$  ainsi mesurées de la formule de l'acétylène entre crochets [ $C_2H_2$ ].

### A. — MISE AU POINT DE LA MÉTHODOLOGIE

La méthode de réduction de l'acétylène consiste à placer le système à étudier dans une enceinte fermée, en contact avec une atmosphère enrichie en acétylène, et à mesurer la production d'éthylène par chromatographie en phase gazeuse. La technique utilisée est celle de STEWART *et al.* (1967) et HARDY *et al.* (1968), 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.

#### 1. Cas du système « sol sans plante ».

Pour obtenir au laboratoire une fixation de  $N_2$  significative dans un échantillon de sol sans plante, il est souvent nécessaire d'apporter une source d'énergie. Cet apport énergétique est un substrat carboné pour les bactéries

fixatrices non photosynthétiques, la lumière pour les microorganismes photosynthétiques.

a) *Dispositif expérimental pour l'étude de l'influence de la concentration en azote ammoniacal sur la fixation de  $N_2$  [ $C_2H_2$ ] par des sols enrichis en glucose.*

Les sols ont été placés dans des flacons de 12 ml à raison de 2 g par flacon. Les conditions optimales de mesure ont été déterminées par des expériences préliminaires qui ne seront pas décrites ici. Ces conditions sont les suivantes :

— prétraitement consistant à placer les sols 15 jours dans des conditions de submersion,

— addition de 0,5 ml d'une solution contenant glucose et sulfate d'ammoniac en quantités variables (0 à 2 % de glucose et 0 à 200 ppm N-NH<sub>4</sub>, ces concentrations étant exprimées par rapport au poids de sol sec),

— préincubation avec glucose et azote ammoniacal de durée optimale pour chaque sol (Dabou : 38 h, Abengourou : 45 h, Yamoussokro : 36 h),

— mise en incubation sous argon et acétylène.

La réduction de  $C_2H_2$  en fonction du temps est linéaire ; les mesures sont effectuées après 5 h d'incubation (5 répétitions par mesure).

b) *Dispositif expérimental pour l'étude de la fixation de  $N_2$  [ $C_2H_2$ ] par des sols incubés à la lumière.*

2 g de sol ont été placés dans des flacons de 12 ml et maintenus 30 jours à 28° C sous une lame d'eau. La photopériode a été de 14 h d'illumination et l'éclairage de 20 000 lux. Parallèlement des sols témoins ont été maintenus à l'obscurité pendant toute la durée de l'expérience. Les mesures ont été effectuées au 30<sup>e</sup> jour, après 1 h, 4 h et 7 h d'incubation (6 répétitions par mesure). La surface du sol était alors recouverte par une pellicule d'algues parmi lesquelles ont pu être observées de nombreuses Cyanophycées.

## 2. Cas du système « sol-plante ».

La source d'énergie est ici constituée par les exsudats racinaires qui fournissent aux bactéries fixatrices les substrats carbonés nécessaires à leur activité.

Pour chacun des sols, le dispositif expérimental a été le suivant :

— microcolonnes de sol de 12 × 120 mm (tubes en pyrex),ensemencées par une graine de riz IR8 prégermée (sol rhizosphérique),

— microcolonnes de sol nonensemencées (sol non rhizosphérique). L'éclairage au niveau des plantules était de 20 000 lux, la photopériode de 14 h d'illumination. Pendant toute la durée de l'expérience, les sols ont été maintenus dans des conditions de submersion et à l'abri de la lumière pour éviter le développement des algues.

a) *Mesure de la fixation de  $N_2$  [ $C_2H_2$ ] par le système « sol-plante ».*

Chaque système (sol rhizosphérique ou sol non rhizosphérique) est extrait du tube et placé dans un flacon sérum de 140 ml fermé par un bouchon de

caoutchouc étanche avec virolle, en présence du mélange gazeux argon-acétylène. Les flacons sont incubés à 28° C à l'obscurité et les mesures effectuées après divers temps d'incubation. Une activité nitrogénasique n'est observée que dans le cas de sols plantés ; la courbe de réduction de  $C_2H_2$  comprend une phase de latence de 8 à 12 h, suivie d'une phase linéaire de 10 à

