

PRODUCTION D'OXYDE NITRIQUE DANS LES SOLS DE RIZIÈRE

par J.-L. Garcia

O. R. S. T. O. M., Laboratoire de Microbiologie du Sol,
BP 1386, Dakar (Sénégal)

SUMMARY

NITRIC OXIDE PRODUCTION IN RICE SOILS

Nitric oxide gas evolution from nitrite was studied *in vitro* in three rice soils by gas chromatography. Autoclaved soils showed an NO evolution when supplemented with nitrite. Yet, when temperature of incubation, soil pH, soil moisture content and nitrite concentration were varied in the three soils, and with addition of nitrite reductase inhibitors, it appeared in one soil that NO production was partially a biological process. Thus, NO formation was two times as high in non-sterile soil as in sterile soil, and decreased when the temperature increased. Optimal NO production occurred at about neutrality and increased with increasing soil moisture content; moreover, this NO formation increased much less than in the other two soils with increasing nitrite concentration. Finally, the first soil contained three times more denitrifying bacteria tolerating a high nitrite concentration (5 g/l) than the other soils.

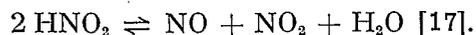
KEY-WORDS: Denitrification, Soil, Nitric oxide; Rice soil.

INTRODUCTION

La production d'oxyde nitrique dans les sols est un phénomène relativement bien étudié et semble être due à une décomposition chimique du nitrite en milieu acide [1, 2, 5] :



ou



Manuscrit reçu le 17 décembre 1975, accepté le 15 mars 1976.

Ann. Microbiol. (Inst. Past.), 127 A, n° 3, 1976.

- 9 NOV. 1977

O. R. S. T. O. M.

Collection de Référence

8875 Biosol

En effet, des sols stérilisés à l'autoclave [3, 19, 23] ou par les rayons γ [8, 26] produisent NO quand on leur ajoute NO_2^- . Par ailleurs, cette production augmente avec la température [15] et elle atteint un maximum aux faibles humidités, c'est-à-dire quand la concentration en nitrite est la plus forte [15, 21, 22, 29]. De nombreuses études ont montré que la formation de NO intervient surtout dans des sols acides [15, 18, 26]; or à pH acide, l'activité biologique est faible et le processus chimique serait prédominant. Nous avons nous-mêmes mis en évidence l'existence d'une forte corrélation inverse entre la quantité de NO formée *in vitro* à partir de NO_2^- et le pH d'une série de sols de rizières du Sénégal [9]. Selon Van Cleemput et Patrick [27], les variations d'Eh qui augmentent la concentration des composés solubles minéraux et organiques, influenceraient également la réduction chimique du nitrite en augmentant les propriétés catalytiques du sol.

Reuss et Smith [20] ont montré qu'il n'y avait pas de production de NO à partir de nitrite adsorbé sur une résine acide, démontrant ainsi la présence obligatoire du sol comme réactif ou catalyseur de la réaction. Cette dernière découlerait d'une réaction de NO_2^- avec la matière organique à pH acide, la nitrosation [4, 23, 24, 25]. Selon Nömmik et Thorin [19], comme NO peut également apparaître à la neutralité, d'autres mécanismes interviendraient dans cette formation : instabilité des nitrites accrue par certains composants de l'humus, réaction des orthophénols avec NO_2^- et réaction des nitrites avec des composés hydroxylés non saturés produits par clivage des noyaux aromatiques.

Plusieurs auteurs ont signalé l'influence de Fe^{++} sur la production de NO [18, 30, 31]. Selon Nelson et Bremner [16] les sols submergés renferment de grandes quantités de Fe^{++} qui pourraient provoquer la formation de NO à partir de nitrites. Par ailleurs, Mortland [14] a montré que le NO formé dans le sol pouvait être adsorbé chimiquement, sur la montmorillonite et la nontronite, quand le complexe absorbant est saturé par des ions de certains métaux de transition.

Après plusieurs études de la séquence des produits de la dénitrification chez certaines bactéries, on a tendance à considérer actuellement l'oxyde nitrique comme l'unique intermédiaire entre le nitrite et l'oxyde nitreux, mais cette hypothèse n'avait pu être confirmée dans les sols [12]. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, le NO serait produit dans les sols par une réaction chimique de décomposition du nitrite. D'autre part, selon Cady et Bartholomew [7] qui ont utilisé l'azote marqué (^{15}N), le NO ne serait pas nécessairement un intermédiaire entre NO_3^- et N_2 dans le sol.

Lors d'une étude de la séquence des produits de la dénitrification *in vitro*, dans une série de sols de rizières du Sénégal, nous avons décelé une production de NO dans 16 sols sur 30; mais elle était importante pour 4 d'entre eux seulement [9]. Cependant, nous n'avons pas détecté de NO lors de l'incubation de ces 4 sols saturés d'eau en présence de NO_3^- ou NO_2^- , après stérilisation à l'autoclave. Nous avons repris deux

de ces sols avec un troisième sol de rizière pour une étude détaillée de l'influence de divers facteurs physico-chimiques sur la production de NO, et cela en vue d'identifier le processus exact de cette formation.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les trois sols étudiés ont été prélevés dans des rizières du Sénégal, Goudomp (G) et Bounkilinn (B), et dans celles du Mali, Kalaban (K), puis séchés à l'air et tamisés à 2 mm. Leurs principales caractéristiques sont décrites dans le tableau I. Ils sont stérilisés à l'état sec, à l'autoclave, à 120° C pendant 30 minutes; l'opération est répétée trois fois à 24 h d'intervalle.

