

## REDUCTION DE L'OXYDE NITREUX DANS LES SOLS DE RIZIERES DU SENEGAL: MESURE DE L'ACTIVITE DENITRIFIANTE

J. -L. GARCIA

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

(Accepted 20 October 1973)

**Résumé**—Une nouvelle méthode d'estimation de la dénitrification dans les sols a été mise au point. Elle permet de mesurer: (1) l'activité dénitrifiante initiale (ou réelle) du sol au moment du prélèvement; (2) l'activité dénitrifiante potentielle du sol induite par l'introduction de  $N_2O$ . On met en incubation une quantité de sol inférieure à 50 g, saturé d'eau, en anaérobiose parfaite et à 37°C, en présence d'une quantité définie de  $N_2O$  et l'on mesure la vitesse de disparition de ce gaz par chromatographie en phase gazeuse. Il existe une corrélation des rangs hautement significative et positive entre les résultats obtenus par la nouvelle méthode et ceux fournis par la technique respirométrique dans les mêmes conditions,  $N_2O$  étant remplacé par  $KNO_3$ . La méthode chromatographique a montré qu'il n'y avait aucune activité dénitrifiante dans la rhizosphère du riz après 3 semaines de culture.

**Summary**—A new method to estimate the rate of denitrification in soil was developed, and two different activities were measured: (1) the initial (or true) denitrifying activity of the soil under prevailing conditions; (2) the potential denitrifying activity induced by the addition of  $N_2O$ . Less than 50 g of soil, saturated with water, were incubated anaerobically at 37°C, with a known amount of  $N_2O$ , and the disappearance of  $N_2O$  was followed by gas chromatography. In 25 paddy soils of Senegal, a highly positive rank correlation was found to exist between the denitrifying activity measured by chromatographic and respirometric methods, under the same conditions of incubation with either  $N_2O$  or  $NO_3^-$  as the hydrogen acceptor. By the  $N_2O$  reduction method, it was found that there was no initial denitrifying activity in the rhizosphere of 3-week-old rice.

### INTRODUCTION

La dénitrification dans les sols libère de l'oxyde nitreux (Wijler et Delwiche, 1954; Nommik, 1956; Garcia, 1973b). Les quantités mesurées sont plus importantes pour les sols acides que pour les sols neutres ou légèrement alcalins dans lesquels sa réduction est plus rapide. Dans tous les cas,  $N_2O$  est réduit ultérieurement en  $N_2$ , mais l'on n'est pas certain qu'il constitue toujours un intermédiaire obligatoire de la dénitrification.

Nous avons observé que la vitesse de réduction de  $N_2O$  dans les sols était en étroite corrélation, d'une part, avec sa vitesse de formation, et, d'autre part, avec la vitesse de réduction de  $NO_3^-$  (Garcia, 1973b). Pour estimer l'activité dénitrifiante de sols forestiers, Todd et Nuner (1972) ont utilisé récemment la vitesse de réduction de  $N_2O$  qu'ils comparent au nombre de bactéries dénitrifiantes.

La présente étude a pour but de définir les conditions d'emploi d'une méthode d'évaluation de l'activité dénitrifiante dans les sols, basée sur la mesure de la vitesse de disparition de  $N_2O$ .

### MATERIEL ET METHODES

L'étude préliminaire de la méthode a été réalisée sur un sol de rizière du Sénégal. Ce sol est un limon argilo-

sableux; ses teneurs en carbone et azote sont respectivement 3,6 et 0,27 pour cent et son pH est de 5,5. 25 sols de rizières du Sénégal, dont les caractéristiques sont décrites par ailleurs (Garcia *et al.*, 1973), ont été employés pour comparer cette nouvelle méthode avec celle de la mesure de la dénitrification potentielle au respiromètre de Warburg.

Les dosages de  $N_2O$  ont été effectués au chromatographe à détection par conductibilité thermique Varian Aerograph 90 P4, dans les conditions suivantes: colonne interne 305 cm  $\times$  6,35 mm en inox, remplie avec Porapak Q 100/120 mesh, température colonne 80°C, température injecteur 110°C, température détecteur 250°C, intensité filaments 200 mA, gaz vecteur Hélium N45 (Sté l'Air Liquide), débit gaz vecteur 60 ml/min, volume injecté 0,7 ml par vanne d'injection automatique, enregistreur Varian Aerograph A25. L'étalonnage est réalisé à partir de gaz purs de la Sté l'Air Liquide.