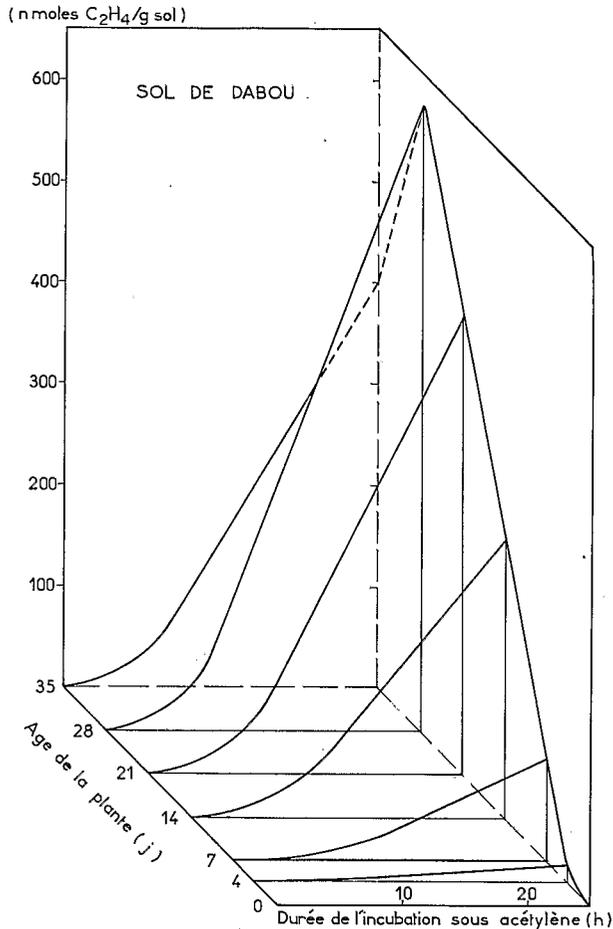


FIG. 5. — Fixation de  $N_2$  [ $C_2H_2$ ] par le système « sol-plante » en fonction du temps d'incubation, à divers âges de la plante (la réduction de  $C_2H_2$  est nulle dans le cas de sols non plantés).

14 h. L'activité des sols non plantés est pratiquement nulle. A titre d'exemple, nous avons représenté dans le cas du sol de Dabou, les courbes de réduction de  $C_2H_2$  à divers âges de la plante (Fig. 5). La vitesse de fixation de  $N_2$  [ $C_2H_2$ ] est déduite de la vitesse de réduction de  $C_2H_2$  correspondant à la phase linéaire en se fondant sur le rapport molaire théorique «  $C_2H_4$  :  $N_2$  réduit » de 3 (RINAUDO *et al.*, 1971).

On détermine ainsi l'activité nitrogénasique du système « sol-plante » à un moment donné. De telles mesures ont été effectuées à des intervalles de temps réguliers pendant 35 jours (5 répétitions par mesure) afin de tracer pour chacun des trois sols, la courbe d'activité nitrogénasique en fonction de l'âge de la plante. On peut alors estimer graphiquement la quantité d'azote fixée pendant l'intervalle de temps considéré, par la surface comprise entre la courbe des vitesses de fixation et l'axe des abscisses.

b) *Validité de la méthode.*

Afin de vérifier la validité de cette méthode, la fixation de  $N_2$  a été également estimée par la méthode de Kjeldahl : la quantité d'azote fixé dans la rhizosphère du riz en 35 jours est déterminée par le calcul de la différence entre la teneur en azote total de l'écosystème « sol-plante » et celle de l'écosystème « sol non rhizosphérique » :  $\Delta N = [N(\text{sol rhizosphérique}) + N(\text{plante})] - [N(\text{sol non rhizosphérique})]$ .

