

## EVALUATION DE LA DENITRIFICATION DANS LES RIZIERES PAR LA METHODE DE REDUCTION DE N<sub>2</sub>O

J.-L. GARCIA

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

(Accepted 22 October 1974)

**Résumé**—Une méthode de terrain pour l'estimation de la dénitrification dans les rizières est décrite. Cette méthode est basée sur la mesure de la réduction de N<sub>2</sub>O. Les échantillons de sol sont incubés immédiatement après leur prélèvement, dans des flacons sérum de 250 ml, en atmosphère anaérobie et en présence de N<sub>2</sub>O et de krypton comme étalon interne. Les flacons sont placés à 37°C dans une étuve à ventilation fonctionnant sur deux batteries d'accumulateurs de 12 V. Les prélèvements d'atmosphère sont effectués dans des tubes sous vide et analysés ultérieurement par chromatographie en phase gazeuse au laboratoire. Cette méthode a permis de déceler l'existence d'une activité dénitrifiante initiale à différents stades de croissance du riz, dans plusieurs rizières du Sénégal, ainsi que dans une culture en pots. Elle a également confirmé l'effet rhizosphère positif du riz sur la dénitrification.

**Summary**—A field method to evaluate denitrification in rice paddy soil was developed, by measurement of N<sub>2</sub>O reduction rates. Immediately after collection, samples of soil were incubated anaerobically in 250 ml serum flasks, with addition of N<sub>2</sub>O as well as krypton as an internal standard. The flasks were maintained at 37°C in a portable temperature insulated box operating on two 12 V battery accumulators. At intervals during incubation, evacuated glass tubes were used to collect samples of the flasks atmosphere, and later these gas samples were analysed by gas chromatography in the laboratory. With this method, an initial denitrifying activity was found at various stages of rice growth, in several rice fields in Senegal and in pot culture. The positive effect of the rice rhizosphere on denitrification was also confirmed.

### INTRODUCTION

L'estimation de la dénitrification au champ a été réalisée, jusqu'à présent, à l'aide de lysimètres spéciaux (Overrein, 1968; Martin et Ross, 1968; McGarity et Hauck, 1969), ou en prélevant des échantillons de sol mis en incubation au laboratoire sans perturbation (Stefanson, 1972; Myers et McGarity, 1972). C'est cette dernière technique de prélèvement que nous appliquons mais en effectuant immédiatement les incubations sur le terrain.

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse de la séquence des produits formés au cours de la dénitrification dans les sols de rizières (Garcia, 1973b) nous a permis de mettre au point une nouvelle méthode d'estimation de la dénitrification basée sur la réduction de N<sub>2</sub>O (Garcia, 1974a) qui est préférable à la méthode respirométrique de McGarity (1961) (Garcia, 1973a; Garcia *et al.*, 1974).

On mesure la disparition de N<sub>2</sub>O de la phase gazeuse des flacons de mesure dans les conditions optimales de réduction de ce gaz; rappelons que la vitesse de réduction mesurée pendant les six premières heures de l'incubation permet d'estimer une activité dénitrifiante du sol au moment du prélèvement, alors que la vitesse de réduction mesurée après une vingtaine d'heures d'incubation, représente l'activité dénitrifiante potentielle.