Les dosages de  $N_2O$  sont effectués sur des prélèvements de l'atmosphère des flacons serum renfermant le sol, dans lesquels l'anaérobiose est obtenue par un vide poussé suivi d'un remplissage d'hélium. L'opération est répétée trois fois. On introduit ensuite de l'hélium à une pression supérieure de 15 cm de mercure environ à la pression atmosphérique, puis une quantité connue de  $N_2O$ . Dans ces conditions, on obtient trois pics bien séparés:  $N_2$ ,  $CO_2$  et  $N_2O$ . L'emploi de la vanne d'in-

jection automatique calibrée supprime toute mesure de pression, le volume gazeux injecté étant une fraction bien définie du volume total de la fiole de mesure. En outre, par suite de la surpression d'hélium, la perte de volume à chaque prélèvement est rendue négligeable.

Notre méthode a été appliquée à la rhizosphère du riz. Cette plante est cultivée pendant trois semaines en tubes de verre de  $14 \times 200$  mm. Chaque tube reçoit 17 g de sol no. 1, 16 ou 26 et une seule graine (variété IR8). Une série de tubes non ensemencés constitue le sol non rhizosphérique. La photopériode comporte 14 h d'un éclairage de 20 000 lx.

## RESULTATS ET DISCUSSION

### 1. Influence de différents facteurs sur la réduction de $N_2O$

(i) *Quantité de sol.* Le premier problème qui se pose est celui de la diffusion de  $N_2O$  à travers la couche de sol contenu dans la fiole de mesure. En utilisant des flacons sérum de 250 ml, il ne faut pas dépasser 50 g de sol, les récipients étant incubés couchés. Au-dessus de cette quantité, la vitesse de réduction de  $N_2O$  n'est plus proportionnelle au poids de sol (Fig. 1).

(ii) *Humidité.* Pour déterminer l'humidification du sol pour laquelle la vitesse de réduction de  $N_2O$  est maximale, 50 g de sol ont été mis en incubation dans quatre conditions différentes: humidité équivalente, saturation, submersion et submersion agitée. La condition optimale est la saturation (Fig. 2). Dans le cas de la submersion agitée, la vitesse de réduction de  $N_2O$  est un peu supérieure mais on observe une latence plus importante.

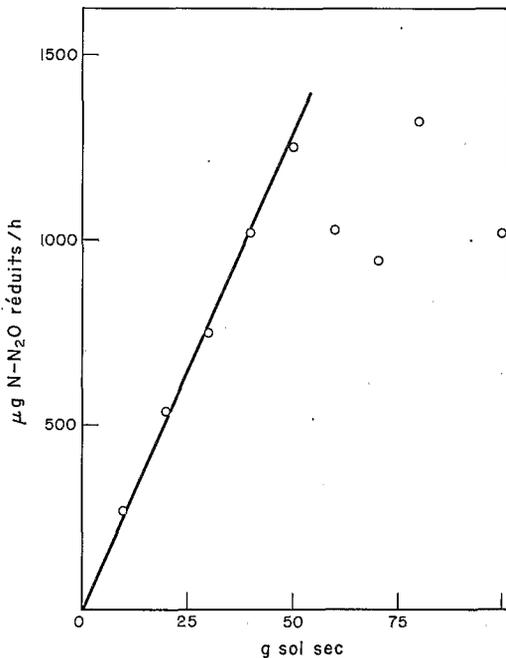


Fig. 1.

