

Jean-Louis Garcia

ETUDE
DE LA
DENITRIFICATION

DANS LES SOLS
DE RIZIERE
DU SENEGAL

Marseille
1978

T H E S E

présentée

à l'U.E.R. SCIENTIFIQUE DE LUMINY
UNIVERSITE D'AIX-MARSEILLE II

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES

par

Jean-Louis GARCIA

ETUDE DE LA DENITRIFICATION
DANS LES SOLS DE RIZIERE DU SENEGAL

Soutenue le 12 Janvier 1978 devant la Commission d'Examen

Monsieur J. SENEZ	Président
Monsieur J.-P. AUBERT	
Monsieur R. ROSSET	Examineurs
Monsieur F. PICHINOTY	
Monsieur J.-P. BELAICH	

Jean-Louis GARCIA

ETUDE DE LA DENITRIFICATION

DANS LES SOLS DE RIZIERE DU SENEGAL

MARSEILLE 1978

A mon épouse

A mes enfants

A la mémoire de mon père

A ma mère

A ma famille et à ma belle-famille

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Microbiologie des Sols de l'ORSTOM à Dakar (Sénégal) sous la direction de Mr. M. MOURARET, Directeur de Recherches à l'ORSTOM. Qu'il me soit permis de lui exprimer ma profonde reconnaissance.

J'adresse tous mes remerciements à Mr. F. PICHINOTY, Maître de Recherches au CNRS, pour les conseils qu'il n'a cessé de me prodiguer, la fructueuse collaboration qui s'est établie entre nous et pour avoir accepté de faire partie de mon Jury.

Je tiens également à remercier tous mes collègues de laboratoire et, en particulier, ceux qui ont contribué à l'élaboration de publications communes.

Je ne saurais oublier Messieurs J. BAKHOUM, M. N'DAO, le regretté W. SY dont je salue la mémoire et tous leurs collègues de Dakar pour leur efficace collaboration technique.

Qu'il me soit enfin permis de remercier Madame C. JOB et Monsieur M. DURAND du Laboratoire de Biochimie Végétale de Luminy pour l'aide précieuse qu'ils m'ont apportée lors de mon séjour dans ce laboratoire.

J'exprime ma sincère gratitude à

Monsieur le Professeur J. SENEZ pour les conseils qu'il m'a prodigués tout au long de ce travail et pour avoir accepté de présider mon Jury de Thèse.

Messieurs les Professeurs J.P. AUBERT, R. ROSSET et J.P. BELAICH pour avoir accepté de faire partie de mon Jury.

Monsieur le Professeur J. RICARD et Monsieur J. LE GALL, Maître de Recherches au CNRS, pour m'avoir accueilli dans leur laboratoire.

Monsieur Y. DOMMERMUES, Directeur de Recherches au CNRS, pour ses suggestions et ses conseils éclairés.

PUBLICATIONS

- 1 - GARCIA J.-L. (1975) La dénitrification dans les sols. Bull.Inst. Pasteur , 73 , 167-193 .
- 2 - GARCIA J.-L., RAIMBAULT M., JACQ V., RINAUDO G. & ROGER P. (1974) Activités microbiennes dans les sols de rizières du Sénégal : relations avec les propriétés physico-chimiques et influence de la rhizosphère. Rev.Ecol.Biol.Sol , 11 , 169-185 .
- 3 - GARCIA J.-L. (1973) Séquence des produits formés au cours de la dénitrification dans les sols de rizières du Sénégal . Ann. Microbiol.(Inst.Pasteur) , 124 B , 351-362 .
- 4 - GARCIA J.-L. (1976) Production d'oxyde nitrique dans les sols de rizières. Ann.Microbiol.(Inst.Pasteur), 127 A , 401-414 .
- 5 - GARCIA J.-L. (1974) Réduction de l'oxyde nitreux dans les sols de rizières du Sénégal : mesure de l'activité dénitrifiante. Soil Biol.Biochem. , 6 , 79-84 .
- 6 - GARCIA J.-L. (1977) Evaluation de la dénitrification par la mesure de l'activité oxyde nitreux-réductase. Etude complémentaire. Cah.ORSTOM, sér.Biol. , (sous-presse).
- 7 - GARCIA J.-L. (1975) Evaluation de la dénitrification dans les rizières par la méthode de réduction de N_2O . Soil Biol.Biochem. 7 , 251-256 .
- 8 - GARCIA J.-L. (1977) La dénitrification en sol de rizières : influence de la nature et du mode d'épandage des engrais azotés . Cah.ORSTOM, sér.Biol., (sous-presse).
- 9 - GARCIA J.-L. (1973) Influence de la rhizosphère du riz sur l'activité dénitrifiante potentielle des sols de rizières du Sénégal . Oecol.Plant., 8 , 315-323 .
- 10 - GARCIA J.-L. (1975) Effet rhizosphère du riz sur la dénitrification. Soil Biol.Biochem., 7 , 139-141 .
- 11 - RAIMBAULT M., RINAUDO G., GARCIA J.-L. & BOUREAU M. (1977) A device to study metabolic gases in the rice rhizosphere. Soil Biol.Biochem. , 9 , 193-196 .
- 12 - BALDENSPERGER J. & GARCIA J.-L. (1975) Reduction of oxidized inorganic nitrogen compounds by a new strain of Thiobacillus denitrificans . Arch.Microbiol. , 103 , 31-36 .

- 13 - GARCIA J.-L. (1977) Etude de la dénitrification chez une bactérie thermophile sporulée. Ann.Microbiol.(Inst.Pasteur), 128 A , 447-458 .
- 14 - GARCIA J.-L. (1977) Analyse de différents groupes composant la microflore dénitrifiante des sols de rizière du Sénégal. Ann.Microbiol.(Inst.Pasteur), 128 A , 433-446 .
- 15 - PICHINOTY F., DE BARJAC H., MANDEL M., GREENWAY B. & GARCIA J.-L. (1976) Une nouvelle bactérie sporulée, dénitrifiante, mésophile : Bacillus azotoformans n.sp. Ann.Microbiol.(Inst.Pasteur) , 127 B , 351-361 .
- 16 - PICHINOTY F., GARCIA J.-L., JOB C. & DURAND M. (1977) La dénitrification chez Bacillus licheniformis . Can.J.Microbiol. , 23, (sous-presse) .
- 17 - PICHINOTY F., MANDEL M., GREENWAY B. & GARCIA J.-L. (1977) Etude de 14 bactéries dénitrifiantes appartenant au groupe Pseudomonas stutzeri isolées du sol par culture d'enrichissement en présence d'oxyde nitreux. Ann.Microbiol.(Inst.Pasteur), 128 A, 75-87 .
- 18 - PICHINOTY F., MANDEL M., GREENWAY B. & GARCIA J.-L. (1977) The isolation and properties of a denitrifying bacterium related to Pseudomonas lemoignei . Int.J.Syst.Bact. , 27 (sous-presse).
- 19 - GARCIA J.-L., PICHINOTY F., MANDEL M. & GREENWAY B. (1977) A new denitrifying saprophyte related to Pseudomonas pickettii. Ann.Microbiol.(Inst.Pasteur), 128 A , 229-237 .
- 20 - PICHINOTY F., MANDEL M., GREENWAY B. & GARCIA J.-L. (1975) Isolement à partir du sol et étude d'une bactérie dénitrifiante appartenant au genre Alcaligenes . C.R.Acad.Sci.(Paris), Ser. D , 281 , 1273-1275 .
- 21 - PICHINOTY F., BIGLIARDI-ROUVIER J., MANDEL M., GREENWAY B., METENIER G. & GARCIA J.-L. (1976) The isolation and properties of a denitrifying bacterium of the genus Flavobacterium . Antonie Van Leeuwenhoek , 42 , 349-354 .
- 22 - PICHINOTY F., MANDEL M. & GARCIA J.-L. (1977) Etude de six souches de Agrobacterium tumefaciens et Agrobacterium radiobacter Ann.Microbiol.(Inst.Pasteur), 128 A , 303-310 .
- 23 - PICHINOTY F., MANDEL M. & GARCIA J.-L. (1977) Etude de six souches de Paracoccus denitrificans . Ann.Microbiol.(Inst.Pasteur), 128 B , 243-251 .

S O M M A I R E

Introduction	1
I - Revue bibliographique	4
Article 1	
II - Etude sur le sol	32
A - Sol nu	
1- Influence des facteurs physico-chimiques	33
Article 2	
2- Séquence des produits formés	50
Articles 3 et 4	
3- Mise au point d'une nouvelle méthode de mesure	77
Articles 5 et 6	
4- Application à la culture du riz	91
Articles 7 et 8	
B - Rhizosphère du riz	103
1- Influence sur l'activité potentielle	104
Article 9	
2- Influence sur l'activité induite	113
Articles 10 et 11	
III - Etude microbiologique	121
A - Généralités	
B - Etude de la séquence des produits de la dénitrification	
1- <u>Thiobacillus denitrificans</u> Article 12	124
2- <u>Bacillus thermodenitrificans</u> Article 13	130
C - Analyse de la microflore dénitrifiante des sols de rizière du Sénégal	142
1- Mise en évidence de bactéries tolérant des concentra- tions élevées de nitrite	143
Article 14	
2- Etude systématique de souches pures isolées	157
a- bactéries mésophiles	157
b- bactéries thermophiles	159
D - Etude de la dénitrification chez d'autres organismes ..	163
1- <u>Bacillus</u>	165
Articles 15 et 16	

2- <u>Pseudomonas</u>	168
Articles 17, 18 et 19	
3- <u>Alcaligenes</u>	173
Article 20	
4- <u>Flavobacterium</u>	173
Article 21	
5- <u>Agrobacterium</u>	176
Article 22	
6- <u>Paracoccus</u>	176
Article 23	
Conclusions	180
Bibliographie	187

I N T R O D U C T I O N

La dénitrification, découverte à la fin du siècle dernier, consiste en une réduction dissimilatrice du nitrate en gaz (N_2O et N_2). Il s'agit d'un processus respiratoire anaérobie qui confère à certaines espèces bactériennes, la faculté d'utiliser le nitrate et d'autres composés oxygénés minéraux de l'azote comme accepteurs d'électrons.

En agriculture, le processus de la dénitrification aboutit à une perte de l'azote présent initialement dans le sol ou apporté sous forme d'engrais. De nombreuses études, tant en sol exondé qu'en sol inondé, ont été effectuées pour préciser l'influence de certains facteurs physico-chimiques ainsi que pour comprendre son mécanisme et ses étapes intermédiaires. Parmi ces travaux, un petit nombre est consacré à l'influence des plantes vivantes, mais ils ont porté principalement sur les sols exondés où, dans la rhizosphère, l'anaérobiose s'établit par suite d'une consommation importante d'oxygène par les racines et les microorganismes qui prolifèrent à proximité (Wol-dendorp, 1963).

Les sols de rizière sont généralement riches en carbone organique provenant de la décomposition des résidus de récolte enfouis lors des travaux préculturaux; submergés pendant la culture du riz, ils sont anoxiques et constituent ainsi un milieu particulièrement propice à la dénitrification. Cependant, le riz absorbe préférentiellement l'azote sous forme de NH_4^+ . On utilise donc, pour sa fertilisation azotée, des engrais ammoniacaux tels que le sulfate d'ammonium et l'urée. On assiste cependant à des pertes importantes d'azote estimées selon certains auteurs, à 25-50 pour cent de l'engrais ajouté. En effet, la submersion entraîne d'importantes modifications biologiques et chimiques : alors que le potentiel d'oxydoréduction baisse dans le sol, à une distance de quelques millimètres à quelques centimètres de la couche supérieure, une zone oxydée s'établit directement au contact de la lame d'eau, zone dans laquelle l'oxy-

gène est fourni par l'eau de submersion, par les nombreuses colonies d'algues se développant à la surface et par l'exsudation de diverses plantes aquatiques. Cette zone oxydée est propice à la vie microbienne aérobie et notamment à la nitrification des engrais ammoniacaux épandus en surface. Le nitrate produit diffuse dans la zone réduite sous-jacente où il est réduit par la dénitrification (Tusneem et Patrick, 1971). L'étude de la dénitrification dans les sols est analysée dans le détail dans la revue bibliographique (article 1).

En abordant l'étude de la dénitrification dans les sols de rizière, après avoir précisé l'influence de divers facteurs physico-chimiques (article 2) et examiné la séquence des produits formés au cours du processus (articles 3 et 4), le premier problème à résoudre était de savoir si la dénitrification se produisait effectivement dans la rhizosphère du riz. En effet, contrairement aux plantes cultivées en sol exondé pour lesquelles on assiste, dans la rhizosphère, à l'établissement d'une zone anaérobie, le riz exsude de l'oxygène par ses racines entraînant l'existence d'une zone aérobie dans la rhizosphère (article 1). Or actuellement, l'absence de dénitrification dans des conditions rigoureusement aérobies est reconnue comme un fait indiscutable (Pichinoty, 1973).

Les techniques habituelles d'étude de la dénitrification ne permettaient pas de résoudre facilement ce problème. Aussi l'élaboration d'une nouvelle méthode devint rapidement indispensable (articles 5 et 6). Elle devait aussi pouvoir nous permettre de vérifier les données actuelles du problème de la dénitrification dans les rizières et de proposer une solution originale pour remédier à ce phénomène (articles 7 et 8). Il avait en effet été démontré par d'autres auteurs que les pertes d'azote étaient moins importantes en sol cultivé qu'en sol nu et qu'en employant des inhibiteurs de nitrification, on pouvait diminuer sensiblement ces pertes (article 1).

L'étude de l'influence de la rhizosphère du riz sur la dénitrification (article 9) a été facilitée par l'emploi de la nouvelle méthode d'estimation du processus (article 10) et l'utilisation d'un dispositif simple mis au point au laboratoire (article 11).

Parallèlement aux études globales sur le sol, une étude microbiologique était entreprise. Elle devait tout d'abord nous permettre de préciser la séquence des produits de la dénitrification chez deux bactéries isolées au Sénégal, une nouvelle souche de la bactérie sulfo-oxydante et chimio-lithotrophe Thiobacillus denitrificans RT (article 12) et une bactérie sporulée thermophile apparentée à Bacillus thermodenitrificans (article 13). Nous avons tiré profit de l'inhibition de la réduction de N_2O par l'acétylène (Balderston et coll., 1976 ; Yoshinari et Knowles, 1976). La séquence

$NO_3^- \longrightarrow NO_2^- \longrightarrow NO \longrightarrow N_2O \longrightarrow N_2$
 avait été démontrée auparavant chez plusieurs bactéries : Pseudomonas denitrificans qui est en réalité une espèce mal définie du genre Alcaligenes (Matsubara, 1970), P.perfectomarinus (Payne et coll., 1971), Alcaligenes faecalis (Matsubara et Iwasaki, 1971) et Achromobacter cycloclastes (Iwasaki et Matsubara, 1972).

Cette étude microbiologique avait également pour but de déterminer la population dénitrifiante des sols de rizière du Sénégal à l'aide de numérations spécifiques et d'isolements de souches pures, en sol nu comme dans la rhizosphère du riz (article 14). Woldendorp (1963) pense que des espèces sporulées du genre Bacillus doivent jouer un rôle important dans la dénitrification, mais les espèces citées par cet auteur ne sont pas considérées comme dénitrifiantes. Il nous est nécessaire de vérifier ce fait dans les sols de rizière et d'exploiter une information nouvelle concernant la présence dans les sols, de bactéries dénitrifiantes capables d'utiliser des concentrations en nitrite nettement supérieures à celles tolérées normalement par la plupart des souches connues (Vangnai et Klein, 1974).

Enfin, en association étroite avec Pichinoty à Marseille et Mandel à Houston (U.S.A.), nous avons entrepris l'étude de la dénitrification sur des souches de collection et de nouvelles espèces dénitrifiantes isolées en France et au Sénégal, en utilisant l'oxyde nitreux comme substrat respiratoire (articles 15 à 23 non inclus).

I - REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

article 1

article 1

BULLETIN DE L'INSTITUT PASTEUR, 1975, 73, p. 167 à 193

LA DÉNITRIFICATION DANS LES SOLS

par

J.-L. Garcia

PLAN

	Pages
I. — Généralités	168
II. — Bactéries dénitrifiantes.	169
III. — Méthodes d'étude.	170
1) Mesure de l'activité dénitrifiante.	170
2) Dispositifs d'étude.	171
IV. — Facteurs physico-chimiques.	171
1) Tension d'oxygène.	172
2) Humidité et submersion.	172
3) Matière organique	174
4) pH	175
5) Température	175
6) Salinité	176
7) Teneur en argile.	177
V. — Mécanisme et étapes intermédiaires.	177
VI. — Effet rhizosphère.	179
1) Plantes en sol exonoc.	179
2) Plantes en sol inondé.	181

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

article 1

BULLETIN DE L'INSTITUT PASTEUR, 1975, 73, p. 167 à 193

LA DÉNITRIFICATION DANS LES SOLS

par

J.-L. Garcia

PLAN

	Pages
I. — Généralités	168
II. — Bactéries dénitrifiantes.	169
III. — Méthodes d'étude.	170
1) Mesure de l'activité dénitrifiante.	170
2) Dispositifs d'étude.	171
IV. — Facteurs physico-chimiques.	171
1) Tension d'oxygène.	172
2) Humidité et submersion.	172
3) Matière organique	174
4) pH	175
5) Température	175
6) Salinité	176
7) Teneur en argile.	177
V. — Mécanisme et étapes intermédiaires.	177
VI. — Effet rhizosphère.	179
1) Plantes en sol exondé.	179
2) Plantes en sol inondé.	181

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

VII. — Importance effective de la dénitrification dans le sol.	184
1) Les pertes normales	184
2) Les pertes accidentelles	184
3) Les remèdes.	184

Mots-clés : Nitrate, Dénitrification, Sol, Eau, Rhizosphère ; Revue.

I. — GÉNÉRALITÉS

La découverte de la dénitrification dans les sols et des pertes consécutives d'azote sous forme gazeuse, date du siècle dernier. En 1882, Dehérain et Maquenne [41, 42] montraient que les nitrates étaient réduits dans la terre arable en N_2O et N_2 , en présence d'une forte proportion de matière organique et en atmosphère privée d'oxygène. A la même époque, deux autres chercheurs français, Gayon et Dupetit [55, 56, 57], apportaient pour la première fois la preuve de l'origine microbienne de la dénitrification en isolant en cultures pures, deux germes : *Bacterium denitrificans* α et *B. denitrificans* β . Ces mêmes auteurs entrevoyaient la nature exacte du phénomène, véritable processus respiratoire qui confère à certaines espèces de bactéries la faculté d'utiliser le nitrate et d'autres composés oxygénés minéraux de l'azote comme accepteurs finaux d'électrons, en fournissant ainsi à ces organismes l'énergie nécessaire à leur croissance.

Depuis cette époque, de très nombreuses études ont été réalisées sur le sol ou sur des souches pures isolées du sol. Delwiche [44] donne, dans une revue bibliographique, de plus amples renseignements sur ces premiers travaux. Plusieurs monographies concernant l'étude de la dénitrification dans les sols ont été publiées par la suite [26, 67, 91, 115, 124, 167, 169]. Les plus récentes et les plus générales, présentées par Payne [114] et Pichinoty [117], donnent un aperçu exhaustif des connaissances actuelles concernant les aspects biochimiques et physiologiques de la réduction bactérienne des composés oxygénés minéraux de l'azote. Le lecteur trouvera également des informations dans les ouvrages de microbiologie des sols [4, 46, 120, 162].

Outre la dénitrification qui se définit comme une réduction dissimilatrice véritable du nitrate en gaz (N_2O et N_2), on reconnaît l'existence de deux autres types de réduction du nitrate chez les bactéries [79] : 1) la réduction dissimilatrice incidente, qui aboutit à la formation de nitrite hautement toxique et qui est réalisée par

de nombreuses bactéries faisant fermenter les hydrates de carbone ; 2) la réduction assimilatrice, qui conduit à la formation d'ammoniac utilisé pour la biosynthèse des protéines et des autres constituants cellulaires azotés, et qui est très répandue chez les bactéries, les algues, les champignons et les végétaux supérieurs.

II. — BACTÉRIES DÉNITRIFIANTES

Chez aucune espèce bactérienne dénitrifiante connue, la respiration du nitrate ne présente un caractère obligatoire puisqu'elle peut toujours être remplacée par un autre processus d'oxydoréduction : la respiration de l'oxygène. Par contre, ces bactéries sont généralement dénuées de pouvoir fermentaire et ne peuvent croître en anaérobiose qu'en présence de nitrate, de nitrite ou d'oxyde nitreux qui remplissent, dans ce cas, la fonction de l'oxygène en aérobiose. L'oxydation des composés organiques est complète pendant la dénitrification, le CO₂ étant le seul produit final. Les bactéries dénitrifiantes peuvent oxyder les mêmes substrats carbonés au cours de la respiration et de la dénitrification, avec cependant une exception pour les composés aromatiques qui nécessitent la participation d'oxygénases et ne sont utilisables qu'en aérobiose [138].

On connaît actuellement une vingtaine d'espèces bactériennes dénitrifiantes isolées du sol. Elles se répartissent en sept genres, dont deux sont chimiolithotrophes : *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens* (biotypes B, C, D et F) [139], *P. stutzeri*, *P. stanieri* (variété de la précédente), *P. mendocina* [109] ; *Alcaligenes eutrophus* (*Hydrogenomonas eutropha*) ; *Paracoccus denitrificans* (*Micrococcus denitrificans*), *P. halodenitrificans* (*M. halodenitrificans*) [39] ; *Alcaligenes odorans* var. *viridans* [36], *A. denitrificans* [118], *A. faecalis* [92] ; *Achromobacter cycloclastes* [72] ; *Hyphomicrobium* B522 et WC [137] ; *Thiobacillus denitrificans* [13, 71], *T. denitrificans* RT [16], *Thiobacillus* Λ 2 [149] ; *Bacillus licheniformis* (*B. nitroxus*) [136, 160], *B. nitritollens* [43], *B. thermodenitrificans* (*B. kaustophilus*) [7, 170]. Pour l'isolement et la caractérisation sommaire de ces bactéries, le lecteur se reportera à la récente monographie de Pichinoty [117]. De leur côté, Smith et coll. [136] et Woldendorp [167] signalent tout un groupe de *Bacillus* capables de produire du gaz à partir du nitrate : *B. cereus*, *B. circulans*, *B. macerans*, *B. laterosporus* et *B. coagulans* ; cependant, ces organismes ne sont pas encore considérés comme des dénitrifiants.

En dehors de la multitude de travaux de biochimie et de physiologie portant sur des suspensions cellulaires ou des extraits acellu-

lares des souches isolées du sol, certains auteurs ont testé l'aptitude à la dénitrification de l'ensemble de la population dénitrifiante de sols hydromorphes [76, 121] ou de prairie [167], ainsi que l'influence de divers facteurs sur l'activité de ces populations, tels que la température et le pH [19, 54, 153, 155]. Au sein de ces populations, des différences nutritionnelles ont pu également être établies [155, 167]. A l'examen des résultats de plusieurs travaux, il ne semble pas exister de corrélation entre le nombre initial de bactéries dénitrifiantes d'un sol et l'activité dénitrifiante de la population considérée [54, 150, 167].

III. — MÉTHODES D'ÉTUDE

1) *Mesure de l'activité dénitrifiante.*

L'étude, au laboratoire, de la dénitrification dans les sols peut être réalisée par divers procédés. Le plus ancien d'entre eux consiste à déterminer soit la perte d'azote par la mesure de l'azote total au moyen de la méthode de Kjeldahl, soit la disparition du nitrate ou l'apparition du nitrite dans les extraits à l'eau [23]. Cette dernière technique peut être couplée à une analyse gazeuse lorsque l'on veut établir la séquence des produits formés lors de la dénitrification dans un sol. Plusieurs procédés peuvent être utilisés pour le dosage du nitrate, mais le plus rapide semble être celui qui consiste à le réduire en nitrite par un catalyseur approprié, le cadmium, le dosage de NO_2^- étant beaucoup plus sensible. On utilise pour cela une trousse d'analyse des eaux qui peut également servir sur le terrain.

Un deuxième procédé d'étude de la dénitrification consiste à mesurer la totalité du gaz formé au cours de la réduction du nitrate ajouté au sol, à l'aide de l'appareil de Dumas [75], de l'appareil de Van Slyke [172], d'un respiromètre électrolytique [95] ou, enfin, d'un respiromètre classique de Warburg [93] utilisé couramment avec des souches bactériennes pures. Mais cette méthode peut être faussée, surtout lors d'un enrichissement en carbone organique, par le dégagement de H_2 ou de CH_4 [81].

Un progrès très net a pu être accompli grâce à l'analyse de la composition des gaz produits lors de la dénitrification, par spectrométrie en infrarouge pour le N_2O [10, 161] et par spectrométrie de masse à l'aide de ^{15}N [65, 68, 69, 106, 165], ou par chromatographie en phase gazeuse avec détection par conductibilité thermique [135, 148] pour NO , N_2O et N_2 . Cette dernière technique, la moins coûteuse et la plus simple, a également permis de mettre

au point une nouvelle méthode d'évaluation de la dénitrification basée sur la réduction de N_2O [51]. La méthode permet d'estimer, pendant les 6 premières heures de l'incubation, l'activité dénitrifiante initiale présente dans le sol au moment du prélèvement, alors que la vitesse de réduction de N_2O mesurée après une vingtaine d'heures d'incubation représente l'activité dénitrifiante potentielle qui se développe après l'introduction de l'oxyde nitreux [51].

2) Dispositifs d'étude.

Toutes ces méthodes peuvent être employées pour la mesure de l'activité dénitrifiante d'échantillons de sol secs, humidifiés et incubés en présence de nitrate dans des flacons appropriés. Des études ont également été menées à l'aide de dispositifs contenant des plantes pour l'étude de l'effet rhizosphère. C'est ainsi que des travaux concernant la dénitrification ont été faits à l'aide de lysimètres normaux [108, 123] ou à gaz [90, 96], par percolation d'une solution de nitrate au travers d'une colonne de sol [62, 164] ou par analyse des variations de composition de l'atmosphère de phytotrons spécialement conçus pour l'étude des pertes d'azote gazeux dans le système sol- plante [131, 141, 146]. Woldendorp [167, 168] a utilisé, quant à lui, le respiromètre de Warburg en plaçant, dans les coupes de mesure, des petites boîtes en matière plastique contenant un sol artificiel et des plantules de pois. Brar [22] a utilisé des racines lavées de fétuque mises en incubation en présence de nitrate ou de nitrite.

Des mesures ont également été effectuées sur des échantillons de sol prélevés au champ et incubés au laboratoire, sans perturbation [105, 144]. Très récemment, Garcia [53] a appliqué la méthode de réduction de N_2O à l'évaluation de la dénitrification dans les rizières en effectuant, dans une étuve portative, les incubations en anaérobiose des échantillons de sol immédiatement après le prélèvement ; les prélèvements d'atmosphère ont été effectués dans des tubes sous vide et analysés ultérieurement par chromatographie en phase gazeuse, au laboratoire. Enfin, un dispositif très simple vient d'être mis au point pour l'étude des phénomènes gazeux dans la rhizosphère du riz et notamment pour l'évaluation de la dénitrification par la méthode de réduction de N_2O [125].

IV. — FACTEURS PHYSICO-CHIMIQUES

L'activité dénitrifiante d'un sol dépend essentiellement des facteurs physico-chimiques ; certains, comme la tension d'oxygène, le degré

d'humidité et la teneur en carbone organique, sont très importants ; d'autres comme le pH, la température, la salinité, ont une influence moins marquée.

1) *Tension d'oxygène.*

Malgré Dehérain et Maquenne [42] qui ont montré que la réduction du nitrate dans la terre arable n'a lieu que si son atmosphère est complètement privée d'oxygène, de nombreux auteurs ont invoqué par la suite une dénitrification aérobie [25, 27, 38, 60, 100, 101]. Selon Allison et coll. [6, 34], bien que la dénitrification n'ait lieu que lorsque la pression partielle d'O₂ est très réduite, il est indéniable qu'au champ, la dénitrification est possible même dans des sols aérés et bien drainés. Cela peut s'expliquer par le fait que le sol est un milieu hétérogène où des zones aérobies et anaérobies plus ou moins étendues, peuvent coexister à peu de distance [63, 64]. Nömmik [106] a ainsi pu montrer l'existence d'une corrélation entre l'activité dénitrifiante d'un sol et sa teneur en gros agrégats : dans la zone interne des gros agrégats, la vitesse de diffusion de l'oxygène est plus lente que dans celle des petits agrégats.

De nombreux travaux ont montré que l'oxygène inhibe la dénitrification dans les sols [21, 24, 32, 58, 98, 126, 165] et, actuellement, l'absence de dénitrification dans des conditions rigoureusement aérobies est reconnue comme un fait indiscutable [116, 117]. L'ancienne controverse semble avoir eu une cause d'ordre technique, car l'observation courante montre qu'il est difficile de maintenir une concentration élevée d'oxygène dans une culture bactérienne douée d'une forte activité respiratoire : l'oxygène se dissout dans le milieu moins vite qu'il n'est consommé. C'est la raison pour laquelle les cultures très denses dénitrifient généralement en présence d'air.

L'oxygène réprime la formation et inhibe le fonctionnement des enzymes de la dénitrification. C'est ainsi que la vitesse de réduction de N₂O dans un sol de rizière est diminuée de moitié en présence de 4 % d'O₂ [51].

2) *Humidité et submersion.*

L'étude de l'influence de la teneur en eau d'un sol sur la dénitrification montre que, en général, l'activité maximale est atteinte à la saturation [10, 24, 30, 35, 47, 58, 61, 73, 134]. L'humidification du sol affecte indirectement la dénitrification en entravant la diffusion d'O₂ dans le sol [165] ; en effet, la teneur en eau d'un sol modifie sa porosité à l'air [119]. Selon Nömmik [105], la dénitrification est

stoppée pour une teneur en eau inférieure ou égale à 60 % de la saturation, et N_2O prédomine dans la phase gazeuse quand le taux d'humidité est faible. Pour Mahendrappa et Smith [86], l'effet de l'humidification sur l'activité dénitrifiante d'un sol ne résulterait pas seulement de son influence sur la diffusion de l'oxygène. Ces auteurs invoquent aussi son influence sur la distribution des micro-organismes et (ou) des composés azotés, ainsi que sur la dilution des produits toxiques formés par le métabolisme microbien dans le sol. D'après ces auteurs, à chaque sol correspondrait — en conditions anaérobies — une teneur en eau optimale pour une activité dénitrifiante maximale.

Les sols submergés, tels que ceux des rizières, sont anoxiques et constituent ainsi un milieu particulièrement propice à la dénitrification [1, 14, 28, 88, 89, 99, 110, 127, 128, 132, 163, 173]. Celle-ci est en étroite relation avec l'Eh des sols immergés [8] et ne commencerait, selon Patrick [111], que lorsque l'Eh atteint 338 mV dans un sol dont le pH est de 5,1. Tusneem et Patrick [152], dans une récente revue de la littérature relative aux transformations de l'azote en sol submergé, ont exposé clairement les processus qui aboutissent à une perte d'azote en rizière, malgré l'emploi d'engrais ammoniacaux. La submersion entraîne d'importantes modifications biologiques et chimiques : alors que le potentiel d'oxydoréduction baisse dans le sol [8], à une distance de quelques millimètres à quelques centimètres de la couche supérieure, une zone oxydée s'établit directement au contact de la lame d'eau, zone dans laquelle O_2 est fourni par l'eau de submersion, par les nombreuses colonies d'algues se développant à la surface et par l'exsudation de diverses plantes aquatiques. Cette zone oxydée est propice à la vie microbienne aérobie et notamment à la nitrification des engrais ammoniacaux mis à la surface. Le nitrate produit diffuse dans la zone réduite sous-jacente où il est perdu par dénitrification [147, 152, 172]. Il peut y avoir également immobilisation d'une partie de ce nitrate dans la fraction organique du sol [84]. L'enfouissement de l'engrais azoté à faible profondeur réduirait de beaucoup la perte d'azote [3] estimée selon certains auteurs à 25-50 pour cent de l'engrais ajouté [1, 40, 172]. La succession submersion-assèchement du sol crée également des conditions idéales pour la dénitrification ; le nitrate formé pendant la période aérée est rapidement dénitrifié quand le sol est submergé de nouveau. Patrick et Wyatt [113] signalent ainsi une perte de 15 à 20 pour cent de l'azote total du sol après plusieurs cycles d'alternance. Le NO_3^- n'est généralement pas décelé dans le sol submergé. Cependant, par la méthode d'estimation de la dénitrification basée sur la réduction de N_2O , Garcia [53] a pu montrer l'existence d'une activité

dénitrifiante en rizière au moment du prélèvement, preuve de l'apparition puis de la réduction du nitrate.