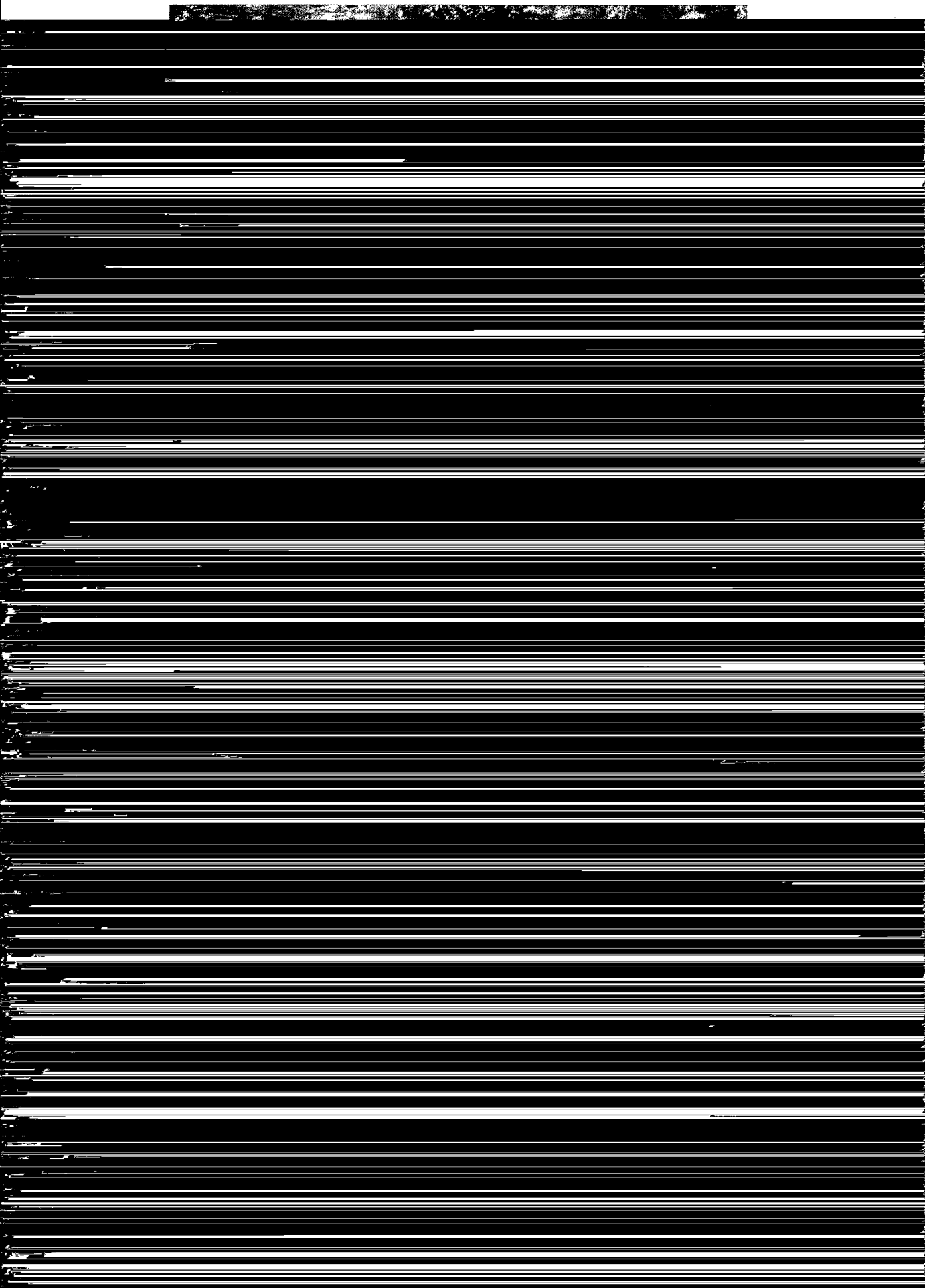
Pour adapter cette méthode à des mesures au champ, nous avons construit un matériel de terrain destiné à l'étude de la dénitrification dans les rizières mais qui devrait pouvoir être utilisé pour n'importe quel type de culture après adaptation de la méthode.

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

#### Matériel

Le matériel de terrain, représenté sur la Fig. 1, comprend:

- (1) Une étuve à ventilation en bois doublé de polystyrène expansé, permettant d'incuber les échantillons de sol à 37°. Cette étuve, qui fonctionne sur deux batteries d'accumulateurs, comporte trois compartiments; un compartiment central renferme une résistance chauffante, un ventilateur situé au-dessus d'elle, qui assure une circulation permanente de l'air dans l'étuve, une sonde thermique, un relais d'avertisseur sonore de voiture couplé à la sonde pour limiter l'intensité du courant passant dans celle-ci, et un thermomètre coudé visible à l'extérieur; deux compartiments latéraux communiquent avec le compartiment central par deux ouies inférieure et supérieure; ils renferment chacun un bâti en bois pouvant contenir 30 flacons sérum de 250 ml en position allongée, répartis sur quatre rangées.
- (2) Deux batteries d'accumulateurs de 12 V, montées en parallèle dans un coffret en bois doublé intérieurement de polystyrène expansé pour amortir les chocs.
- (3) Une rampe de gazage en cuivre à 12 postes, confectionnée à partir de deux anciennes rampes d'appareil de minéralisation, montée dans un coffret en bois ouvrant, et munie d'un manomètre à vide et de deux robinets à gaz: l'un pour le vide, et l'autre pour l'admission d'hélium.
- (4) Une pompe à vide manuelle Arthur Thomas (ref. 1015).