TABLEAU I. — Description des sols.

Sol	pH	N ‰	C ‰	Argile ‰
Goudomp (G)	4,85	0,63	8,93	16,0
Bounkilinn (B)	4,10	1,48	22,86	38,5
Kalaban (K)	4,95	1,54	20,7	33,4

Les incubations sont toutes effectuées avec 25 g de sol sec, dans des flacons-sérum de 250 ml placés en position horizontale, après réalisation de l'anaérobiose par un vide poussé suivi d'un remplissage à l'hélium N45 (Sté « Air Liquide »); l'opération est répétée trois fois. On ajoute 1 ml de krypton N35, dans tous les cas, comme étalon interne.

Des mesures de la composition de l'atmosphère des flacons sont effectuées deux fois par jour à l'aide d'un chromatographe à détection par conductibilité thermique « Varian aerograph » 90 P4 couplé à un enregistreur « Varian » A 25 dans les conditions d'utilisation décrites par ailleurs [11, 13]. Le pic de NO sort immédiatement après celui de l'air résiduel et précède le pic du krypton; pour éviter les pollutions d'air qui entraîneraient la formation de NO₂, les injections d'échantillons de l'atmosphère des flacons sont réalisées à l'aide d'une vanne semi-automatique dont l'utilisation a été décrite ainsi que le calcul des résultats [13]. Les valeurs exprimées correspondent à trois répétitions.

On effectue des numérations de bactéries dénitrifiantes sur 1 g de sol sec selon la méthode du nombre le plus probable, en utilisant NO₃⁻ ou NO₂⁻ (5g/l) comme accepteur final d'électron [10].

RÉSULTATS

1) Influence de la stérilisation du sol

A l'aide d'une solution contenant 200 ppm de N-NO₃⁻, 25 g de sol non stérilisé sont amenés à l'humidité équivalente puis incubés à 37° pendant 450 h; de la même manière on incube 25 g de sol stérilisé et humi-

diffié à l'humidité équivalente par une solution contenant 200 ppm de $N-NO_2^-$.

Les résultats (fig. 1 A et 1 B) montrent tout d'abord que dans les sols stériles, le maximum de NO accumulé représente 30 à 65 % du nitrite

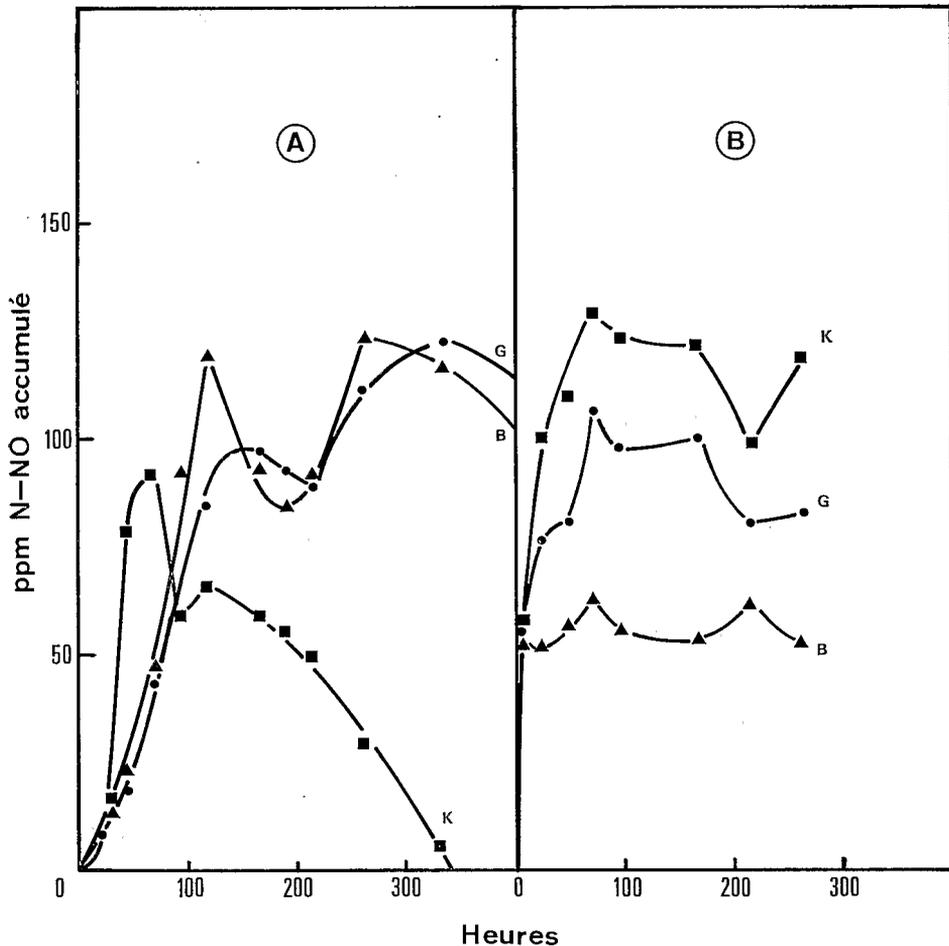


FIG. 1. — Formation de NO dans 3 sols de rizière.

A) Sol non stérile incubé à 37° à l'humidité équivalente en présence de 200 ppm $N-NO_3^-$.