3) *Matière organique.*

De très nombreuses études ont montré l'action favorable de la matière organique du sol sur son activité dénitrifiante [48, 75, 77, 78, 97, 104, 105, 132, 167]. La fraction de carbone organique soluble et facilement assimilable du sol fournit l'énergie nécessaire à l'activité et à la croissance des bactéries dénitrifiantes ; c'est un facteur majeur qui détermine le taux maximal de dénitrification lorsque les composés oxygénés de l'azote ne sont pas en quantité limitante et que les deux facteurs précédemment décrits (anaérobiose et humidification optimale) sont réunis [93].

Dans les sols de rizières, une corrélation positive hautement significative entre l'activité dénitrifiante potentielle et la teneur en matière organique, a pu être mise en évidence [54, 128]. Dans les sols exondés, l'apport de matière organique facilement assimilable entraîne une augmentation de l'activité microbienne, donc de la consommation d'O₂ qui peut aboutir rapidement à l'établissement de zones anaérobies propices à la dénitrification, si la teneur en eau est suffisante [106].

De nombreux travaux concernent l'influence de l'apport de divers substrats carbonés sur l'activité dénitrifiante des sols. L'enrichissement par les glucides présente l'inconvénient de permettre le développement de nombreux microorganismes qui entrent en compétition avec la microflore dénitrifiante et peuvent également produire de l'hydrogène lors de la fermentation des glucides. Les substrats carbonés non fermentescibles sont beaucoup plus sélectifs et peuvent aboutir à des résultats remarquables. Divers autres substrats ont été utilisés avec plus ou moins de succès. La luzerne donne de meilleurs résultats que la paille d'avoine ou de blé [73, 165]. Selon Bremner et Shaw [24], il faut davantage de paille de blé que de glucose pour obtenir la même activité dénitrifiante ; ce sont les composés hydrosolubles et les constituants facilement décomposables de la paille qui agissent sur le phénomène. Selon ces mêmes auteurs, l'ordre d'influence décroissant obtenu avec divers substrats serait le suivant : cellulose, paille, engrais vert, sciure, lignine ; l'assimilation possible de ces matériaux varie avec leur résistance à la décomposition microbienne. L'effet de la paille serait également fortement réduit par le compostage [24]. Enfin, Guiraud et Berlier [66] ont montré que l'incorporation de paille avait un effet dépressif sur la culture du ray-grass en pot, à cause d'une perte précoce d'azote par dénitrifi-

fication. Selon ces auteurs, l'effet dépressif de la paille n'aurait donc pas seulement pour cause l'immobilisation temporaire de l'azote sous forme organique.

L'action favorable du carbone organique sur l'activité dénitrifiante d'un sol se retrouve également lorsqu'on examine l'influence des plantes sur le phénomène. Mais cela constitue un chapitre spécial qui sera abordé un peu plus loin.

4) *pH.*

La vitesse de dénitrification est très faible en milieu acide (pH 3,6 à 4,8) [24, 73, 165] et augmente avec le pH [70] pour devenir rapide à pH 8-8,6 [24, 58, 106] ; la dénitrification cesse à partir de pH 10,5 [106]. Selon Broadbent [25] et Wijler et Delwiche [165], l'optimum se situerait vers pH 6-6,3. Pour Valera et Alexander [154], la dénitrification ne serait conséquente que dans des habitats voisins de la neutralité, alors que d'autres auteurs ont trouvé une activité dénitrifiante appréciable dans une large gamme de pH [48, 77, 78, 82]. Selon Khan et Moore [77, 78], le pH ne serait pas un facteur limitant pour la dénitrification. Dans des sols de rizière, seule une corrélation faiblement significative a été mise en évidence entre l'activité dénitrifiante et le pH [54].

S'il intervient sur la vitesse de la dénitrification, le pH agit également sur l'accumulation des intermédiaires de la dénitrification. C'est ainsi que l'on observe une accumulation de nitrite à pH alcalin par suite de la faible vitesse de réduction de NO_2^- en milieu alcalin ; par contre, le nitrite constitue un intermédiaire très fugace à bas pH [37, 50]. Le facteur limitant la dénitrification serait la réduction de NO_3^- dans les sols acides et la réduction de NO_2^- dans les sols alcalins [37]. Par ailleurs, on observe souvent une production d'oxyde nitrique à pH acide, qui semblerait provenir d'une réduction chimique du nitrite [106, 165]. Une corrélation inverse hautement significative a été décelée entre l'accumulation de NO et le pH de sols de rizière [50]. Enfin, au-dessous de pH 7, le produit final majeur de la dénitrification est l'oxyde nitreux, tandis qu'à la neutralité, le N_2O ne s'accumule pas [37, 106, 165] ; les mêmes observations ont été effectuées dans des sols de rizières [50] ; la réduction du N_2O est inhibée à pH acide ou alcalin, tandis qu'à pH neutre, l'oxyde nitreux est rapidement réduit en azote.

5) *Température.*

L'activité dénitrifiante d'un sol est en étroite relation avec la température [11, 15, 24, 58, 106, 159]. Presque négligeable de 3 à

5° C [15, 24, 106, 133], elle augmente avec la température pour atteindre un optimum qui se situe aux environs de 60 à 65° [24, 106] et cesse entre 70 et 85°. Selon Nömmik [106], la dénitrification est déjà importante à 12-13° et peut ainsi entraîner une perte d'azote appréciable dans les champs des régions tempérées, pendant les mois pluvieux d'automne. Un effet stimulant de l'alternance gel-réchauffement a été signalé [94, 133]; plus cette alternance est fréquente et plus l'écart de température est fort, plus grande est l'activation. L'expérience de Nömmik [106], conduite à une pression partielle d'O₂ de 80 à 170 mm de mercure, a montré l'existence d'une forte corrélation positive entre la dénitrification et la consommation d'oxygène aux différentes températures. Pour Woldendorp [169], la température influe également sur l'activité microbienne générale, sur la solubilité d'O₂ et sa vitesse de diffusion dans le sol, d'où l'impossibilité de faire la part exacte de l'influence de la température sur la dénitrification en conditions aérobies. Selon Bremner et Shaw [24], la vitesse de dénitrification dans le sol varie très peu de 25 à 60°. Enfin, Garcia [51] a récemment montré l'existence de deux maximums pour la réduction de N₂O par un sol de rizière, à 37 et à 65°; la deuxième température correspond à l'activité optimale d'une bactérie dénitrifiante thermophile, *Bacillus thermodenitrificans*. En culture pure, l'optimum d'activité des bactéries dénitrifiantes se situe entre 30 et 37°.

Selon Nömmik [106], N₂O serait le produit majeur de la dénitrification à basse température, tandis qu'à haute température, N₂ s'accumulerait. Pour Bailey et Beauchamp [15], il y aurait une inhibition complète de la réduction de NO₃⁻ à 5°, mais la réduction de NO₂⁻ continuerait lentement; l'abaissement de température ne modifierait pas l'accumulation de N₂O, mais entraînerait une diminution de production de N₂ et une augmentation de la quantité de NO. Ce dernier gaz proviendrait d'une réduction chimique du nitrite.

6) Salinité.

Ce facteur peut se révéler important dans les sols salés comme les sols de delta ou les sols de rizière de la côte ouest de l'Afrique. Pour 29 sols de rizière du Sénégal, on a noté une corrélation des rangs inverse qui est hautement significative entre l'activité dénitrifiante potentielle et la teneur en chlorures. Une corrélation identique existe également entre le nombre initial de bactéries dénitrifiantes et la teneur en chlorures [54]. Lorsque l'on enrichit un sol non salé avec des quantités croissantes de NaCl, l'activité dénitrifiante

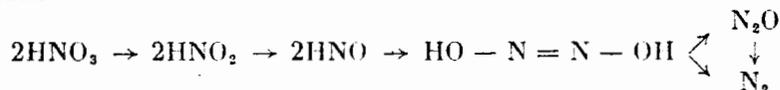
diminue ; une teneur de 10 mg Cl⁻/g de sol semble constituer le seuil de tolérance.

7) *Teneur en argile.*

Redman et Patrick [128] ont signalé l'existence d'une forte corrélation entre la vitesse de réduction du nitrate et la teneur en argile de 26 sols hydromorphes de Louisiane, avec un coefficient de corrélation de 0,820. Cependant, cette corrélation n'a pas été retrouvée sur 29 sols de rizières du Sénégal [54].

V. — MÉCANISME ET ÉTAPES INTERMÉDIAIRES

Différents schémas ont été proposés pour expliquer la succession des réactions qui interviennent dans la réduction du nitrate en gaz (N₂O et N₂). D'après Kluyver [79], le nitrite serait réduit en un composé hypothétique, le radical nitroxyde HNO qui se dimériserait en un composé très instable, l'acide hyponitrique HO — N = N — OH. Ce dernier donnerait N₂O par déshydratation et N₂ par hydrogénation ou réduction :

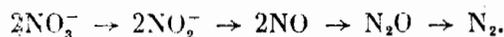


D'autres composés ont été proposés pour le remplacement du nitroxyde

et de l'hyponitrite, notamment la nitramide $\begin{matrix} \text{H} \\ \diagup \\ \text{N} - \text{N} \\ \diagdown \\ \text{H} \end{matrix} \begin{matrix} \text{O} \\ \diagdown \\ \text{O} \end{matrix}$ et

l'hydroxylamine NH₂OH, de même que la nitrohydroxylamine NO₂NHOH. Mais aucune preuve formelle n'a pu être établie quant à la présence de l'un de ces composés dans le sol ou dans le milieu de culture d'une bactérie dénitrifiante. En outre, ces corps sont très instables pour la plupart et se décomposent spontanément en donnant N₂, N₂O et parfois NO.

Actuellement, on a tendance à considérer l'oxyde nitrique comme l'unique intermédiaire entre le nitrite et l'oxyde nitreux :



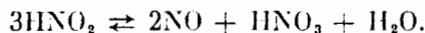
En effet, cette séquence a été établie avec certitude chez des bactéries appartenant à 5 genres différents [16, 72, 92, 117] parmi les 9 dans lesquels se rencontrent des espèces véritablement dénitrifiantes. Le lecteur trouvera un exposé des connaissances actuelles sur ce

point dans les récentes monographies de Payne [114] et de Pichinoty [117].

Cependant, ces présomptions ne semblent pas confirmées dans les études menées sur les sols. Il est indéniable que le nitrite constitue le premier intermédiaire de la dénitrification. Comme nous l'avons déjà vu, il s'accumule dans les sols alcalins, alors qu'on ne le décele pas en grande quantité dans les sols acides où il est rapidement réduit.

Une production de NO au cours de la réduction du nitrate dans les sols a été signalée par plusieurs auteurs [31, 50, 106, 107, 134, 156, 157, 165] mais elle n'intervient pas toujours [37, 50, 156]. En général, les quantités détectées sont très faibles [50, 134, 156], au plus égales à 5 % du nitrate ajouté [31].

Cependant, Wijler et Delwiche [165] ont décelé 15 % de NO dans un sol acide et Garcia [50] jusqu'à 60 % dans un sol de rizière de pH 4,7. En enrichissant des sols forestiers en nitrite, Nömmik et Thorin [107] ont décelé 30 % de NO à pH 7,3. Selon Wijler et Delwiche [165], NO apparaît seulement si la teneur en eau est basse et l'oxygène absent. Cette production occasionnelle d'oxyde nitrique est attribuée à une décomposition chimique du nitrique en milieu acide [31, 106, 107, 129, 165] suivant la réaction



Selon Nömmik [106], la réaction chimique a lieu même à pH 6,4 en présence d'une grande quantité d'ions Fe^{++} . Wijler et Delwiche [165] ont observé la formation de NO à pH 7,2 à un faible taux d'humidité. Une corrélation étroite a été mise en évidence entre la quantité de NO accumulée lors d'études effectuées en atmosphère confinée et la quantité de nitrite détectée [31, 50] de même qu'une corrélation inverse entre la quantité de NO et le pH d'une série de sols de rizière [50]. Par ailleurs, la production de NO, quand elle a lieu, est encore décelable dans les sols stérilisés et enrichis en nitrite [107]. Van Cleemput et Baert [157] ont même détecté l'oxyde nitrique dans des sols irradiés par ^{60}Co à la dose de 2,5 Mrad, alors qu'il n'y en avait pas dans les mêmes sols non irradiés. Cependant, en apportant 100 ppm de $\text{N} - \text{NO}_2^-$ dans 4 sols de rizière stérilisés durant 30 min à 120° et ayant produit plus de 25 % de NO lors de la dénitrification de NO_3^- , Garcia [50] n'a pu déceler aucune trace de NO après plusieurs jours d'incubation à 30°.

Dans tous les cas où une formation de NO a été observée, ce composé est ultérieurement réduit puisqu'il disparaît toujours de la phase gazeuse en donnant N_2O et N_2 . Quand on introduit NO dans un sol, il est réduit lentement, la période de latence étant assez

longue [106]. Selon Cady et Bartholomew [33], il y aurait formation, dans les premiers stades de la dénitrification, d'autres composés qui agiraient sur les vitesses de réduction de NO_3^- , NO_2^- et NO . Étudiant la séquence des produits formés au cours de la dénitrification dans certains sols, plusieurs auteurs ont mis en évidence une perte momentanée d'azote en totalisant les composés azotés déterminés ; en fin d'expérience, la presque totalité de l'azote initial est cependant retrouvée sous forme de N_2 [50, 106]. Nömmik [106] attribue cette perte à l'accumulation d'un ou plusieurs composés intermédiaires non détectés par l'analyse ou bien à l'inhibition momentanée du dégagement de N_2O et N_2 , la solubilité élevée de N_2O n'expliquant qu'en partie cette perte.

Quand on étudie la dénitrification dans les sols, on assiste toujours à une formation de N_2O ; lorsque les expériences sont conduites en atmosphère confinée, ce gaz est ultérieurement réduit en N_2 , produit final de la dénitrification. Nous avons déjà vu que les proportions relatives de N_2O et N_2 dépendaient du pH, de la teneur en eau et (ou) de la température. N_2O prédomine également quand la concentration de nitrate est forte, car sa réduction ne commence que lorsque la majeure partie de NO_3^- a disparu [106]. Comme N_2O est très soluble dans l'eau, les sols submergés favorisent sa réduction en N_2 , alors qu'il a tendance, en sols exondés, à s'échapper dans l'atmosphère où sa concentration est d'environ 0,5 vpm. À l'aide de l'azote marqué, Nömmik [106] a pu établir avec certitude que N_2O est un précurseur obligatoire de N_2 dans les sols, assertion admise par d'autres auteurs [31, 37, 156].

VI. — EFFET RHIZOSPHERE

Les études consacrées jusqu'à présent à l'influence des plantes vivantes sur le processus de dénitrification ne sont pas très nombreuses si on les compare aux innombrables expériences se rapportant à ce processus. Comme nous l'avons déjà vu, l'oxygène est le facteur majeur qui régit la dénitrification. Ainsi distinguerons-nous, pour l'effet rhizosphère, le cas des plantes en sol exondé (dont les racines consomment de l'oxygène) et le cas des plantes en sol inondé (dont les racines exsudent de l'oxygène).

1) Plantes en sol exondé.

Diverses études de dénitrification ont été effectuées dans la rhizosphère du blé [130, 142, 151], du haricot, du maïs, de l'orge [102],

du pois [168] et de plusieurs plantes fourragères [22, 131, 167].

Dans une revue des travaux russes sur la rhizosphère, Krasil'nikov [80] a constaté que, par rapport aux observations concernant le sol nu, le nitrate est absent de la zone des racines de différentes plantes, ou présent en faible quantité durant les premiers stades de la croissance et en fin de végétation. Les bactéries dénitrifiantes sont très nombreuses dans la rhizosphère et se chiffrent par millions voire par billions par gramme de sol sec [140]. Pour le blé, Rivière [130] a constaté un effet rhizosphère positif sur le nombre de bactéries dénitrifiantes à la germination, au tallage et à l'épiaison, avec un maximum au moment du tallage quand la plante a des besoins nutritifs accrus. Michoustine et coll. [102] ont montré que la perte en nitrate était maximale à la floraison du haricot et à l'épiaison du maïs ; pour cette dernière plante, le calcul de la quantité de carbone nécessaire à la perte d'azote constatée donnait un chiffre très nettement inférieur à l'estimation du carbone fourni par les exsudats racinaires. Au stade de l'épiaison, par exemple, pour un poids sec de matériel végétal de 70 g, il y a eu une perte de 264 mg d'azote ayant nécessité la présence de 684 mg de carbone ; or la quantité de carbone estimée à ce stade de la croissance du maïs, dans les exsudats et les débris racinaires, est de 3 000 à 7 000 mg.

Selon Allison [5], les pertes en azote seraient plus faibles dans les sols recouverts de plantes qu'en sol nu, car l'exportation par les plantes préviendrait la dénitrification. Woldendorp [166, 167, 168] conteste cette hypothèse dans une étude de la perte d'azote sous prairie. Selon cet auteur, il existerait un effet stimulant des plantes sur la dénitrification ; il résulterait de la consommation d'O₂ par les racines et de l'existence d'une microflore rhizosphérique active. La consommation d'O₂, mesurée au respiromètre de Warburg, est 20 fois plus grande en présence de racines vivantes que dans le cas de racines mortes. Les racines sont entourées d'une petite pellicule d'eau dans laquelle la pression partielle d'O₂ est presque nulle ; des conditions anaérobies nécessaires à une activité dénitrifiante élevée se rencontreront donc dans un sol planté. Selon Woldendorp [168], 10 à 20 % des engrais seraient perdus aux Pays-Bas sous l'influence de ce facteur. En comparant un sol stérile et un sol non stérile, l'auteur attribue, dans le cas de plantules de pois de 10 jours, 65 % de la consommation d'O₂ aux racines et 35 % aux microorganismes de la rhizosphère.

La dénitrification est également stimulée par les exsudations racinaires. Woldendorp [166, 167, 168] l'a démontré à l'aide de plantules cultivées sur un sol artificiel dépourvu de matière organique, et disposées dans les fioles de mesure d'un respiromètre de Warburg,

sous atmosphère anaérobie et en présence de nitrate. L'effet supérieur du pois par rapport au ray-grass, constaté lors de cette expérience, serait à attribuer, selon l'auteur, aux acides aminés excrétés en plus grande quantité par le pois. Des expériences avec des plantules à système racinaire stérile ensemencé par *Pseudomonas* sp. ont montré que cette bactérie peut utiliser les exsudats racinaires comme donneurs d' H^+ pour la dénitrification, tandis que *Bacillus* sp. en est incapable. Selon Woldendorp, les bâtonnets à Gram-négatif seraient les principaux responsables de la dénitrification sous prairie, et l'effet favorable des acides aminés découlerait du transfert rapide des protons au nitrate pendant la désamination de l'acide. Au cours d'une expérience sur la dénitrification à l'aide de racines excisées de plants de fétuque âgés d'un mois, Brar [22] a constaté que les racines, en respirant, entraînent une déficience en O_2 dans leur proche environnement, déficience favorable à la réduction du nitrate, mais les racines excisées ne fournissent pas suffisamment de substrats pour réduire en gaz le nitrite formé.

Enfin, tout récemment, à l'aide d'un dispositif spécial, Stefanson [141, 142, 143, 144, 145] a montré que les produits gazeux de la dénitrification sont plus abondants dans un sol portant des plants de blé et renfermant différentes quantités d'eau. En présence des plantes, on obtient beaucoup plus de N_2 que de N_2O , alors qu'en sol nu, on obtient le contraire. Selon l'auteur, la réduction du nitrate en azote serait directement influencée par la rhizosphère : en sol non planté, N_2O ne serait pas un précurseur obligatoire de N_2 . A notre avis, une autre explication peut être donnée : en effet, en sol nu, N_2O serait libéré dans l'atmosphère au fur et à mesure de sa production, surtout si le sol n'est pas riche en carbone organique, tandis qu'en présence de plantes, les exsudats racinaires riches en substances carbonées directement assimilables permettraient la réduction de N_2O au fur et à mesure de sa production et entraîneraient une libération supérieure de N_2 dans l'atmosphère.

2) Plantes en sol inondé.

Il s'agit essentiellement du riz. Comme nous l'avons déjà vu, les pertes d'azote par dénitrification en sol inondé sont assez importantes, malgré l'emploi d'engrais ammoniacaux, et résultent principalement d'une nitrification préalable de NH_4^+ dans la mince couche de sol oxygénée au contact direct de l'eau de submersion et dans la zone aérobie de la rhizosphère du riz, engendrée par l'exsudation d' O_2 par les racines.

De très nombreux travaux ont en effet montré l'existence d'une

exsudation d'oxygène par les racines de riz [2, 9, 17, 20, 74, 83, 158]. Van Raalte [158] était l'un des premiers à montrer qu' O_2 est présent dans le cortex des racines et provient d'un transport des parties aériennes vers les racines. Alberda [2], dans une revue de la littérature concernant ce problème a montré que le riz développe, à la surface du sol, un tapis de fines racines abondamment ramifiées qui seraient capables de prélever l'oxygène du milieu qui serait transporté dans d'autres parties du système racinaire. Ces racines se développeraient en fin de tallage et demeureraient actives jusqu'à la maturité des graines. Selon Bouldin [20], la rhizosphère du riz ne serait pas beaucoup oxydée dans la région du sommet des racines ; par contre, la zone aérobie serait plus étendue dans les parties les plus âgées dans lesquelles les racines possèdent de larges espaces intercellulaires remplis d'air. Pour Armstrong [9], le riz peut tolérer des conditions très réductrices parce qu'il possède au niveau des racines un fort pouvoir oxydant résultant de la fourniture interne d'oxygène. Selon cet auteur, il existerait une différence entre les variétés de riz, en ce qui concerne la diffusion d' O_2 ; et les petites racines latérales pourraient oxygéner une zone aussi étendue sinon plus grande que la racine primaire qui leur a donné naissance. Enfin, Luxmoore et Stolzy [83] ont calculé qu'une racine de riz de 20 cm de long et de 0,2 cm de diamètre exsuderait 5 à 7 % d' O_2 au sommet de la racine ; un accroissement du diamètre entraînerait une augmentation de la concentration d' O_2 à l'intérieur et particulièrement le long des parois de la racine.

Il semble que le nombre de bactéries dénitrifiantes soit nettement plus élevé dans la rhizosphère du riz que dans le sol éloigné des racines. Selon Wu [171], ce nombre serait faible au début de la croissance et augmenterait brusquement en fin de tallage. Dans 20 des 23 sols de rizière du Sénégal étudiés, Garcia [49] a trouvé un rapport R/S (*) supérieur à 1. Cependant, Mahmoud et Ibrahim [87] ont observé, dans des sols de rizière d'Égypte, une densité de bactéries dénitrifiantes plus faible dans la rhizosphère que dans les sols non plantés. Mais il convient de rappeler qu'en aérobiose, les bactéries dénitrifiantes sont capables de se développer sans dissimiler le nitrate, donc, que leur présence en plus ou moins grand nombre ne reflète pas nécessairement l'importance du processus de dénitrification.

L'étude de la dénitrification dans la rhizosphère du riz est encore très fragmentaire. De et Digar [40], puis Broadbent et Tusneem [28] ont signalé, lors d'essais en pots et au champ, que la culture du riz

(*) R/S = nombre de bactéries du rhizoplan/nombre de bactéries dans le sol éloigné.

diminuait la perte d'azote observée lors d'un apport d'engrais ammoniacal. Cela résulterait de l'absorption de NH_4^+ par les plantes avant qu'il ne soit mobilisé puis perdu dans la séquence nitrification-dénitrification. Cette séquence se présente-t-elle effectivement dans la rhizosphère du riz ?

En utilisant le test statistique de la corrélation des rangs [48], Garcia [49] a observé, dans des cultures de riz en boîtes de plastique [45], un effet stimulant du riz sur l'activité dénitrifiante potentielle. Cette stimulation, strictement localisée à la mince pellicule de sol adhérent aux racines, est d'autant plus marquée que le sol est plus pauvre en carbone organique. Une corrélation positive hautement significative a été mise en évidence entre le poids sec de matériel végétal et l'activité dénitrifiante potentielle des bactéries de la rhizosphère ; comme l'exsudation racinaire est liée à la quantité de matériel végétal [85], la dénitrification potentielle serait donc en relation avec la quantité d'exsudats racinaires. Ce résultat a été confirmé par celui de la mesure de la réduction de N_2O qui permet d'estimer la dénitrification [51]. Avec cette méthode, aucune activité N_2O -réductase n'a été décelée dans la rhizosphère d'un riz de trois semaines, au moment du prélèvement. Cette absence d'activité dénitrifiante initiale peut résulter d'une absence de nitrification de NH_4^+ du sol (il n'y a pas eu addition d'engrais dans cette expérience) ou de la présence de conditions défavorables telle la libération d' O_2 dans la rhizosphère. L'application de la méthode de réduction de N_2O a cependant permis de déceler une activité dénitrifiante au moment du prélèvement, à différents stades de croissance du riz, dans des échantillons prélevés en pots et dans les champs [53] ; l'effet rhizosphère positif du riz sur la dénitrification a également pu être confirmé [53].

Par ailleurs, cette méthode a permis de démontrer la possibilité de dénitrification dans la rhizosphère du riz, malgré la présence d' O_2 excrété par les racines [52]. En effet, après préincubation en présence de N_2O , dans un dispositif approprié (une rhizosphère de riz représentée par le système plantule âgée de trois semaines et 15 g de sol dans lesquels elle s'est développée, en tube de verre), l'activité N_2O -réductase mesurée en 6 h est quatre fois plus élevée dans la rhizosphère — donc malgré la présence de la plante vivante — que dans le sol témoin non planté lorsque N_2O est introduit au contact même du sol, au travers d'un tamis « Inox » de 200 μ . Quand la préincubation est effectuée par introduction de N_2O au contact de la partie aérienne de la plantule enfermée dans un tube à essai maintenu par un joint de caoutchouc, l'activité de la rhizosphère est deux fois moins élevée, car la zone de sol atteinte par N_2O — qui diffuse

probablement par la même voie qu' O_2 — est plus restreinte dans ce cas.

Cependant, puisqu'il y a eu induction de l'enzyme responsable de l'activité, induction qui est strictement inhibée par O_2 [116], le N_2O a probablement diffusé dans une zone du sol où l'influence d' O_2 ne s'est pas manifestée, mais qui est atteinte par les exsudats racinaires puisque l'activité y est plus grande que dans le sol nu. Il y aurait donc, dans la rhizosphère du riz, des zones anaérobies dans lesquelles les processus biologiques peuvent se manifester avec une plus grande intensité que dans le sol non planté, par suite de la présence d'une plus grande quantité de substances directement assimilables et d'une densité bactérienne plus élevée.

VII. — IMPORTANCE EFFECTIVE DE LA DÉNITRIFICATION DANS LE SOL.

On reconnaît actuellement deux catégories de pertes d'azote par dénitrification [46].

1) *Les pertes normales.*

Elles sont lentes et progressives et découleraient de l'existence dans le sol — même bien drainé — de microhabitats anaérobies favorables à la dénitrification du nitrate apporté au sol sous forme d'engrais ou formé par nitrification dans les microsites voisins, aérobies [64]. Ces pertes peuvent représenter jusqu'à 10 et même 15 % de la production annuelle et de l'apport d'azote nitrique [46].

2) *Les pertes accidentelles.*

Elles sont rapides et importantes et elles apparaissent lorsque les conditions optimales pour la dénitrification sont réalisées, telles que la présence d'une quantité appréciable de nitrate dans un sol riche en carbone organique, l'anaérobiose consécutive aux pluies ou à l'irrigation, et une température assez élevée. Dans les régions tempérées, ces conditions peuvent se rencontrer en été ou pendant les mois pluvieux d'automne [106] et surtout dans les prairies [168]. Dans les régions tropicales, les pertes d'azote peuvent être considérables dans les rizières.

3) *Les remèdes.*

Pour réduire les pertes par dénitrification, on conseille généralement l'apport d'engrais sous forme ammoniacale dans tous les cas

où NH_4^+ est absorbé préférentiellement par la culture, notamment pour le riz. On peut également employer des inhibiteurs de nitrification [29, 59, 112, 122] pour réduire la formation de NO_3^- à partir de l'engrais ammoniacal. Enfin, il est conseillé de fractionner les apports de matière organique fraîche qui stimulent la microflore dénitrifiante.

Une inhibition spécifique partielle de la dénitrification a été signalée, après usage de pesticides [12, 103] et actuellement plusieurs recherches dans ce sens sont en cours au Japon. Rappelons, à ce propos, que la microflore dénitrifiante peut avoir une action bénéfique sur le sol — notamment en sol submergé. — en éliminant certains acides toxiques pour les cultures [171].

RÉFÉRENCES

- [1] ABICHANDANI, C. F. & PATNAIK, S., Nitrogen changes and fertilizer losses in lowland waterlogged soils. *J. Indian Soc. Soil Sci.*, 1958, 6, 87-93.
- [2] ALBERDA, T., Growth and root development of lowland rice and its relation to oxygen supply. *Plant a. Soil*, 1953, 5, 1-28.
- [3] ALECKSIC, Z., BROESHART, H. & MIDDELBOE, V., Shallow depth placement of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in submerged rice soils as related to gaseous losses of fertilizer nitrogen and fertilizer efficiency. *Plant a. Soil*, 1968, 24, 338-342.
- [4] ALEXANDER, M., « Introduction to soil microbiology ». John Wiley & Sons, New York, 1961.
- [5] ALLISON, F. E., The fate of nitrogen applied to soils. *Advanc. Agron.*, 1966, 18, 219-258.
- [6] ALLISON, F. E., CARTER, J. N. & STERLING, L. D., The effect of partial pressure of oxygen on denitrification in soil. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 1960, 24, 283-285.
- [7] AMBROZ, A., *Denitrobacterium thermophilum spec. nova*, ein Beitrag zur Biologie der thermophilen Bakterien. *Zentrbl. Bakt.*, 1913, 37, 3-16.
- [8] AOMINE, S., A review of research on redox potentials of paddy soils in Japan. *Soil Sci.*, 1962, 94, 6-13.
- [9] ARMSTRONG, W., Rhizosphere oxidation in rice: an analysis of intervarietal differences in oxygen flux from the roots. *Plant. Physiol.*, 1969, 22, 296-303.
- [10] ARNOLD, P. W., Losses of nitrous oxide from soil. *J. Soil Sci.*, 1954, 5, 116-138.
- [11] AVNIMELECH, Y., Nitrate transformation in peat. *Soil Sci.*, 1971, 111, 113-118.
- [12] AZAD, M. I. & KHAN, A. A., Reduction of nitrogen losses through denitrification from paddy soil by the application of pesticides. *West Pak. J. Agr. Res.*, 1968, 6, 128-133.
- [13] BAALSBRUD, K. & BAALSBRUD, K. S., Studies on *Thiobacillus denitrificans*. *Arch. Mikrobiol.*, 1954, 20, 34-62.