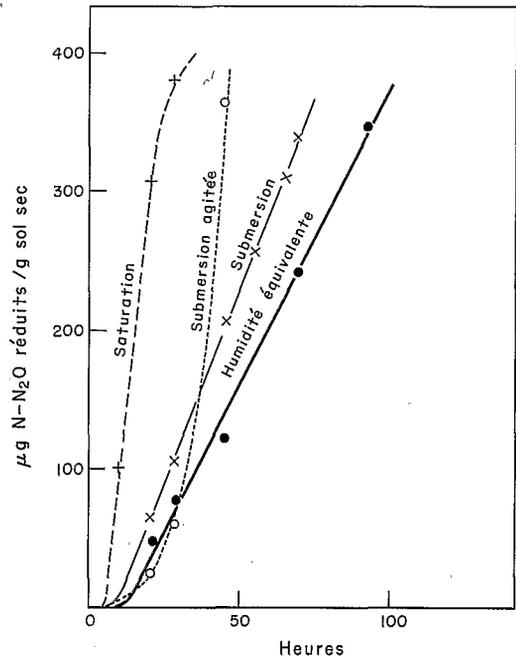


Fig. 2.

(iii) *Température.* 50 g de sol saturé d'eau ont été mis en incubation à des températures variant tous les 5 de 30 à 75°C, avec 500 partes/10<sup>6</sup> de N-N<sub>2</sub>O. La courbe représentative des variations de la vitesse de réduction de  $N_2O$  en fonction de la température montre deux maxima, aux environs respectivement de 37 et 65°C (Fig. 3). Le premier correspond à l'optimum de l'acti-

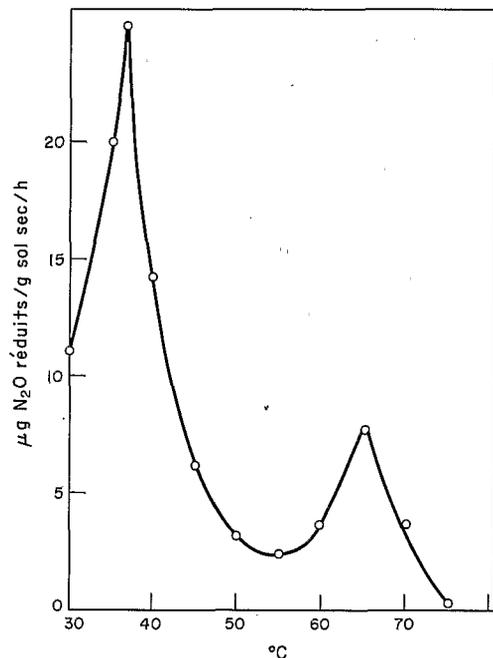


Fig. 3.

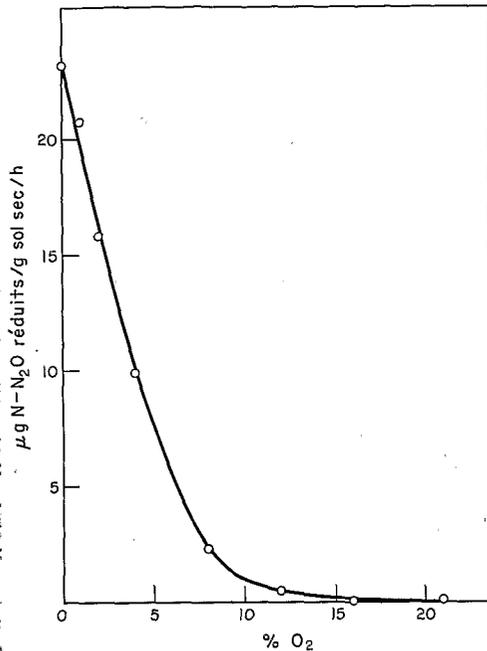


Fig. 4.

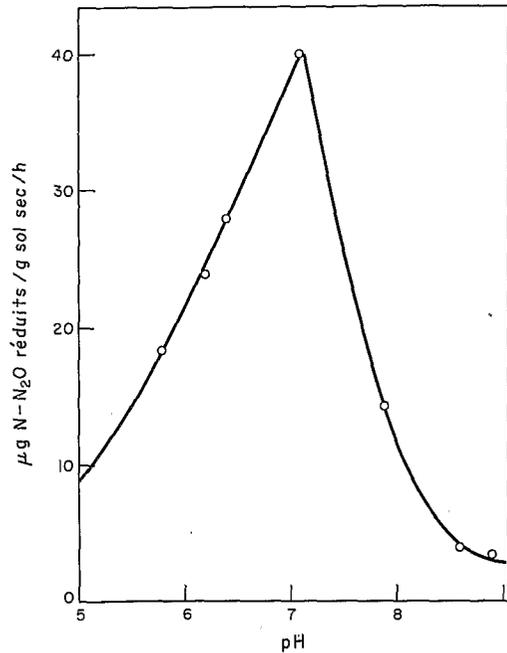


Fig. 5.