*Remarque* : afin de comparer les résultats obtenus par la méthode de réduction de l'acétylène et par la méthode de Kjeldahl, les vitesses de fixation seront exprimées en nanomoles d'éthylène et en microgrammes d'azote (équivalence théorique :  $1 \text{ nmole } C_2H_4/h = 0,224 \text{ } \mu\text{g } N/j$ ).

c) *Remarque.*

Le riz présente la particularité de permettre les échanges gazeux à travers ses canaux aëriifères. Des études récentes tenant compte de cette propriété, ont montré que l'activité fixatrice dans la rhizosphère du riz peut varier de façon assez considérable au cours de la journée (FARES *et al.*, 1972). La technique utilisée par ces chercheurs présente l'avantage d'être écologique et de ne pas perturber l'écosystème : les parties aériennes du riz sont enfermées dans un tube en pyrex renversé placé sur le tube contenant le sol, et rendu solidaire de lui par un joint en caoutchouc. L'acétylène est introduit par piqûre à travers le joint de caoutchouc et les mesures ont lieu à partir de prélèvements de gaz effectués de la même manière, au cours des premières heures qui suivent l'introduction de l'acétylène.

Nous avons vérifié que par la technique que nous avons utilisée ici (perturbation de l'écosystème et incubation en présence d'argon et d'acétylène), la vitesse de réduction de  $C_2H_2$  au cours de la journée est pratiquement constante.

Des études sont en cours actuellement, dont le but est de comparer les taux journaliers de fixation, évalués par ces deux techniques.

## B. — APPLICATION DE LA MÉTHODE A L'ÉTUDE DE L'INFLUENCE DE DIVERS FACTEURS

### 1. Cas du système « sol sans plante ».

a) *Influence de la concentration en azote ammoniacal sur la fixation de  $N_2$  [ $C_2H_2$ ] par des sols enrichis en glucose.*

La figure 6 représente les vitesses de fixation de  $N_2$  en fonction de l'apport en azote ammoniacal. L'effet inhibiteur est net quelle que soit la concentra-

tion en glucose dans le sol. Toutefois l'allure de ces courbes semble montrer que l'azote ammoniacal préexistant (de l'ordre de 60 à 100 ppm  $\text{N-NH}_4$ ) n'exerce pas d'effet dépressif très marqué ; ainsi dans le sol de Dabou enrichi par 2 % de glucose, la vitesse de réduction de  $\text{C}_2\text{H}_2$  ne diminue que de 372 à 356 nmoles  $\text{C}_2\text{H}_4/\text{g sol/h}$ , après un apport de 50 ppm d'azote ammoniacal. L'azote ammoniacal étant assimilé préférentiellement à l'azote moléculaire, les microorganismes fixateurs ont donc dans le sol, la possibilité d'assimiler les deux formes d'azote simultanément. Des observations analogues ont été faites pour de faibles concentrations en azote ammoniacal, avec des cultures

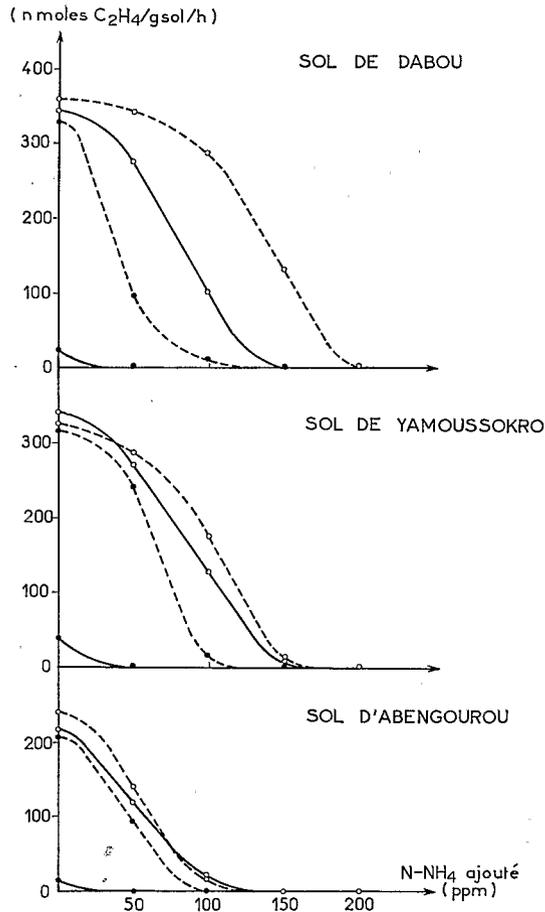


FIG. 6. — Influence d'un apport d'azote ammoniacal sur l'activité fixatrice de  $\text{N}_2$  [ $\text{C}_2\text{H}_2$ ] par des systèmes « sol sans plante » enrichis en glucose (mesures après 5 h d'incubation).