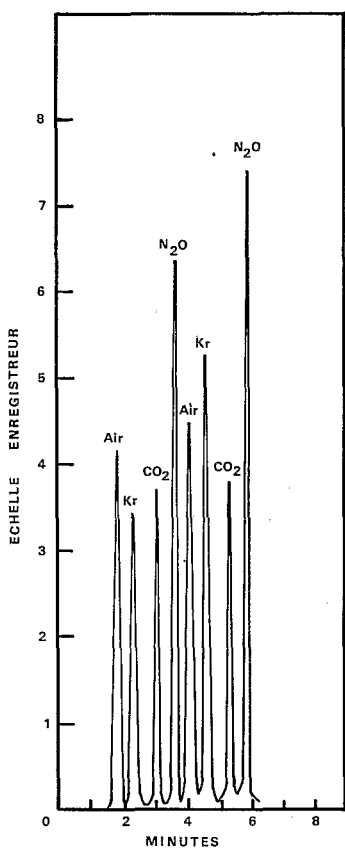


Fig. 2. Chromatogramme obtenu pour deux analyses groupées du contenu de deux tubes Vacutainer. La vitesse de déroulement du papier enregistreur est de 50 cm/h, et la hauteur des pics est atténuée deux fois.

#### Analyse

Le contenu des tubes Vacutainer est analysé au laboratoire à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse Varian Aerograph 90 P4 à détection par conductibilité thermique, couplé à un enregistreur Varian A 25. Les conditions d'utilisation sont identiques à celles déjà décrites (Garcia, 1974). On travaille à l'atténuation deux du chromatographe. La succession des pics est la suivante: air résiduel + N<sub>2</sub>-Kr-CO<sub>2</sub>-N<sub>2</sub>O (Fig. 2).

Ces conditions d'utilisation du chromatographe permettent d'obtenir des pics très étroits dont on ne

mesure que la hauteur pour leur exploitation. En outre, on peut réaliser deux injections à 2 min 20 sec d'intervalle, toutes les 10 min, en groupant ainsi la sortie des deux pics d'eau. Les opérations à effectuer sont décrites au Tableau 1.

Pour certains sols de rizières riches en carbone organique, notamment des sols rhizosphériques, on peut observer une légère production de méthane après 20 h d'incubation à 37°C. En effet, la faible concentration en N-N<sub>2</sub>O employée pour la mesure (100 parties/10<sup>6</sup> environ) ne permet pas l'inhibition totale de la production de CH<sub>4</sub> (Bollag et Czlonkowski, 1973). Pour détecter cette production, il suffit de comparer la hauteur des pics du krypton des tubes correspondant aux temps zéro et 20 h; si elle a augmenté, c'est qu'il y a eu production de CH<sub>4</sub>. Il faut alors modifier les conditions d'utilisation du chromatographe. Comme la quantité de méthane est faible et au plus égale à 20 pour cent de celle du krypton ajouté, il suffit simplement de modifier la température de la colonne. En coupant le chauffage du four renfermant la colonne et en le refroidissant par ouverture de son couvercle pendant 15 min, la température se stabilise à 65°C à cause du chauffage dû aux fours de l'injecteur et du détecteur. A cette température, le pic du krypton présente un petit épaulement dû au méthane, ce qui ne modifie pas sa hauteur. Mais la succession des analyses est ralentie: la deuxième injection se fait 3 min. après la première, et l'on doit attendre 16 min. pour recommencer une autre série de deux injections. On pourrait également employer une colonne plus longue, comme celle préconisée par Burford et Bremner (1972) (5,5 m × 1,59 mm), ce qui séparerait plus nettement CH<sub>4</sub> et Kr mais allongerait le temps d'élution.