vité  $N_2O$ -réductase du sol; il est très différent du maximum obtenu pour la mesure de la dénitrification de  $NO_3^-$  qui se situe à  $65^\circ C$  (Nommik, 1956). Le deuxième pic de la courbe correspond d'ailleurs à cette température. Pour expliquer son origine, des cultures d'enrichissement ont été réalisées dans un milieu complexe, contenant du succinate de sodium, en présence de  $N_2O$ , à  $65^\circ C$ . Dans ces conditions, un bacille sporulé a été isolé en culture pure qui semble répondre à la définition de l'espèce *Bacillus thermodenitrificans* décrite par Wolf et Barker (1968). La réduction de  $N_2O$  à  $65^\circ C$  pourrait donc être l'oeuvre de cet organisme.

Pour la méthode proposée, nous avons retenu la température de  $37^\circ C$  à laquelle la quantité de  $N_2O$  en solution dans la phase liquide est faible.

(iv) *Oxygène*. 25 g de sol saturé d'eau ont été mis en incubation à  $37^\circ C$ , dans des flacons sérum en position horizontale, en présence de 1000 parties/10<sup>6</sup> de N-N<sub>2</sub>O et d'une quantité croissante de O<sub>2</sub> allant jusqu'à 21 pour cent. La Fig. 4 montre que l'oxygène inhibe la réduction de  $N_2O$  dans les sols; avec 5% de O<sub>2</sub> dans l'atmosphère, la vitesse de réduction de  $N_2O$  est diminuée des deux tiers. Elle est pratiquement nulle à partir de 15% de O<sub>2</sub>. Selon Pichinoty et D'ornano (1961), l'oxygène inhiberait la biosynthèse de l'oxyde nitreux-réductase, mais non son fonctionnement, chez *Micrococcus denitrificans*.

(v) *pH*. La méthode de Chaminade citée par Brunel (1948) a été utilisée pour faire varier le pH du sol de Djibelor. A 50 g de sol submergé par 100 ml d'eau, dans des flacons sérum de 500 ml, ont été ajoutées des quantités variables de CaO. Les fioles ont été mises en

incubation à  $30^\circ C$ , sous agitation, en présence de 30 ml de  $N_2O$ , et le pH a été mesuré en fin d'expérience. La Fig. 5 montre que le pH optimum se situe vers 7,0.

(vi) *Concentration en N<sub>2</sub>O*. 25 g de sol saturé en eau ont été mis en incubation à  $37^\circ C$ , dans des flacons sérum de 250 ml en position horizontale, en présence

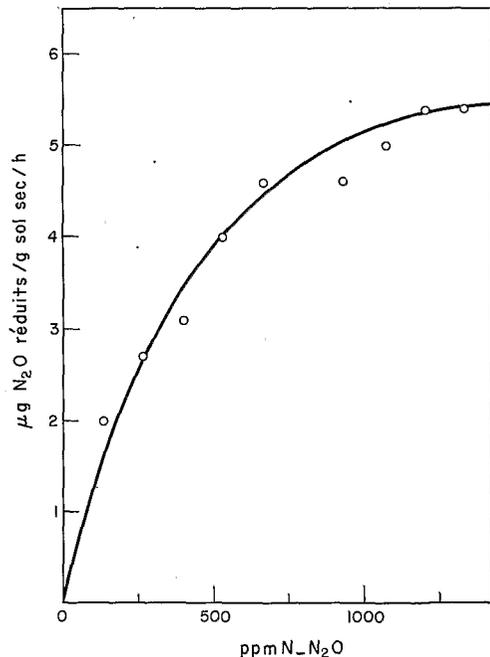


Fig. 6.