- — ● 0,5 % de glucose
- — ● 1 % de glucose
- — ○ 1,5 % de glucose
- — ○ 2 % de glucose

pures d'*Azotobacter* (STRANDBERG et WILSON, 1958), *Clostridium* (ZELITCH, 1951), et *Calothrix* (STEWART, 1964).

b) *Fixation de  $N_2$  [ $C_2H_2$ ] par des sols incubés à la lumière.*

L'activité nitrogénasique des sols maintenus à l'obscurité est pratiquement nulle. La figure 7 représente la réduction de  $C_2H_2$  en fonction du temps d'incubation des sols incubés à la lumière. Les vitesses maximales de réduction de  $C_2H_2$  sont respectivement : 75,0, 77,5 et 42,5 nmoles  $C_2H_4/g$  sol sec/h, pour les sols de Dabou, Abengourou et Yamoussokro. Les valeurs correspondantes calculées en se fondant sur le rapport molaire «  $C_2H_4$  :  $N_2$  réduit » de 3 sont : 9,82, 10,10 et 5,54  $\mu g$  N/g sol sec/j.

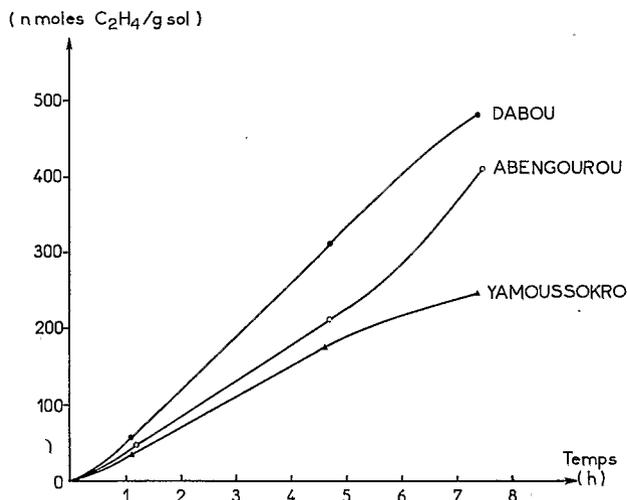


FIG. 7. — Fixation de  $N_2$  [ $C_2H_2$ ] par des systèmes « sol sans plante » incubés à la lumière, en fonction du temps d'incubation (la réduction de  $C_2H_2$  est pratiquement nulle dans le cas de sols maintenus à l'obscurité).

## 2. Cas du système « sol-plante ».

### a) *Évolution de l'activité fixatrice dans la rhizosphère du riz au cours de la croissance de la plante.*

Les fixations de  $N_2$  [ $C_2H_2$ ] maximales se situent suivant le sol entre 11 et 32 nmoles  $C_2H_4/g$  sol/h (soit 2,5 et 8  $\mu g$  N/g sol/j). La fixation de  $N_2$  en 35 jours est représentée par la surface comprise entre chaque courbe et l'axe des abscisses (Fig. 8).

Par la méthode de Kjeldahl, on mesure la totalité de l'azote fixé pendant toute la croissance de la plante (35 jours). A partir de cette valeur, on a calculé la vitesse moyenne de fixation journalière que l'on a reportée sur la figure 8. La fixation de  $N_2$  dans la rhizosphère en 35 jours est représentée par la surface comprise entre chaque valeur moyenne et l'axe des abscisses. Il apparaît que les résultats obtenus par les deux méthodes sont très voisins

(tableau II et III). L'adoption du rapport molaire «  $C_2H_4 : N_2$  réduit » de 3 nous paraît donc justifiée dans le cas du système expérimental considéré (RINAUDO et DOMMERMUES, 1971).