- [14] BAILEY, L. D. & BEAUCHAMP, E. G., Nitrate reduction and redox potentials measured with permanently and temporarily placed platinum electrodes in saturated soils. *Canad. J. Soil Sci.*, 1971, *51*, 51-58.
- [15] BAILEY, L. D. & BEAUCHAMP, E. G., Effects of temperature on nitrate and nitrite ion reduction, nitrogenous gas production and redox potential in a saturated soil. *Canad. J. Soil Sci.*, 1973, *53*, 213-218.
- [16] BALDENSPERGER, J. & GARCIA, J.-L., Reduction of oxidized nitrogen compounds by a new-strain of *Thiobacillus denitrificans*. *Arch. Mikrobiol.*, 1975 (sous presse).
- [17] BARBER, D. A., EBERT, M. & EVANS, N. T. S., The movement of ^{65}Zn through barley and rice plants. *J. exp. Botany*, 1962, *13*, 397-403.
- [18] BAUZON, D., van den DRIESSCHE, R. & DOMMERGUES, Y., L'effet litière. I. Influence *in situ* des litières forestières sur quelques caractéristiques biologiques des sols. *Oecol. Plant.*, 1969, *4*, 99-122.
- [19] BOLLAG, J. M., ORCUTT, M. L. & BOLLAG, B., Denitrification by isolated soil bacteria under various environmental conditions. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 1970, *34*, 875-879.
- [20] BOULDIN, D. R., Speculations on the oxidation-reduction status of the rhizosphere of rice roots in submerged soils. *Techn. Repts. Ser. Int. At. Energy Agency*, 1958, *65*, 128-139.
- [21] BRANDT, G. H., WOLCOTT, A. R. & ERICKSON, A. E., Nitrogen transformations in soil as related to structure, moisture and oxygen diffusion rate. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 1964, *28*, 71-75.
- [22] BRAR, S. S., Influence of roots on denitrification. *Plant a. Soil*, 1972, *36*, 713-715.
- [23] BREMNER, J. M., Methods of soils analysis, in « Inorganic forms of nitrogen » (part 2) (C. A. Black), Amer. Soc. Agron. Inc. Publ., Madison, 1965.
- [24] BREMNER, J. M. & SHAW, K., Denitrification in soil. II. Factors affecting denitrification. *J. agric. Sci.*, 1958, *51*, 40-52.
- [25] BROADBENT, F. E., Denitrification in some California soils. *Soil Sci.*, 1951, *72*, 129-138.
- [26] BROADBENT, F. E. & CLARK, F., Denitrification, in « Soil nitrogen » (Bartholomew W. V. & Clark F. E.) (p. 344-359). Amer. Soc. Agron. Inc., Madison, 1965.
- [27] BROADBENT, F. E. & STOJANOVIC, B. F., The effect of partial pressure of oxygen on some soil nitrogen transformations. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 1952, *16*, 359-363.
- [28] BROADBENT, F. E. & TUSNEEM, M. E., Losses of nitrogen from some flooded soils in tracer experiments. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 1971, *35*, 922-926.
- [29] BUNDY, L. G. & BREMNER, J. M., Inhibition of nitrification in soils. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 1973, *37*, 396-398.
- [30] BURFORD, J. R. & MILLINGTON, R. J., Nitrous oxide in the atmosphere of a red-brown earth. 9th Int. Congr. Soil Sci., Adelaide II, 1960, 505-511.
- [31] CADY, F. B. & BARTHOLOMEW, M. V., Sequential products of anaerobic denitrification in Norfolk soil material. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 1960, *24*, 477-482.
- [32] CADY, F. B. & BARTHOLOMEW, W. V., Influence of low $p\text{O}_2$ on denitrification processes and products. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 1961, *25*, 362-365.
- [33] CADY, F. B. & BARTHOLOMEW, W. V., Investigations of nitric oxide reactions in soils. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 1963, *27*, 546-549.

- [34] CARTER, J. N. & ALLISON, F. E., Investigations on denitrification in well-aerated soils. *Soil Sci.*, 1960, *90*, 173-177.
- [35] CAWSE, P. A. & SHELDON, D., Rapid reduction of nitrate in soil remoistened after air-drying. *J. agric. Sci.*, 1972, *78*, 405-412.
- [36] CHATELAIN, R., Réduction des nitrites par *Alcaligenes odorans* var. *viridans*. *Ann. Inst. Pasteur*, 1969, *116*, 498-500.
- [37] COOPER, G. S. & SMITH, R. L., Sequence of products formed during denitrification in some diverse western soils. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 1963, *27*, 659-662.
- [38] CORBET, A. S. & WOOLDRIDGE, W. R., The nitrogen cycle in biological systems. 3. Aerobic denitrification in soils. *Biochem. J.*, 1940, *34*, 1036-1040.
- [39] DAVIS, D. H., DOUDOROFF, M. & STANIER, R. Y., Proposal to reject the genus *Hydrogenomonas*: taxonomic implications. *Int. J. syst. Bact.*, 1969, *19*, 375-390.
- [40] DE, P. K. & DIGAR, S., Influence of the rice crop on the loss of nitrogen gas from water-logged soils. *J. agric. Sci.*, 1955, *45*, 280-282.
- [41] DEHERAIN, P. P., La réduction des nitrates dans la terre arable. *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 1897, *124*, 269-273.
- [42] DEHERAIN, P. P. & MAQUENNE, L., Sur la réduction des nitrates dans la terre arable. *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 1882, *95*, 691-693.
- [43] DELAPORTE, B., Trois nouvelles espèces de *Bacillus* : *Bacillus similabadius* n. sp., *Bacillus longisporus* n. sp. et *Bacillus nitritollens* n. sp. *Ann. Inst. Pasteur*, 1972, *123*, 821-834.
- [44] DELWICHE, C. C., Denitrification, in « Inorganic nitrogen metabolism », 1955 (Symposium, McCollum. Pratt Institute, Baltimore) (McElroy W. D. & Glass B.) (p. 233-259). The Johns Hopkins Press, Baltimore, 1956.
- [45] DOMMERGUES, Y., COMBREMONT, R., BECK, G. & OLLAT, C., Note préliminaire concernant la sulfato-réduction rhizosphérique dans un sol salin tunisien. *Rev. Ecol. Biol. Sol*, 1969, *6*, 115-129.
- [46] DOMMERGUES, Y. & MANGENOT, F., « Écologie microbienne du sol ». Masson & Cie, Paris, 1970.
- [47] EKPE, D. M. & CORNFIELD, A. H., Losses, through denitrification, from soil of applied inorganic nitrogen even at low moisture content. *Nature (Lond.)*, 1964, *201*, 322-323.
- [48] EKPE, D. M. & CORNFIELD, A. H., Effect of pH and addition of organic materials on denitrification losses from soil. *Nature (Lond.)*, 1965, *208*, 1200.
- [49] 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.
- [50] 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.
- [51] 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.
- [52] GARCIA, J.-L., Effet rhizosphère du riz sur la dénitrification. *Soil Biol. Biochem.*, 1975, *7* (sous presse).
- [53] GARCIA, J.-L., Évaluation de la dénitrification dans les rizières par la méthode de réduction de N_2O . *Soil Biol. Biochem.*, 1975, *7* (sous presse).

- [54] GARCIA, J.-L., RAIMBAULT, M., JACQ, V., RINAUDO, G. & ROGER, P., Activités microbiennes dans les sols de rizières du Sénégal : relations avec les caractéristiques physico-chimiques et influence de la rhizosphère. *Rev. Ecol. Biol. Sol.*, 1974, *11*, 169-185.
- [55] GAYON, U. & DUPETIT, G., Sur la fermentation des nitrates. *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 1882, *95*, 644-646.
- [56] GAYON, U. & DUPETIT, G., Sur la transformation des nitrates en nitrites. *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 1882, *95*, 1365-1367.
- [57] GAYON, U. & DUPETIT, G., Recherches sur la réduction des nitrates par les infiniments petits. *Soc. Sci. Phys. Nat. Bordeaux*, 1886, *2* (sér. 3), 201-307.
- [58] GILMOUR, C. M., TERESA, G. & BOLLEN, W. B., Determination of soil nitrogen losses in palouse soils. *Bact. Proc.*, 1957, *57*, 9 (A3).
- [59] GORING, C. A. I., Control of nitrification by 2-chloro-6-trichloromethyl pyridine. *Soil Sci.*, 1962, *93*, 211-218.
- [60] GREENLAND, D. J., Is aerobic denitrification important in tropical soils? 6th Int. Congr. Soil Sci., 1956, B, 765-769.
- [61] GREENLAND, D. J., Denitrification in some tropical soils. *J. agric. Sci.*, 1962, *58*, 227-233.
- [62] GREENWOOD, D. J., Nitrification and nitrate dissimilation in soil. I. Method of studying nitrate dissimilation. *Plant a. Soil*, 1962, *17*, 365-377.
- [63] GREENWOOD, D. J., Nitrification and nitrate dissimilation in soil. II. Effect of oxygen concentration. *Plant a. Soil.*, 1962, *17*, 378-391.
- [64] GREENWOOD, D. J., Nitrogen transformations and the distribution of oxygen in soil. *Chem. Ind.*, 1963, 799-803.
- [65] GUIRAUD, G. & BERLIER, Y., Détermination quantitative et isotopique, par spectrométrie de masse, des composés gazeux produits dans la dénitrification. *Chim. anal.*, 1970, *52*, 53-56.
- [66] GUIRAUD, G. & BERLIER, Y., Étude avec l'aide de l'azote 15, de la dénitrification dans le sol notamment en présence de paille enfouie. *C. R. Acad. Agric. Fr.*, 1969, *35*, 1000-1007.
- [67] HAUCK, R. D., Soil and fertilizer nitrogen. A review of recent work and commentary. 9th Int. Congr. Soil Sci. Adelaide II, 1968, 475-486.
- [68] HAUCK, R. D. & MELSTED, S. W., Some aspects of the problem of evaluating denitrification in soils. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 1956, *20*, 361-364.
- [69] HAUCK, R. D., MELSTED, S. M. & YANKWICH, P. E., Use of an isotope distribution in nitrogen gas in the study of denitrification. *Soil Sci.*, 1958, *86*, 287-291.
- [70] HILTBOLD, A. E. & ADAMS, F., Effect of nitrogen volatilization on soil acidity changes due to applied nitrogen. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 1969, *24*, 45-47.
- [71] HUTCHINSON, M., JOHNSTONE, K. I. & WHITE, D., Taxonomy of anaerobic *Thiobacilli*. *J. gen. Microbiol.*, 1967, *47*, 17-23.
- [72] IWASAKI, H. & MATSUBARA, T., A nitrite reductase from *Achromobacter cycloclastes*. *J. Biochem. (Tokyo)*, 1972, *71*, 645-652.
- [73] JANSSON, S. L. & CLARK, F. E., Losses of nitrogen during decomposition of plant material in the presence of inorganic nitrogen. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 1952, *16*, 330-334.
- [74] JENSEN, C. R., STOLZY, L. H. & LETEY, J., Tracer studies of oxygen diffusion through roots of barley, corn and rice. *Soil Sci.*, 1967, *103*, 23-29.
- [75] JONES, E. J., Loss of elemental nitrogen from soils under anaerobic conditions. *Soil Sci.*, 1951, *71*, 193-196.

- [76] JORDAN, J. H. JR, PATRICK, W. H. JR & WILLIS, W. H., Nitrate reduction by bacteria isolated from waterlogged crowley soil. *Soil Sci.*, 1967, *104*, 129-133.
- [77] KHAN, M. F. A. & MOORE, A. W., Losses of added nitrogen from some Alberta soils. *Soil Sci.*, 1968, *106*, 232-234.
- [78] KHAN, M. F. A. & MOORE, A. W., Denitrifying capacity of some Alberta soils. *Canad. J. Soil Sci.*, 1968, *48*, 89-91.
- [79] KLUYVER, A. J., Some aspects of nitrate reduction, in « Microbial metabolism », Symposium, Rome, 1953 (p. 71-91).
- [80] KRASIL'NIKOV, N. A., Interaction between soil microorganisms and plants, in « Soil microorganisms and higher plants » (p. 279-304), 1968, Acad. Sci. USSR.
- [81] LASKOWSKI, D. & MORAGAN, J. T., The effect of nitrate and nitrous oxide on hydrogen and methane accumulation in anaerobically incubated soils. *Plant a. Soil*, 1967, *27*, 357-368.
- [82] LOEWENSTEIN, H., ENGLEBERT, L. E., ATTOE, O. T. & ALLEN, O. N., Nitrogen loss in gaseous form from soils as influenced by fertilizers and management. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 1957, *21*, 397-400.
- [83] LUXMOORE, R. J. & STOLSY, L. H., Oxygen diffusion in the soil-plant system. *Agron. J.*, 1970, *62*, 322-324.
- [84] MACRAE, I. C., ANGAJAS, R. R. & SALANDANAN, S., The fate of nitrate nitrogen in some tropical soils following submergence. *Soil Sci.*, 1968, *105*, 327-334.
- [85] MACURA, J., Interactions nutritionnelles plantes-bactéries et bases expérimentales de la bactérisation des graines. Rapport général. *Ann. Inst. Pasteur*, 1966, *111* (suppl.), 9-38.
- [86] MAHENDRAPPA, M. K. & SMITH, R. L., Some effects of moisture on denitrification in acid and alkaline soils. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 1967, *31*, 212-215.
- [87] MAHMOUD, S. A. Z. & IBRAHIM, A. N., Studies on the rhizosphere microflora of rice. *Acta agron. Acad. Hung.*, 1970, *19*, 71-78.
- [88] MANN, L. D., Anaerobiosis in soils. Measurement of parameters contributing to denitrification. *Diss. Abstr. Int. B.*, 1972, *33*, 2437.
- [89] MANZANO, A. H., Tracer study of some nitrogen transformations in a soil under flooded conditions. *Diss. Abstr. Int. B.*, 1969, *29*, 4475.
- [90] MARTIN, A. E. & ROSS, P. J., A nitrogen-balance study using labelled fertilizer in a gas lysimeter. *Plant a. Soil*, 1968, *28*, 182-186.
- [91] MARTIN, A. E. & SKYRING, G. W., Losses of nitrogen from the soil-plant system. *Commonwealth Bur. Pastures Field Crops Bull.*, 1962, *46*, 19-34.
- [92] MATSUBARA, T. & IWABAKI, H., Enzymatic steps of dissimilatory nitrite reduction in *Alcaligenes faecalis*. *J. Biochem. (Tokyo)*, 1971, *69*, 859-868.
- [93] MCGARITY, J. W., Denitrification studies on some south Australian soils. *Plant a. Soil*, 1961, *14*, 1-21.
- [94] MCGARITY, J. W., Effect of freezing of soil on denitrification. *Nature (Lond.)*, 1962, *196*, 1342-1343.
- [95] MCGARITY, J. W., GILMOUR, C. M. & BOLLEN, W. B., Use of an electrolytic respirometer to study denitrification in soil. *Canad. J. Microbiol.*, 1958, *4*, 303-316.
- [96] MCGARITY, J. W. & HAUCK, R. D., An aerometric apparatus for the evaluation of gaseous nitrogen transformations in fields soils. *Soil Sci.*, 1969, *108*, 335-344.

- [97] MCGARITY, J. W. & MYERS, R. J. K., Denitrifying activity in solodized solonetz soils of eastern Australia. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 1968, **32**, 812-817.
- [98] MEEK, B. D., GRASS, L. B. & MACKENZIE, A. J., Applied nitrogen losses in relation to oxygen status of soils. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 1969, **33**, 575-578.
- [99] MEEK, B. D., GRASS, L. B., WILLARDSON, L. S. & MACKENZIE, A. J., Nitrate transformations in a column with a controlled water table. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 1970, **34**, 235-239.
- [100] MEEK, B. D. & MACKENZIE, A. J., The effect of nitrite and organic matter on aerobic gaseous losses of nitrogen from a calcareous soil. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 1965, **29**, 176-178.
- [101] MEIKLEJOHN, J., Aerobic denitrification. *Ann. appl. Biol.*, 1940, **27**, 558-573.
- [102] MICHROUSTINE, E. N., HAKIM, A., BAZLIEVITCH, S. D. & LEGG, J. O., Le processus de la dénitrification et les pertes de l'azote par le sol. *Ann. Inst. Pasteur*, 1965, **109** (suppl.), 235-247.
- [103] MITSUI, S., WATANABE, J. & HONMA, M., The effect of pesticides on the denitrification in paddy soil. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 1964, **10**, 15-23.
- [104] MYERS, R. J. K. & MCGARITY, J. W., Factors influencing high denitrifying activity in the subsoil of solodized solonetz. *Plant a. Soil*, 1971, **35**, 145-160.
- [105] MYERS, R. J. K. & MCGARITY, J. W., Denitrification in undisturbed cores from a solodized solonetz B horizon. *Plant a. Soil*, 1972, **37**, 81-89.
- [106] NÖMMIK, H., Investigations on denitrification in soil. *Acta Agr. Scand.*, 1956, **6**, 195-228.
- [107] NÖMMIK, H. & THORIN, J., Transformations of ¹⁵N-labelled nitrite and nitrate in forest raw humus during anaerobic incubation, in « Isotopes and radiation in soil plant relationships including forestry » (p. 369-382). IAEA-Vienna, 1972.
- [108] OVERREIN, L. N., Lysimeter studies on tracer nitrogen in forest soil. I. Nitrogen losses by leaching and volatilization after addition of urea N15. *Soil Sci.*, 1968, **106**, 280-290.
- [109] PALLERONI, N. J., DOUDOROFF, M., STANIER, R. Y., SOLANES, R. E. & MANDEL, M., Taxonomy of the aerobic pseudomonas: the properties of the *Pseudomonas stutzeri* group. *J. gen. Microbiol.*, 1970, **60**, 215-231.
- [110] PATNAIK, S., N15 tracer studies on the transformation of applied nitrogen in submerged rice soils. *Proc. Indian Acad. Sci.*, 1965, **61**, 25-30.
- [111] PATRICK, W. H. Jr, Nitrate reduction rates in a submerged soil as affected by redox potential, in « 7th Int. Congr. Soil Sci. Madison », 1960, II (p. 494-500).
- [112] PATRICK, W. H. Jr, PETERSON, F. J. & TURNER, F. T., Nitrification inhibitors for lowland rice. *Soil Sci.*, 1968, **105**, 103-105.
- [113] PATRICK, W. H. Jr & WYATT, R., Soil nitrogen loss as a result of alternate submergence and drying. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 1964, **28**, 647-653.
- [114] PAYNE, W. J., Reduction of nitrogenous oxides by microorganisms. *Bact. Rev.*, 1973, **37**, 409-452.
- [115] PERIGAUD, S., La dynamique de l'azote dans les sols hydromorphes. *Bull. A. F. E. S.*, 1963, **1**, 1-58.
- [116] PICHINOTY, F., L'inhibition par l'oxygène de la dénitrification bactérienne. *Ann. Inst. Pasteur*, 1965, **109** (suppl.), 248-255.

- [117] PICHINOTY, F., La réduction bactérienne des composés oxygénés minéraux de l'azote. *Bull. Inst. Pasteur*, 1973, 71, 317-395.
- [118] PICHINOTY, F. & CHATELAIN, R., Réduction du nitrate, du nitrite et de l'oxyde nitreux par *Alcaligenes denitrificans* et *Alcaligenes odorans*. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 1973, 124 B, 445-449.
- [119] PILOT, L. & PATRICK, W. H. Jr, Nitrate reduction in soils. Effect of soil moisture tension. *Soil Sci.*, 1972, 114, 312-316.
- [120] POCHON, J. & de BARJAC, H., « Traité de microbiologie des sols », Dunod, Paris, 1958.
- [121] POCHON, J. & NAGHIB, A. J., Sur la microflore dénitrifiante des tourbes acides. *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, 90, 510-512.
- [122] PRASAD, R., TURNHEDE, B. B. & DAS, U. K., 2-chloro-6-(trichloromethyl)pyridine for reducing nitrogen losses from upland paddy soils. *Current Sci. (India)*, 1966, 35, 312-313.
- [123] PRATT, P. F., CHAPMAN, H. D. & GRABER, M. J., Gains and losses of nitrogen and depth distribution of nitrogen and inorganic carbon in the soil of a lysimeter investigation. *Soil Sci.*, 1960, 90, 293-297.
- [124] QUASTEL, J. H., Soil metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 1965, 16, 217-240.
- [125] RAIMBAULT, M., RINAUDO, G., GARCIA, J.-L. & BOUREAU, M., Device for the study of gaseous metabolisms in the rice rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.*, 1975 (sous presse).
- [126] REDDY, K. R. & PATRICK, W. H. Jr, Effect of alternate aerobic and anaerobic conditions on redox potential, organic matter decomposition and nitrogen loss in a flooded soil. *Soil Biol. Biochem.*, 1975, 7 (sous presse).
- [127] REDMAN, F. H., Effect of submergence on denitrification and physico-chemical properties of important Louisiana soils. *Diss. Abstr.*, 1965, 25, 5480.
- [128] REDMAN, F. H. & PATRICK, W. H. Jr, Effect of submergence on several biological and chemical soil properties. *Louisiana State Univ. Agric. Expt. Sta. Bull.*, 1965, 592, 28.
- [129] REUSS, J. O. & SMITH, R. L., Chemical reactions of nitrites in acid soils. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 1965, 29, 267-270.
- [130] RIVIÈRE, J., Contribution à l'étude de la rhizosphère du blé. Thèse Fac. Sci. Univ. Paris, 1959, série A, n° 3328, 245 p.
- [131] ROSS, P. J., MARTIN, A. E. & HENZELL, E. F., A gas-tight growth chamber for investigating gaseous nitrogen changes in the soil plant: atmosphere system. *Nature (Lond.)*, 1964, 204, 444-447.
- [132] SCHAEFER, R., Sur la réduction dissimilatrice des nitrates dans les sols hydromorphes. *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 1951, 252, 2591-2593.
- [133] SCHAEFER, R., Influence du régime thermique d'incubation, en particulier d'un gel répété, sur la réduction dissimilative des nitrates dans un mull et un hydromull calciques. *Ann. Inst. Pasteur*, 1964, 107 (suppl. au n° 3), 282-292.
- [134] SCHWARTZBECK, R. A., MCGREGOR, J. M. & SCHMIDT, E. L., Gaseous nitrogen losses from nitrogen fertilized soils measured with infrared and mass spectroscopy. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 1961, 25, 186-189.
- [135] SMITH, D. H. & CLARK, F. E., Some useful techniques and accessories for adaptation of the gas chromatograph to soil nitrogen studies. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 1960, 24, 111-115.
- [136] SMITH, N. R., GORDON, R. E. & CLARK, F. E., Aerobic sporeforming bacteria. *Monogr. U. S. Dep. Agric.*, 1952, n° 16.

- [137] SPERL, G. T. & HOARE, D. S., Denitrification with methanol: a selective enrichment for *Hyphomicrobium* species. *J. Bact.*, 1971, **108**, 733-736.
- [138] STANIER, R. Y., DOUDOROFF, M. & ADELBERG, E. A., « The microbial word » (p. 214). Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs (N. J.), 1970.
- [139] STANIER, R. Y., PALLERONI, N. J. & DOUDOROFF, M., The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. *J. gen. Microbiol.*, 1966, **43**, 159-171.
- [140] STARKEY, R. L., Interrelationships between microorganisms and plant roots in the rhizosphere. *Bact. Rev.*, 1959, **22**, 154-176.
- [141] STEFANSON, R. C., Sealed growth chambers for studies of the effects of plants on the soil atmosphere. *J. Agric. Engng. Res.*, 1970, **15**, 295-301.
- [142] STEFANSON, R. C., Soil denitrification in sealed soil-plant systems. I. Effect of plants soil water content and soil organic matter content. *Plant a. Soil*, 1972, **37**, 113-127.
- [143] STEFANSON, R. C., Soil denitrification in sealed soil-plant systems. II. Effect of soil water content and form of applied nitrogen. *Plant a. Soil*, 1972, **37**, 129-140.
- [144] STEFANSON, R. C., Soil denitrification in sealed soil-plant systems. III. Effect of disturbed and undisturbed soil samples. *Plant a. Soil*, 1972, **37**, 141-149.
- [145] STEFANSON, R. C., Effect of plant growth and form of nitrogen fertilizer on denitrification from south Australian soils. *Austr. J. Soil Res.*, 1972, **10**, 183-195.
- [146] STEFANSON, R. C. & GREENLAND, D. J., Measurement of nitrogen and nitrous oxide evolution from soil-plant systems using sealed growth chambers. *Soil Sci.*, 1970, **109**, 203-206.
- [147] SUZUKI, T., Characteristics of microorganisms in paddy field soils. *Jap. agric. Res. quart.*, 1967, **2**, 8-12.
- [148] TACKETT, J. L., Theory and application of gas chromatography in soil aeration research. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 1968, **32**, 346-350.
- [149] TAYLOR, B. F. & HOARE, S. L., *Thiobacillus denitrificans* as an obligate chemolithotroph. *Bact. Proc.*, 1969, 63.
- [150] TODD, R. L. & NUNER, J. H., Comparison of two techniques for assessing denitrification in terrestrial ecosystems. Contribution from the Eastern Deciduous Forest Biome, 1972, US-IBP, 2 p.
- [151] TROLLDENIER, G., Einfluss der stickstoff und Kaliumernährung von Weizen sowie der Sauerstoffversorgung der Wurzeln auf Bakterienzahl, Wurzelatmung und Denitrifikation in der Rhizosphäre. *Zbl. Bakt.*, I. Abt. Orig., 1971, **126**, 130-141.
- [152] TUSNEEM, M. E. & PATRICK, W. H. Jr, Nitrogen transformations in waterlogged soil. *Louisiana State Univ. Agric. Expt. Sta. Bull.*, 1971, **657**, 75.
- [153] VALERA, C. L., Investigations on the denitrifying flora of the soil. *Diss. Abst.*, 1959, **20**, 1929-1930.
- [154] VALERA, C. L. & ALEXANDER, M., The significance of pH in bacterial denitrification. *Bact. Proc.*, 1959, 25.
- [155] VALERA, C. L. & ALEXANDER, M., Nutrition and physiology of denitrifying bacteria. *Plant a. Soil*, 1961, **15**, 268-280.
- [156] van CLEEMPUT, O., Étude de la dénitrification dans le sol. *Pédologie (Gand)*, 1971, 367-376.
- [157] van CLEEMPUT, O. & BAERT, L., The denitrification process in closed anaerobic conditions of γ -irradiated and non irradiated soil samples. *Meded. Fac. Landbouwwetensch. Gent*, 1972, **37**, 1177-1184.
- [158] van RAALTE, M. H., On the oxygen supply of rice roots. *Ann. Jard. Bot. Buitenzorg*, 1941, **51**, 43-57.

- [159] van SCHREVEN, D. A., Nitrogen transformations in the former subaqueous soils of polders recently reclaimed from lake IJssel. II. Losses of nitrogen due to denitrification and leaching. *Plant a. Soil*, 1963, 18, 163-175.
- [160] VERHOEVEN, W., Aerobic sporeforming nitrate reducing bacteria, Thesis, Uitgeverij Waltman, Delft, 1952.
- [161] WAGNER, G. H. & SMITH, G. E., Nitrogen losses from soils fertilized with different nitrogen carriers. *Soil Sci.*, 1958, 85, 125-129.
- [162] WAKSMAN, S. A., Soil microbiology, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1952.
- [163] WANG, W. C., On the fate of nitrate in soils under flooded conditions. *Mem. Coll. Agric. Nat. Taiwan Univ.*, 1963, 7, 26-35.
- [164] WHEELER, B. E. J., The conversion of amino-acids in soils. II. Denitrification in percolated soils. *Plant a. Soil*, 1963, 19, 219-232.
- [165] WIJLER, J. & DELWICHE, C. C., Investigations on the denitrifying process in soil. *Plant a. Soil*, 1954, 5, 155-169.
- [166] WOLDENDORP, J. W., The quantitative influence of the rhizosphere on denitrification. *Plant a. Soil*, 1962, 17, 267-270.
- [167] WOLDENDORP, J. W., The influence of living plants on denitrification. *Meded. Landbhoogesch. Wageningen*, 1963, 63, 1-100.
- [168] WOLDENDORP, J. W., L'influence des plantes vivantes sur la dénitrification. *Ann. Inst. Pasteur*, 1963, 105, 426-433.
- [169] WOLDENDORP, J. W., Losses of soil nitrogen. *Stikstof*, 1968, 12, 32-46.
- [170] WOLF, J. & BARKER, A. N., The genus *Bacillus* : aids to the identification of its species, in « Identification methods for microbiologists » (Gibbs, B. M. et Shapton, D. A.) (part B, 93-109). Academic Press, New York, 1968.
- [171] WU, M. M. II., Microbiological studies of the rhizosphere of rice in the poorly drained paddy soil. *Soils Fertil. Taiwan*, 1967, 23-31.
- [172] YAMANE, I., Nitrate reduction and denitrification in flooded soil. *Soil Plant food.*, 1957, 3, 100-103.
- [173] YAMANE, I., Reduction of nitrate and sulfate in submerged soils with special reference to redox potential and water-soluble sugar content of soils. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 1969, 139-148.

II - E T U D E S U R L E S O L

A - S O L N U

1 - Influence des facteurs physico-chimiques

article 2

article 2

Activités microbiennes dans les sols de rizières du Sénégal : Relations avec les caractéristiques physico-chimiques et influence de la rhizosphère

PAR

J.-L. GARCIA, M. RAIMBAULT, V. JACQ, G. RINAUDO et P. ROGER

Laboratoire de Microbiologie du sol de l'O.R.S.T.O.M., B.P. 1386, Dakar - Sénégal

INTRODUCTION

L'influence des facteurs physiques et chimiques et de la rhizosphère du riz sur les activités microbiennes des sols hydromorphes a déjà fait l'objet de nombreuses publications. Dans des sols de Louisiane a notamment été étudiée l'influence de la submersion sur la réduction des nitrates (REDMAN et PATRICK, 1965) et sur la réduction des sulfates (CONNEL et PATRICK, 1968). Au Japon, OKUDA et YAMAGUCHI (1956) ont analysé l'influence des propriétés de différents sols de rizières sur l'activité des cyanophycées fixatrices de N_2 tandis que YAMANE (1958) s'est intéressé à la formation du méthane. Enfin RINAUDO et coll. (1971) ont étudié la fixation non symbiotique de N_2 dans les sols de rizières de Côte d'Ivoire. Ces différentes activités microbiennes ont toujours été étudiées séparément sur des sols provenant de régions éloignées, ce qui rend difficile toute comparaison.

Pour cette raison, nous avons évalué sur un même lot d'échantillons de sols de rizières : (1) la fixation de N_2 (a) par les cyanophycées, (b) par les bactéries libres dans la rhizosphère du riz, (2) la nitrification, (3) la dénitrification, (4) la sulfato-réduction, (5) la formation biologique du méthane.

GÉNÉRALITÉS

Au Sénégal, les rizières sont essentiellement localisées dans le sud du pays (région de Casamance) et dans le nord (région du delta du fleuve Sénégal). Les rizières artisanales de Casamance sont cultivées en billons dans leur grande majo-

TABLEAU I

Caractéristiques physico-chimiques des sols étudiés

N°	Localité	Argile %	Limon %	Sable %	Texture ⁽¹⁾	Teneur en					Rapport C/N	Conductivité mmhos/cm	
						C. organique ‰	C ‰	N ‰	S-SO ₄ ppm	N-NO ₃ ppm			Cl meq/100 g
1	Boutolot.....	2,75	15,28	76,59	S L	6,49	3,77	0,38	89	0	0	9,9	0,27
2	Bignona.....	49,75	13,57	10,39	A	17,38	27,50	1,93	286	0	3,73	14,2	0,50
3	Medina.....	66,00	21,28	1,68	A	29,60	17,18	0,61	1 600	0	13,37	28,1	1,76
4	Medina.....	27,50	25,13	18,13	L A	15,95	89,93	3,08	1 547	0	23,01	29,0	2,84
5	Medina.....	65,75	18,80	1,74	A	19,38	11,25	0,58	1 430	0	12,89	19,4	4,65
6	Kamoboul.....	12,00	20,42	62,45	L S	12,94	7,51	0,63	70	2,4	0	11,9	0,05
7	Loudia.....	4,00	8,98	82,61	S L	35,82	20,79	1,34	69	3,0	0	15,5	0,05
8	Oussouye.....	13,50	19,15	65,41	L S	25,84	15,00	1,12	83	3,2	0	13,3	0,06
9	Dar-Salam.....	32,00	28,93	12,46	L A	26,69	15,49	4,35	1 690	0,8	41,85	3,5	4,50
10	Djibefor.....	15,75	23,54	36,71	L A S	56,79	32,96	2,49	208	6,6	0	13,2	0,08
11	Djibefor.....	21,00	32,84	39,33	L	10,13	23,29	1,48	53	0	4,13	15,7	0,72
12	Djibefor.....	13,00	25,56	56,14	L S	20,33	11,80	0,81	244	0,6	0	14,5	0,11
13	Niaguise.....	36,00	25,61	31,09	L A	26,52	15,39	1,01	402	0	1,58	15,2	0,32
14	Sibink.....	8,00	30,58	46,24	L S	15,90	9,23	0,49	95	1,2	0	18,8	0,08
15	Goudomp.....	16,00	13,62	67,64	L S	15,39	8,93	0,63	84	5,7	0,80	14,1	0,11
16	Bambato.....	5,75	24,00	41,77	L S	35,89	20,83	1,71	77	0	0	12,1	0,04
17	Tauaff.....	26,00	23,28	32,05	L A	12,33	24,57	1,42	67	0	0	17,3	0,11
18	Diango.....	32,00	26,10	32,66	L A	31,31	18,17	1,29	94	4,0	1,16	14,0	0,22
19	Bounkilinn.....	38,50	30,83	17,97	A	39,37	22,86	1,48	71	0	0,96	15,4	0,19
20	Kaolack.....	4,25	57,67	36,64	L F	12,30	7,14	0,63	144	9,8	1,82	11,3	0,28
21	Enanpor.....	25,50	7,89	57,84	L A S	27,55	15,99	0,78	426	0	13,17	20,5	1,84
22	Medina.....	35,75	25,44	6,64	A	127,00	73,71	2,94	103	0	10,11	25,0	5,30
23	Thiaroye.....	18,75	15,91	57,91	L A S	31,79	18,45	1,34	995	41,8	5,37	13,7	1,67
24	Djibefor.....	31,50	29,00	32,70	L A	68,00	38,20	3,00	478	0	0	12,7	0,11
25	Ross-Belbio.....	60,50	20,15	10,55	A	22,98	13,34	0,76	162	0,5	1,24	17,5	0,29
26	Boundoum.....	47,75	18,74	20,72	A	23,24	13,49	0,58	204	0	0,96	23,2	0,23
27	Niagar.....	34,75	22,60	32,83	L A	12,03	6,98	0,59	86	0	0,62	11,8	0,19
28	Keur-Diallo.....	27,50	26,09	37,79	L A	11,35	6,59	0,38	72	0	0	17,3	0,08
29	Bafingor.....	40,00	26,89	36,85	L A	15,80	9,13	0,35	86	0	7,35	26,1	0,99

(1) Texture : A : argile, L A : limon argileux ; L A S : limon argilo-sableux ; L F : limon fin ; L S : limon sableux ; S L : sable limoneux.

rité et le riz y est repiqué ; dans la région du fleuve Sénégal, par contre, les rizières sont planes, plus étendues et le riz y est semé mécaniquement.