B) Sol stérilisé à l'autoclave, incubé à 37° à l'humidité équivalente en présence de 200 ppm $N-NO_2^-$.

ajouté, alors que dans les sols non stérilisés, il représente 47 à 80 % du nitrate ajouté. Dans ce dernier cas, le nitrate doit être préalablement réduit en nitrite par la microflore dénitrifiante avant d'être transformé ultérieurement en NO. Et il est remarquable que pour l'un des sols (B),

le maximum de NO accumulé est nettement supérieur en l'absence de stérilisation.

2) Influence de la température

A l'aide d'une solution contenant 200 ppm de $N-NO_2^-$, 25 g de sol non stérilisé sont amenés à l'humidité équivalente et incubés à des températures comprises entre 30 et 70°. On mesure la quantité maximale de NO accumulé ainsi que la vitesse moyenne de sa disparition au-delà du maximum d'accumulation.

Une augmentation de l'accumulation de NO avec la température est observée dans les sols K et G ; par contre, l'accumulation est peu influen-

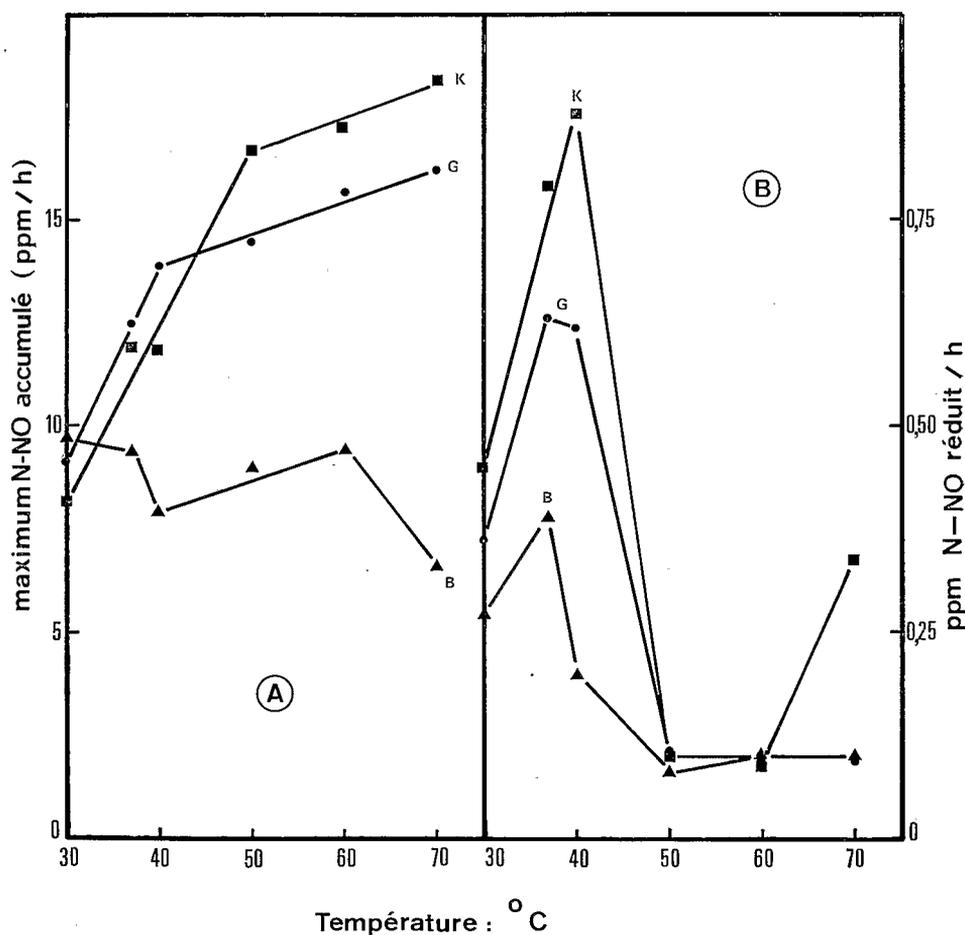


FIG. 2. — Influence de la température.

- A) Effet sur l'accumulation maximale de NO dans 3 sols de rizière incubés à l'humidité équivalente avec 200 ppm $N-NO_2^-$.
- B) Effet sur la réduction de NO formé dans les conditions précédentes.

cée par la température dans le sol B, sauf à 70° où elle est plus faible (fig. 2 A). Or si la vitesse d'une réaction chimique augmente avec la température, celle d'une réaction biologique présente toujours un optimum. Pour la dénitrification, la température optimale de réduction de