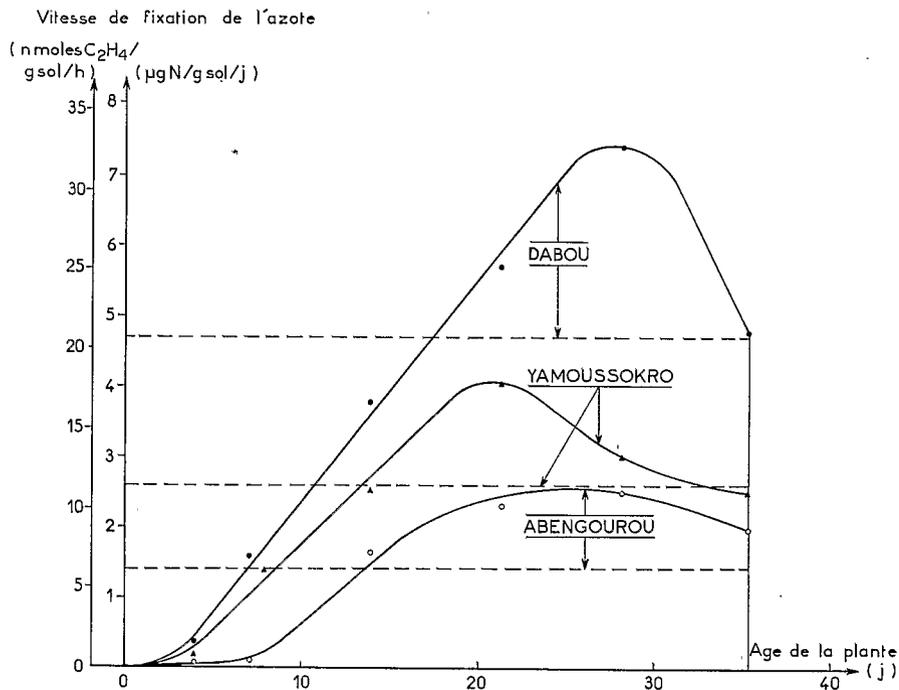


FIG. 8. — Mesure de l'activité fixatrice de  $N_2$  par des systèmes « sol-plante » en fonction de l'âge de la plante :

- vitesse déterminée par la méthode de réduction de l'acétylène,
- - - - - vitesse moyenne déterminée par la méthode de Kjeldahl.

TABLEAU II

Fixation de  $N_2$  en 35 jours dans la rhizosphère du riz déterminée par la méthode de réduction de l'acétylène et par la méthode de Kjeldahl (en  $\mu g N$  / 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 de  $N_2$  sur le rapport molaire théorique «  $C_2H_4 : N_2$  réduit » de 3.

TABLEAU III

Rapports molaires «  $C_2H_4$  :  $N_2$  réduit » calculés à partir des données expérimentales  
Fixation de  $N_2$  en 35 jours

	Méthode de réduction de l'acétylène (nmoles $C_2H_4/g$ sol)	Méthode de Kjeldahl (nmoles N/g sol)	Rapport molaire calculé
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