Tableau 1. Vitesses de réduction de  $\text{NO}_3^-$  (mesurées au Warburg) et de  $\text{N}_2\text{O}$  (mesurées au chromatographe) pour 25 sols de rizières du Sénégal

No. sols	1	2	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	23	25	28	29	31	32	33	
Réduction $\text{NO}_3^-$ N partes/ $10^6$ /h																										
Vit.*	2,1	4,9	1,1	5,6	4,7	1,3	1,1	1,0	1,2	1,0	2,5	1,1	3,4	4,6	1,6	0,1	0,8	0,4	2,8	3,0	2,5	0,4	2,4	1,6	2,4	
Rang	12	2	18	1	3	15	18	20,5	16	20,5	8,5	18	5	4	13,5	25	22	23,5	7	6	8,5	23,5	10,5	13,5	10,5	
Réduction $\text{N}_2\text{O}$ N partes/ $10^6$ /h																										
Vit.*	1,1	3,5	2,5	7,4	6,0	5,8	1,8	0,5	0,7	0,1	0,3	1,0	0,6	4,0	2,4	0,5	1,1	0,5	2,5	1,8	4,1	0,2	2,2	1,9	2,1	
Rang	15,5	6	7,5	1	2	3	13,5	21	18	25	23	17	19	5	9	21	15,5	21	7,5	13,5	4	24	10	12	11	

\* Vitesse maximum mesurée au cours de la dénitrification (moyenne de trois mesures).

d'une quantité croissante de  $N_2O$  allant de 100 à 1 300 partes/ $10^6$  de  $N-N_2O$ . La Fig. 6 montre que la vitesse de réduction de  $N_2O$  est fonction de la quantité introduite; pour comparer l'activité dénitrifiante de plusieurs sols, il faudra donc utiliser une même quantité initiale de  $N_2O$ . En outre, l'activité dénitrifiante étant mesurée par la différence entre les teneurs en  $N_2O$  initiale et finale, il convient que cette différence soit la plus grande possible pour avoir le maximum de précision, ce qui conduit à ne pas utiliser une quantité initiale de  $N_2O$  trop importante.

(vii) *Production endogène de  $N_2O$* . Nous avons recherché l'incidence éventuelle sur la mesure, de la production de  $N_2O$  à partir de composés oxygénés de l'azote présents initialement dans les sols. Pour cela, 10 sols du lot étudié, dont la teneur en  $N-NO_3^-$  est nulle ou inférieure à 10 partes/ $10^6$ , ont été incubés dans les conditions de la mesure, mais sans addition de  $N_2O$ , pendant 48 h. La quantité de  $N-N_2O$  la plus élevée a été de 4 partes/ $10^6$ . La production endogène de  $N_2O$  n'a donc pas d'incidence sur la méthode de mesure quand le sol contient peu ou pas de nitrate ou nitrite. Dans le cas contraire, la mesure peut être faussée et une étude est actuellement en cours pour préciser ce phénomène.

## 2. Comparaison avec la méthode respirométrique

La validité de la méthode d'estimation de l'activité dénitrifiante des sols ainsi définie, a été testée par comparaison avec la méthode classique de mesure de la dénitrification au respiromètre de Warburg dans les sols saturés d'eau et incubés à  $37^\circ C$  en présence de 100 partes/ $10^6$  d' $N-NO_3^-$ . Les résultats des mesures effectuées sur les 25 sols par les deux méthodes (Tableau 1), ont été soumis au test statistique de corrélation des rangs de Spearman (1904). Une corrélation positive hautement significative a été mise en évidence:  $r_s = +0,672$  (valeur critique au risque 1% = 0,497).

La présente méthode chromatographique peut donc remplacer avantageusement la méthode respirométrique.

## 3. Application à la mesure des activités dénitrifiantes réelle et potentielle

Au cours des expériences préliminaires, nous avons constaté que la réduction de  $N_2O$  ne commençait dans les sols qu'après une période de latence de 6 à 8 h. Or, ces mêmes sols, mis en incubation en présence de  $N_2O$ , réduisent immédiatement le  $N_2O$  réintroduit dans les fioles de mesure plusieurs jours après épuisement du gaz initial.