Nous avons prélevé 29 échantillons de sols de rizières bien représentatives ; les échantillons ont été séchés à l'air et tamisés à 2 mm. L'analyse de leurs propriétés physiques et chimiques a été effectuée suivant les méthodes classiques d'analyse des sols (tableau I). Nous avons mesuré au laboratoire les variations hebdomadaires du pH et du Eh au cours de la submersion de tous les échantillons de sols incubés à 30° C sous une couche d'eau de 2 cm, pendant un mois.

Pour l'étude de l'influence de la rhizosphère du riz, la variété IR8 a été cultivée sur l'ensemble des échantillons de sols, dans des colonnes de terre en boîtes plates de matière plastique transparente (DOMMERS et coll., 1969) à raison de 10 plants par boîte. Pour chaque sol, 2 boîtes sont plantées et une boîte non plantée constitue le témoin. Le sol a été maintenu par arrosage quotidien, à une humidité proche de la capacité au champ pendant 15 jours, puis engorgé par immersion pendant les 45 jours suivants. Pour expliquer les variations observées dans les différentes activités microbiennes, tous les résultats ont été soumis à une analyse statistique et plus précisément au test de corrélation des rangs de SPEARMAN décrit par BAUZZON et coll. (1969).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

I. — Variation du pH et du Eh au cours de la submersion.

Les résultats (tableau II) montrent que pour 6 sols (N^{os} 1, 3, 5, 9, 22 et 29) le pH et le Eh ont très peu varié ; il s'agit de sols acides, plus précisément d'anciennes mangroves aménagées pour la riziculture, à l'exception du sol N^o 1 qui est très sableux et pauvre en carbone organique.

Pour tous les autres sols, le pH, acide au départ, augmente plus ou moins rapidement pour se stabiliser à une valeur supérieure à 6,0 tandis que le Eh diminue puis se fixe vers — 100 mV. Pour les sols N^{os} 18 et 26, le pH qui est supérieur à 6,0 n'évolue pas au cours de la submersion. En appliquant le test de corrélation des rangs de SPEARMAN, nous avons trouvé une corrélation inverse hautement significative entre le pH après 3 semaines de submersion et la teneur en chlorures des sols.

II. — Croissance du riz en vases de végétation.

La croissance a été exprimée par le poids sec du matériel végétal de l'ensemble des plants de riz obtenus (tableau III). Le riz n'a pas poussé sur les sols N^{os} 3, 4, 5, 6 et 29 où les graines ont été tuées par sulfato-réduction spERMOSPHÉRIQUE (voir § VI). Les sols N^{os} 1, 2, 13, 18 et 22 ont montré une croissance faible tandis que les meilleurs sols se révélaient être dans l'ensemble, ceux des stations expérimentales.

III. — Fixation potentielle de N₂.

1. Fixation algale dans les sols de Casamance.

— Mesure de la fixation de N₂ :

Des échantillons de 2 g de sol séché à l'air sont introduits dans des fioles de 10 ml puis submergés sous une lame d'eau de 1 mm. Ces fioles, dont la moitié est

TABLEAU II

Variation du pH et du Eh au cours de la submersion

N°	Localité	pH					Eh (Volts)				
		initial	1 sem.	2 sem.	3 sem.	4 sem.	initial	1 sem.	2 sem.	3 sem.	4 sem.
1	Boulolal.....	5,2	6,2	5,6	5,9	5,2	+ 0,270	+ 0,165	+ 0,220	+ 0,230	+ 0,385
2	Bignona.....	4,3	4,9	4,1	5,0	6,2	+ 0,395	+ 0,200	+ 0,230	+ 0,115	-- 0,085
3	Medina.....	4,0	3,2	2,7	3,0	3,2	+ 0,375	+ 0,380	+ 0,395	+ 0,400	+ 0,395
4	Medina.....	4,3	4,7	4,9	5,0	5,7	+ 0,360	+ 0,105	+ 0,075	+ 0,060	-- 0,050
5	Medina.....	4,2	3,4	3,35	3,35	3,5	+ 0,400	+ 0,355	+ 0,370	+ 0,365	+ 0,375
6	Kamobeul.....	5,2	5,7	5,8	6,2	6,1	+ 0,370	-- 0,040	-- 0,035	-- 0,075	-- 0,035
7	Loudia.....	5,3	6,45	5,5	6,35	6,45	+ 0,350	-- 0,040	-- 0,005	-- 0,055	-- 0,055
8	Oussouye.....	5,5	6,8	5,9	6,7	6,65	+ 0,360	-- 0,135	-- 0,110	-- 0,145	-- 0,130
9	Dar-Salam.....	4,6	4,95	4,2	4,9	5,2	+ 0,375	-- 0,080	+ 0,045	-- 0,010	+ 0,090
10	Djibelor.....	5,3	6,0	6,1	6,1	6,1	+ 0,370	-- 0,100	-- 0,105	-- 0,155	-- 0,085
11	Djibelor.....	5,4	5,8	6,2	6,2	6,5	+ 0,345	-- 0,060	-- 0,140	-- 0,135	-- 0,150
12	Djibelor.....	4,8	5,4	6,25	6,1	6,3	+ 0,400	+ 0,045	-- 0,080	-- 0,015	-- 0,050
13	Niaguise.....	4,6	5,1	6,2	6,4	6,55	+ 0,410	+ 0,030	-- 0,105	-- 0,175	-- 0,180
14	Sibink.....	4,6	5,7	6,5	6,55	6,2	+ 0,435	-- 0,025	-- 0,155	-- 0,170	-- 0,035
15	Goudomp.....	4,7	5,4	6,0	6,4	6,4	+ 0,485	+ 0,145	-- 0,065	-- 0,155	-- 0,135
16	Bambato.....	5,6	6,35	6,6	6,5	6,4	+ 0,415	-- 0,125	-- 0,145	-- 0,160	-- 0,120
17	Tanaff.....	5,0	6,3	6,5	6,3	6,35	+ 0,495	-- 0,095	-- 0,100	-- 0,120	-- 0,105
18	Diango.....	4,8	5,3	6,2	6,3	6,4	+ 0,500	+ 0,270	-- 0,010	-- 0,120	-- 0,090
19	Boungilinn.....	4,5	4,3	5,5	5,8	6,05	+ 0,500	+ 0,400	+ 0,240	+ 0,030	-- 0,040
20	Kaolack.....	5,6	6,0	6,6	6,5	6,5	+ 0,450	-- 0,015	-- 0,120	-- 0,150	-- 0,165
21	Enanpor.....	5,4	5,6	6,4	6,25	6,2	+ 0,445	+ 0,230	-- 0,090	-- 0,170	-- 0,095
22	Medina.....	4,5	3,65	4,6	4,45	4,3	+ 0,395	+ 0,310	+ 0,115	+ 0,110	+ 0,110
23	Thiaroye.....	4,6	4,75	6,0	5,95	5,9	+ 0,485	+ 0,275	-- 0,115	-- 0,160	-- 0,130
24	Djibelor.....	4,3	5,4	5,9	6,0	6,0	+ 0,405	+ 0,095	-- 0,035	-- 0,045	-- 0,045
25	Ross-Bethio.....	4,6	5,6	6,0	6,1	6,05	+ 0,465	+ 0,185	-- 0,050	-- 0,080	-- 0,105
26	Boundoum.....	6,3	6,2	6,45	6,5	6,5	+ 0,385	+ 0,250	-- 0,025	-- 0,085	-- 0,100
27	Niagar.....	5,4	6,0	6,2	6,4	6,4	+ 0,480	+ 0,225	+ 0,025	-- 0,080	-- 0,090
28	Keur-Diallo.....	6,8	6,65	6,7	6,75	6,8	+ 0,380	+ 0,030	-- 0,125	-- 0,115	-- 0,140
29	Balingor.....	4,1	4,2	4,6	4,7	4,5	+ 0,450	+ 0,385	+ 0,275	+ 0,250	+ 0,325

entourée de papier d'aluminium afin d'obtenir des témoins dans lesquels les algues ne se développent pas, sont placées pendant 21 jours dans un phytotron. Le niveau d'eau est régulièrement ajusté pour compenser les pertes par évaporation. A la fin de l'incubation, on effectue directement dans les fioles une mesure de réduction de l'acétylène (STEWART et coll., 1967). Pour chaque sol, 5 répétitions ont été faites. La fixation algale est mesurée par différence entre les fioles incubées à la lumière et celles incubées à l'obscurité.

Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau III. Pour les sols étudiés, à l'exception du N° 1 très sableux, on n'observe pas de fixation algale en dessous de pH = 6,0 sous eau. Il ne semble pas exister de corrélation entre l'intensité de la fixation de N₂ et le pH du sol. Les fixations mesurées sont faibles, à l'exception du sol N° 13. A titre indicatif, une réduction de 10 nmoles de C₂H₄/g/h correspondrait approximativement à une fixation de 60 kg de N₂ par hectare et par an si le sol, non planté, était placé constamment dans les conditions de submersion utilisées pour l'expérience, avec une période d'éclairement de 10 h/j.

— *Numération des cyanophycées :*

La numération des cyanophycées a été faite par la méthode des suspensions-dilutions sur milieu de WATANABE (1959) qui renferme par litre : K₂HPO₄, 0,3 g ; MgSO₄, 7H₂O, 0,2 g ; CaCl₂, 0,05 g ; FeCl₃, traces.

Le nombre de cyanophycées fixatrices de N₂ varie entre 0 et 6 × 10⁶ par gramme de sol sec (tableau III). Le test de SPEARMAN a été utilisé pour rechercher l'existence d'une corrélation entre la densité de ces organismes et le pH du sol. La corrélation est positive et hautement significative dans les trois cas étudiés : pH initial, pH après 3 semaines de submersion et pH intermédiaire. En ce qui concerne les sols submergés étudiés, la valeur pH = 5 mesurée après un mois d'incubation semble constituer la limite inférieure compatible avec la présence de cyanophycées. En effet, dans 3 sols de pH inférieur à 5,0, ces organismes étaient absents.

2. *Fixation de N₂ par les bactéries libres dans la rhizosphère du riz.*

L'expérimentation a porté sur 23 sols, le riz ne poussant pas dans les N°s 3, 4, 5, 21, 22 et 29. Pour chacun des sols, le dispositif expérimental suivant a été utilisé : microcolonnes de sol de 12 × 120 mm (tubes en pyrex)ensemencées avec une graine de riz IR8 prégermée pour le sol rhizosphérique et microcolonnes de sol nonensemencées pour le sol non rhizosphérique. La photopériode comportait 14 h d'éclairement à 20 000 lux. La fixation de N₂ a été estimée au 15^e jour par la méthode de réduction de l'acétylène (RINAUDO et coll., 1971).

Les résultats obtenus (tableau III) ont été exprimés à la fois en nanomoles d'éthylène et en microgrammes de N₂ (1 nmole C₂H₄/h correspond à 0,224 µg N₂/j). Il a été en effet démontré que la fixation de N₂ pouvait être valablement estimée par la méthode de réduction de l'acétylène en se basant sur le facteur de conversion « C₂H₄ : N₂ = 3 » (RINAUDO et DOMMERGUES, 1971). Aucune corrélation n'a pu être observée entre la fixation rhizosphérique de N₂ et les différentes caractéristiques physico-chimiques des sols. Il convient toutefois de faire les deux remarques suivantes (a) la fixation de N₂ dans la rhizosphère est très étroitement liée à la croissance de la plante qui dépend elle-même de la richesse du sol ; (b) les sols N°s 3, 4, 5, 21, 22 et 29 sur lesquels le riz n'a pas poussé dans les conditions expérimentales, n'ont pas été retenus pour les recherches de corrélation. Si toutefois on tient compte de ces sols en leur attribuant une activité fixatrice nulle, une corrélation inverse et hautement significative peut être observée entre la fixation de N₂ et la teneur en chlorures.

IV. — Nitrification.

L'étude de l'azote nitrifiable a porté sur l'ensemble des sols ; pour chaque sol, une série d'échantillons est mise en incubation pendant 7 semaines à 30° C en aérobiose, à l'humidité équivalente sans apport de substrat. Chaque semaine, 3 échantillons sont prélevés pour le dosage de la teneur en nitrates (méthode à l'acide 2-4 phénol-disulfonique). Les courbes représentatives de l'apparition des nitrates présentent une phase de latence plus ou moins longue, puis une zone d'activité maximale pour laquelle il est possible d'évaluer une vitesse maximum de nitrification et pour certaines d'entre elles, un maximum de production de N-NO.

Les résultats, rapportés au tableau III, ont été soumis au test de SPEARMAN avec certaines données de l'analyse des sols. Les corrélations suivantes ont pu être ainsi établies (tableau VI) :

- une corrélation inverse faiblement significative entre la quantité de N-NO₃ obtenue après 7 semaines d'incubation et la conductivité des sols ;
- une corrélation inverse faiblement significative entre la vitesse maximale de nitrification et la conductivité des sols ;
- une corrélation inverse faiblement significative entre le délai d'apparition des nitrates et le pH des sols.

Dans les sols de rizières du Sénégal, l'azote nitrifiable semble donc dépendre de la salinité et du pH des sols : le délai d'apparition des nitrates est d'autant plus court que le pH est plus élevé et la vitesse de formation ainsi que la quantité produite sont d'autant plus élevées que la salinité est plus faible.

V. — Dénitrification.

Cette étude a porté essentiellement sur la mesure de la dénitrification potentielle des sols et la numération des bactéries dénitrifiantes.

— Mesure du potentiel dénitrifiant :

Nous désignons par potentiel dénitrifiant le temps nécessaire pour la dénitrification du maximum du nitrate ajouté.

Les mesures ont été effectuées à l'aide de la méthode manométrique de WARBURG décrite par Mc GARTY (1961) ; on a ajouté 100 ppm de N-NO₃ sous forme de KNO₃ à 25 g de sol ajusté à l'humidité équivalente et mis en incubation à 30° C dans des fioles de 130 ml environ, sous atmosphère d'azote très pur. Des mesures de pression sont effectuées toutes les 3 à 4 h pendant plusieurs jours.

Les valeurs du potentiel dénitrifiant des sols obtenues en faisant la moyenne de 3 répétitions, montrent une très grande diversité (tableau III) ; la durée totale de dénitrification varie entre 40 et 1 500 h, les temps élevés ayant été obtenus par extrapolation. Pour tenter d'expliquer ces variations, nous avons cherché à savoir si cette activité microbienne était en corrélation avec certaines données physico-chimiques des sols. En attribuant le rang 1 au temps de dénitrification le plus court et aux données physico-chimiques les plus élevées, nous avons observé (tableau VI) :

- une corrélation positive hautement significative avec la teneur en carbone organique ;

— une corrélation inverse hautement significative avec la conductivité et la teneur en chlorures ;

— une corrélation positive faiblement significative avec le pH obtenu après une semaine de submersion, correspondant au pH effectif lors de la dénitrification.

Il n'a pas été possible de mettre en évidence une corrélation entre le potentiel dénitrifiant et la teneur en argile des sols, contrairement à ce qui a été observé par REDMAN et PATRICK (1965) sur 26 sols hydromorphes de Louisiane.

Nous retrouvons donc pour les sols de rizières du Sénégal, des résultats déjà décrits dans la littérature concernant la dénitrification, avec cependant une précision supplémentaire relative à l'effet de la salinité.

— Numération des bactéries dénitrifiantes :

Le nombre de bactéries dénitrifiantes a été déterminé par la méthode du nombre le plus probable (MPN) de Mc CRADY, en ensemençant 1 ml de chaque dilution de sol dans des tubes à essais de 12 × 120 mm contenant le milieu faiblement gélosé suivant : Na_2HPO_4 , 12H₂O, 3,575 g ; KH_2PO_4 , 0,980 g ; MgSO_4 , 0,030 g ; extrait de levure Difco, 1 g ; bacto-peptone Difco, 1 g ; succinate de sodium, 10 g ; KNO_3 , 10 g ; bacto-agar Difco, 2 g ; eau distillée q.s.p. 1 000 ml. Après ensemencement, on recouvre le milieu avec 2 à 3 ml d'agar mou à 5 p. mille et on met en incubation à 30° C pendant 15 jours. Les tubes sont comptés comme positifs lorsqu'il y a eu formation de bulles de gaz.

Le test de corrélation des rangs montre qu'il existe une corrélation positive faiblement significative entre le nombre initial de bactéries dénitrifiantes et le potentiel dénitrifiant des sols. Il semble que cette corrélation dépende essentiellement de la teneur en chlorures, car si le nombre de bactéries dénitrifiantes ne présente pas de corrélation avec la teneur en carbone organique, il présente, comme le potentiel dénitrifiant, une corrélation inverse hautement significative avec la teneur en chlorures.

Ceci nous a conduit à séparer les échantillons de sols en 2 classes distinctes suivant leur teneur en chlorures. Dans la classe des sols non salés (effectif 11), le potentiel dénitrifiant présente une corrélation uniquement avec la teneur en carbone organique : elle est positive et hautement significative. Par contre, dans la classe des sols salés (effectif 18), il présente une corrélation uniquement avec le nombre de bactéries dénitrifiantes : elle est positive et faiblement significative.

Enfin, le nombre initial de bactéries dénitrifiantes présente une corrélation positive hautement significative avec le pH après une semaine de submersion, ce qui confirme les conclusions de VALERA et ALEXANDER (1961).

VI. — Sulfato-réduction.

— Estimation de la sulfato-réduction :

Le riz a été cultivé sur l'ensemble des sols dans des boîtes plates en matière plastique décrites précédemment ; à la fin de la culture, nous avons noté, à travers les parois transparentes des boîtes, la présence et l'importance des tâches noires de sulfures autour des graines (sulfato-réduction spermosphérique), le long des

TABLEAU III

Croissance du riz et activités microbiennes des sols de rizières du Sénégal

N°	SOLS Localité	CROIS- SANGE DU RIZ Mat. Vég. poids sec en g	FIXATION DE N ₂				AZOTE NITRIFIABLE			DÉNITRIFICATION	
			CYANOPHYCÉES		RIZOSPHERE		ppm N-NO ₂ formés en 7 semaines	Vitesse de nitrifi- cation ppm/100 h	latence en h	Temps den. 100 ppm N-NO ₂ en h = Potentiel Dénitrifiant	Germs /g sol sec (log ₁₀)
			Fixation nmoles C ₂ H ₄ /g/h	Densité /g sol (log ₁₀)	nmoles C ₂ H ₄ /g/h	µg N /g/j					
1	Boulolal.....	2,12	1,4	3,90	0,4	0,09	5,5	1,25	800	600	2,15
2	Bignona.....	1,35	0	2,15	3,0	0,67	10	2,25	800	200	4,48
3	Medina.....	0	0	n	0	0	14	3,50	800	650	1,70
4	Medina.....	0	0	2,04	0	0	21,5	5,50	800	200	4,23
5	Medina.....	0	0	n	0	0	2,5	0,30	800	> 1 500	1,90
6	Kamoboul.....	0	0,4	3,90	4,9	1,10	35	9,20	800	250	3,54
7	Loudia.....	4,30	0	4,90	4,7	1,05	50	9,30	660	100	3,85
8	Oussouye.....	4,39	2,0	5,54	15,2	3,40	39	10,00	600	75	5,23
9	Dar-Salam.....	5,39	0	n	0	0	n.d.	n.d.	n.d.	100	3,04
10	Djibelor.....	7,06	4,4	4,65	10,2	2,28	25	10,00	700	40	4,98
11	Djibelor.....	6,72	n.d.	n.d.	18,6	4,17	1,8	0,35	550	250	4,24
12	Djibelor.....	3,80	0	3,54	6,0	0,13	2,4	0,50	650	350	4,40
13	Niagnisse.....	1,33	8,0	6,20	1,6	0,36	0	0	> 1 200	200	4,11
14	Sibink.....	3,95	3,6	2,70	10,2	2,28	12	2,00	700	110	3,60
15	Goudomp.....	4,82	0,8	1,90	6,2	1,39	26	5,00	500	300	3,48
16	Bambato.....	4,34	0	6,78	2,2	0,49	14	3,00	700	70	3,85
17	Tanaff.....	7,85	n.d.	n.d.	8,1	1,81	15	3,00	800	110	4,48
18	Diango.....	2,42	0	4,30	1,3	0,29	32,5	7,00	500	220	4,98
19	Bouakilinn.....	2,60	0	2,40	8,8	1,97	3,3	0,30	400	90	3,95
20	Kaolack.....	3,90	0	2,90	11,5	2,58	15	1,30	200	750	3,95
21	Enanpor.....	3,61	0	0	0	0	1,8	0,35	550	500	3,40
22	Medina.....	1,82	0	0	0	0	n.d.	n.d.	n.d.	> 1 500	2,11
23	Thiaroye.....	6,00	0,2	0,04	0,04	0,04	58	9,00	400	110	3,98
24	Djibelor.....	6,20	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	60	4,54
25	Ross-Bethio.....	4,92	n.d.	n.d.	13,5	3,02	10	2,60	800	180	5,15
26	Boundoum.....	1,23	0	0	21,4	4,79	23	4,00	200	180	5,40
27	Ntiagar.....	4,31	0	0	7,3	1,61	7	2,00	700	1 000	5,19
28	Keur-Diallo.....	2,18	0	0	10,1	2,26	n.d.	n.d.	n.d.	260	5,34
29	Balingor.....	0	0	0	0	0	n.d.	n.d.	n.d.	750	2,54

n : absence de cyanophycée, n.d. : non déterminé.

racines (sulfato-réduction rhizosphérique) et dans l'ensemble du sol planté ou non (sulfato-réduction diffuse).

Nous définissons le potentiel sulfato-réducteur par le pourcentage de plantes mortes après 60 jours, ayant succombé par sulfato-réduction spermosphérique pendant la germination ou par sulfato-réduction rhizosphérique pendant la croissance. Il a été vérifié que chaque graine morte est bien entourée d'une gaine de sulfure ferreux, et que les plantes mortes ont bien leurs racines couvertes de la même gaine. Pour exprimer les résultats, nous avons défini des échelles d'intensité de 0 à 5 (tableau V). Pour les différentes formes de sulfato-réduction, il a été tenu compte de pourcentage de survie des graines, ou de l'état de la plante, et de l'importance des taches de sulfures.

TABLEAU V
Échelle d'intensité de la sulfato-réduction
et estimation du risque total (Potentiel sulfato-réducteur)

Critères choisis		SULFATO-RÉDUCTION			POTENTIEL SULFATO-RÉDUCTEUR = Risque total estimé		
		Spermosphérique	Rhizosphérique	Diffuse	Pourcentage de plants morts au 60 ^e jour		
		Pourcentage de graines mortes en cours de germination	Pourcentage de plants morts en cours de croissance	Étendue des taches hors spermosphère et rhizosphère			
Échelle d'intensité	0	absence de sulfures	0	0	croissance normale	aucune tache	0
	1	sulfures en quantités croissantes	0 à 20	0	croissance ralentie	taches petites et rares	0 à 20
	2		20 à 50	0	croissance arrêtée	taches petites et nombreuses	20 à 50
	3		50 à 80	0		taches étendues	50 à 80
	4		80 à 100	0 à 50		taches très étendues	80 à 90
	5	100	50 à 100			horizon noirci en totalité	90 à 100

Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau IV. En appliquant le test de corrélation des rangs de SPEARMAN entre, d'une part les intensités des différentes formes de sulfato-réduction et le potentiel sulfato-réducteur, et d'autre part, certaines propriétés physico-chimiques des sols, sont apparues les corrélations suivantes (tableau VI) :

— une corrélation positive faiblement significative entre la teneur en argile et les sulfato-réductions spermosphérique et rhizosphérique et le potentiel sulfato-réducteur ;

— une corrélation inverse faiblement significative entre le pH initial et la sulfato-réduction spermosphérique, et hautement significative entre le pH initial et la sulfato-réduction rhizosphérique et le potentiel sulfato-réducteur ;

— une corrélation positive faiblement significative entre la conductivité et les sulfato-réductions spermosphérique et rhizosphérique et le potentiel sulfato-réducteur ;

— une corrélation positive faiblement significative entre la teneur en sulfate et la sulfato-réduction rhizosphérique et le potentiel sulfato-réducteur ;

— une corrélation positive hautement significative entre les intensités des sulfato-réductions spermosphérique et rhizosphérique : les sols sensibles à la première forme le sont aussi à la seconde mais la réciproque n'est pas vraie.

Dans les sols de rizières de Casamance, l'intensité de la sulfato-réduction est à relier à l'origine pédologique : les sols les plus sensibles sont ceux qui ont été aménagés sur d'anciennes mangroves. Dans les sols du delta du fleuve Sénégal, formés sur alluvions fluvio-marines, la sulfato-réduction peut se manifester même dans des sols peu acides. Rappelons que des études préliminaires (JACO, 1970) ont montré que la sulfato-réduction ne survient que dans des sols engorgés et suffisamment riches en sulfates. Signalons également que l'accumulation de sulfures produits par des bactéries sulfato-réductrices a été constatée *in situ* en 1971 : a) dans la spermosphère du riz semé dans le sol alluvial de Boundoum où elle a provoqué la mort de la totalité du semis, b) dans la rhizosphère du riz cultivé dans une rizière artisanale, récemment créée sur une ancienne mangrove à Balingor en Casamance où les jeunes plants ont rapidement péri.

Dans cette étude, la sulfato-réduction spermosphérique a été mise en évidence pour un tiers des sols testés. En Casamance, les pertes dues à cette forme de sulfato-réduction sont réduites car le riz est repiqué ; par contre dans la région du fleuve Sénégal, les pertes peuvent être importantes puisque le riz est semé directement en place par des procédés mécaniques. La sulfato-réduction rhizosphérique est beaucoup plus fréquente et apparaît à des degrés divers dans presque tous les sols testés. La culture en « billons », comme elle est pratiquée en Casamance, permet de lutter efficacement contre la sulfato-réduction en maintenant une partie des racines au-dessus du niveau de la nappe.

— Numération des bactéries sulfato-réductrices :

Les bactéries sulfato-réductrices ont été dénombrées dans le milieu liquide de STARKEY modifié par ABD-EL-MALEK (1958) et PICHINOTY (1966) selon la méthode du nombre le plus probable (MPN).

Les résultats sont rapportés dans le tableau IV. En appliquant le test de corrélation des rangs, nous avons observé (tableau VI) :

— une corrélation positive hautement significative avec la teneur en argile ;

— une corrélation inverse hautement significative avec le pH initial ;

— une corrélation positive faiblement significative avec la conductivité ;

— une corrélation positive hautement significative avec la teneur en sulfates ;

— une corrélation positive hautement significative avec la sulfato-réduction rhizosphérique et le potentiel sulfato-réducteur.

Le nombre de bactéries sulfato-réductrices est donc d'autant plus grand que le sol est plus argileux, plus riche en sulfates, plus salé et à pH plus bas.

VII. — Formation biologique du méthane.

— Mesure du pouvoir méthanigène :

Pour déterminer le pouvoir méthanigène des sols, des fioles de 125 ml munies d'un robinet rodé, contenant 10 g de sol séché à l'air et 12 ml d'eau, sont remplies d' N_2 et préincubées 3 jours à 37° C, de façon à rétablir dans le sol les conditions réductrices favorables. On ajoute alors 10 ml d'eau et on incube à 37° C après avoir renouvelé l'atmosphère d' N_2 (t_0). La mesure du CH_4 formé est faite au chromatographe à ionisation de flamme, tous les jours pendant 8 à 12 jours. Les courbes de production de méthane étant linéaires, la pente permet de connaître l'activité méthanigène du sol (exprimée en ml de CH_4 formé/g de sol sec/j). Pour chaque sol, deux répétitions sont suffisantes car la reproductibilité est bonne.

Les résultats sont rapportés dans le tableau IV. Nous avons constaté, en appliquant le test de corrélation des rangs, des corrélations inverses hautement significatives entre le pouvoir méthanigène et la conductivité, la teneur en chlorures, la teneur en argile et le rapport C/N (tableau VI). L'absence de corrélation avec la teneur en carbone organique est vraisemblablement due au fait que son influence est masquée par celles inverses des autres facteurs. En effet, si on élimine le facteur salinité en ne considérant que les 11 sols non salés, nous obtenons une corrélation positive hautement significative entre le pouvoir méthanigène et la teneur en carbone organique. En ce qui concerne le pH et le Eh, on observe une corrélation au stade d'une semaine; cette durée correspond sensiblement à celle de la mesure du pouvoir méthanigène.

KOYAMA et coll. (1970) ont montré l'influence inhibitrice de l'addition de sels sur la formation de méthane dans un sol non salé. De notre côté, nous constatons le même effet inhibiteur en comparant des sols provenant de biotopes naturels. En traçant des diagrammes, il nous a été possible de déterminer le seuil de salinité au-delà duquel la formation biologique du méthane ne peut être que très faible ou nulle, quelles que soient les autres conditions physico-chimiques. En utilisant la conductivité (mesurée à partir du sol séché à l'air et mis en suspension dans l'eau à raison de 10 g de sol pour 100 ml d'eau) comme indicateur de salinité, ce seuil se situerait entre 0,15 et 0,20 minhos/cm.

— Numération des bactéries méthanigènes :

Pour la numération des bactéries méthanigènes, nous avons utilisé la technique récemment mise au point (RAIMBAULT, 1974) basée sur la détermination du nombre le plus probable (MPN); les dilutions de sol séché à l'air ont servi pour l'inoculation des tubes de culture, contenant un milieu riche à l'extrait de terre qui permet la meilleure croissance des germes. Après une incubation de 8 à 10 jours, 1 ml de l'atmosphère de chaque tube est injecté dans un chromatographe à ionisation de flamme qui permet de déterminer avec une grande certitude les tubes ayant montré une activité méthanigène.

Les résultats sont rapportés dans le tableau IV. En appliquant le test de corrélation des rangs, nous constatons qu'il existe, comme pour le pouvoir méthanigène, les mêmes corrélations en ce qui concerne la conductivité, la teneur en chlorures, la teneur en argile, le pH et le Eh à une semaine (tableau VI). Cependant, nous avons noté que la valeur des coefficients de corrélation obtenus est, en règle générale, plus élevée dans le cas des numérations. Il existe également une corrélation positive hautement significative entre le pouvoir méthanigène et le nombre de bactéries.

D'après les résultats que nous avons obtenus, il apparaît que le nombre de bactéries méthanigènes dans le sol est d'autant plus élevé que le pH est plus élevé

TABLEAU IV

Croissance du riz et activités microbiennes des sols de rizières du Sénégal (suite)

N°	SOLS Localité	CROISSANCE DU RIZ Mal. Vég. poids sec en g	SULFATO-RÉDUCTION (1)					MÉTHANOGENÈSE		
			Spermos- phérique	Rhizos- phérique	DIFFUSE		Potentiel sulfato-réduc- teur = Risque total estimé	Germes /g sol sec (log ₁₀)	Pouvoir méthanigène mgl CH ₄ /g/j	Germes /g sol sec (log ₁₀)
					Sol planté	Sol nu				
1	Boutotal	2,12	1	4	1	1	4	4,60	2 600	5,06
2	Bignona	1,35	1	3	0	1	4	5,87	2	4,78
3	Medina	0	4	5	0	1	5	4,94	0	2,00
4	Medina	0	3	5	1	2	5	3,81	3	4,60
5	Medina	0	5	—	—	1	5	4,70	0	2,00
6	Kamobeul	0	5	—	1	3	5	2,49	1 000	5,78
7	Loudia	4,30	0	0	1	0	0	2,20	10 000	6,78
8	Oussouye	4,39	0	3	1	1	2	3,45	8 000	6,30
9	Dar-Salam	5,39	1	3	1	1	3	2,65	200	4,22
10	Djibelor	7,06	0	1	1	2	0	3,28	13 000	5,22
11	Djibelor	6,72	0	3	1	2	1	1,79	0	3,98
12	Djibelor	3,80	0	1	0	1	1	2,45	20	5,06
13	Niagnisse	1,33	0	2	1	1	2	3,17	40	5,78
14	Sibink	3,95	0	1	1	1	0	3,60	1 500	5,60
15	Gondomp	4,82	0	1	1	1	1	2,61	50	6,30
16	Bambato	4,34	0	4	0	0	2	3,49	5 000	7,15
17	Tanaff	7,85	0	0	2	0	0	2,61	15 000	6,60
18	Diango	2,42	0	1	1	1	1	2,49	20	3,54
19	Boukitinn	2,60	0	2	1	1	1	3,15	1	4,22
20	Kaolack	3,90	0	1	0	1	0	2,31	1	2,78
21	Enanpor	3,61	0	1	0	1	0	3,48	0	3,54
22	Medina	1,82	0	1	1	1	1	2,85	1	2,48
23	Thiaroye	6,00	0	4	2	5	3	3,97	20	2,48
24	Djibelor	6,20	0	3	1	2	2	4,10	25 000	5,06
25	Ros-Belbio	4,92	0	3	3	2	3	3,50	40	5,22
26	Boundoun	1,23	1	2	3	0	3	5,59	5	4,40
27	Nliagar	4,31	0	1	1	1	1	2,50	1	3,06
28	Keur-Diallo	2,18	3	2	1	0	4	2,34	1	3,06
29	Balingor	0	5	—	—	0	5	4,41	n.d.	n.d.