#### Calcul des résultats

Les calculs sont simples (Balandreau et Dommergues, 1971). Soient  $v$  et  $v'$  les volumes respectifs de N<sub>2</sub>O et de Kr contenus dans les  $V$  ml injectés et soit  $X$  le volume de N<sub>2</sub>O dans la phase gazeuse du flacon de mesure. L'approximation du calcul consiste à supposer que le N<sub>2</sub>O diffuse dans le même volume que le krypton. Ecrivons alors que les pourcentages de N<sub>2</sub>O et de Kr sont les mêmes dans le flacon et dans le tube Vacutainer:

$$\frac{1}{X} = \frac{v'}{v} \text{ d'où } X = \frac{v}{v'}$$

Les volumes injectés  $v$  et  $v'$  de N<sub>2</sub>O et de Kr sont liés aux hauteurs de pics  $h$  et  $h'$  du chromatogramme

Tableau 1. Opérations détaillées d'injection du contenu des tubes Vacutainer dans le chromatographe

Temps	Opérations
0	Mettre en route la pompe à vide, robinet ouvert, tube Vacutainer en position sur l'aiguille de la vanne.
50 sec	Fermer le robinet du vide, enfoncer l'aiguille de la vanne dans le tube Vacutainer.
1 min	1ère injection: appuyer sur le poussoir de la vanne, enlever le tube, mettre le tube suivant en position sur l'aiguille, ouvrir le robinet du vide et tirer le poussoir.
2 min	Mettre en route l'enregistreur.
3 min	Fermer le robinet du vide, enfoncer l'aiguille dans le tube.
3 min 20 sec	2ème injection: appuyer sur le poussoir, enlever le tube, mettre le tube suivant sur l'aiguille, tirer le poussoir, ouvrir le robinet du vide, arrêter la pompe à vide.
7 min environ	Arrêter l'enregistreur après la sortie du deuxième pic de N <sub>2</sub> O.
10 min	Recommencer les opérations comme précédemment.

par les relations

$$\begin{aligned}v &= kh \\ v' &= k'h'\end{aligned}$$

où  $k$  et  $k'$  sont des constantes dépendant du détecteur  $D$  où

$$X = \frac{kh}{k'h'} = K \frac{h}{h'} \text{ (ml)}$$

Si  $P$  est le poids sec du sol du flacon en grammes, la quantité de  $N-N_2O$  présente dans la phase gazeuse par gramme de sol sec, exprimée en parties/10<sup>6</sup> et sachant que le rapport volume/poids pour  $N-N_2O$  est de 1,25, sera donc:

$$Q = 1,25 \cdot 10^3 \frac{X}{P}$$

Après l'obtention du chromatogramme, la suite des calculs est donc la suivante pour chaque injection: (1) calcul du rapport des hauteurs de pic  $N_2O/Kr$ , (2) différence avec le résultat du prélèvement précédent, (3) multiplication par  $1,25 \cdot 10^3 \cdot K$ , (4) division par  $P$ , (5) division par le temps d'incubation. On obtient ainsi la vitesse moyenne de réduction de  $N_2O$  pendant le temps considéré et par gramme de sol sec. On calcule la moyenne des  $n = 10$  échantillons,  $V_m$ , l'écart type  $\sigma$ , l'intervalle de confiance de la moyenne,  $i$ , par le test  $t$  de Student-Fischer avec une probabilité de 0,05:

$$i = t \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

et enfin le coefficient de variation de  $i$ ,

$$C.V. = \frac{100i}{V_m} \%$$

#### Expérimentation

Pour tester cette méthode au champ, nous avons

prélèvements ont été effectués en sol nu ( $S$ ) et dans la rhizosphère du riz ( $R$ ).

La méthode a également été appliquée à plusieurs époques d'une culture de riz IR8 en pots de P.V.C. ( $\phi 30$  cm, hauteur 50 cm) sur un sol argileux dont les teneurs en carbone et en azote sont respectivement 0,5 et 0,06 pour cent et dont le pH est de 5,9.

#### RÉSULTATS ET DISCUSSION

##### 1 Rizières

Dans les sols de rizières ayant fait l'objet des mesures, nous n'avons pas décelé de nitrate. Rappelons, à ce propos, que la méthode peut être faussée quand le sol contient du nitrate ou du nitrite (Garcia, 1974). Certains prélèvements ont été effectués sur la même parcelle, à un mois et demi d'intervalle et sur la même culture (Boundoum Nord) ou bien sur deux cultures successives (Savoigne). L'âge du riz variait de 30 à 125 jours.