Deux séries de 30 g de sol de Djibelo saturé en eau, ont été mises en préincubation, à  $30^\circ C$ , en anaérobiose, dans des flacons sérum de 250 ml. Dans l'une des séries, 100 partes/ $10^6$  de  $N-NO_3^-$  étaient ajoutées sous forme de  $KNO_3$ . La dénitrification était totale après 48 h d'incubation. Au bout d'une semaine, les gaz produits ont été éliminés sans ouvrir les fioles et l'incubation a été poursuivie, à  $37^\circ C$ , après addition de 400 partes/ $10^6$  de  $N-N_2O$ .

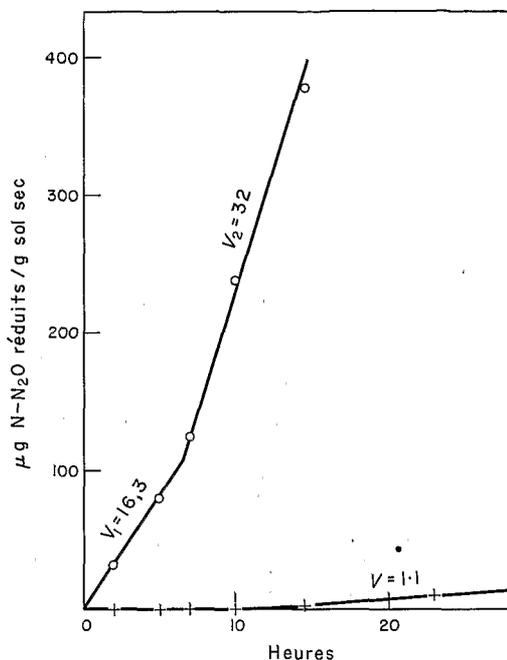


Fig. 7.

La Fig. 7 montre que, pour le sol préincubé sans  $NO_3^-$ , la vitesse de réduction de  $N_2O$  est lente (1,1 partes/ $10^6$ /h) et ne commence qu'après une période de latence d'environ 12 h. Elle est un peu plus faible que celle du même sol non préincubé (1,8 partes/ $10^6$ /h). Par contre, pour le sol préincubé avec 100 partes/ $10^6$  de  $N-NO_3^-$ , on peut observer deux vitesses de réduction de  $N_2O$ : durant les 6 premières heures, la vitesse est de 16,3 partes/ $10^6$ /h ( $V_1$ ) et au-delà, elle est double ( $V_2 = 32$  partes/ $10^6$ /h).  $V_1$  résulte de l'activité  $N_2O$ -réductase apparue au cours de la préincubation avec  $NO_3^-$ , et présente dans le sol au début de la seconde incubation;  $V_2$ , par contre, pourrait résulter d'une biosynthèse *de novo* d'enzyme en présence du substrat introduit avant la deuxième incubation. Autrement dit,  $V_1$  représenterait l'activité  $N_2O$ -réductase initiale (ou réelle) du sol, et  $V_2$  son activité potentielle.

Ainsi l'application de la méthode à un échantillon prélevé à un instant donné dans une rizière, pourra indiquer si ce sol a été récemment le siège, au niveau du prélèvement, d'une dénitrification plus ou moins intense. Ceci était particulièrement intéressant à déterminer dans le cas de la rhizosphère. Le sol rhizosphérique obtenu comme indiqué précédemment, a été introduit dans des flacons sérum de 250 ml en position horizontale, à raison du contenu de 3 tubes par flacon. Cinq essais ont été effectués pour chacun des 3 sols et pour chaque traitement: rhizosphère (R) et sol nu (S). La mesure de la réduction de  $N_2O$  n'a permis de déceler pour aucun sol, une activité dénitrifiante initiale. Par contre, les activités dénitrifiantes potentielles sont bien différentes quand on considère R et S (Fig. 8).