(1) Voir échelle d'intensité au tableau V.
n.d. : non déterminé.

TABLEAU VI

Résultats du test de corrélation des rangs de SPEARMAN :
 corrélation positive hautement significative : P, faiblement significative : p
 corrélation négative hautement significative : N, faiblement significative : n
 absence de corrélation : A ; case vide : rs non calculé

		Teneurs en			con- duc- tivité	pH		Eh		Teneurs en		Rapport C/N	Nombre de germes /g sol sec			Sulfato- réduction	
		argile	Cl ⁻	SO ₄ ²⁻		initial	I sem.	initial	I sem.	C.O.	N		DEN (1)	BSR (2)	MET (3)	rhiz.	Dif.
Fixation de N ₂	Par cyanophycées..	A	A		A	A	A			A	A						
	Cyanophycées/g sol sec.....	A	A		A	P	P			A	A						
	Rhizosphérique....	A	N		N	A				A	A						
N-NO ₃	Produit en 7 sem...	A	A		n	A				A	A						
	Vitesse de forma- tion.....	A	A		n	A				A	A						
	Délai de formation.	A	A		A	n				A	A						
Potentiel dénitrifiant.....	A	N		N	A	p			P	A	A	p					
Bactéries dénitrifiantes/g sol sec.....	A	N		N	A	P			A	A	A	o					
Sulfato- réduction	Spermosphérique...	p	A	A	p	n				A		A		A		P	A
	Rhizosphérique....	p	A	p	p	N				A		A		P		o	A
	Diffuse.....	A	A	A	A	A				A		A		A			o
Potentiel sulfato-réducteur....	p	A	p	p	N					A		A		P			
Bact. sulfato-réductrices/g sol sec.....	P	A	P	p	N					A		A		o			
Pouvoir méthanigène.....	N	N		N	A	P	A	N	A		N				p		
Bactéries méthanigènes/g sol sec.....	N	N		N	A	P	A	N	A		A					o	

(1) DEN : bactéries dénitrifiantes ; (2) BSR : bactéries sulfato-réductrices ; (3) MET : bactéries méthanigènes.

et que la teneur en chlorures, la conductivité et le Eh sont plus faibles ; le pouvoir méthanigène est influencé de la même façon puisqu'il est en corrélation très étroite avec le nombre de bactéries. La teneur en carbone organique ne semble pas intervenir quand il s'agit de sols salés pour lesquels c'est plutôt le rapport C/N qui est important. Dans les sols non salés, par contre, la teneur en carbone organique influence fortement l'activité des bactéries méthanigènes mais pas leur densité.

CONCLUSION

Parmi les facteurs physico-chimiques étudiés, la teneur en carbone organique, le pH et la salinité ont une grande influence sur les différentes activités microbiennes des sols submergés.

Le fait que la matière organique facilement assimilable soit un facteur important n'est pas nouveau, mais il faut noter qu'elle intervient surtout dans les sols non plantés ; en effet, l'apport d'exsudats racinaires par les plantes compense éventuellement le manque de substances carbonées assimilables par les microorganismes. Nous avons observé des corrélations positives dans le cas de la dénitrification et de la méthanogénèse, mais pas dans celui de la nitrification dont les germes responsables sont en majorité autotrophes.

Le pH est également un facteur important ; il est en corrélation avec la densité des cyanophycées fixatrices de N_2 , avec l'activité nitrifiante et avec la densité et l'activité des bactéries dénitrifiantes et méthanigènes. Par contre, les sols acides sont favorables à la sulfato-réduction.

Parmi tous les facteurs physico-chimiques, la salinité semble jouer un rôle prépondérant dans les sols submergés car elle intervient dans la plupart des activités microbiennes : elle est défavorable à la fixation rhizosphérique de N_2 par les bactéries, à la nitrification, à la dénitrification et à la méthanogénèse ; seule la sulfato-réduction est favorisée dans les sols salés.

L'influence de la rhizosphère est également très importante. Nous avons pu montrer que la fixation rhizosphérique de N_2 par les bactéries est beaucoup plus importante que la fixation dans les sols non plantés, par les bactéries ou les cyanophycées. La sulfato-réduction est également beaucoup plus importante dans les sols plantés et elle est localisée essentiellement autour des graines et le long des racines.

En général, nous avons constaté que les sols qui supportent la meilleure croissance du riz sont ceux pour lesquels nous avons obtenu des activités bactériennes élevées en ce qui concerne la fixation de N_2 , la nitrification, la dénitrification et la méthanogénèse, mais des activités sulfato-réductrices faibles.

RÉSUMÉ

L'étude comparative, pour 29 échantillons de sols de rizières du Sénégal, de l'influence des facteurs physico-chimiques et de la rhizosphère du riz sur différentes activités microbiennes, nous a permis de constater que :

1. La densité des cyanophycées fixatrices de N_2 est étroitement liée au pH des sols, le pH = 5 constituant une limite inférieure. La fixation de N_2 par les algues dans les sols non plantés est en général peu importante.

2. La fixation de N_2 par les bactéries libres de la rhizosphère du riz est ralentie par la salinité.

3. L'azote nitrifiable dépend de la salinité et du pH : quand le sol n'est pas submergé, l'apparition des nitrates est d'autant plus rapide que le pH est plus élevé ; la vitesse de formation et la quantité de nitrates produits sont d'autant plus importantes que la salinité est plus faible.

4. Le potentiel dénitrifiant qui représente le temps nécessaire pour la dénitrification du maximum du nitrate ajouté, est en étroite corrélation avec la teneur en carbone organique, et en corrélation inverse avec la salinité. Une faible corrélation existe avec le nombre initial de bactéries dénitrifiantes.

5. La sulfato-réduction spermosphérique a été mise en évidence dans un tiers des sols testés et principalement sur d'anciennes mangroves. La sulfato-réduction rhizosphérique, beaucoup plus fréquente, est en étroite corrélation avec le nombre de bactéries sulfato-réductrices, comme le potentiel sulfato-réducteur qui est défini par le pourcentage de plantes mortes en 60 jours.

6. La densité et l'activité des bactéries méthanigènes sont d'autant plus importantes que le pH est élevé, et que la teneur en chlorures et le Eh sont faibles. Il existe une corrélation entre la densité des germes méthanigènes dans le sol et le pouvoir méthanigène.

SUMMARY

The influence of the physico-chemical properties and of the rhizosphere effect of rice on some microbial activities has been compared in 29 rice soils from Senegal.

1. The number of N_2 -fixing cyanophyceae was highly correlated with the soil pH, soils of pH below 5.0 being devoid of cyanophyceae; N_2 fixation by algae in bare soils was generally low.

2. Non symbiotic N_2 -fixation by rhizosphere bacteria was depressed by increasing soil salinity.

3. In non waterlogged soils, nitrates appeared earlier in soils of high pH; the total amount and the rate of formation of nitrates were depressed by increasing salinity.

4. The denitrifying potential of soils, that is the time required for the denitrification of the highest amount of nitrate added, was highly correlated with the organic carbon content of the soil, and depressed by salinity. A low correlation was found between the denitrifying potential and the initial number of denitrifying bacteria.

5. Spermospherical sulfate-reduction occurred in one third of the soils, especially in former mangrove soils; rhizosphere sulfate-reduction was more frequent. A high correlation was found between the initial number of sulfate-reducing bacteria and respectively the rhizosphere sulfate-reduction and the sulfate-reducing potential, defined as the percentage of plants dead out in 60 days.

6. The number and the activity of methane producing bacteria increased with soil pH and were reduced when the amount of chlorides or the redox potential raised. A correlation was found between the number of methane forming bacteria and the methane production capacity.

REMERCIEMENTS

Les auteurs expriment leurs remerciements à MM. Y. DOMMÈRGUES et M. MOURARET pour les conseils qu'ils leur ont prodigués, au personnel du Laboratoire de Chimie des Sols du Centre O.R.S.T.O.M. de Dakar pour l'analyse des divers échantillons de sols, ainsi qu'à MM. M. BOUREAU, W. SY, P. DUPONT, L. FALL et M. N'DAO pour leur collaboration technique.

REFERENCES

- ABD-EL-MALEK (Y.) and RIZK (S. C.), 1958. — Counting of sulphate-reducing bacteria in mixed bacterial populations. *Nature*, **182**: 538-539.
- BAUZON (D.), VAN DEN DRIESSCHE (R.) et DOMMÈRGUES (Y.), 1969. — L'effet litière ; I. Influence *in situ* des litières forestières sur quelques caractéristiques biologiques des sols. *Oecol. Plant.*, **4**: 99-122.
- CONNEL (W. E.) and PATRICK (W. H.), 1968. — Sulphate-reduction in soil : effect of redox potential and pH. *Science*, **159**: 86-87.
- DOMMÈRGUES (Y.), COMBREMONT (R.), BECK (G.) et OLLAT (C.), 1969. — Note préliminaire concernant la sulfato-réduction rhizosphérique dans un sol salin tunisien. *Rev. Ecol. Biol. Sol*, **6**: 115-129.
- JACQ (V.), 1970. — Recherches préliminaires concernant la sulfato-réduction rhizosphérique et la sulfato-réduction spermosphérique. *Thèse doct. spéc. Fac. Sciences Nancy*, publiée en 1971 par l'ORSTOM (doc. ronéo), 137 pages.
- KOYAMA (T.), HISHIDA (M.) and TOMINO (T.), 1970. — Influence of sea salts on the soil metabolism. II. On the gaseous metabolism. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **16**: 81-86.
- Mc GARTY (J. W.), 1961. — Denitrification studies on some south australian soils. *Plant and Soil*, **14**, 1: 1-21.
- OKUDA (A.) and YAMAGUCHI (M.), 1956. — Nitrogen-fixing microorganisms in paddy soils. 2. Distribution of blue-green algae in paddy soil and the relationship between the growth of them and soil properties. *Soil and Plant Food*, **2**: 4-7.
- PICHINOTY (F.), 1966. — Mesures de l'activité de quelques réductases de microorganismes. *Oxidative phosphorylation and terminal electrons transport. Information Exchange Group N° 1, scientific memo n° 555*, 1-13.
- RAIMBAULT (M.), 1974. — Utilisation de la chromatographie en phase gazeuse pour la numération des bactéries méthano-formatrices. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)* (à paraître).
- REDMAN (F. H.) and PATRICK (W. H. Jr.), 1965. — Effect of submergence on several biological and chemical soil properties. *Agric. Exp. Station Louisiana State Univ., Agric. Mech. Coll., Bul. N° 592*, 1-28.
- RINAUDO (G.), BALANDREAU (J.) and DOMMÈRGUES (Y.), 1971. — Algal and bacterial non symbiotic nitrogen fixation in paddy soils. *Plant and Soil, Special Volume*, 471-479.
- RINAUDO (G.) et DOMMÈRGUES (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. Pasteur*, **121**: 93-99.

- STEWART (W. D. P.), FITZGERALD (G. P.) and BURRIS (R. H.), 1967. — *In situ* studies on N₂ fixation using the acetylene reduction technique. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **58**, 5: 2071-2078.
- VALERA (C. L.) and ALEXANDER (M.), 1961. — Nutrition and physiology of denitrifying bacteria. *Plant and Soil*, **15**: 268-280.
- WATANABE (A.), 1959. — Distribution of nitrogen-fixing blue-green algae in various areas of south and east Asia. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **5**: 21-29.
- YAMANE (I.), 1958. — Metabolism in muck paddy soils. Part. 1. Formation of ammonium nitrogen and gases as the endproduct of microbial activity and its change by the pretreatment of soil. *Sci. Rep. Res. Inst. Tohoku Univ.*, **D-Vol 9**, N° 1: 69-83.

2 - Séquence des produits formés

articles 3 et 4

Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)
1973, 124 B, 351-362

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

par J.-L. Garcia

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

SUMMARY

SEQUENTIAL PRODUCTS OF DENITRIFICATION IN SENEGALESE PADDY SOILS

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

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

INTRODUCTION

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

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

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

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

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

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les 30 sols de rizières du Sénégal, utilisés pour cette étude (tableau I), sont décrits par ailleurs [9]. Cinquante grammes de sol, amenés à l'humidité équivalente par une solution de KNO_3 contenant $100 \mu\text{g}$ de $\text{N} - \text{NO}_3^-$ par gramme de sol sec, sont mis en incubation à 30°C , sous atmosphère d'hélium (He N15, Sté l'Air Liquide) à plusieurs répétitions, dans des flacons sérum de 500 ml dans lesquels la faible épaisseur de sol facilite les échanges gazeux. Un vide poussé et répété est effectué pour éliminer O_2 .

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

La deuxième série de flacons est utilisée pour l'analyse périodique de l'atmosphère des sols à l'aide d'un chromatographe à détection par conductibilité thermique, Varian Aerograph 90P1, dont les conditions d'utilisation sont les suivantes : colonne interne $10' \times 1/4''$ ($L = 3,048 \text{ m}$, $r = 6,35 \text{ mm}$) en inox, remplie avec du Porapak Q100/120 mesh ; température de la colonne, 80° ; température de l'injecteur, 110° ; température du détecteur, 250° ; intensité des filaments, 200 mA ; gaz vecteur, hélium N15 (Sté l'Air Liquide) ; débit du gaz vecteur, 60 ml/min ; colonne externe, $10' \times 1/4''$ en inox, remplie avec un tamis moléculaire 5/A ; température ambiante, 22° environ ; volume injecté, 0,7 ml par vanne d'injection automatique ; enregistreur Varian Aerograph A25 ; déroulement, 50 cm/h. La calibration a été faite avec des gaz purs (N_2 , O_2 , CO_2 , NO et N_2O) de la Sté l'Air Liquide.

SÉQUENCE DES PRODUITS DE LA DÉNITRIFICATION 353

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

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

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

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

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

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Deux sortes de séquence pourraient avoir lieu dans les 30 sols de rizières étudiés : $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ et $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$. La première séquence aurait lieu dans 14 sols, la deuxième dans les 16 autres. Parmi ces derniers, 4 sols ont produit plus de 25 ppm de N -- NO, la pro-

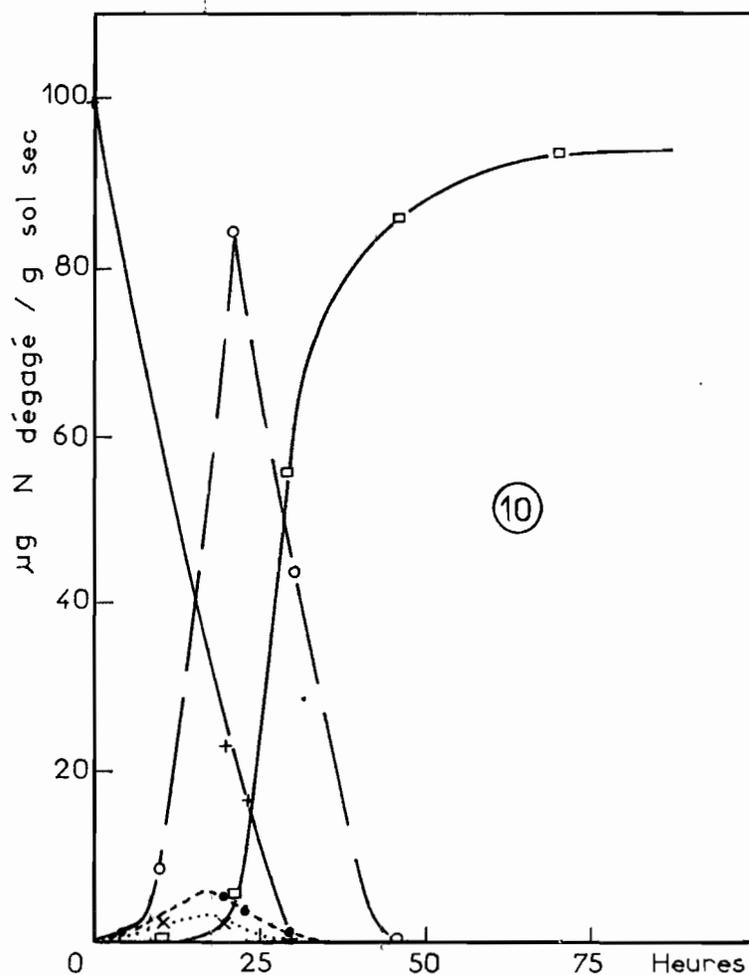


FIG. 1. — Séquence des produits formés au cours de la dénitrification dans le sol de rizière n° 10. Quantité de N formé en $\mu\text{g/g}$ de sol sec après apport de $100 \mu\text{g}$ de $\text{N} - \text{NO}_3^-$ sous forme de KNO_3 et incubation anaérobie à 30° à humidité équivalente.

+ — + $\text{N} - \text{NO}_3^-$, x ····· x $\text{N} - \text{NO}$,
 • - - - • $\text{N} - \text{NO}_2^-$, o - - - o $\text{N} - \text{N}_2\text{O}$,
 □ — □ $\text{N} - \text{N}_2$.

duction étant très faible dans les autres sols. Dans tous les cas, le NO formé a été réduit ultérieurement, ainsi que le N_2O , et le gaz final a toujours été N_2 (fig. 1, fig. 2 et fig. 3).

I. — RÉDUCTION DU NITRATE

Le dosage du nitrate au cours de sa disparition nous a permis d'établir la vitesse de réduction de $\text{N} - \text{NO}_3^-$ (tableau II). En attribuant le rang 1 à

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

III. — FORMATION ET RÉDUCTION DE L'OXYDE NITRIQUE

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

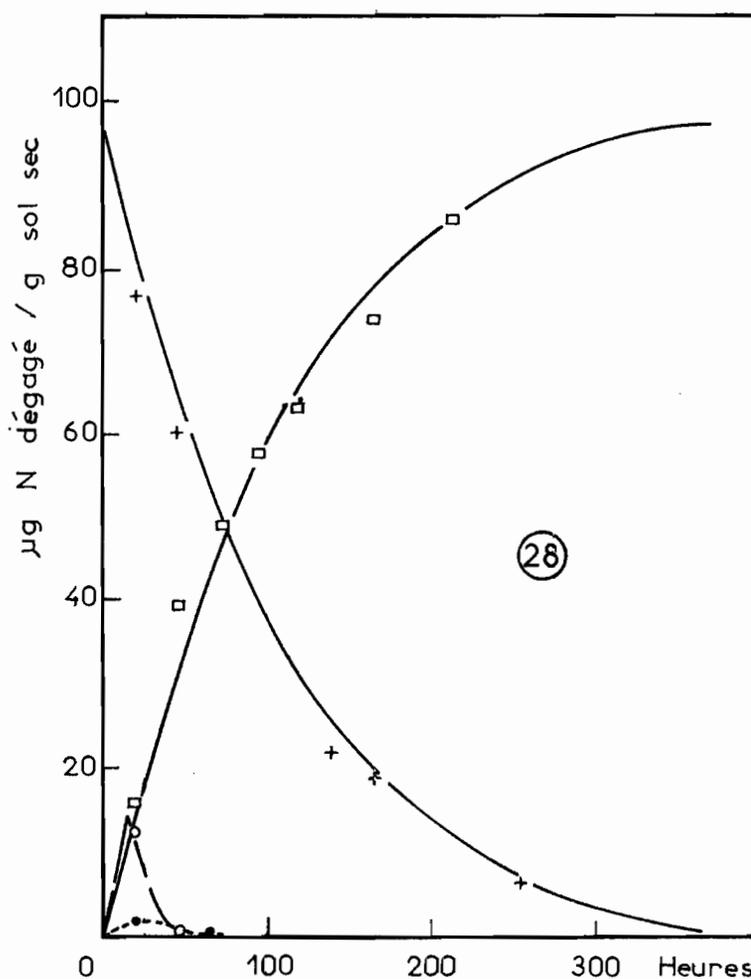


FIG. 3. — Séquence des produits formés au cours de la dénitrification dans le sol de rizière n° 28. Quantité de N formé en µg/g de sol sec après apport de 100 µg de N — NO₃⁻ sous forme de KNO₃ et incubation anaérobie à 30° à humidité équivalente.

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

SÉQUENCE DES PRODUITS DE LA DÉNITRIFICATION 357

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

SÉQUENCE DES PRODUITS DE LA DÉNITRIFICATION 359

IV. — FORMATION ET RÉDUCTION DE L'OXYDE NITREUX

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

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

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

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

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

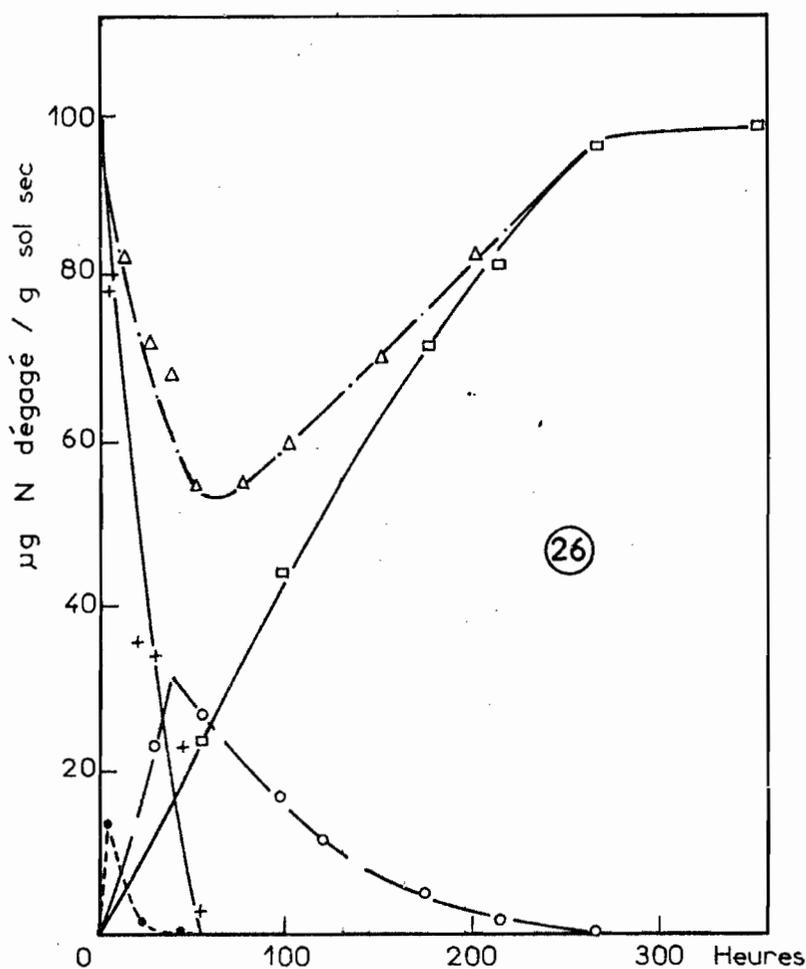


FIG. 4. — Perte apparente et momentanée d'azote au cours de la dénitrification dans le sol de rizière n° 26. Quantité de N formé en $\mu\text{g/g}$ de sol sec après apport de $100 \mu\text{g}$ de $\text{N} - \text{NO}_3^-$ sous forme de KNO_3 et incubation anaérobie à 30° à humidité équivalente.

+ ——— +	N - NO_3^- ,	x ····· x	N - NO,
• - - - - •	N - NO_2^- ,	o - - - - o	N - N_2O ,
□ ——— □	N - N_2 ,	Δ - - - Δ	perte apparente momentanée de N.

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

RÉSUMÉ

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

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

REMERCIEMENTS

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

BIBLIOGRAPHIE

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

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

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

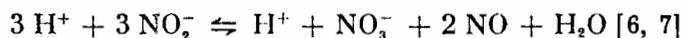
NITRIC OXIDE PRODUCTION IN RICE SOILS

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.

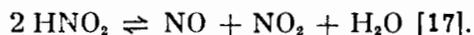
KEY-WORDS: Denitrification, Soil, Nitric oxide; Rice soil.

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.

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_3^- 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

PRODUCTION DE NO DANS LES SOLS DE RIZIÈRE 403

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-

difié 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

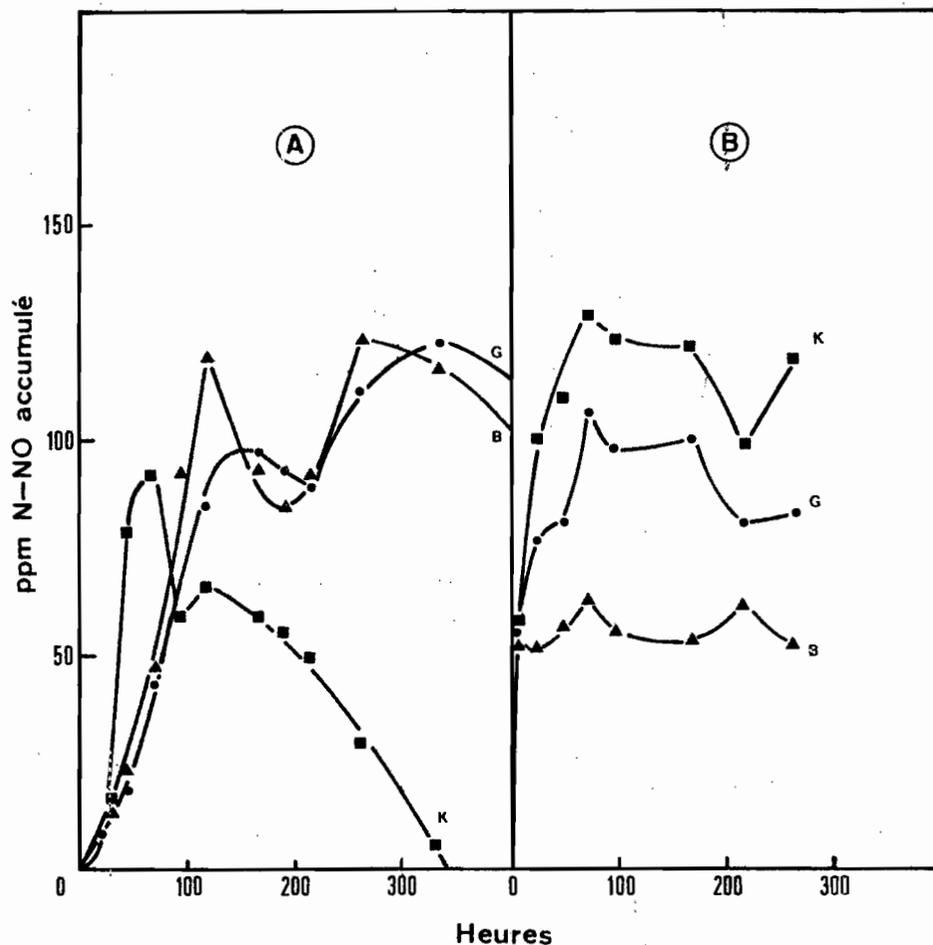


FIG. 1. — Formation de NO dans 3 sols de rizière.

- A) Sol non stérile incubé à 37° à l'humidité équivalente en présence de 200 ppm $N-NO_2^-$.
 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),

PRODUCTION DE NO DANS LES SOLS DE RIZIÈRE 405

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 $N-NO_3^-$, 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-

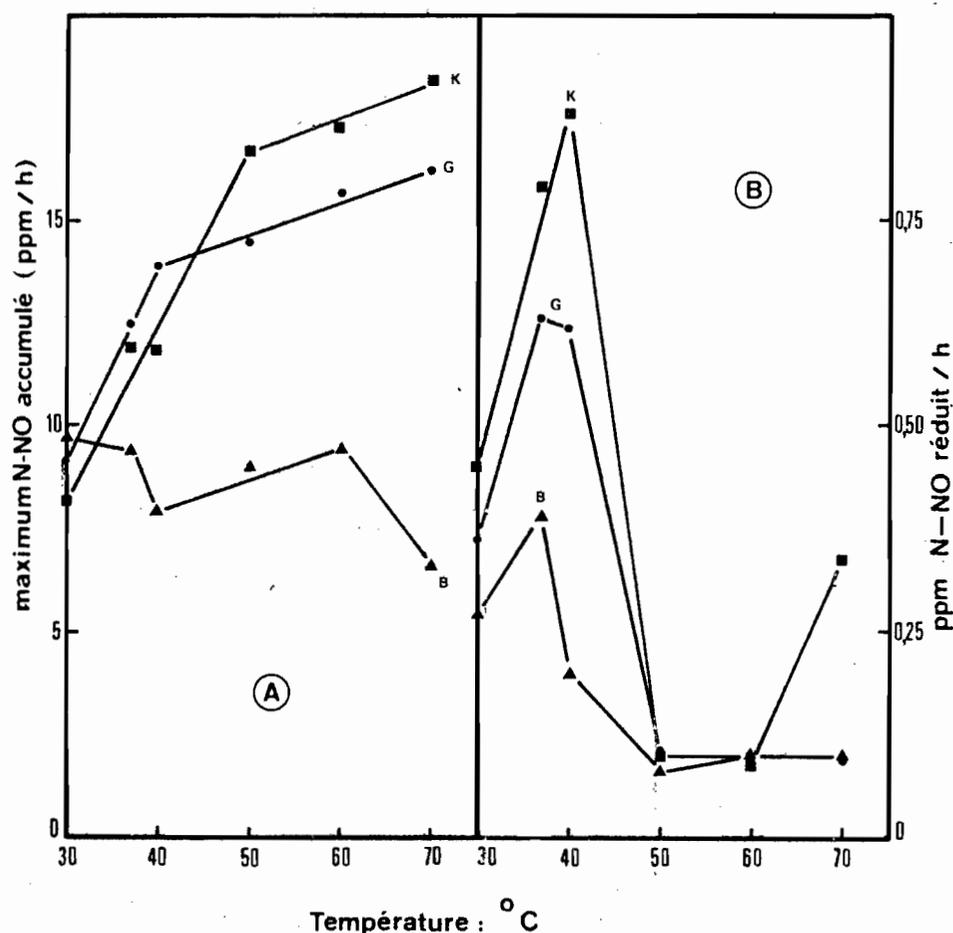


FIG. 2. — Influence de la température.