Une première constatation peut être faite (Tableau 3): le coefficient de variation de l'intervalle de confiance de la vitesse de réduction de  $N_2O$  est en général plus élevé pour la vitesse initiale (moyenne: 38% pour  $S$  et 45% pour  $R$ ) que pour la vitesse potentielle (moyenne: 30% pour  $S$  et 22% pour  $R$ ). Les mesures de l'activité potentielle sont donc plus reproductibles que celles de l'activité initiale. Quoiqu'il en soit, les forts coefficients sont rares et l'on peut dire que la technique de prélèvement est satisfaisante, compte tenu de l'hétérogénéité des sols. Signalons également que les coefficients de variation les plus élevés concernent les prélèvements effectués en fin de croissance du riz (100 à 125 j).

Dans tous les cas, nous avons mesuré une activité dénitrifiante initiale alors qu'au laboratoire, elle n'avait pu être décelée au cours d'expériences effectuées sur des sols de rizière dépourvus de nitrate, nus ou plantés en riz (Garcia, 1974). Ceci traduit probable-

Tableau 3. Activités dénitrifiantes initiales et potentielles mesurées dans plusieurs rizières du Sénégal.  $V_m$ : vitesse moyenne de réduction de  $N-N_2O$  (parties/ $10^6$ /h).  $i$ : intervalle de confiance de  $V_m$ . C.V.: coefficient de variation (pour cent).

Localité (date)	Sol nu (S)						Rhizosphère (R)						R/S			
	Activité initiale (I)			Activité potentielle (P)			Activité initiale (I)			Activité potentielle (P)			P/I	I	P	
	$V_m$	$i$	C.V.	$V_m$	$i$	C.V.	$V_m$	$i$	C.V.	$V_m$	$i$	C.V.				
Boundoum Nord (10-Oct-73)	0,53	0,14	26	0,52	0,18	34	1,0	0,68	0,27	40	0,97	0,27	28	1,4	1,3	1,8
Savoigne (11-Oct-73)	0,58	0,17	29	0,83	0,24	29	1,4	0,55	0,18	33	1,04	0,28	27	1,9	0,9	1,2
Boundoum Nord (28-Nov-73)	0,70	0,41	58	1,61	0,32	20	2,3	0,99	0,66	67	1,78	0,20	11	1,8	1,4	1,1
Richard-Toll 1 (28-Nov-73)								1,02	0,45	44	1,62	0,31	19	1,6		
Fanaye (28-Nov-73)	0,98	0,52	53	1,03	0,23	22	1,0	0,85	0,57	67	1,52	0,25	16	1,8	0,9	1,5
Richard-Toll 2 (27-Fev-74)	0,28	0,11	39	0,36	0,11	30	1,3	0,68	0,18	26	1,52	0,48	32	2,2	2,4	4,2
Savoigne (28-Fev-74)	0,39	0,09	23	0,81	0,38	47	2,1	0,58	0,21	36	1,22	0,30	25	2,1	1,5	1,5

à 1,02 parties/ $10^6$  de  $N-N_2O$  réduit/h, et assez peu différente pour S et R, à l'exception du sol de Richard-Toll 2 pour lequel le rapport R/S des activités initiales est de 2,4.

L'activité dénitrifiante potentielle est en général supérieure à l'activité initiale. Elle est dans tous les cas

montrent un coefficient de variation en général plus faible que pour les mesures au champ; l'échantillonnage est donc meilleur dans le cas des pots.

Une activité initiale a également été décelée pour tous les prélèvements; elle varie très peu au cours du temps dans le sol nu mais est multipliée par 2,8 dans

zosphère du riz sur l'activité dénitrifiante semble donc plus marqué que pour les mesures au champ.

## REFERENCES

- BALANDREAU J. et DOMMERGUES Y. (1971) Mesure *in situ* de l'activité nitrogénasique. *C. R. Acad. Sci. (Paris) sér. D*, 273, 2020-2023.
- BOLLAG J.-M. and CZLONKOWSKI S. T. (1973) Inhibition of methane formation in soil by various nitrogen containing