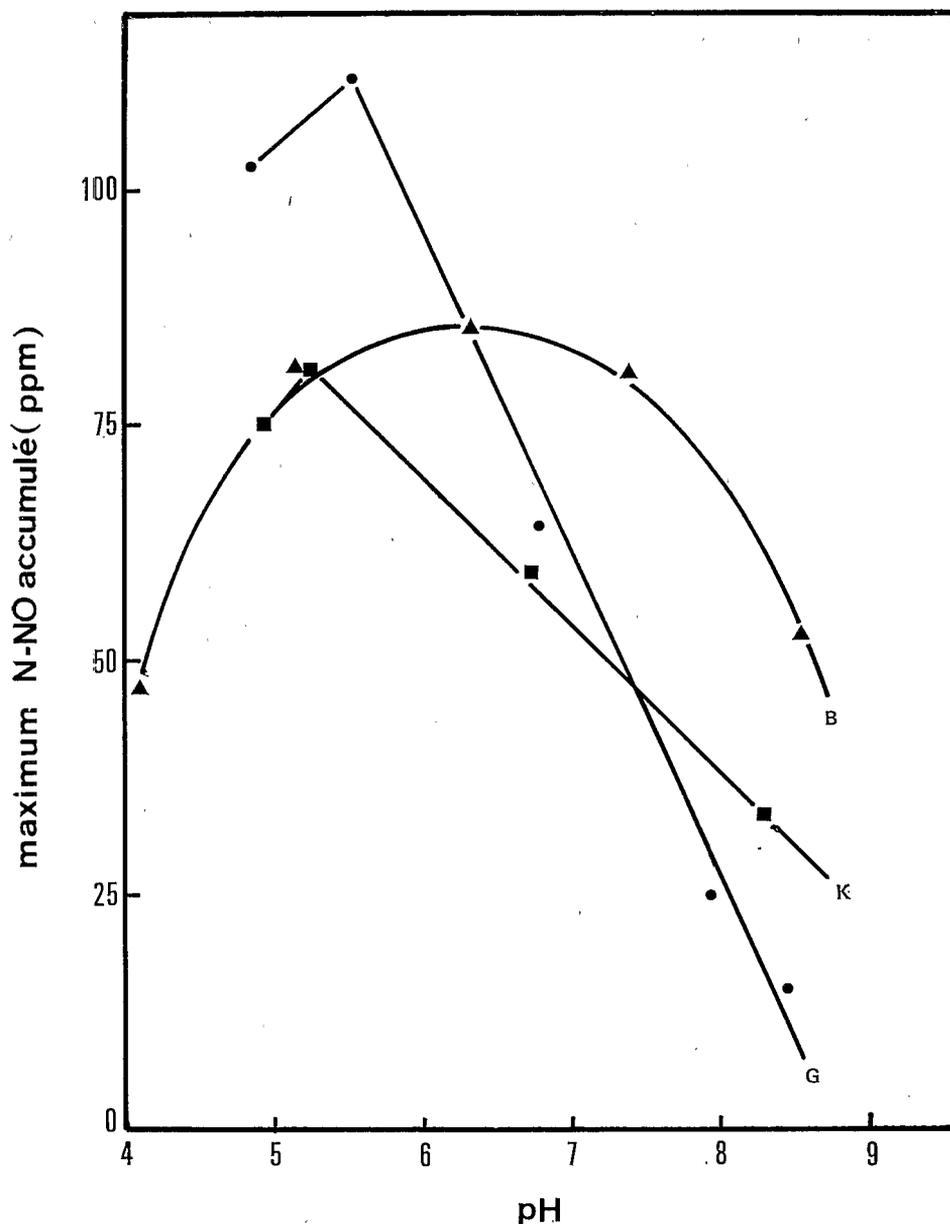


FIG. 3. — Influence du pH sur l'accumulation maximale de NO dans 3 sols de rizière. Incubation à 37°, à l'humidité équivalente avec 200 ppm $N_2-NO_2^-$.

TABLEAU II. — Variation du pH des sols en fonction de l'addition de CaO.

Sol	CaO mg	pH
Goudomp (G)	0	4,85
	10	5,55
	30	6,80
	50	7,95
	70	8,45
Boungkilinn (B)	0	4,10
	50	5,15
	90	6,35
	110	7,40
	150	8,55
Kalaban (K)	0	4,95
	10	5,25
	30	6,75
	50	7,20
	90	8,30

Mesures effectuées avec un volume d'eau égal au poids du sol.

N_2O est 37° [11]. Celle de la réduction de NO semble comprise entre 37 et 40° (fig. 2 B).

3) Influence du pH

On ajoute des quantités croissantes de CaO à 25 g de sol non stérilisé (tableau II) que l'on amène ensuite à l'humidité équivalente par une solution contenant 200 ppm de $N-NO_2^-$ puis on incube à 37°.

La figure 3 représente les quantités maximales de NO accumulées en fonction du pH. Pour les sols G et K, il semble qu'il existe une zone de pH comprise entre 5,2 et 5,6 dans laquelle l'accumulation de NO est maximale; elle diminue rapidement quand le pH augmente. Dans le sol B, par contre, une accumulation optimale est observée à pH 6,5, et la courbe représentant les variations de cette accumulation en fonction du pH, a une forme en cloche caractéristique d'une activité biologique.

4) Influence de l'humidité

Avec des quantités croissantes d'eau contenant la même quantité de NO_2^- , 25 g de sol non stérilisé sont humidifiés puis incubés à 37°.

La figure 4 représente les variations de la vitesse maximale d'accumulation de NO en fonction de l'humidité. Elle diminue dans les sols G et K lorsque l'humidité augmente. C'est le contraire qui est observé dans le sol B.