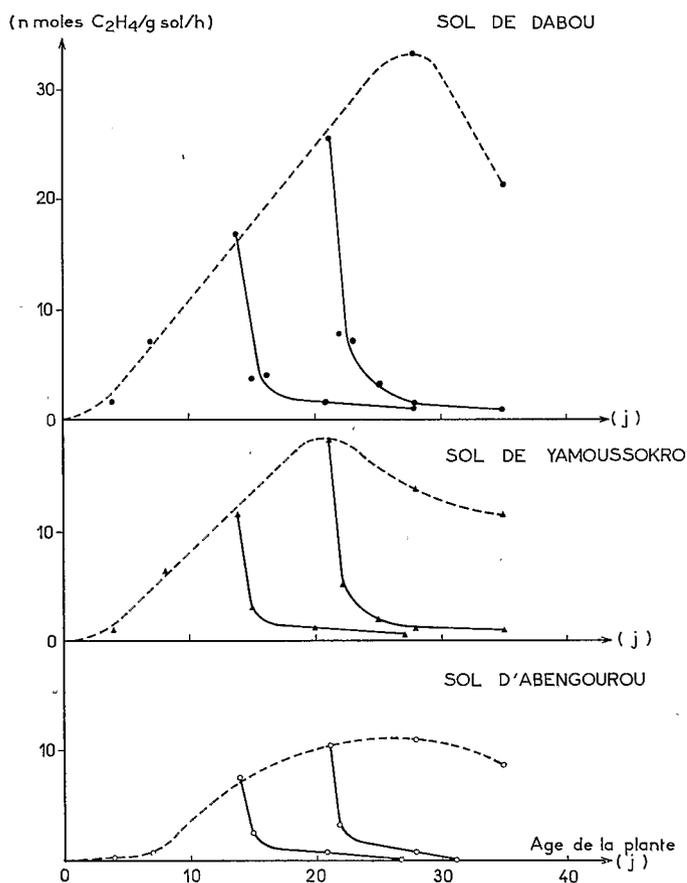


FIG. 9. — Influence de la coupe sur l'activité fixatrice de  $N_2$  [ $C_2H_4$ ] dans la rhizosphère du riz :

----- plante entière,  
——— plante coupée.

*b) Influence de la coupe des parties aériennes du riz.*

La vitesse de réduction de  $C_2H_2$  a été également mesurée après la coupe des parties aériennes. Cette coupe est intervenue aux 14<sup>e</sup> et 21<sup>e</sup> jours. On a reporté sur la figure 9 les vitesses de fixation dans les jours qui suivent la coupe. Dans les trois sols, l'effet est très net : la vitesse de fixation baisse en moyenne de 80 % dans les 24 heures qui suivent la coupe. Elle devient pratiquement négligeable après 5 jours.

Cette expérience met bien en évidence l'influence favorable des exsudats racinaires sur l'activité fixatrice : quand la plante meurt, l'exsudation cesse et l'activité fixatrice devient nulle.

*c) Influence du type pédologique.*

La fixation de  $N_2$  [ $C_2H_2$ ] dans la rhizosphère du riz, varie considérablement en fonction du type pédologique du sol (Fig. 8). Les variations sont vraisemblablement dues à l'intervention de facteurs physiques (texture, structure...) ou chimique (complexe absorbant, taux d'humification...), qui ont une incidence directe sur la nutrition de la plante, donc sur l'exsudation racinaire. Ainsi, les vitesses de fixation les plus fortes, sont obtenues avec le sol de Dabou, qui, du point de vue chimique, est plus riche que les sols de Yamoussoko et Abengourou.

## VI. — CONCLUSIONS

La fertilité élevée des sols de rizières peut être associée à leur remarquable aptitude à s'enrichir en azote. La fixation libre de  $N_2$  est particulièrement active dans deux sites distincts : l'interface sol-eau où le développement des Cyanophycées est luxuriant, et la rhizosphère du riz où les exsudats fournissent aux bactéries fixatrices, les substrats énergétiques nécessaires à leur activité. Dans les deux cas, la submersion du sol est un facteur favorable : les Cyanophycées sont en effet nettement hydrophiles, et la submersion induit des modifications physico-chimiques du milieu favorables à l'activité des bactéries fixatrices. De plus l'azote ammoniacal semble ne pas avoir d'effet inhibiteur très marqué aux concentrations généralement observées dans ces sols. La fixation de  $N_2$  par les Cyanophycées est forte dans les trois sols (de l'ordre de 20 kg N/ha/mois, dans les conditions expérimentales).

L'activité fixatrice dans la rhizosphère est étroitement liée à la croissance de la plante, elle-même fonction du potentiel nutritionnel du sol. C'est pourquoi on observe des variations d'activité importantes suivant le type de sol, les plus fortes activités étant obtenues avec le sol de Dabou, qui, du point de vue agronomique, est le plus riche. Les conditions opératoires sont trop éloignées des conditions de terrain pour qu'il soit permis d'extrapoler à l'hectare de rizière, les taux de fixation mesurés expérimentalement. Néanmoins les résultats obtenus semblent montrer que pour de bons sols, la contribution des bactéries fixatrices au niveau de la rhizosphère, est d'une importance agronomique tout à fait comparable à celle des Cyanophycées, dans l'enrichissement des sols de rizières en azote.