- A) Effet sur l'accumulation maximale de NO dans 3 sols de rizière incubés à l'humidité équivalente avec 200 ppm $N-NO_3^-$.
 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

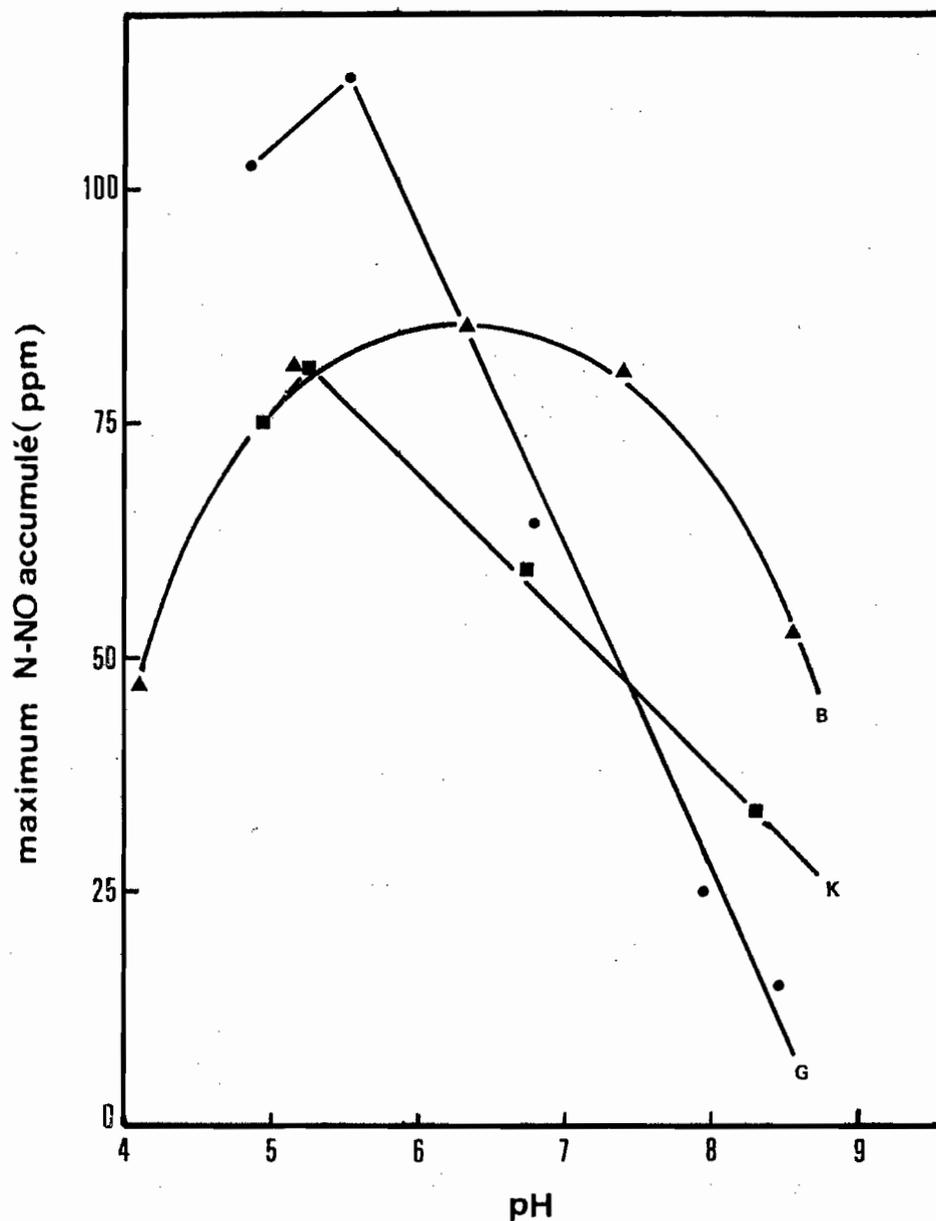


FIG. 3. — Influence du pH sur l'accumulation maximale de NO dans 3 sols de rizière. Incubation à 37°, à l'humidité équivalente avec 200 ppm N-NO₃⁻.

PRODUCTION DE NO DANS LES SOLS DE RIZIÈRE 407

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 accumulé 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.

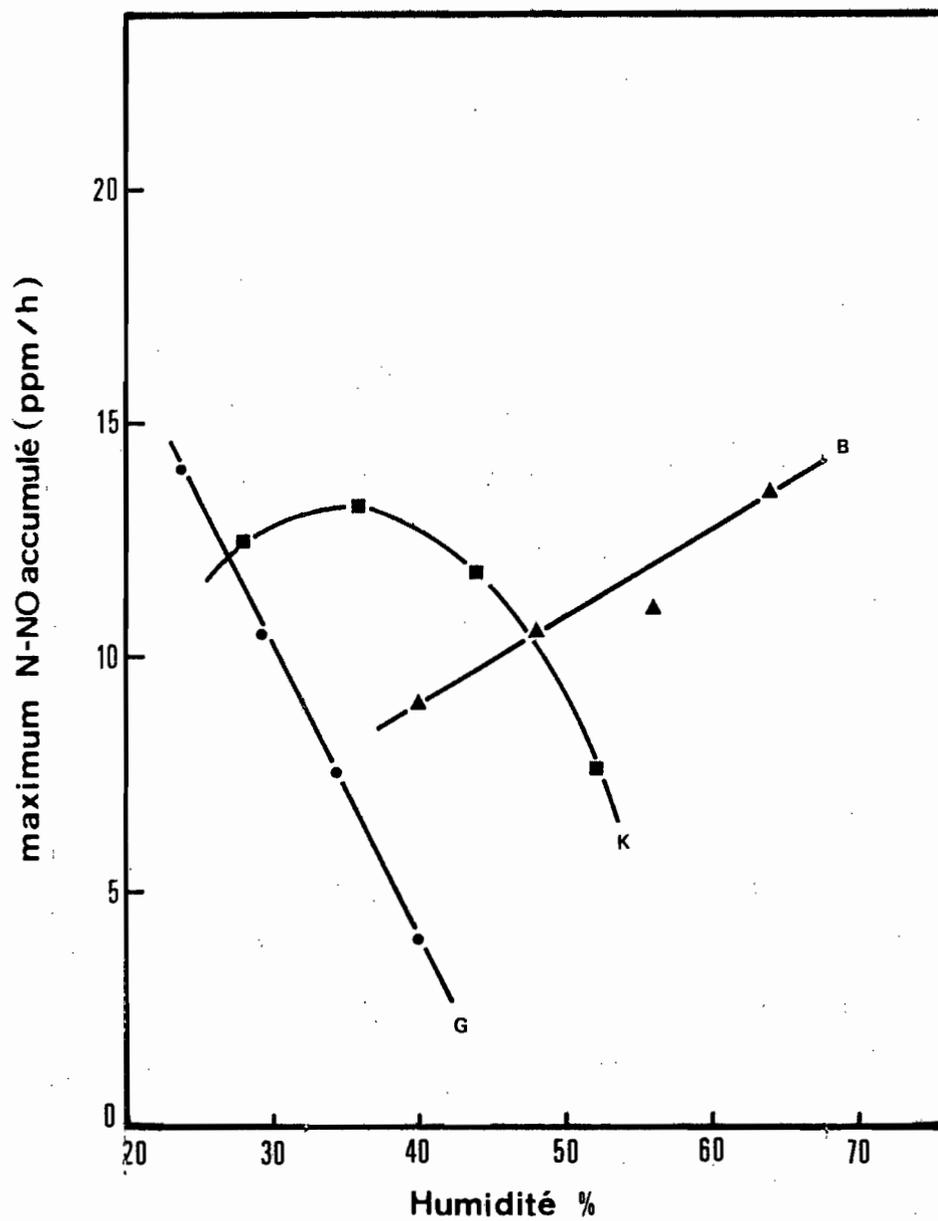


FIG. 4. — Influence de l'humidité sur la vitesse maximale d'accumulation de NO dans 3 sols de rizière.

Incubation à 37° avec 200 ppm N-NO₂⁻.

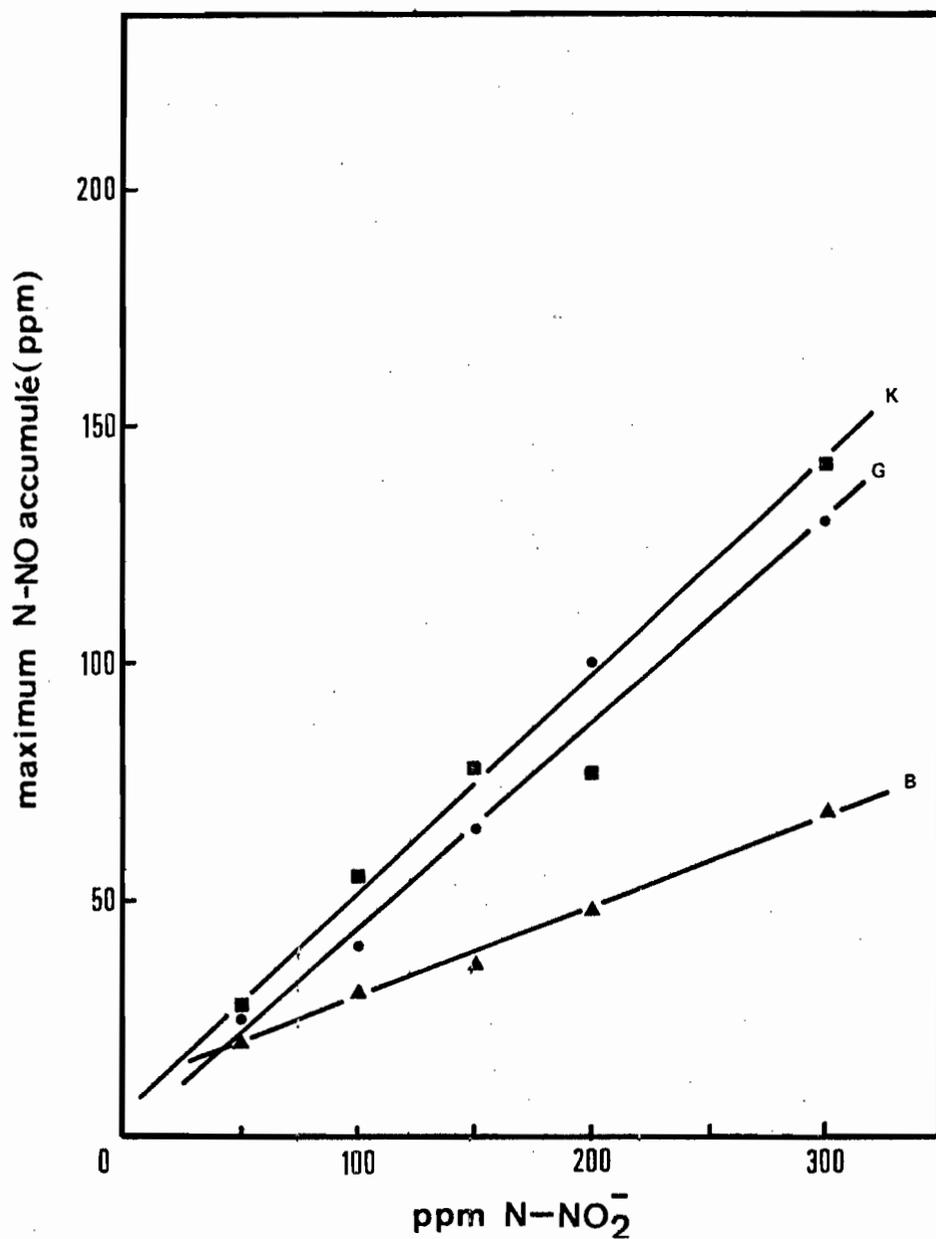


FIG. 5. — Influence de la concentration de nitrite sur l'accumulation maximale de NO dans 3 sols de rizière.

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 (HOQN(O)) 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

PRODUCTION DE NO DANS LES SOLS DE RIZIÈRE 413

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.

3 - Mise au point d'une nouvelle méthode de mesure

articles 5 et 6

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 sérum 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 14×200 mm. Chaque tube reçoit 17 g de sol no. 1. 15 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.

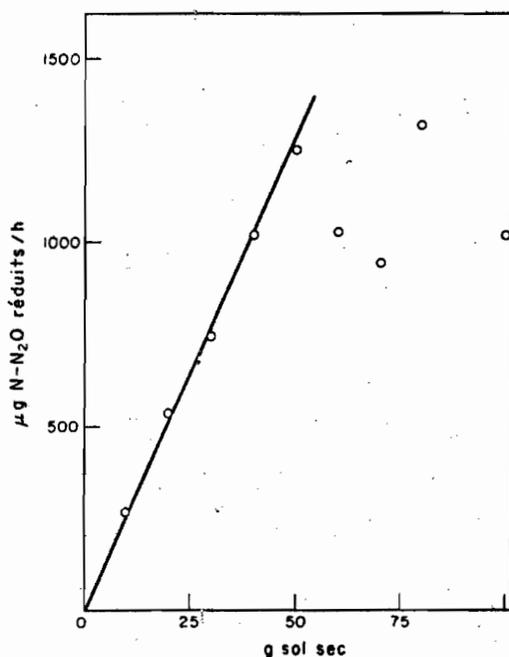


Fig. 1.

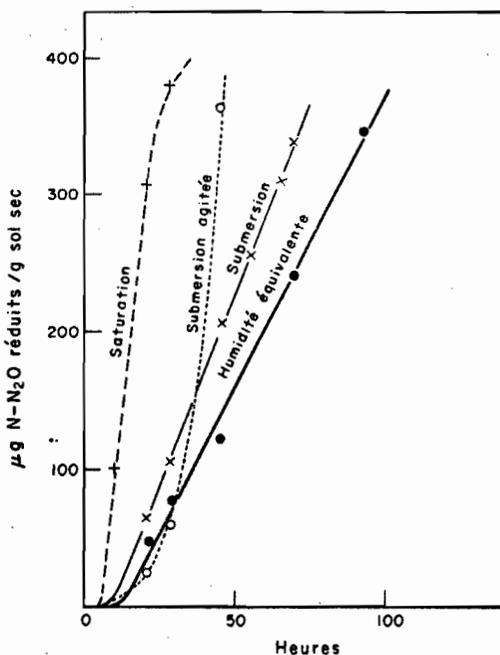


Fig. 2.

(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 parties '10⁶ de N-N₂O. 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-

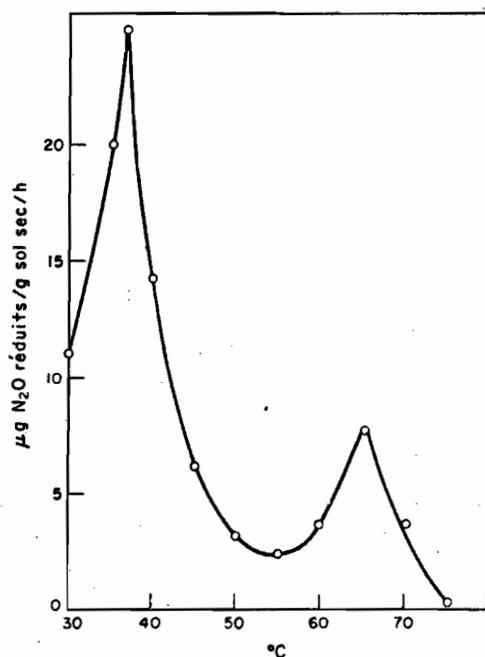


Fig. 3.

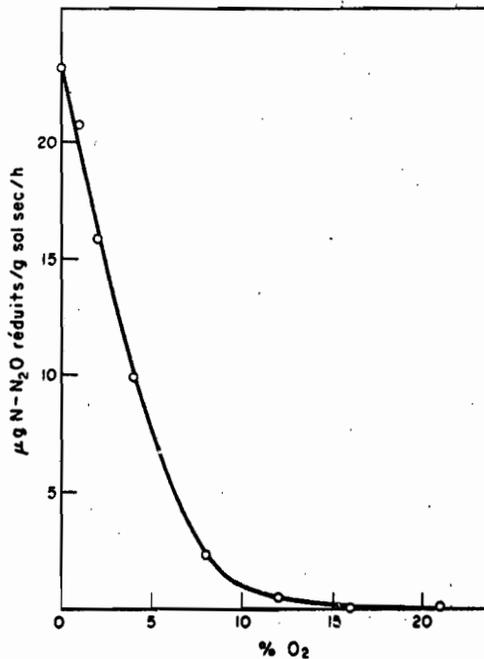


Fig. 4.

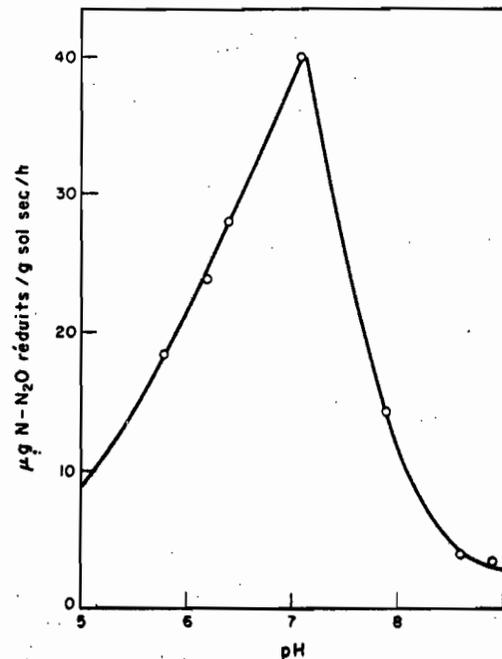


Fig. 5.

tivité 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 $65^\circ C$ (Nomnik, 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/10⁶ de $N-N_2O$ et d'une quantité croissante de O_2 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_2 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_2 . 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 Djiblor. 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_2O* . 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

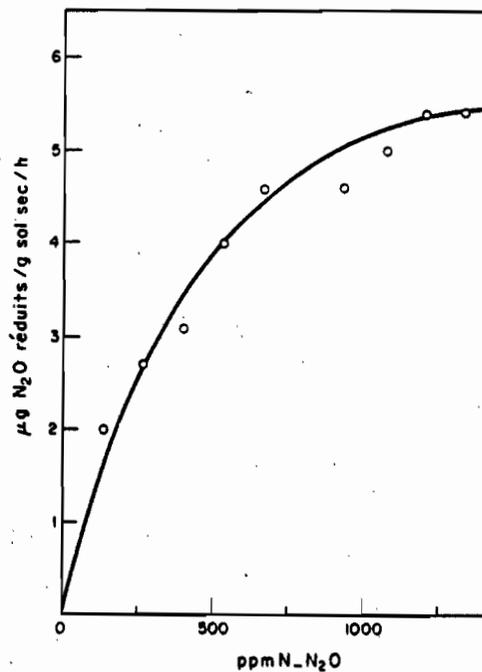


Fig. 6.

Tableau 1. Vitesses de réduction de NO_3^- (mesurées au Warburg) et de N_2O (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 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 N_2O 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°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 Djibelor saturé en eau, ont été mises en préincubation, à 30°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°C, après addition de 400 partes/ 10^6 de $N-N_2O$.

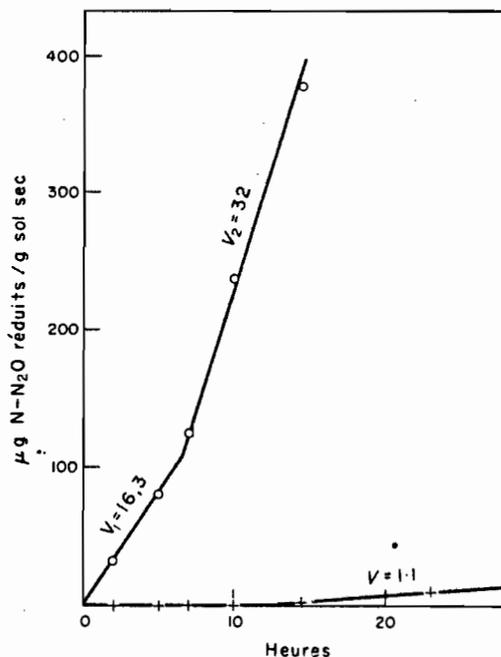


Fig. 7.

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).

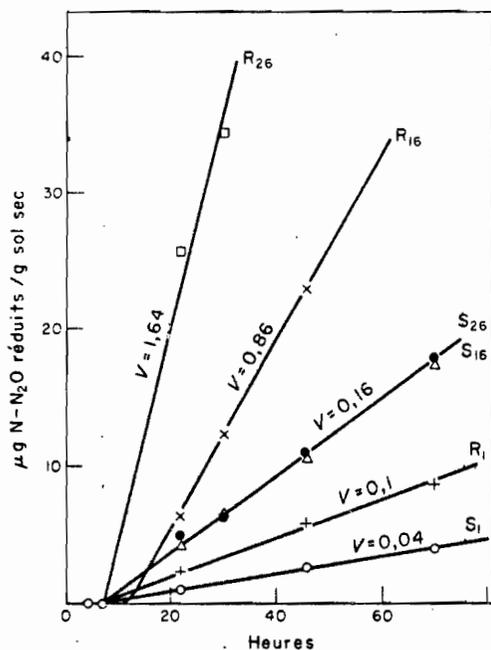


Fig. 8.

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 O₂ 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 N₂O 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. Bakhoun 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.
- WILLER 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.

article 6

Evaluation de la dénitrification par mesure de l'activité oxyde nitreux réductase Etude complémentaire

Jean-Louis GARCIA

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

RÉSUMÉ

Les conditions de mesure de la vitesse de réduction du N_2O utilisée comme moyen d'estimation de l'intensité de la dénitrification ont été précisées pour un sol de rizière. Grâce au chloramphénicol, il a été possible de confirmer l'existence de deux activités distinctes : l'activité initiale due à l'oxyde nitreux-réductase présente dans l'échantillon de sol au moment du prélèvement et l'activité potentielle due à l'oxyde nitreux-réductase induite par le substrat respiratoire après une latence de 4 à 6 h. Pour une même quantité de N_2O , l'activité est proportionnelle à la quantité de sol, et pour un même poids de sol, elle est fonction de la concentration en N_2O ; pour accroître la sensibilité de la mesure, il est recommandé de se placer à $V_m/2$ ce qui permet de n'utiliser que le sixième du gaz requis pour V_m .

L'activité liée à l'enzyme induite dans un sol saturé se maintient pendant un mois et demi à son niveau initial. Lorsque ce sol est soumis à plusieurs dessiccations suivies de réhumidifications, l'activité augmente d'abord puis diminue rapidement. Les mesures effectuées après induction de l'activité dans le sol, mettent en évidence un accroissement important de celle-ci puis une diminution qui résulte partiellement de l'épuisement du N_2O au cours de l'incubation. Ces résultats montrent que l'activité mesurée après une longue période d'incubation ne représente qu'une faible fraction de l'activité réelle induite dans le sol à un moment donné par l'accumulation maximum du substrat respiratoire. Parmi plusieurs substrats carbonés ajoutés au sol, seul le succinate a eu un effet favorable, tous les autres ont inhibé l'activité.

La distribution des mesures effectuées dans une rizière suit une loi normale et 10 mesures sont généralement suffisantes pour obtenir une estimation satisfaisante de la moyenne.

MOTS CLÉS : Dénitrification - activité oxyde nitreux-réductase - technique.

ABSTRACT

The method for measuring the rate of N_2O reduction in rice paddy soil as a means for estimating the intensity of denitrification, is completed. Using the method with chloramphenicol we have confirmed the existence of two distinct activities: the nitrous oxide reductase activity initially pre-

sent when the sample was taken and the potential nitrous oxide reductase activity induced by the respiratory substrate after a lag of 4 to 6 hrs. With a fixed amount of N_2O the activity is proportional to the amount of soil, and for a given weight of soil it is a function of the N_2O concentration; to increase the sensibility of measurement, it is advisable to use a N_2O concentration that gives $V_m/2$ (only one-sixth as much gas is needed as for V_m).

The activity of enzyme induced in saturated soil maintains its initial level for a month and a half. If the soil undergoes several cycles of desiccation and rehumidification, the activity increases at first and then declines rapidly. Measurements made after induction of activity in the soil show that there is a large increase in activity followed by a decrease resulting partially from N_2O depletion. These results show that activity measured after a long incubation represents only a small fraction of the actual activity induced in the soil by the maximum accumulation of respiratory substrate. Of several carbon substrates added to the soil only succinate had a favorable effect, the others all inhibiting the activity.

KEY WORDS : Denitrification - nitrous oxide reductase activity - technics.

INTRODUCTION.

L'étude de la séquence des produits formés au cours de la dénitrification dans des sols de rizière du Sénégal, a permis de mettre en évidence une étroite corrélation entre les vitesses de formation et de réduction du N_2O et la vitesse de réduction de NO_3^- (Garcia, 1973). Ceci a conduit à l'élaboration d'une nouvelle méthode d'estimation de la dénitrification basée sur la mesure de la vitesse de réduction de N_2O (Garcia, 1974). Cette méthode a permis de démontrer l'effet rhizosphère très nettement positif du riz sur la dénitrification (Garcia, 1975 a) et a été appliquée au champ (Garcia, 1975 b).

La méthode consiste à déterminer la vitesse de consommation du N_2O par des mesures effectuées dans la

phase gazeuse des flacons contenant le sol saturé d'eau et maintenus à 37°C. La vitesse mesurée pendant les six premières heures permet d'estimer l'activité dénitrifiante initiale du sol, tandis que la vitesse mesurée ultérieurement représente l'activité dénitrifiante potentielle.

La présente étude a pour but de préciser les conditions d'utilisation de la méthode pour l'estimation de la dénitrification dans les sols de rizière.

MATÉRIEL ET MÉTHODES.

Le sol employé a été prélevé dans une rizière de la vallée du fleuve Sénégal (Boundoum Nord), séché à l'air et tamisé à 2 mm; ses principales caractéristiques sont décrites dans le tableau I. Le sol saturé d'eau est placé dans des flacons sérum de 250 ml (sauf cas particulier mentionné) en position allongée pour permettre un étalement important de l'échantillon de sol. On réalise l'anaérobiose par un vide poussé suivi d'un remplissage à l'hélium N45 (Sté l'Air Liquide, Paris), opérations qui sont répétées 3 fois. Du krypton N35 est ajouté dans tous les cas comme étalon interne.

D'autre part, dans le but d'établir la loi de répartition statistique des mesures, 50 prélèvements de sol ont été effectués dans une parcelle de la station expérimentale de Djibélor en Casamance. Les caractéristiques du sol de la parcelle sont indiquées au tableau I.

Pour suivre la réduction du N_2O dans l'atmosphère des flacons, des mesures sont effectuées à l'aide d'un chromatographe à détection par conductibilité thermique VARIAN AEROGRAPH 90 P4 couplé à un enregistreur VARIAN A25, dans les conditions d'utilisation décrites par ailleurs (Garcia, 1974). 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 (Garcia, 1975 b). Les valeurs exprimées correspondent à 5 répétitions.

RÉSULTATS.

1. ACTION DU CHLORAMPHÉNICOL.

50 g de sol additionnés de 50 ml d'eau sont pré-incubés en anaérobiose à 30° en agitation, dans des flacons sérum de 500 ml, en présence de 500 ppm de $N-N_2O$ pendant 48 h, en présence ou en l'absence de chloramphénicol (2 mg). Au bout de ce laps de temps, l'atmosphère des flacons est renouvelée et l'incubation poursuivie pendant 26 h en présence de 20 ml de N_2O et 10 m de krypton pour la détermination de l'activité oxyde nitreux-réductase. Dans une deuxième série de flacons, l'incubation de 26 h est effectuée immédiatement après humectation du sol.

Les différents traitements ont été les suivants : (1) sol non préincubé; (2) sol non préincubé, détermination de l'activité effectuée avec chloramphénicol; (3) sol préincubé; (4) sol préincubé, détermination de l'activité effectuée avec chloramphénicol; (5) sol préincubé avec chloramphénicol.

Les résultats des mesures sont rapportés à la figure 1. Le sol préincubé avec chloramphénicol et N_2O et le sol non préincubé mais dont l'activité est déterminée en présence de chloramphénicol ont une activité oxyde nitreux-réductase nulle. Dans le sol préincubé avec N_2O et dont l'activité oxyde nitreux-réductase est déterminée en présence de chloramphénicol, cette dernière est voisine de celle qui est mesurée directement après humectation, en l'absence de chloramphénicol. Dans ce dernier cas, une latence de 4 h environ est observée.

Ces résultats montrent qu'une activité oxyde nitreux-réductase peut être induite dans le sol en présence de N_2O , et que cette induction est empêchée par le chloramphénicol. Ce dernier remplit donc également dans le sol sa fonction d'inhibiteur des synthèses protéiques. L'induction peut être provoquée au moyen d'une incubation préalable à la détermination de l'activité, mais elle peut également avoir lieu au cours de la détermination après un temps suffisant. Il est donc

TABLEAU I
DESCRIPTION DES SOLS

Sol	pH	N %	C %	Argile %
Boundoum Nord	5,3	1,40	18,00	48,30
Djibélor	5,3	1,92	17,56	25,32

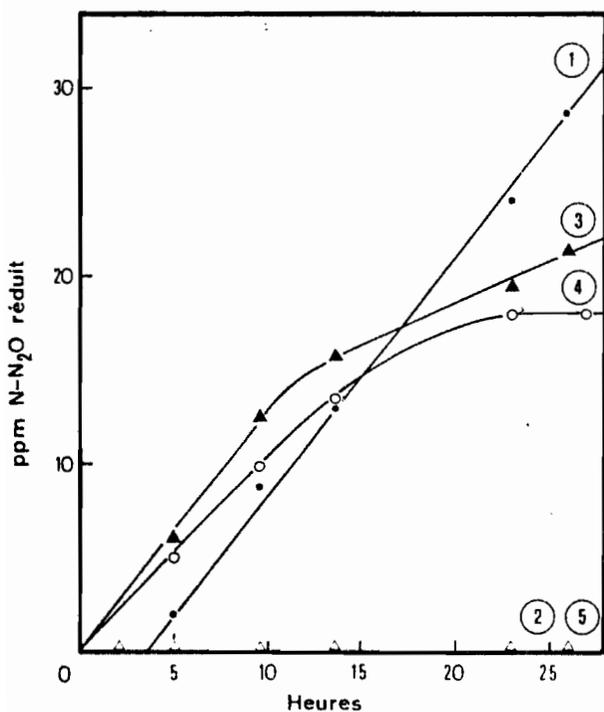


Fig. 1. — Action du chloramphénicol sur l'activité oxyde nitreux-réductase d'un sol de rizière. (1) sol non préincubé; (2) sol non préincubé, mesure effectuée en présence de chloramphénicol; (3) sol préincubé avec N_2O ; (4) sol préincubé avec N_2O , mesure effectuée en présence de chloramphénicol; (5) sol préincubé avec N_2O et chloramphénicol.

possible de mesurer par cette méthode une activité initiale si elle est présente dans le sol au moment du prélèvement, puis une activité potentielle induite par le substrat respiratoire.

2. INFLUENCE DE LA QUANTITÉ DE SOL ET DE LA CONCENTRATION EN N_2O .

Une quantité de sol de 1,3 kg répartie par fractions de 100 g en flacons sérum de 500 ml, saturées d'eau, maintenues en anaérobiose à 37° en présence de 1500 ppm de $N-N_2O$, est séchée à l'air après une semaine d'incubation puis tamisée à 2 mm. Des échantillons de 5, 10, 20 et 40 g du sol ainsi traité sont saturés d'eau puis maintenus en présence de 50, 100, 200 ou 400 ppm de $N-N_2O$ et 2 ml de krypton, en anaérobiose à 37° pendant 24 h.

On effectue ensuite les analyses de l'atmosphère pour déterminer l'activité oxyde nitreux-réductase. Les résultats (fig. 2) montrent que pour une même concentration en N_2O , l'activité est proportionnelle à la quantité de

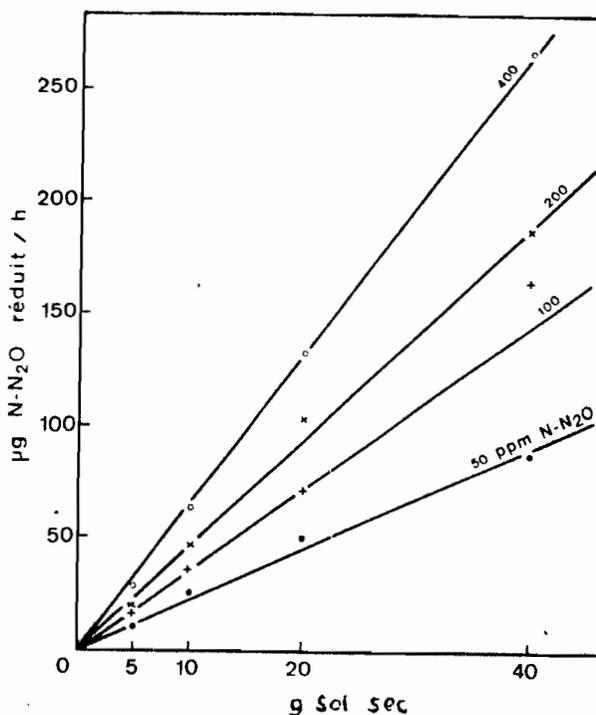


Fig. 2. — Influence de la quantité de sol et de la concentration en N_2O sur l'activité oxyde nitreux-réductase d'un sol de rizière.

sol, et que pour une même quantité de sol, cette activité est fonction de la concentration en N_2O . Rappelons que la vitesse maximum V_m est obtenue avec 1 500 ppm de $N-N_2O$, c'est-à-dire environ 10 % de N_2O dans la phase gazeuse du flacon de mesure (Garcia, 1974).

3. PERSISTANCE DE L'ACTIVITÉ OXYDE NITREUX-RÉDUCTASE INDUITE DANS LE SOL.

30 g de sol sont saturés d'eau et mis en incubation en anaérobiose en présence de 2,5 ml de N_2O à 37° pendant 48 h, puis on renouvelle l'atmosphère des flacons par un vide poussé suivi d'un gazage à l'hélium, opérations qui sont répétées 3 fois. On maintient ensuite les flacons à 37° pendant 6 h en présence de 2,5 ml de N_2O et 1 ml de krypton pour déterminer l'activité oxyde nitreux-réductase induite pendant la préincubation. Les flacons sont ensuite séparés en deux lots de 5 flacons chacun et incubés à 30°. Les flacons du premier lot sont débouchés pour permettre le dessèchement du sol.