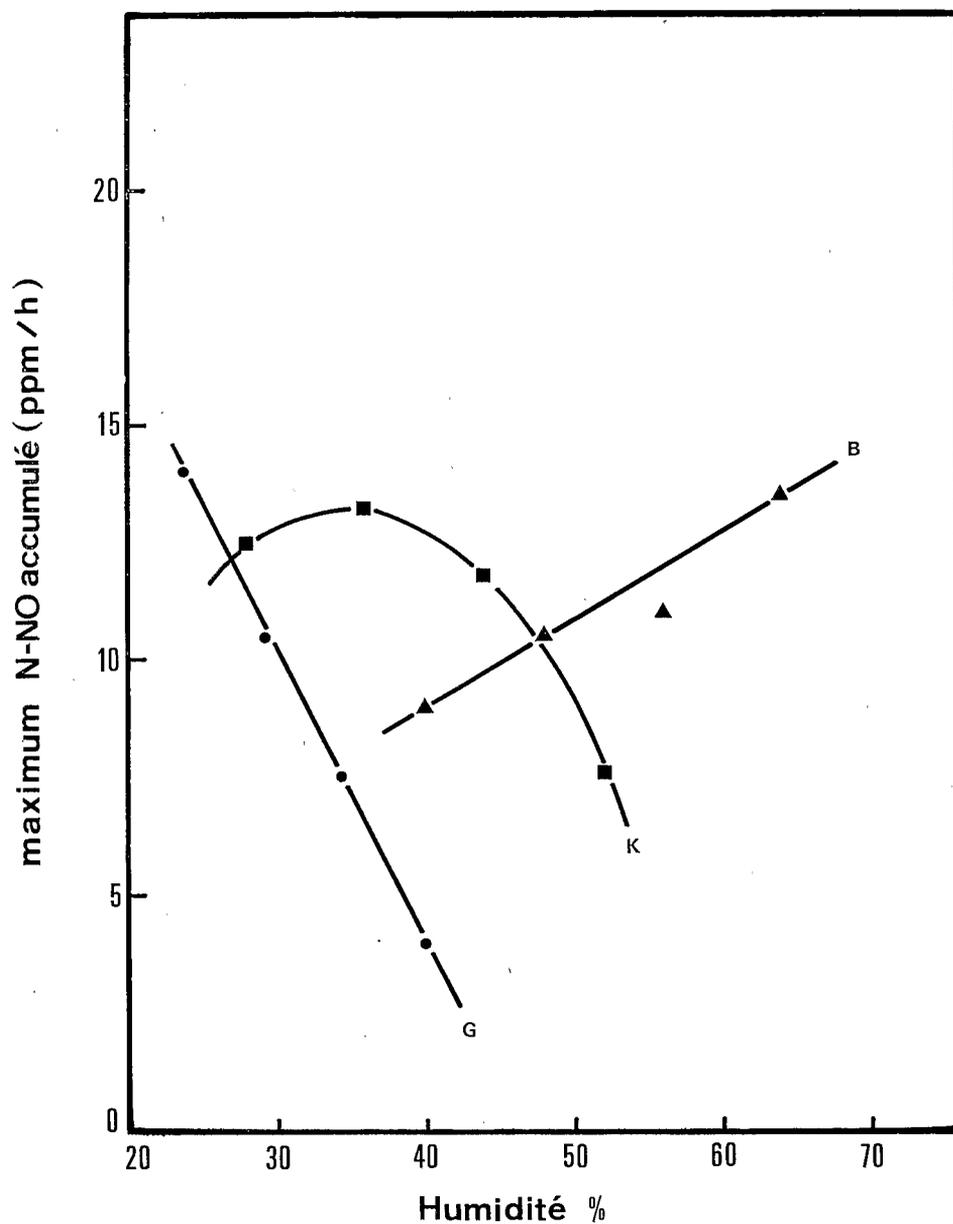


FIG. 4. — Influence de l'humidité sur la vitesse maximale d'accumulation de NO dans 3 sols de rizière.

Incubation à 37° avec 200 ppm N-NO₂⁻.