## RÉSUMÉ

Une étude préliminaire *in situ*, a montré que la submersion des sols de rizières a pour effet de créer un environnement particulièrement favorable à la fixation de  $N_2$ .

La fixation d'azote paraît être essentiellement le fait des bactéries anaérobies (*Clostridium* en particulier) et des *Cyanophycées*, dont les densités sont fortes dans les trois sols. Les *Azotobacter* ne semblent jouer un rôle appréciable que dans le sol d'une station (Yamoussokro).

L'étude expérimentale a consisté à mesurer dans des sols placés dans des conditions d'incubation contrôlées, en présence ou en l'absence de plante, la fixation d'azote *nette* par la méthode de Kjeldahl, et la fixation d'azote *brute* par la méthode de réduction de l'acétylène. Les principaux résultats obtenus sont les suivants :

1. *Effet inhibiteur de l'azote ammoniacal.*

L'addition aux sols d'azote ammoniacal freine ou bloque la fixation de  $N_2$ . Il semble que cet effet dépressif ne se manifeste que pour des concentrations en azote ammoniacal supérieures à celles que l'on observe habituellement dans le sol (60 à 100 ppm  $N-NH_4$ ).

2. *Influence de la lumière.*

L'énergie lumineuse permet une intense activité fixatrice par les *Cyanophycées* : des fixations de  $N_2$  de 6 à 10  $\mu g N/g sol/j$ , ont été mesurées à partir de sols soumis à un éclaircissement de 20 000 lux (l'activité fixatrice de témoins placés à l'obscurité était pratiquement nulle).

3. *Influence de la rhizosphère du riz.*

La fixation de  $N_2$  dans la rhizosphère paraît être le facteur majeur de l'enrichissement en azote des sols de rizières : les vitesses de fixation maximales mesurées dans les sols plantés ont été comprises entre 2,5 et 8  $\mu g N/g sol/j$  (dans les témoins non plantés, ces vitesses étaient négligeables).

L'étude comparative de la fixation rhizosphérique par la méthode de réduction de l'acétylène et par la méthode de Kjeldahl, a confirmé la validité du rapport molaire théorique «  $C_2H_4 : N_2$  réduit » de 3, dans le cas du modèle expérimental considéré.

## SUMMARY

A preliminary study of three paddy soils in Ivory Coast was made *in situ*, and showed that good conditions for  $N_2$  fixation were created by waterlogging.  $N_2$  fixation was especially due to anaerobic bacteria (*Clostridium* particularly) and *Cyanophyceae*, both organisms being numerous in the three soils. The aerobic nitrogen fixers *Azotobacter* were only abundant in one soil (Yamoussokro).

The experimental study was performed by measuring, under controlled conditions in planted or non planted soils, the fixation by the Kjeldahl method and by the acetylene reduction method. The following results were obtained:

1. *Inhibition of nitrogen fixation by ammonium nitrogen.*

A depressive effect was observed with additions of ammonium nitrogen. A decrease of fixation seemed to occur only for ammonium nitrogen concentrations higher than those generally present in waterlogged soils (60 to 100 ppm  $N-NH_4$ ).

### 2. Influence of light.

An active  $N_2$  fixation by Cyanophyceae was observed: fixations of 6 to 10  $\mu\text{g N/g soil/day}$  were measured in soil samples incubated in the light (ca. 20 000 lux). Control samples incubated in the dark did not show a significant fixation.

### 3. Rice rhizospheric effect.

Rhizospheric nitrogen fixation appeared to be the other way of nitrogen enrichment in paddy soils: rates of fixation up to 2.5 to 8  $\mu\text{g N/g soil/day}$  were measured in planted soils. In non planted soils, the fixation was negligible.