Tous les 15 j, pendant trois mois, les flacons desséchés sont rehumidifiés puis on effectue une mesure de l'acti-

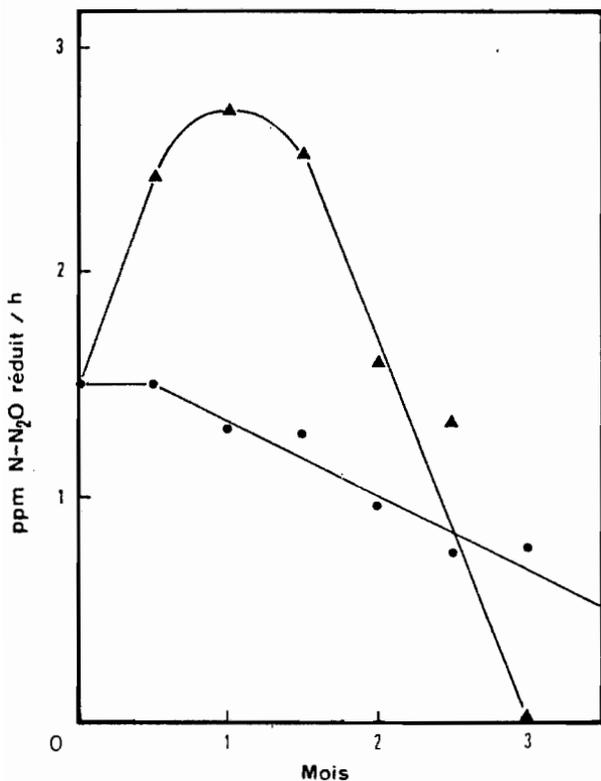


Fig. 3. — Persistence de l'activité oxyde nitreux-réductase induite dans un sol de rizière. —●—, sol maintenu saturé en anaérobiose; +——+ sol séché après chaque mesure d'activité.

tivité oxyde nitreux-réductase initiale de la même façon que précédemment. Les mêmes conditions de mesure sont également appliquées aux flacons conservés bouchés.

Les résultats des mesures (fig. 3) montrent que l'activité oxyde nitreux-réductase qui correspond initialement à 1,5 ppm de N-N₂O réduit/h, diminue très lentement dans le sol maintenu humide alors que dans le sol périodiquement séché puis rehumidifié pour la mesure, l'activité présente un maximum (2,7 ppm N-N₂O réduit/h) au bout d'un mois puis diminue. Elle atteint le niveau initial après 2 mois puis disparaît après 3 mois.

4. INFLUENCE DE LA DURÉE DE LA PRÉINCUBATION SUR L'ACTIVITÉ OXYDE NITREUX-RÉDUCTASE INITIALE.

Des échantillons de 30 g de sol sont saturés d'eau et mis en incubation en anaérobiose à 37° en présence de 2,5 ml de N₂O pendant 48 h. Toutes les 3 h, on effectue

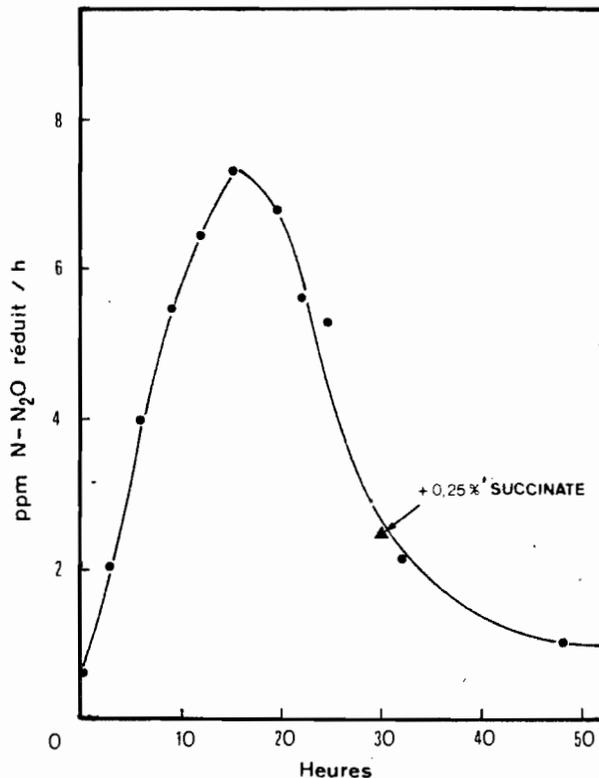


Fig. 4. — Influence de la durée d'incubation d'un sol de rizière avec N₂O, sur l'activité oxyde nitreux-réductase initiale.

une mesure de l'activité oxyde nitreux-réductase initiale à 37°, dans 5 flacons prélevés dans le lot. Pour cela on renouvelle l'atmosphère d'hélium et on ajoute 2,5 ml de N₂O et 1 ml de krypton.

Les résultats des mesures (fig. 4) montrent que l'activité initiale augmente régulièrement pendant les 15 premières heures puis diminue. Elle est, après 48 h d'incubation, égale au double de la valeur initiale (1 ppm N-N₂O réduit/h).

5. INFLUENCE DE L'ADDITION D'UN SUBSTRAT CARBONÉ.

Des échantillons de 30 g de sol sont saturés avec des solutions de glucose ou de succinate de sodium dont les concentrations sont telles que les quantités dans le sol soient de 0,25, 0,50, 0,75, 1 ou 2 %, exprimées par rapport au poids sec de sol. On incube en anaérobiose à 37° pendant 5 j en présence de 10 ml de N₂O. Après ce laps de temps, on renouvelle l'atmosphère des flacons qui sont à nouveau incubés en anaérobiose à 37° pendant 24 h après addition de 5 ml de N₂O et 2 ml

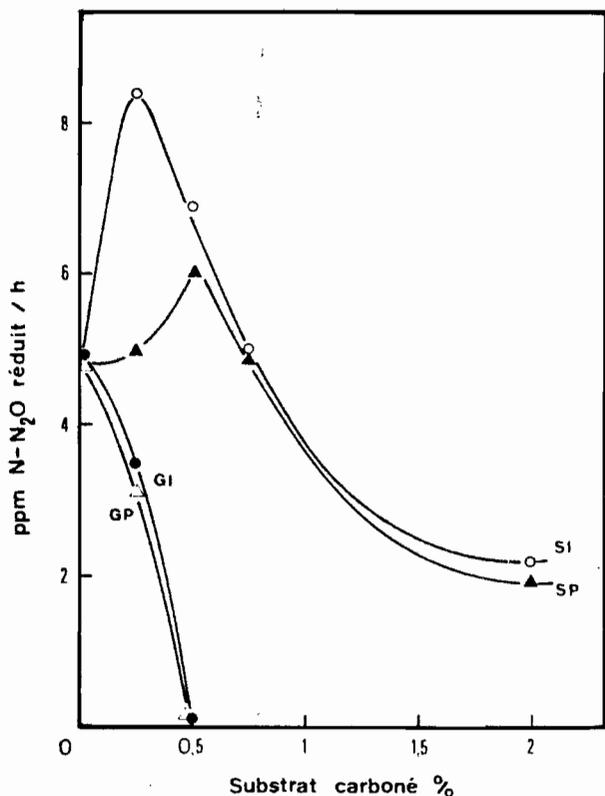


Fig. 5. — Influence de l'addition d'un substrat carboné sur l'activité oxyde nitreux-réductase d'un sol de rizière. S = succinate; G = glucose; I = activité initiale; P = activité potentielle.

de krypton pour la mesure des activités initiale et potentielle.

Les résultats des mesures (fig. 5) montrent un très net effet dépressif du glucose sur l'activité oxyde nitreux-réductase qui est nulle en présence de 0,50 % de glucose. Par contre la présence d'une teneur en succinate de 0,25 % conduit presque au doublement de l'activité initiale puis au-delà d'une teneur de 1 %, les activités initiale et potentielle diminuent sans toutefois s'annuler comme dans le cas du glucose. D'autres substrats tels que saccharose, mannitol, acétate, lactate et pyruvate ont pour effet la disparition de l'activité, dès la teneur 0,25 %.

6. LOI STATISTIQUE DE RÉPARTITION DES MESURES OBTENUES PAR LA MÉTHODE DE RÉDUCTION DE N₂O.

Dans le but de définir la loi de répartition statistique des mesures obtenues par la méthode de réduction de N₂O suivant la technique habituelle (Garcia, 1975 b),

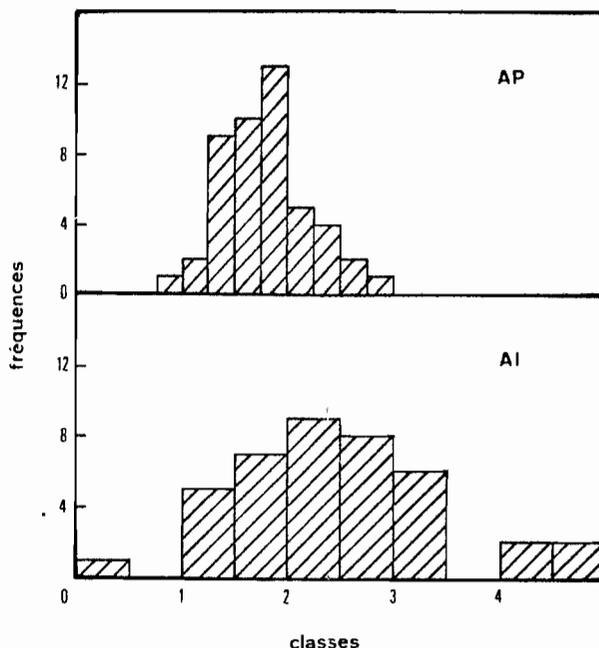


Fig. 6. — Histogramme de répartition des mesures des activités dénitrifiantes initiales (AI) et potentielles (AP) pour l'essai au champ.

50 répétitions ont été réalisées dans une parcelle de la station expérimentale de Djibélor en Casamance. Les prélèvements ont été effectués dans la rhizosphère d'un riz de un mois et demi, 3 semaines après un épandage d'urée.

Les histogrammes de répartition des résultats des mesures sont compatibles avec une loi normale (fig. 6). La vérification de la normalité (fig. 7) consistant à porter les fréquences cumulées relatives sur un graphique à ordonnées en échelle gaussienne (MONJALLON, 1961), donne un résultat acceptable confirmé par le fait que 95 % des données sont comprises dans l'intervalle $m \pm 2s$ (m = moyenne arithmétique, s = écart-type).

DISCUSSION.

Dans un sol qui n'a pas été le siège d'une dénitrification récente, la réduction de N₂O ne se produit qu'après une latence de plusieurs heures. Dans le cas contraire, elle intervient dès le début de l'incubation et peut être amplifiée après plusieurs heures. L'accroissement d'activité, comme cela est montré par l'effet du chloramphénicol, résulte de la synthèse *de novo* d'enzyme induite par le substrat respiratoire, lorsque le niveau de carbone organique assimilable est suffisant.

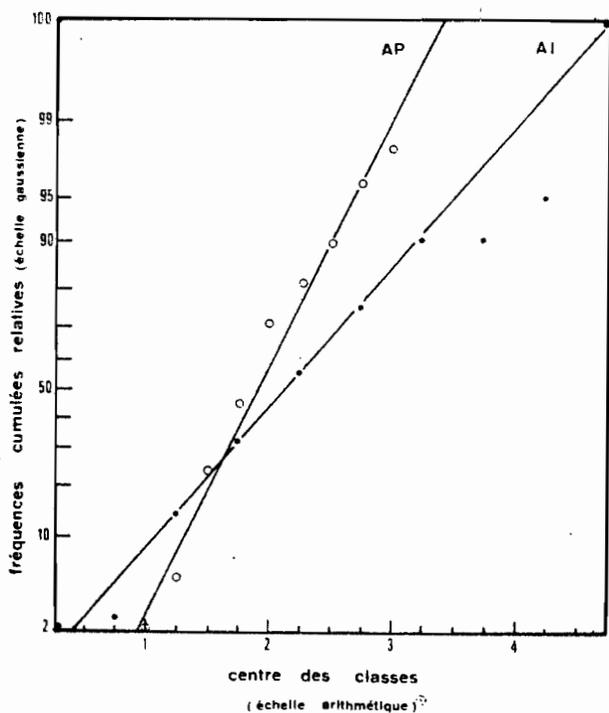


Fig. 7. — Fréquence cumulée relative des mesures des activités dénitrifiantes initiales (AI) et potentielles (AP) pour l'essai au champ.

La réduction de N_2O est proportionnelle à la quantité de sol mais il faut veiller à ce que l'épaisseur de celui-ci ne limite pas la diffusion du gaz. C'est pourquoi on ne doit pas dépasser 50 g de sol dans les flacons serum de 250 ml placés en position horizontale (Garcia, 1974). Pour une quantité de sol donnée, la vitesse de réduction de N_2O est fonction de sa concentration. Il a été montré qu'elle est maximum pour une concentration de N_2O égale à environ 10 % de la phase gazeuse (Garcia, 1974). Cependant pour accroître la sensibilité de la méthode, il est préférable de n'utiliser que le sixième de cette concentration. La vitesse de réduction est alors diminuée de moitié mais les pics mesurés sur le chromatogramme sont beaucoup moins hauts, ce qui permet de détecter plus facilement de faibles activités.

Dans le sol maintenu humide, l'activité oxyde nitreux-réductase mesurée périodiquement ne diminue que lentement; elle est sensiblement constante au cours des premières semaines. Par contre, lorsque le sol est soumis à des humectations et dessiccations répétées, l'activité mesurée immédiatement après la rehumectation croît après les deux premières humectations puis diminue très rapidement par suite probablement d'un épuisement des substrats carbonés libérés par les humectations et dessiccations successives.

En suivant l'activité oxyde nitreux-réductase dans un sol au cours d'une incubation avec N_2O , on constate

TABLEAU II
RESULTATS DU TEST STATISTIQUE DE REPARTITION DES MESURES
OBTENUES PAR LA METHODE DE REDUCTION DE N_2O APPLIQUEE AU CHAMP

		Activité initiale AI	Activité potentielle AP
Effectif	n	39	47
Moyenne ppm N réduit/h	m	2,49	1,78
Variance	s^2	0,818	0,176
Ecart-type	s	0,29	0,12
% des mesures comprises dans l'intervalle $m \pm 2s$	$\frac{ts}{\sqrt{n}}$	97,5 %	96 %
Précision de m pour 40 mesures	V	11,6 %	6,74 %
Précision de m pour 10 mesures	$2V$	23,6 %	13,5 %

qu'elle atteint rapidement une valeur très élevée puis diminue très vite. Cette diminution d'activité semble correspondre à la disparition du substrat respiratoire de la phase gazeuse des flacons; en effet, un apport de carbone pendant cette période n'entraîne aucune modification d'activité (fig. 4). Par contre, lorsqu'on rajoute du N_2O dans les flacons pendant cette même période, plusieurs heures après sa totale disparition et que l'on poursuit l'incubation pendant quelques heures, l'activité mesurée est à nouveau accrue. L'activité initiale mesurée après une longue période d'incubation pourrait donc n'être qu'une petite fraction de l'activité réelle induite dans le sol à un moment donné par la présence de composés oxydés de l'azote dont le N_2O . En effet, l'accumulation de N_2O a lieu pendant la dénitrification dans les sols acides (Garcia, 1973), ce qui est le cas de la plupart des sols de rizière du Sénégal. Par l'utilisation de cette méthode *in situ*, il est donc possible de savoir si le sol a été le siège d'une récente dénitrification mais l'intensité réelle de cette dernière ne peut être évaluée.

Dans le sol étudié, parmi une série de glucides et d'acides organiques testés, seul le succinate a montré un effet positif sur l'activité oxyde nitreux-réductase en doublant l'activité potentielle du sol; les autres substrats ont tous eu un effet dépressif. Aucune explication valable n'a pu être avancée.

Enfin, la distribution des mesures obtenues par l'application de la méthode au champ suit une loi Normale. En effectuant 10 répétitions pour chaque mesure, on obtient une évaluation satisfaisante de la moyenne, l'intervalle de confiance étant de l'ordre de 15 à 20 %.

CONCLUSION.

Une dénitrification dont le sol de rizière a été le siège récemment peut être mise en évidence par la mesure d'une activité oxyde nitreux-réductase. La méthode élaborée peut se révéler très utile pour tester les inhibiteurs de nitrification ou les engrais réputés libérer lentement l'azote. Elle pourrait également permettre d'évaluer indirectement une densité de population après induction de l'oxyde nitreux-réductase au moyen d'une préincubation du sol en présence de N_2O .

Manuscrit reçu au Service des Publications le 11 mai 1977

BIBLIOGRAPHIE

- GARCIA (J.-L.), 1973. — Séquence des produits formés au cours de la dénitrification dans les sols de rizières du Sénégal. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 124B : 351-362.
- GARCIA (J.-L.), 1974. — Réduction de l'oxyde nitreux dans les sols de rizières du Sénégal: mesure de l'activité dénitrifiante. *Soil Biol. Biochem.*, 6 : 79-84.
- GARCIA (J.-L.), 1975 a. — Effet rhizosphère du riz sur la dénitrification. *Soil Biol. Biochem.*, 7 : 139-141.
- GARCIA (J.-L.), 1975 b. — Evaluation de la dénitrification dans les rizières par la méthode de réduction de N_2O . *Soil Biol. Biochem.*, 7 : 251-256.
- MOJALLON (A.), 1961. — Introduction à la méthode statistique, pp. 137-138, Vuibert éd., Paris.

4 - Application à la culture du riz

articles 7 et 8

EVALUATION DE LA DÉNITRIFICATION DANS LES RIZIÈRES PAR LA MÉTHODE DE RÉDUCTION DE N_2O

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_2O . 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_2O 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_2O reduction rates. Immediately after collection, samples of soil were incubated anaerobically in 250 ml serum flasks, with addition of N_2O 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 flask 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_2O (Garcia, 1974a) qui est préférable à la méthode respirométrique de McGarity (1961) (Garcia, 1973a; Garcia *et al.*, 1974).

On mesure la disparition de N_2O 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).

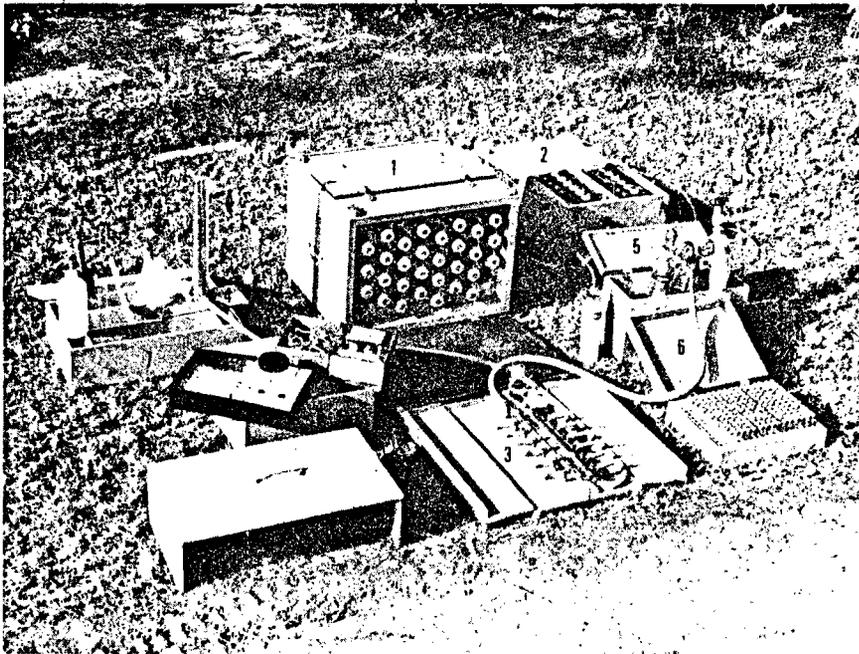


Fig. 1. Matériel de terrain pour l'évaluation de la dénitrification dans les rizières par la méthode de réduction de N_2O : (1) étuve à ventilation, (2) deux batteries d'accumulateurs de 12 V, (3) rampe de gazage, (4) pompe à vide manuelle, (5) coffret à gaz, (6) coffret pour tubes Vacutainer, (7) coffret pour accessoires, (8) conductivimètre et trousse pour dosage des nitrates.

(5) Trois petites bouteilles de gaz purs: hélium N55, N_2O N40 et krypton N35 (Sté l'Air Liquide).

(6) Un coffret-portoir en bois pour 200 tubes Vacutainer de 5 ml, (Becton-Dickinson, ref. 4827.0-0), mis sous vide au laboratoire.

(7) Un coffret en bois renfermant tous les accessoires: seringues en plastique de 1 ml et 2,5 ml, aiguilles de rechange, aiguilles doubles de 25 mm 7.10 pour le prélèvement d'atmosphère en tubes Vacutainer (Becton-Dickinson, ref. 5741-0-1), seringues en plastique de 30 ml pour prélèvement de sol.

(8) Un conductivimètre Cenco et une trousse Hach pour le dosage des nitrates et des nitrites.

(9) Un pH-mètre Polymetron Type 55B dans une boîte étanche, non représenté sur la Fig. 1, sert également à mesurer *in situ* le pH et le Eh. L'ensemble de ce matériel est disposé dans un véhicule suffisamment vaste pour être utilisé sans déchargement.

Prélèvement et préparation des échantillons

Une seringue en plastique de 30 ml dont l'extrémité a été sectionnée, est utilisée pour effectuer les prélèvements de sol directement sous les plants de riz ou en sol nu. On prélève en trois endroits différents, 10 ml de sol avec la même seringue, qui sont déposés à l'aide du piston, dans un même flacon sérum de 250 ml. Pour chaque traitement (sol nu ou planté), on prépare ainsi 10 flacons. La moyenne des mesures résultera donc de 30 prélèvements distincts. Les carottes de sol sont disposées dans les flacons en position allongée; ces derniers sont tapotés énergiquement pour bien étaler le sol saturé d'eau.

Les flacons sont ensuite reliés par une aiguille à la rampe de gazage et on effectue un vide maximum à l'aide de la pompe manuelle, avant de gazer avec l'hélium. On répète l'opération trois fois en ajustant la

pression finale de l'hélium à la pression atmosphérique. On retire ensuite les flacons de la rampe puis on introduit à l'aide d'une seringue, 1 ml de krypton dans chaque flacon. Ce gaz est employé comme étalon interne pour simplifier les calculs en supprimant les mesures de volume et de pression pour chaque flacon (Burford et Bremner, 1972). On place les flacons toujours en position allongée, dans l'étuve à 37°C pendant 30 min environ, pour leur permettre d'atteindre l'équilibre thermique; cette période peut varier suivant la température ambiante. Puis, sans retirer les flacons de l'étuve, on introduit à l'aide d'une seringue, 2,5 ml de N_2O .

On effectue alors le prélèvement du temps zéro à l'aide de tubes Vacutainer et d'aiguilles à tête double, en enfonçant au préalable une tête de l'aiguille dans le bouchon du tube, sans casser le vide, puis en enfonçant l'autre extrémité de l'aiguille dans le flacon sérum; il suffit alors d'enfoncer la première extrémité dans le tube Vacutainer pour aspirer une fraction de l'atmosphère du flacon. L'opération est répétée dans deux autres séries de tubes Vacutainer après 6 h puis une vingtaine d'heures d'incubation à 37°C.

Au Sénégal, il arrive, notamment à la saison des pluies, que la température ambiante dépasse 37°C pendant quelques heures l'après-midi. On y remédie en introduisant dans le compartiment central de l'étuve, dans deux bacs en altuglass, deux accumulateurs de froid pour glacière de terrain, congelés au laboratoire et transportés dans une glacière portable. Ces accumulateurs sont changés toutes les deux heures, tant que la température ambiante ne descend pas au-dessous de 37°C.

De retour au laboratoire, les flacons sont mis à l'étuve à 110°C pendant 24 h pour déterminer le poids sec du sol.

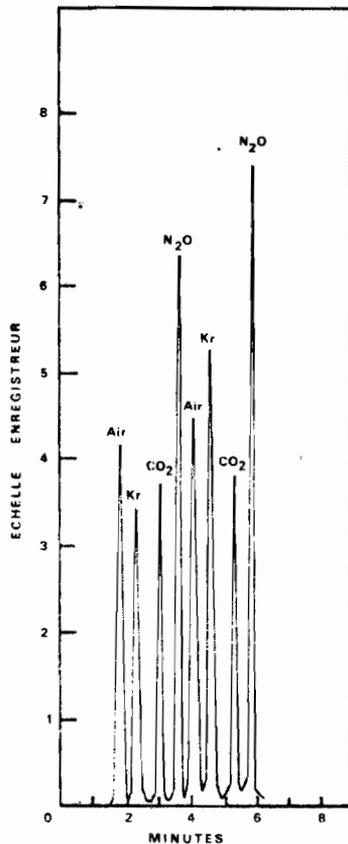


Fig. 2. Chromatogramme obtenu pour deux analyses groupées du contenu de deux tubes Vacutainer. La vitesse de déroulement du papier enregistreur est de 50 cm/h, et la hauteur des pics est atténuée deux fois.

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 + N₂ - Kr - CO₂ - N₂O (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 N₂O employée pour la mesure (100 parties.10⁶ environ) ne permet pas l'inhibition totale de la production de CH₄ (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 CH₄. 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 CH₄ 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 N₂O et de Kr contenus dans les V ml injectés et soit X le volume de N₂O dans la phase gazeuse du flacon de mesure. L'approximation du calcul consiste à supposer que le N₂O diffuse dans le même volume que le krypton. Ecrivons alors que les pourcentages de N₂O 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 N₂O 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 de 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 ₂ 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/ 10^6 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 σ , 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 effectué plusieurs prélèvements en divers endroits de la vallée du Fleuve Sénégal et à différents stades de la croissance du riz (Tableau 2). Pour chaque rizière, les

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 probablement le fait qu'une activité dénitrifiante a eu lieu dans ces sols consécutivement à une production de nitrates non décelable. Elle est cependant faible, au plus égale

Tableau 2. Prélèvements effectués dans les rizières de la vallée du Fleuve Sénégal

Localité	Date	pH Sol	Résistivité $\mu m^2/oh/cm$	âge du riz (jours)	Variété	Engrais
Boundoum Nord	10-Oct-73	6,5	150	65	D52-37 (140 j)	100 Kg/ha $PO_4(NH_4)_3$ 16-48-0 avant semis 50 Kg/ha urée début submersion 50 Kg/ha urée montaison
Savoigne	11-Oct-73	5,8	155	45	SE-302 G	120 Kg/ha $PO_4(NH_4)_3$ 16-48-0 avant semis 350 Kg/ha urée en deux épandages
Boundoum Nord	28-Nov-73	6,5	100	125	D52-37	même parcelle
Richard-Toll 1	28-Nov-73	7,2	200	100		
Fanaye	28-Nov-73	5,4	80	115	IR8 (130 j)	125 Kg/ha $PO_4(NH_4)_3$ 16-48-0 avant semis 350 Kg/ha urée en deux épandages
Richard-Toll 2	27-Fev-74	4,9	475	30	IKP	$PO_4(NH_4)_3$ 16-48-0 avant semis
Savoigne	28-Fev-74	7,0	750	30	SE 302 G	$PO_4(NH_4)_3$ 16-48-0 avant semis même parcelle mais culture ultérieure.

Tableau 3. Activités dénitrifiantes initiales et potentielles mesurées dans plusieurs rizières du Sénégal. V_m : vitesse moyenne de réduction de $N-N_2O$ (parties/10⁶/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)			P/I	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/10⁶ 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, plus élevée pour R que pour S, le rapport R/S variant de 1,1 à 4,2. Ceci confirme les résultats obtenus lors d'expériences antérieures au laboratoire (Garcia, 1973a; Garcia, 1974 et 1975), et résulte de la présence dans la rhizosphère, d'un nombre plus élevé de bactéries dénitrifiantes et d'exsudats racinaires facilement assimilables.

Ceci ressort également de l'examen du rapport des activités potentielle et initiale (P/I) d'un même échantillon. En effet, ce rapport est en général plus élevé pour R que pour S.

2 Pots

Quatre prélèvements ont été effectués à différents stades de la croissance du riz. Les résultats (Tableau 4)

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 le cas du sol planté, après 120 j de culture. Nous n'avons cependant pas décelé de nitrate lors des 4 prélèvements. Le rapport R/S entre les activités initiales de S et de R est nettement plus élevé après 90 j de culture: il passe de 0,8 à 2,4 puis se stabilise.

L'activité dénitrifiante potentielle de S est le plus souvent voisine de l'activité initiale: elle est nettement inférieure à celle de R. Le rapport R/S des activités potentielles augmente dans la période des 85 premiers jours de culture, au fur et à mesure du développement de la rhizosphère, puis diminue.

On constate également, comme pour les échantillons de rizières, que le rapport P/I est généralement plus élevé pour R que pour S. Il atteint ici une valeur nettement plus grande: 4,4. Dans le cas des pots, l'effet rhi-

Tableau 4. Activités dénitrifiantes initiales et potentielles mesurées à différentes époques d'une culture de riz en pot. V_m : vitesse moyenne de réduction de $N-N_2O$ (parties/10⁶/h). i : intervalle de confiance de V_m . C.V.: coefficient de variation (pour cent).

Date de prélèvement après le début de l'humidification (jours)	Sol nu (S)						Rhizosphère (R)						R/S			
	Activité initiale (I)			Activité potentielle (P)			P/I	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.			
15	0,48	0,15	31	0,72	0,10	14	1,5									
70 (riz: 50)	0,80	0,18	22	0,84	0,25	30	1,0	0,62	0,15	24	1,46	0,22	15	2,4	0,8	1,7
105 (riz: 85)	0,48	0,16	33	0,53	0,30	56	1,1	1,16	0,40	34	2,35	0,28	12	2,0	2,4	4,4
140 (riz: 120)	0,75	0,16	21	0,75	0,30	40	1,0	1,72	0,31	18	2,24	0,49	22	1,3	2,3	3,0

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

CONCLUSION

L'adaptation de la méthode d'estimation de la dénitrification par la réduction de N_2O , à des mesures en pots et au champ au cours de la culture du riz, nous a permis d'une part, de déceler dans tous les cas une activité dénitrifiante initiale, preuve de l'existence effective d'une dénitrification dans les rizières donc d'une perte d'azote, et d'autre part, de confirmer l'influence favorable de la rhizosphère du riz sur les microorganismes dénitrifiants.

Cette méthode devrait permettre de suivre, tout au long de la culture du riz, comme cela est montré par les résultats de mesures sur la culture en pots, l'évolution des activités dénitrifiantes initiale et potentielle dans les rizières. Ces variations éventuelles de l'activité initiale indiqueront l'existence d'une dénitrification réelle résultant de l'apparition de nitrates dans le sol par suite de la nitrification de l'ammonium présent dans le sol ou apporté par les engrais. Ces mesures pourront ainsi permettre d'évaluer les pertes d'azote en rizière. D'autre part, les variations de l'activité potentielle, laquelle concerne des germes qui ne participaient pas à la dénitrification au moment du prélèvement, indiqueront l'évolution comparative de la densité microbienne.

Remerciements—L'auteur exprime ses remerciements à M. M. Mouraret pour ses conseils ainsi qu'à MM. M. Boureau, R. Zogbi, W. Sy et J. Bakhom pour leur assistance technique.