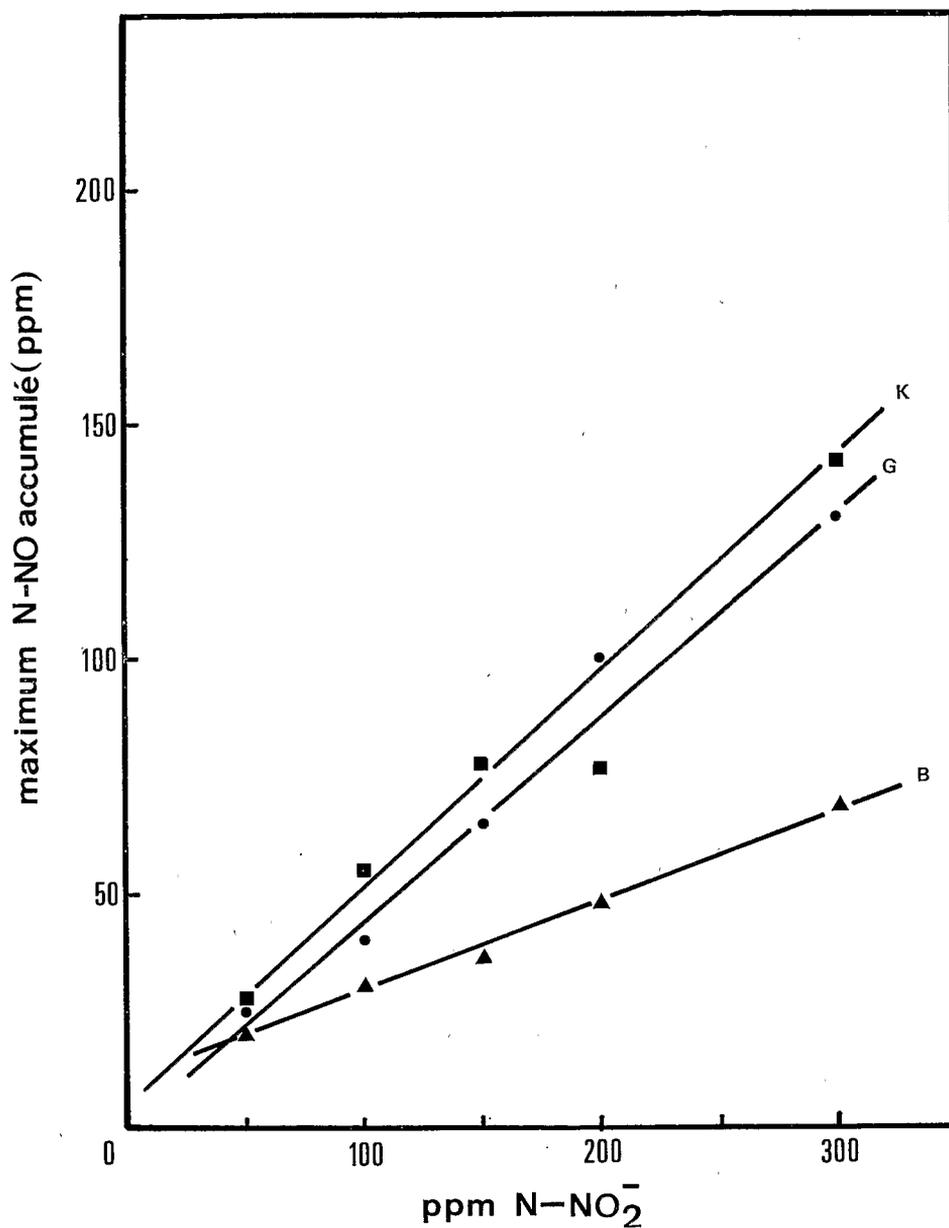


FIG. 5. — Influence de la concentration de nitrite sur l'accumulation maximale de NO dans 3 sols de rizière.

Incubation à 37° à l'humidité équivalente.

5) *Influence de la concentration de nitrite*

A l'aide de solutions contenant des quantités croissantes de KNO_2 comprises entre 50 à 300 ppm de N-NO_2^- , 25 g de sol non stérilisé sont amenés à l'humidité équivalente puis incubés à 37° .

La figure 5 représente les quantités maximales de NO accumulé en fonction de la teneur en nitrite. On observe une augmentation régulière avec la concentration en NO_2^- pour les trois sols ; cependant l'augmentation est nettement plus faible dans le sol B.

6) *Influence de l'emploi d'inhibiteurs de la nitrite-réductase*

Avec une solution contenant 200 ppm de N-NO_2^- et 10 mmoles de KCN, 2-2' dipyridyl ou O-phénanthroline, 25 g de sol non stérilisé sont amenés à l'humidité équivalente puis incubés à 37° .

TABLEAU III. — Influence de divers inhibiteurs de la nitrite réductase (10 mmoles) sur l'accumulation maximale de NO (ppm N-NO) dans 3 sols de rizière incubés à 37° à l'humidité équivalente et 200 ppm N-NO_2^- .

Sol	Sans inhibiteur	KCN	2,2'-Dipyridyl	O-phénanthroline
Goudomp (G)	101	112	76	74,5
Boungkilinn (B)	47	36	40	38,5
Kalaban (K)	76	97	93	90

Les résultats sont rapportés par le tableau III. En employant des inhibiteurs de la nitrite-réductase, on ne modifie pas sensiblement l'accumulation de NO dans le sol K ; deux inhibiteurs sur trois diminuent cette accumulation dans le sol G mais les trois inhibiteurs abaissent l'accumulation de NO dans le sol B.

TABLEAU IV. — Densité des bactéries vraies dénitrifiantes dans les 3 sols de rizière, dénombrées sur nitrate ou nitrite à la concentration de 5g/l.

Sol	Bactéries vraies dénitrifiantes/g sol sec	
	NO_3^- (5g/l)	NO_2^- (5g/l)
Goudomp (G)	3 400	2 600
Boungkilinn (B)	9 000	6 000
Kalaban (K)	4 000	2 200

7) *Densité des bactéries dénitrifiantes*

Les sols étant conservés à l'état sec depuis plusieurs années, le nombre de bactéries dénitrifiantes est faible. Mais on peut constater (tableau IV) que ce nombre est environ trois fois plus élevé dans le sol B que dans les deux autres sols, aussi bien en ce qui concerne les bactéries dénitrifiantes dénombrées sur nitrate que celles dénombrées sur nitrite à forte concentration.

DISCUSSION

L'étude comparative de la production d'oxyde nitrique dans trois sols de rizière a montré que l'accumulation de NO était nettement plus élevée dans le sol B, non stérilisé et enrichi en nitrate, que dans le même sol stérile enrichi en nitrite, contrairement à ce qui a été observé pour les deux autres sols. Cependant il faut noter que le taux d'accumulation de l'oxyde nitrique est régi à la fois par la vitesse de sa formation et par la vitesse de sa réduction ultérieure. Alors qu'en sol stérile le NO produit chimiquement s'accumule sans être ultérieurement réduit (fig. 1 B), son accumulation en sol non stérile n'est que temporaire. Sa réduction intervient rapidement dans le sol K, qui n'accumule qu'environ 90 ppm de N-NO en sol non stérile, alors que l'accumulation en sol stérile s'élève à 125 ppm. Par contre, la réduction ultérieure de l'oxyde nitrique intervient plus tardivement dans les deux autres sols ; par ailleurs, on observe que l'accumulation est deux fois plus élevée pour le sol B non stérile (fig. 1 A) que dans le même sol stérile (fig. 1 B), alors qu'elle est pratiquement identique dans les deux conditions pour le sol G.