The validity of the theoretical molar ratio »  $C_2H_4: N_2$  reduced » of 3, was proved in our experimental model, by the comparative study of nitrogen fixation by the acetylene reduction method and the Kjeldahl method.

## BIBLIOGRAPHIE

- BERGERSEN (F.J.), 1970. — The quantitative relationship between nitrogen fixation and the acetylene reduction assay. *Austr. J. Biol. Sci.*, **23** (5): 1015-1025.
- BROUZES (R.), MAYFIELD (C.I.), KNOWLES (R.), 1971. — Effect of oxygen partial pressure on nitrogen fixation and acetylene reduction in a sandy leam soil amended with glucose. *Plant and soil, Special volume*, 481-494.
- BURRIS (R.H.), 1969. — Progress in the biochemistry of nitrogen fixation. *Proc. Royal Soc. B*, **172**: 339-354.
- CASIDA (L.E.), 1968. — Methods for the isolation and estimation of activity of soil bacteria. In the Ecology of Soil Bacteria (Gray, Parkinson, eds.), *Liverpool Univ. Press*, 97-122.
- DE (P.K.), MANDAL (L.N.), 1956. — Fixation of nitrogen by algae in rice soils. *Soil Sci.*, **81**: 453-458.
- HARDY (R.W.F.), HOLSTEN (R.D.), JACKSON (E.K.), BURNS (R.C.), 1968. — The acetylene reduction assay for  $N_2$  fixation : laboratory and field evaluation. *Plant physiol.*, **43** (8): 1185-1207.
- HARDY (R.W.F.), BURNS (R.C.), HOLSTEN (R.D.), 1973. — Applications of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. *Soil Biochem. Biol.*, **5**: 47-81.
- ISHIZAWA (S.), SUZUKI (T.), ARARAGI (M.), 1970. — Trend of free-living nitrogen fixers in paddy soils. *Proc. Second Symp.  $N_2$  Fixation and Nitrogen Cycle* (H. Takahashi, ed.), 28-40.
- RINAUDO (G.), 1970. — Fixation biologique de l'azote dans trois types de sols de rizières de Côte-d'Ivoire. Thèse Doct. Ing., Fac. Sci. Montpellier.
- RINAUDO (G.), BALANDREAU (J.), DOMMERGUES (Y.), 1971. — Algal and bacterial non-symbiotic nitrogen fixation in paddy-soils. *Plant and Soil, Special Volume*, 471-479.
- RINAUDO (G.), DOMMERGUES (Y.), 1971. — Validité de l'estimation de la fixation biologique de l'azote dans la rhizosphère par la méthode de réduction de l'acétylène. *Ann. Inst. Past.*, **121**: 93-99.
- ROUQUEROL (Th.), 1964. — Sur l'activité des fixateurs d'azote dans les sols du delta de Camargue. Application d'une technique de mesure de capacité potentielle de fixation. *Ann. Agron.*, **15** (6): 599-617.
- SINGH (R.N.), 1961. — Role of blue-green algae in nitrogen economy of Indian Agriculture. I.C.A.R. New-Delhi, 175 pages.

- STEWART (W. D. P.), 1964. — Nitrogen fixation by Myxophyceae from marine environments. *J. Gen. Microbiol.*, **36**: 415-422.
- STEWART (W. D. P.), FITZGERALD (G. P.), BURRIS (R. H.), 1967. — In situ studies on  $N_2$  fixation using the acetylene reduction technique. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **58**: 2071-2078.
- STRANDBERG (G. W.), WILSON (P. W.), 1968. — Formation of the nitrogen-fixing enzyme system in *Azotobacter vinelandii*. *Can J. Microbiol.*, **14**: 25-31.
- YOSHIDA (T.), ANCAJAS (R. R.), 1971. — Nitrogen fixation by bacteria in the root zone of rice. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, **35**: 156-157.
- WATANABE (A.), 1965. — Studies on the blue-green algae as green-manure in Japan. *Proc. Nat. Acad. Sci. India, A* **35**: 361-369.
- ZELITCH (I.), 1951. — Simultaneous use of nitrogen and ammonia by *Clostridium pasteurianum*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **37**: 559-565.