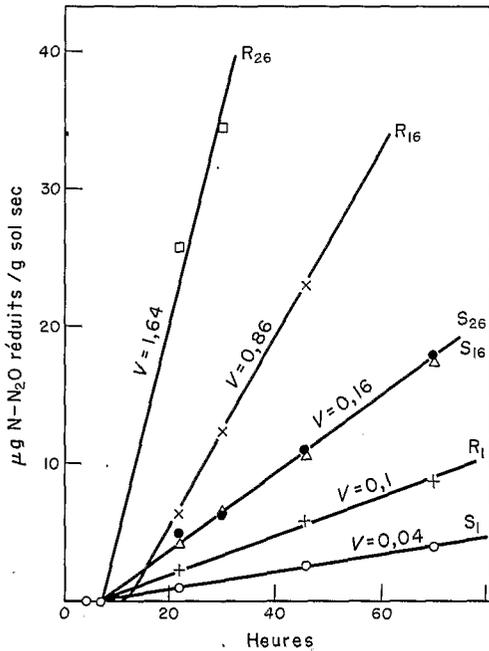


Fig. 8.

L'effet rhizosphère du riz n'affecte donc que l'activité dénitrifiante potentielle. Si cet effet rhizosphère positif avait déjà été observé à l'aide de la méthode respirométrique (Garcia, 1973a), seule la nouvelle méthode montre qu'il n'y a pas d'activité dénitrifiante dans les sols considérés, pendant le début de la croissance du riz. L'absence d'activité dénitrifiante initiale résulte sans doute de conditions défavorables, telles que la libération de O<sub>2</sub> au niveau des racines ou l'absence de nitrification au cours des trois semaines de culture.

#### CONCLUSIONS

La mesure de la vitesse de réduction de N<sub>2</sub>O dans les sols, pendant les premières heures de l'incubation, a permis de mettre en évidence une activité dénitrifiante qui avait effectivement lieu dans le sol peu de

temps avant le prélèvement. Cette activité réelle est très inférieure à celle qui est mesurée au cours de la prolongation de la durée de l'incubation et qui résulte vraisemblablement de la biosynthèse *de novo* d'enzymes. Une expérimentation complémentaire est actuellement en cours pour adapter cette nouvelle méthode à des mesures de la dénitrification au champ.

*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 J. Bakhom pour leur assistance technique.

#### REFERENCES

- BRUNEL A. (1948) *Traité Pratique de Chimie Végétale* (G. Frère, éd.), tome II, pp. 361-362. Frère, Tourcoing.
- GARCIA J. -L., RAIMBAULT M., JACQ V., RINAUDO G. et ROGER P. (1974) Activités microbiennes dans les sols de rizières du Sénégal: relations avec les caractéristiques physico-chimiques et influence de la rhizosphère. *Rev. Ecol. Biol. Sol* **11**, (sous presse).
- GARCIA J. -L. (1973a) Influence de la rhizosphère du riz sur l'activité dénitrifiante potentielle des sols de rizières du Sénégal. *Oecol. Plant.* **8**, 315-323.
- GARCIA J. -L. (1973b) Séquence des produits formés au cours de la dénitrification dans les sols de rizières du Sénégal. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)* **124B**, 351-362.
- NOMMIK H. (1956) Investigations on denitrification. *Acta Agr. Scand.*, **6**, 195-228.
- PICHINOTY F. ET D'ORNANO L. (1961) Recherches sur la réduction du protoxyde d'azote par *Micrococcus denitrificans*. *Ann. Inst. Pasteur* **101**, 418-426.
- SPEARMAN C. (1904) The proof and measurement of association between two things. *Ann. J. Psych.* **15**, 72-101.
- TODD R. L. and NUNER J. H. (1972) Comparison of two techniques for assessing denitrification in terrestrial ecosystems. Contribution from the *Eastern Deciduous Forest Biome*, US-IBP, 2 pp.
- WIJLER J. and DELWICHE C. C. (1954) Investigations on the denitrifying process in soil. *Pl. Soil* **5**, 155-169.
- WOLF J. and BARKER A. N. (1968) The genus *Bacillus*: aids to the identification of its species. In *Identification Methods for Microbiologists* (B. M. Gibbs and D. A. Shapton, eds.), Part B, pp. 93-109. Academic Press, London.