Pour évaluer en toute rigueur la production réelle de NO, il faudrait bloquer sa réduction ultérieure en sol non stérile. On connaît plusieurs inhibiteurs partiels de la réduction de l'oxyde nitrique comme l'antimycine A, le 2-heptyl-4-hydroxyquinoline-N-oxyde (HOQNO) et le 2,3-dimercapto-1-propanol (BAL), mais leur efficacité est très réduite dans le sol.

L'élévation de la température d'incubation des sols non stériles, enrichis en nitrite, a augmenté l'accumulation de NO dans deux sols mais l'a diminuée dans le sol B. L'augmentation du pH des sols a réduit l'accumulation d'oxyde nitrique de manière régulière, à l'exception du sol B où l'accumulation de NO a présenté un optimum à pH 6,5. L'augmentation de la teneur en eau des sols a diminué l'accumulation de NO, à l'exception du sol où celle-ci a augmenté jusqu'à la saturation. Ce sol se singularise donc par un comportement différent des autres sols et en désaccord avec l'hypothèse de la production chimique de NO ; en effet, cette production doit diminuer quand la concentration de NO_2^- diminue, donc, ici, lorsque l'humidité croît. Cela expliquerait le résultat négatif obtenu au cours d'une étude antérieure réalisée avec des sols stériles saturés en eau [9].

Par ailleurs, la différence observée dans l'accumulation de l'oxyde nitrique en condition stérile pour les trois sols peut également s'expliquer en partie par la différence de dilution du nitrite ; en effet, le sol B qui accumule le moins de NO dans ces conditions, a été amené à l'humidité équivalente avec 40 % d'eau alors que les sols K et G, qui accumulent des quantités supérieures de NO, ont nécessité un apport respectif de 28 et 24 % d'eau.

L'accroissement de la concentration de nitrite a augmenté l'accumulation d'oxyde nitrique linéairement et de façon très voisine pour les sols G et K, mais beaucoup moins rapidement pour le sol B. Une diminution de l'accumulation de NO est observée seulement dans le sol B, quel que soit l'inhibiteur de la nitrite-réductase utilisé, montrant ainsi encore une fois une forte présomption d'une participation de l'activité biologique à la production de NO. Enfin, les bactéries dénitrifiantes tolérant de fortes concentrations en nitrite étaient trois fois plus nombreuses dans le sol B que dans les deux autres sols.

Les bactéries vraies dénitrifiantes connues jusqu'à présent ne tolèrent que 0,5 g/l de nitrite, et seuls Vangnai et Klein [28] ont signalé, dans des sols de l'Oregon, des bactéries dénitrifiantes tolérant des quantités plus élevées et incapables de réduire le nitrate. On peut donc concevoir que dans le sol B, la réduction de NO_2^- ajouté a été plus rapide que dans les deux autres sols puisque les bactéries tolérant de hautes concentrations en nitrite y sont plus nombreuses, entraînant ainsi une accumulation accrue d'oxyde nitrique.

Dans deux des sols étudiés (G et K), il est probable que l'accumulation de NO soit essentiellement chimique. Par contre, le comportement particulier du sol B semble traduire une participation importante de l'activité biologique dans la formation d'oxyde nitrique dans ce sol. Donc la séquence des produits formés dans les sols au cours de la dénitrification serait très vraisemblablement identique à celle qui a été observée avec les souches bactériennes.

RÉSUMÉ

La production d'oxyde nitrique à partir de nitrite a été étudiée *in vitro* dans trois sols de rizière (G, B et K) à l'aide de la chromatographie en phase gazeuse. Les sols stérilisés ont produit de l'oxyde nitrique après addition de nitrite. Cependant, en faisant varier dans les trois sols la température d'incubation, le pH, la teneur en eau, ainsi que la concentration en nitrite et en ajoutant des inhibiteurs de la nitrite-réductase, il est apparu que dans l'un des sols (B) l'accumulation de NO résulte partiellement d'un processus biologique. En effet, le sol non stérile accumule deux fois plus de NO que le sol stérilisé, et cette accumulation diminue lorsqu'on augmente la température d'incubation. Elle présente un optimum vers la neutralité et augmente lorsqu'on accroît l'humidité du sol ; en outre elle augmente beaucoup moins fortement que dans les deux autres sols (G et

K) lorsque la concentration en nitrite croît. Enfin le premier sol (B) renferme trois fois plus de bactéries dénitrifiantes tolérant une haute concentration de nitrite (5 g/l) que les deux autres.

MOTS-CLÉS : Dénitrification, Sol, Oxyde nitrique ; Rizière.

REMERCIEMENTS

L'auteur exprime ses remerciements à Monsieur M. Mouraret pour ses conseils, à Monsieur T. Traoré pour son aimable envoi du sol de Kalaban (Mali) et à Monsieur J. Bakhoum pour son assistance technique.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ALLISON, F. E., Losses of gaseous nitrogen from soils by chemical mechanisms involving nitrous acid and nitrites. *Soil Sci.*, 1963, 96, 404-409.
- [2] ALLISON, F. E. & DOETSCH, J. H., Nitrogen gas production by the reaction of nitrites with amino-acids in slightly acidic media. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 1951, 15, 163-166.
- [3] BOLLAG, J. M., DRZYMALA, S. & KARDOS, L. T., Biological versus chemical nitrite decomposition in soil. *Soil Sci.*, 1972, 116, 44-50.
- [4] BREMNER, J. M. & FÜHR, F., Tracer studies of the reaction of soil organic matter with nitrite, in « The use of isotopes in soil organic matter studies » (p. 337-346), Pergamon Press, Oxford, 1966.
- [5] BULLA, L. A. C., GILMOUR, M. & BOLLEN, W. B., Nonbiological reduction of nitrite in soil. *Nature (Lond.)*, 1970, 225, 664.
- [6] CADY, F. B. & BARTHOLOMEW, W. V., Sequential products of anaerobic denitrification in Norfolk soil material. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 1960, 24, 477-482.
- [7] CADY, F. B. & BARTHOLOMEW, W. V., Investigations of nitric oxide reactions in soils. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 1963, 27, 546-549.
- [8] CAWSE, P. A. & CORNFIELD, A. H., Biological and chemical reduction of nitrate to nitrite in γ -irradiated soils, and factors leading to eventual loss of nitrite. *Soil Biol. Biochem.*, 1972, 4, 497-511.
- [9] GARCIA, J.-L., Séquence des produits formés au cours de la dénitrification dans les sols de rizières du Sénégal. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 1973, 124 B, 351-362.
- [10] GARCIA, J.-L., Influence de la rhizosphère du riz sur l'activité dénitrifiante potentielle des sols de rizières du Sénégal. *Oecol. Plant.*, 1973, 8, 315-323.
- [11] GARCIA, J.-L., Réduction de l'oxyde nitreux dans les sols de rizières du Sénégal : mesure de l'activité dénitrifiante. *Soil Biol. Biochem.*, 1974, 6, 79-84.
- [12] GARCIA, J.-L., La dénitrification dans les sols. *Bull. Inst. Pasteur*, 1975, 73, 167-193.
- [13] GARCIA, J.-L., Évaluation de la dénitrification dans les rizières par la méthode de réduction de N_2O . *Soil Biol. Biochem.*, 1975, 7, 251-256.
- [14] MORTLAND, M. M., Nitric oxide adsorption by clay minerals. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 1965, 29, 514-519.
- [15] NELSON, D. W. & BREMNER, J. M., Factors affecting chemical transformations of nitrite in soils. *Soil Biol. Biochem.*, 1969, 1, 229-239.

- [16] NELSON, D. W. & BREMNER, J. M., Role of soil minerals and metallic cations in nitrite decomposition and chemodenitrification in soils. *Soil Biol. Biochem.*, 1970, 2, 1-8.
- [17] NELSON, D. W. & BREMNER, J. M., Gaseous products of nitrite decomposition in soils. *Soil Biol. Biochem.*, 1970, 2, 203-215.
- [18] NÖMMIK, H., Investigations on denitrification in soil. *Acta Agr. Scand.*, 1956, 6, 195-228.
- [19] NÖMMIK, H. & THORIN, J., Transformations of ^{15}N labelled nitrite and nitrate in forest raw humus during anaerobic incubation. Isotopes and radiation in soil-plant relationships including forestry, IAEA Vienna, 1972, SM-151/58, 369-382.
- [20] REUSS, J. O. & SMITH, R. L., Chemical reactions of nitrites in acid soils. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 1965, 29, 267-270.
- [21] SABBE, W. E. & REED, L. W., Investigations concerning nitrogen loss through chemical reactions involving urea and nitrite. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 1964, 28, 478-481.
- [22] SMITH, D. H. & CLARK, F. E., Volatile losses of nitrogen from acid or neutral soils or solutions containing nitrite and ammonium ions. *Soil Sci.*, 1960, 90, 86-92.
- [23] STEEN, W. C. & STOJANOVIC, B. J., Nitric oxide volatilization from a calcareous soil and model aqueous solutions. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 1971, 35, 277-282.
- [24] STEVENSON, F. J., HARRISON, R. M., WETSELAAR, R. & LEEPER, R. A., Nitrosation of soil organic matter.—III. Nature of gases produced by reaction of nitrite with lignins, humic substances and phenolic constituents under neutral and slightly acid conditions. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 1970, 34, 430-435.
- [25] STEVENSON, F. J. & SWABY, R. J., Nitrosation of soil organic matter.—I. Nature of gases evolved during nitrous acid treatment of lignin and humic substances. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 1964, 28, 773-778.
- [26] VAN CLEEMPUT, O. & BAERT, L., The denitrification process in closed anaerobic conditions of γ -irradiated and non-irradiated soil samples. *Mededelingen Fakulteit Landbouwwetenschappen Gent*, 1972, 37, 1177-1184.
- [27] VAN CLEEMPUT, O. & PATRICK, W. H. Jr, Nitrate and nitrite reduction in flooded gamma-irradiated soil under controlled pH and redox potential conditions. *Soil Biol. Biochem.*, 1974, 6, 85-88.
- [28] VANGNAI, S. & KLEIN, D. A., A study of nitrite-dependent dissimilatory micro-organisms isolated from Oregon soils. *Soil Biol. Biochem.*, 1974, 6, 335-339.
- [29] WIJLER, J. & DELWICHE, C. C., Investigations on the denitrifying processes in soil. *Plant a. Soil*, 1954, 5, 155-169.
- [30] WULLSTEIN, L. H., Soil nitrogen volatilization, a case for applied research. *Agr. Sci. Rev.* 1967, 5, 8-13.
- [31] WULLSTEIN, L. H. & GILMOUR, C. M., Non-enzymatic formation of nitrogen gas. *Nature (Lond.)*, 1966, 210, 1150-1151.