REFERENCES

- BALANDREAU J. et DOMMERS 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 compounds. *Soil Biol. Biochem.* **5**, 673-678.
- BURFORD J. R. and BREMNER J. M. (1972) Gas chromatographic determination of carbon dioxide evolved from soils in closed systems. *Soil Biol. Biochem.* **4**, 191-197.
- 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.
- GARCIA J.-L. (1974) Réduction de l'oxyde nitreux dans les sols de rizières du Sénégal: mesure de l'activité dénitrifiante. *Soil Biol. Biochem.* **6**, 79-84.
- GARCIA J.-L. (1975) Effet rhizosphère du riz sur la dénitrification. *Soil Biol. Biochem.* **6**, 139-141.
- 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. Écol. Biol. Sol.* **11**, 169-185.
- MARTIN A. E. and ROSS P. J. (1968) A nitrogen-balance study using labelled fertilizer in a gas lysimeter. *Pl. Soil.* **28**, 182-186.
- MCGARITY J. W. (1961) Denitrification studies on some South Australian soils. *Pl. Soil.* **14**, 1-21.
- MCGARITY J. W. and HAUCK R. D. (1969) An aerometric apparatus for the evaluation of gaseous nitrogen transformations in fields soils. *Soil Sci.* **108**, 335-344.
- MYERS R. J. K. and MCGARITY J. W. (1972) Denitrification in undisturbed cores from a solodized solonetz B horizon. *Pl. Soil.* **37**, 81-89.
- OVERREIN L. N. (1968) Lysimeter studies on tracer nitrogen in forest soil: I. Nitrogen losses by leaching and volatilization after addition of urea N-15. *Soil Sci.* **106**, 280-290.
- STEFANSON R. C. (1972) Soil denitrification in sealed soil-plant systems. III. Effect of disturbed and undisturbed soil samples. *Pl. Soil.* **37**, 141-149.

article 8

La dénitrification en sol de rizière : Influence de la nature et du mode d'épandage des engrais azotés

Jean-Louis GARCIA

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

RÉSUMÉ

L'évaluation de la dénitrification par la mesure de la vitesse de réduction de N_2O a été effectuée au cours de la croissance du riz en pots, dans des sols enrichis soit en urée appliquée en surface ou en profondeur, soit en engrais-retard (Sulfur Coated Urea et N-Lignine). Cette méthode a permis de confirmer que l'enfouissement de l'engrais azoté n'entraîne qu'une perte d'azote faible ou nulle, contrairement à ce qui est observé dans le cas d'une application en surface. Les pertes consécutives à l'épandage d'engrais-retard en surface sont élevées mais interviennent plus tardivement que lorsqu'il s'agit d'urée. Les différences observées entre les traitements sont moins marquées dans la rhizosphère du riz qu'en sol nu. L'effet rhizosphère du riz sur l'activité dénitrifiante potentielle est maximum dans les premiers stades de la croissance et diminue progressivement avec l'âge des plantes.

Le meilleur rendement en grain a été obtenu en enfouissant l'urée. Avec l'urée enrobée de soufre (SCU), le rendement est équivalent à celui qui est obtenu avec l'urée non enrobée épandue en quantité plus importante. La N-Lignine n'a pas eu d'effet sur le rendement; son application a été suivie des pertes d'azote les plus importantes.

MOTS CLÉS : Dénitrification · rizière · engrais azotés.

ABSTRACT

The measurement of rates of N_2O reduction was used for estimating the denitrifying capacity of potted rice-growing soils enriched either with urea applied on the surface or in depth, or with slow-release nitrogen fertilizers (Sulfur-coated urea and N-Lignin). It was confirmed that there is little or no nitrogen loss when the fertilizer is buried, unlike what is observed when it is applied on the surface. The losses from surface spreaded slow-release nitrogen fertilizers are high but occur later than they do with urea. The differences observed are less marked in the rice rhizosphere than in non-planted soil. The rhizosphere effect of rice on the potential denitrifying activity is maximum in the first stages of grow and diminishes progressively with the age of the plants.

The best grain yield was obtained with depth placement of urea. With Sulfur-coated urea (SCU) the yield is equi-

valent to that obtained with non-coated urea spread in greater quantities. N-Lignin had no effect on the yield and gave the greatest nitrogen losses.

KEY WORDS: Denitrification · paddy soils · nitrogen fertilizers.

INTRODUCTION.

Dans des récentes revues de la littérature relative aux transformations de l'azote en sol submergé, Tusneem et Patrick (1971), puis Garcia (1975 a) ont exposé les processus qui aboutissent à une perte d'azote en rizière, malgré l'emploi d'engrais ammoniacaux : il s'établit à la surface du sol une couche oxydée dans laquelle la nitrification est intense jusqu'à 5 cm de profondeur (Yoshida et Padre, 1968). L'épaisseur de cette couche s'accroît avec le temps de submersion (Patrick et Delaune, 1972). Patrick et Gotoh (1974) ont montré qu'elle dépend de la concentration de O_2 dans l'atmosphère, lors d'expériences en atmosphère confinée. Sa limite correspondrait à un Eh de + 220 mV à pH 7 (Patrick et Tusneem, 1972). Dans cette couche oxydée, le nombre de bactéries nitrifiantes augmente pendant la submersion (Takai et Uehara, 1973). Le nitrate produit diffuse dans la zone réduite sous-jacente où il est perdu par dénitrification.

Pour limiter les pertes d'azote par dénitrification, on peut enfouir l'engrais ammoniacal qui n'est alors plus nitrifié (Aleksic et coll., 1968; I.A.E.A., 1970). L'I.R.R.I. (1974) préconise de concentrer l'urée dans des petites boules de terre, les « mudballs », qui sont enfouies à 10 cm de profondeur après repiquage du riz. Ce procédé a permis d'obtenir un rendement de 8 t/ha avec un apport de 60 kg N/ha, alors que le

rendement était de 6,6 t/ha avec un apport habituel de 100 kg N/ha à la montaison. A l'I.R.R.I. (1974) a été également mise au point une machine manuelle permettant d'introduire l'engrais azoté en profondeur, entre les pieds de riz.

On a également tenté de lutter contre les pertes d'azote en inhibant la nitrification ou la dénitrification. De nombreux inhibiteurs de nitrification ont été testés (Patrick et coll., 1968; Rajale et Prasad, 1973; Yoshida et Padre, 1974; Marumoto et coll., 1974). Certains pesticides inhibent la dénitrification (Mitsui et coll., 1964; Azad et Khan, 1968), de même que les azides de Ca et Na et certains composés aromatiques cétonitriles (Ichikawa et coll., 1968 a-b). Mais ces produits sont onéreux et d'un emploi peu courant. C'est pourquoi on s'est tourné vers les engrais-retard, libérateurs lents d'azote. La Tennessee Valley Authority a mis au point en 1972 un produit appelé « Sulfur Coated Urea » (SCU) qui est de l'urée enrobée de soufre. Le soufre freine la dissolution de l'urée dans le sol et sert en outre d'engrais. Le coût de l'engrais est supérieur de 30 % à celui de l'urée, mais on l'utilise en un seul épandage avant la submersion ou le repiquage. Il a été testé en Afrique (O.U.A., 1974). Anjaneya (1974) a obtenu avec 100 kg N/ha de SCU, un rendement équivalent à celui qui résulte d'un apport de 150 kg N/ha d'urée.

La présente étude avait pour but de tester l'efficacité des engrais-retard et de l'enfouissement de l'urée dans une culture de riz en pots, en évaluant la dénitrification par une méthode basée sur la mesure de la vitesse de réduction de N_2O .

MATÉRIEL ET MÉTHODES.

5 pieds de riz de 15 j (variété IR 8) ont été repiqués dans des demi-fûts métalliques de 20 l, contenant 150 kg d'un sol de rizière provenant de la vallée du fleuve Sénégal (Richard-Toll). Ce sol est argileux, ses teneurs en carbone et en azote sont respectivement de 0,76 % et 0,12 % et son pH est de 4,0. Avant submersion, chaque pot a reçu une fumure de fond sous forme de $(NH_4)_2SO_4$ (20 kg N/ha) et de KH_2PO_4 (50 kg P_2O_5 /ha et 35 kg K_2O /ha). La comparaison a porté sur les différentes fertilisations azotées suivantes :

— urée (46,6 % N) appliquée après submersion, en surface (4 pots) ou en profondeur à l'aide d'une grosse seringue (4 pots), à deux époques différentes de la croissance du riz : au tallage (200 kg N/ha) et à la montaison (100 kg N/ha);

— SCU (39,9 % N) appliqué en surface avant la submersion, dans 4 pots (200 kg N/ha);

— N-Lignine (17,8 % N), engrais-retard appliqué en surface avant la submersion dans 4 pots (200 kg N/ha);
— 4 pots témoins n'ont pas reçu d'engrais.

Pour chacun des traitements, 2 pots sur 4 n'ont pas été plantés pour déterminer comparativement l'effet rhizosphère. La submersion a été maintenue pendant 4 mois. Tous les 15 j, 5 carottes de sol ont été prélevées dans tous les pots, soit en sol nu, soit dans la rhizosphère et placées à 37 °C, chacune dans un flacon sérum de 250 ml, en anaérobiose en présence de 5 ml de N_2O et 2 ml de krypton utilisé comme étalon interne. Des analyses de l'atmosphère des flacons effectuées sur des prélèvements en tubes Vacutainer suivant les conditions décrites par ailleurs (Garcia, 1975 b) ont permis de suivre la vitesse de réduction de N_2O après 6 h et 24 h d'incubation.

À la récolte du riz, le nombre total d'épis et le poids sec de grains ont été déterminés pour chaque pied. Le calcul statistique du coefficient de variation de l'intervalle de confiance de la moyenne et le test de Student-Fischer ont été appliqués aux résultats obtenus.

RÉSULTATS.

1. ACTIVITÉ INITIALE.

Mesurée après 6 h d'incubation à 37°, l'activité initiale représente l'activité de l'oxyde nitreux-réductase présente dans le sol au moment du prélèvement. Elle rend compte de l'existence d'une dénitrification récente, donc de la présence préalable de nitrate même si celui-ci n'est pas décelable, comme cela est très généralement constaté en rizière. En sol nu (S), un premier pic d'activité est observé pour tous les traitements (fig. 1). Il est faible et correspond probablement à une perte d'azote aux dépens de la fumure de fond. Lorsque l'urée est appliquée en surface, on constate l'apparition d'un pic d'activité 1 mois après chacune des deux applications. Lorsque l'urée est appliquée en profondeur, on n'observe pas d'incidence sur l'activité dénitrifiante. La plus forte activité est obtenue 1 mois 1/2 après l'application de N-Lignine. Une activité légèrement inférieure à celle-ci est observée 2 mois après l'application de SCU. Dans la rhizosphère (R), les résultats sont analogues mais les différences observées sont moins marquées (fig. 2).

2. ACTIVITÉ POTENTIELLE.

Mesurée entre 6 et 24 h d'incubation, elle rend compte essentiellement de la disponibilité dans le sol, de

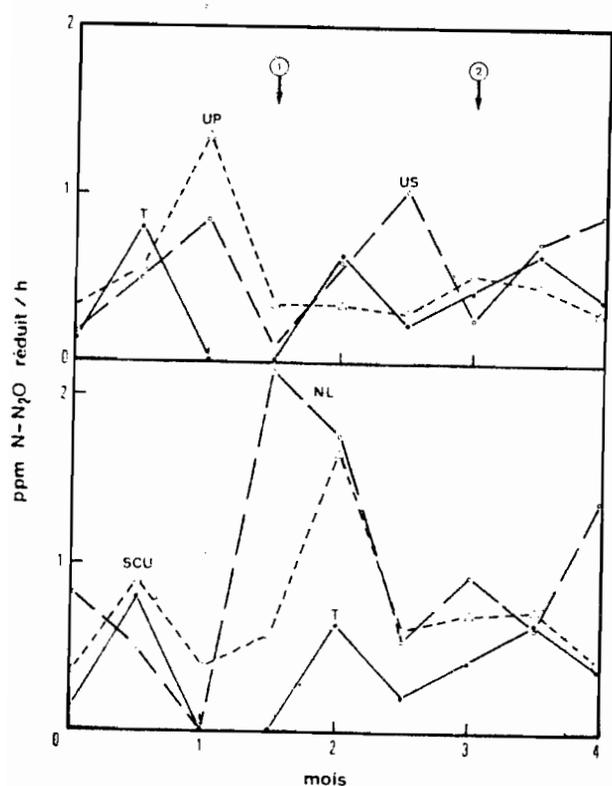


Fig. 1. — Activité dénitrifiante initiale déterminée par la réduction de N_2O en sol nu. T = témoin; US = urée en surface; UP = urée en profondeur; SCU = sulfur coated urea; NL = N-Lignine (1) et (2) = épandages d'urée.

substrats carbonés directement assimilables. En sol nu, elle est pratiquement constante pendant toute la durée de l'expérience, quel que soit le traitement (fig. 3). Par contre, dans la rhizosphère, l'activité atteint très vite un haut niveau (riz de 1 mois) puis diminue rapidement. Après 2 mois, elle est la même qu'en sol nu.

3. RENDEMENTS.

Dans le tableau I sont portés, pour chaque traitement et pour 10 pieds de riz, le nombre total d'épis, le poids sec de grains récoltés pour l'ensemble des pieds et par épi. Le meilleur rendement a été obtenu avec l'urée en profondeur, ce mode d'épandage ayant entraîné une perte minimum d'azote comme le traduisent les mesures de dénitrification. La N-Lignine n'a en aucun effet sur le rendement par rapport au témoin. Avec un épandage de SCU, le rendement est analogue à celui qui est obtenu avec l'urée épandue en surface.

Au tableau II sont rapportés les résultats statistiques relatifs à la comparaison de l'effet des traitements. Les

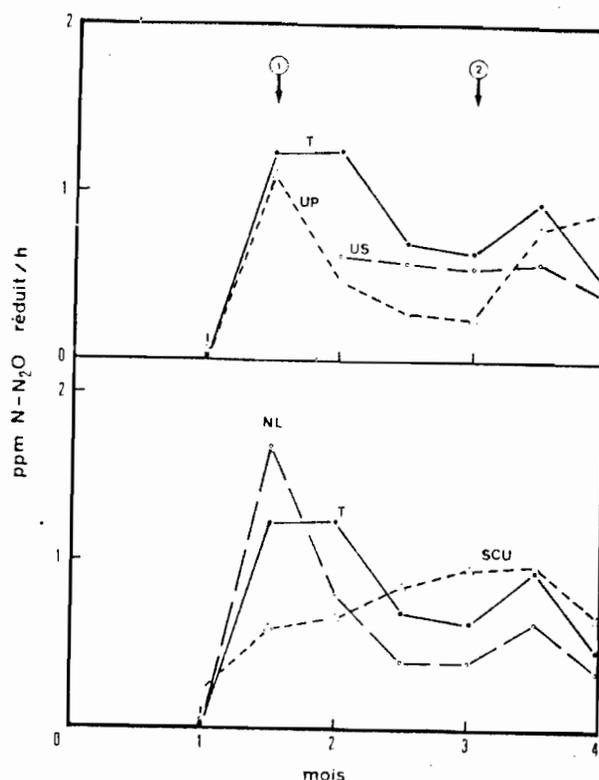


Fig. 2. — Activité dénitrifiante initiale déterminée par la réduction de N_2O dans la rhizosphère du riz. Même légende que la figure 1.

traitements à l'urée non enrobée sont significativement différents du témoin et l'un de l'autre. Le traitement avec N-Lignine et le témoin ne sont pas significativement différents de même que les traitements avec urée en surface et SCU.

DISCUSSION.

La méthode de réduction de N_2O appliquée à des échantillons de sol de rizière a permis de confirmer un résultat connu : l'application de l'engrais azoté en profondeur réduit ou annule les pertes d'azote comparativement à ce qui est observé dans le cas d'une application en surface. D'autre part, les résultats obtenus permettent d'affirmer que la N-Lignine et le SCU ne sont pas des inhibiteurs de nitrification mais constituent simplement des libérateurs lents de N_2 . En effet, la perte par dénitrification consécutive à la nitrification de l'engrais, intervient plus tardivement que dans le cas de l'urée non enrobée.

TABLEAU I
RENDEMENTS OBTENUS POUR 10 PIEDS DE RIZ

Traitement	Nombre d'épis	Poids sec de grains g	Poids sec de grains par épi g
Témoin T	58	46,7	0,81
Urée en surface US	77	102,7	1,33
Urée en profondeur UP	106	149,3	1,41
N-Lignine NL	55	43,6	0,79
Urée enrobée SCU	75	83	1,11

TABLEAU II
COMPARAISON DU NOMBRE D'ÉPIS PAR PIED SELON LES TRAITEMENTS, A L'AIDE DU TEST T DE SUDENT-FISCHER

t 0,1 % = 3,922; t 2 % = 2,552; t 5 % = 2,101;
t 20 % = 1,330

Comparaison des traitements	t	Probabilité d'erreur %
T - US	2,567	2
T - UP	4,480	0,1
T - NL	0,275	90
T - SCU	1,465	20
US - UP	2,552	2
US - NL	2,101	5
US - SCU	0,127	90
UP - NL	3,922	0,1
UP - SCU	2,279	5
NL - SCU	1,330	20

T = témoin
US = urée en surface
UP = urée en profondeur
SCU = Sulfur coated urea
NL = N-Lignine

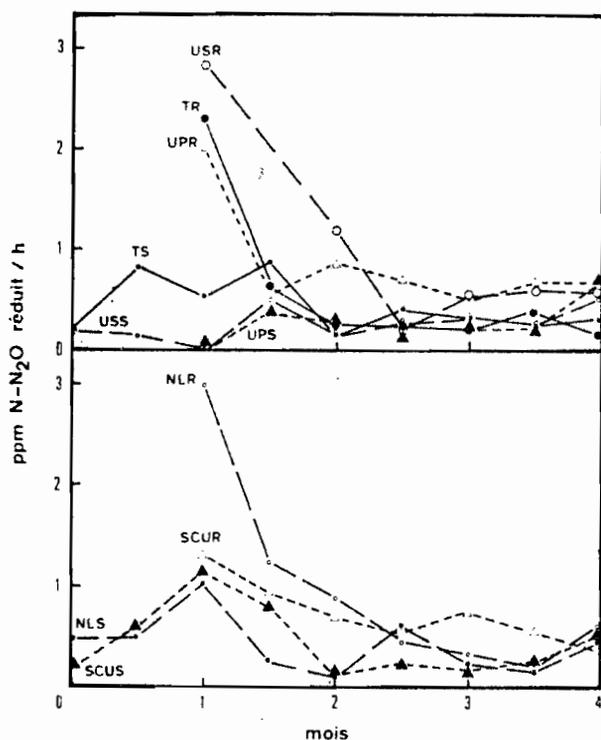


Fig. 3. — Activité dénitrifiante potentielle déterminée par la réduction de N.O. mesurée dans la rhizosphère (R) et en sol nu (S). Même légende que la figure 1.

Dans la rhizosphère du riz, la forme des engrais ou les modalités d'application ont une incidence beaucoup moins marquée qu'en sol nu. Ceci est en accord avec les observations antérieures (De et Digar, 1955; Broadbent et Tusneem, 1971) selon lesquelles la culture du riz diminue la perte d'azote par rapport au sol nu. Ceci pourrait résulter de l'absorption de NH_4^+ par les plantes avant qu'il ne soit oxydé puis perdu par dénitrification. Si les conditions de la dénitrification dans la rhizosphère du riz sont nettement plus favorables qu'en sol nu (Garcia, 1975 c), il semblerait donc que les pertes réelles y soient plus faibles.

Comparativement au sol nu, l'activité dénitrifiante potentielle de la rhizosphère atteint très vite un haut niveau puis diminue rapidement pour atteindre le niveau inférieur observé pour le sol nu. L'effet rhizosphère du riz sur la dénitrification serait donc maximum dans les premiers stades de la croissance de la plante.

La meilleure façon de réduire les pertes d'azote et par conséquent d'augmenter le rendement du riz, est d'appliquer l'engrais azoté en profondeur. Ce procédé est d'ailleurs en cours de développement, comme nous l'avons vu précédemment, en Extrême-Orient. L'emploi de SCU comme engrais-retard a donné un résultat.

identique à celui de l'urée non enrobée appliquée en surface. Mais ce produit a été répandu en une seule fois avant la submersion, en quantité moindre et en surface. La solution consisterait probablement à appliquer l'engrais-retard en profondeur avant la submersion pour réduire les pertes d'azote. En outre, on supprimerait deux façons culturales. L'urée enrobée de soufre (SCU) semble permettre une libération suffisamment lente de N_2 et devrait convenir. Par contre, la N-Lignine a entraîné les plus grandes pertes d'azote et n'a conduit à aucune amélioration du rendement par rapport au témoin. Cet engrais n'est donc pas à conseiller pour le riz inondé.

Manuscrit reçu au Service des Publications le 11 mai 1977

BIBLIOGRAPHIE

- ALECKSIĆ (Z.), BROESHART (M.), MIDDELBOE (V.), 1968. — Shallow depth placement of $(NH_4)_2SO_4$ in submerged rice soils as related to gaseous losses of fertilizer nitrogen and fertilizer efficiency. *Pl. Soil*, 29 : 338-342.
- ANJANEYA (S.D.), 1974. — Relative efficiency of fertilizer nitrogen with and without nitrification inhibitor on IR8 rice. *Andhra Agric. J.*, 19 : 139-144.
- AZAD (M.I.), KHAN (A.A.), 1968. — Reduction of nitrogen losses through denitrification from paddy soil by the application of pesticides. *West Pak. J. Agr. Res.*, 6 : 128-133.
- GARCIA (J.-L.), 1975 a. — La dénitrification dans les sols. *Bull. Inst. Pasteur*, 73 : 167-193.
- GARCIA (J.-L.), 1975 b. — Evaluation de la dénitrification dans les rizières par la méthode de réduction de N_2O . *Soil Biol. Biochem.*, 7 : 251-256.
- GARCIA (J.-L.), 1975 c. — La dénitrification dans la rhizosphère du riz. *Soc. Bot. Fr., Coll. Rhizosphère* : 122-131.
- ICHIKAWA (T.), SETO (S.), GOTO (K.), 1968. — Denitrification resistant fertilizers. *Japan*, 71 29,765, 3 p. (in *Chem. Abstr. Biochem. Sec.*, 78, 83316s).
- ICHIKAWA (T.), SETO (S.), GOTO (K.), 1968. — Aromatic ketonitriles as inhibitors of nitrogen loss from soils. *Japan*, 72 04,965, 3 p. (in *Chem. Abstr. Biochem. Sec.*, 78, 70719a).
- INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, 1970. — Rice fertilization. *Tech. Repts Ser.*, 108 : 1-6.
- I.R.R.I., 1974. — Research Highlights, p. 25.
- MARUMOTO (T.), KIDA (M.), YAMAZAKI (K.), 1974. — Effect of nitrification yield of rice sown directly on an unflooded paddy field. 3 - Relation between the effect of 2-mercaptobenzothiazole and the fertilizer particle size. *Yamaguchi Daigaku Nogakubu Gakujutsu Hokoku*, 25 : 1015-1028 (in *Chem. Abstr. Biochem. Sec.*, 83, 57331b).
- MITSUI (S.), WATANABE (I.), HONMA (M.), HONDA (S.), 1964. — The effect of pesticides on the denitrification in paddy soil. *Soil Sci. Plant Nut.*, 10 : 15-23.
- O.U.A., 1974. — Amélioration des engrais pour les pays en voie de développement. *Séminaire Ibadan*, doc. multigr., p. 10.
- PATRICK (W.H. Jr.), DELAUNE (R.D.), 1972. — Characterization of the oxidized and reduced zones in flooded soil. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 36 : 573-576.
- PATRICK (W.H. Jr.), GOTOH (S.), 1974. — The role of oxygen in nitrogen loss from flooded soils. *Soil Sci.*, 118 : 78-81.
- PATRICK (W.H. Jr.), PETERSON (F.J.), TURNER (F.T.), 1968. — Nitrification inhibitors for lowland rice. *Soil Sci.*, 105 : 103-105.
- PATRICK (W.H. Jr.), TUSNEEM (M.E.), 1972. — Nitrogen loss from flooded soil. *Ecology*, 53 : 735-737.
- RAJALE (G.B.), PRASAD (R.), 1973. — Nitrification inhibitors and slow-release nitrogen fertilizers for rice (*Oryza sativa* L.). *J. Agric. Sci., Camb.*, 80 : 479-487.
- TAKAI (Y.), UEHARA (Y.), 1973. — Nitrification and denitrification in the surface layer of submerged soil. Part 1. Oxidation-reduction condition. Nitrogen transformation and bacterial flora in the surface and deeper layers of submerged soils. *J. Soil Sci. Man., (Japan)*, 44 : 463-470.
- TENNESSEE VALLEY AUTHORITY, 1972. — Tailoring of fertilizers for rice. *Bull. Y-52* : 38-42.
- TUSNEEM (M.E.), PATRICK (W.H. Jr.), 1971. — Nitrogen transformations in waterlogged soil. *Louisiana State Univ. Agric. Expt. Sta. Bull.*, 657 : 1-75.
- YOSHIDA (T.), PADRE (B.C. Jr.), 1974. — Nitrification and denitrification in submerged Maahas clay soil. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 20 : 241-247.

B - RHIZOSPHERE DU RIZ

1 - Influence sur l'activité potentielle

article 9

article 9

Æcol. Plant., 1973, 8 (4), 315-323

Influence de la rhizosphère du riz sur l'activité dénitrifiante potentielle des sols de rizières du Sénégal

J.-L. GARCIA *

RÉSUMÉ

L'étude de l'influence de la rhizosphère du riz sur l'activité dénitrifiante potentielle et le nombre de bactéries dénitrifiantes des sols de rizières du Sénégal a permis de mettre en évidence un effet stimulant du riz. Cette stimulation strictement localisée à la mince pellicule de sol adhérent aux racines, est d'autant plus marquée que le sol est plus pauvre en carbone organique.

SUMMARY

A study of the influence of the rhizosphere of rice on the potential denitrifying activity and the number of denitrifiers in paddy soils from Senegal, has shown that a stimulating effect of rice exists. This stimulation is strictly restricted to the thin layer of soil adhering to the roots and is specially evident as the soil is poorer in organic carbon.

ZUSAMMENFASSUNG

Das Studium des Einflusses der Reirhizosphäre auf die potentielle Nitratreduktion und die dissimilatorisch-nitratreduzierende Flora lässt einen stimulierenden Effekt des Reises erkennen. Dieser Effekt ist auf das dünne Erdhäutchen beschränkt, das an den Wurzeln klebt. Er ist um so deutlicher, je ärmer der Böden an organischem Kohlenstoff ist.

INTRODUCTION

La stimulation de la dénitrification par les plantes et le rôle des bactéries dans ce processus ont été clairement prouvés notamment par WOLDENDORP (1963). Selon MACURA (1966), la consommation élevée d'oxygène par les racines et par la microflore, crée dans la rhizosphère des conditions anaérobies, qui, s'ajoutant à la disponibilité de substances donatrices d'hydrogène excrétées par les racines,

* O.R.S.T.O.M., Laboratoire de Microbiologie du sol, B.P. 1386, Dakar (Sénégal).

sont la cause d'une dénitrification élevée. Dans une revue bibliographique, STARKEY (1959) cite de nombreuses références concernant les microorganismes dénitrifiants qui ont été trouvés en plus grand nombre dans la rhizosphère de diverses plantes supérieures. En ce qui concerne le riz, WU (1967) a montré que le nombre de bactéries dénitrifiantes est faible au début et s'accroît brusquement jusqu'au stade du tallage maximum, principalement sur la surface des racines. Cependant, selon MAHMOUD et IBRAHIM (1970), les bactéries dénitrifiantes seraient moins nombreuses dans la rhizosphère du riz que dans un sol sans racines. Mais il convient de rappeler qu'en condition aérobie, les bactéries dénitrifiantes sont capables de se développer sans dissimiler le nitrate, donc que leur présence en plus ou moins grand nombre ne reflète pas nécessairement l'importance du processus de dénitrification.

Divers dispositifs de culture (ROSS, MARTIN et HENZELL, 1964; STEFANSON et GREENLAND, 1970) ont été utilisés jusqu'à présent pour mesurer l'influence de la rhizosphère de diverses plantes sur la dénitrification, mais pas dans le cas du riz à notre connaissance. Comme beaucoup de plantes aquatiques, le riz assure l'aération de ses racines en transportant de l'oxygène qui est également utilisé par la microflore se trouvant sur les racines mêmes (RAALTE, 1941; ALBERDA, 1963; ARMSTRONG, 1969; LUXMOORE et STOLSY, 1970). Logiquement, la dénitrification, phénomène inhibé par l'oxygène (PICHINOTY, 1965), devrait être extrêmement faible sur les racines du riz; mais l'influence de l'oxygène doit progressivement diminuer avec l'éloignement des racines jusqu'à une zone de la rhizosphère proche où les conditions deviennent favorables à la dénitrification.

La présente étude a pour but de rechercher l'influence de la culture du riz sur l'activité dénitrifiante potentielle et sur la densité des bactéries dénitrifiantes.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

La variété de riz IR8 a été cultivée sur 23 sols de rizières du Sénégal, décrits par ailleurs (GARCIA, RAIMBAULT, JACQ, RINAUDO et ROGER, 1973) et classés dans le tableau I, dans des colonnes plates en chlorure de polyvinyle transparent, de dimensions 200 × 50 × 15 mm, décrites par DOMMERGUES, COMBREMONT, BECK et OLLAT (1969). Ces colonnes sont fermées à la base mais s'ouvrent latéralement pour permettre d'accéder facilement aux racines. Pour chaque sol, on utilise 2 boîtes qui reçoivent chacune 10 graines de riz préalablement stérilisées par HgCl₂ et prégermées; une troisième boîte constitue le témoin non planté. Le sol est maintenu saturé en eau pendant une quinzaine de jours, puis les vases de végétation sont immergés dans des récipients plus grands pendant un mois et demi.

Après ce laps de temps, les sols sont récoltés puis séchés à l'air et tamisés à 2 mm. en 3 lots d'échantillons distincts: le sol témoin (S); le sol rhizosphérique (R), mince pellicule de 1 à 2 mm adhérant aux racines après secouage; le sol éloigné (SE) qui reste dans les boîtes après avoir enlevé et secoué les racines.

Des mesures de dénitrification potentielle au respiromètre de WARBURG ont été effectuées sur l'ensemble des 3 lots d'échantillons selon la méthode de Mc GARTY (1961) en incubant 25 g de sol ajusté à l'humidité équivalente, après un apport de 100 ppm de $N-NO_3^-$ sous forme de KNO_3 , dans des fioles de 130 ml environ, sous atmosphère d'azote très pur, à 30 °C; des mesures de pression sont effectuées toutes les 3 à 4 h pendant plusieurs jours.

Le nombre de bactéries dénitrifiantes de l'ensemble des 3 lots d'échantillons, a été déterminé par la méthode du nombre le plus probable de Mc CRADY, en ensemençant 1 ml de chaque dilution de sol dans des tubes à essais de 12 × 120 mm contenant le milieu faiblement gélosé suivant : Na_2HPO_4 , 12 H_2O , 3,575 g; KH_2PO_4 , 0,980 g; $MgSO_4$, 0,030 g; extrait de levure Difco, 1 g; bacto-peptone Difco, 1 g; succinate de sodium, 10 g; KNO_3 , 10 g; bacto-agar Difco, 2 g; eau distillée, q.s.p. 1 000 ml. Après ensemencement, on recouvre le milieu avec 2 à 3 ml d'agar mou à 5 p. mille et on met en incubation à 30 °C pendant une quinzaine de jours. Les tubes sont comptés comme positifs lorsqu'il y a eu formation de bulles de gaz.

Pour estimer la croissance, les plants de riz ont été lavés puis mis à l'étuve à 80 °C. Après plusieurs jours, leur poids sec a été noté.

Les résultats ont été soumis à l'analyse statistique suivant le test de corrélation des rangs de SPEARMAN décrit par BAUZON, VAN DEN DRIESSE et DOMMERGUES (1969).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. CROISSANCE DU RIZ.

Les résultats sont rapportés au tableau II. Les sols n° 1, 2, 13 et 18 ont montré une croissance faible tandis que les meilleurs sols se révélaient être, dans l'ensemble, ceux des stations expérimentales (sols n° 10, 11, 24, 9, 25, 15 et 27 — tableau I).

2. ACTIVITÉ DENITRIFIANTE POTENTIELLE.

Elle a été exprimée par la vitesse de dénitrification, c'est-à-dire le nombre de μg d'azote dégagé par heure, après apport aux échantillons de sol, de 100 ppm d'azote nitrique sous forme de KNO_3 .

Les résultats, consignés au tableau II, montrent une très nette augmentation de l'activité dénitrifiante potentielle dans la rhizosphère; le rapport entre les vitesses de dénitrification dans les échantillons R et S (R/S) est supérieur à 1 dans tous les cas et varie de 2,0 à 14,2. Par contre, le rapport relatif aux

TABLEAU I
Répartition des sols de rizières du Sénégal étudiés
Distribution of Senegal paddy soils studied

	Région	Salinité	Mise en valeur	Station ou localité	N°
Casiers irrigués de stations expérimentales	Casamance	non ou peu salés	RP	Djibelor	10
			RP	Djibelor	11
			RP	Djibelor	12
			RP	Djibelor	24
			RP	Goudomp	15
		salés	RP - MA	Dar-Salam	9
	Delta du fleuve Sénégal	non ou peu salés	RP	Ross-Bethio	25
			RP	Boundoum	26
			RP	Ntiagar	27
RP			Keur-Diallo	28	
Rizières artisanales	Casamance	non salés	RB	Boutolat	1
			RB	Loudia	7
			RB	Oussouye	8
			RB	Sibink	14
			RP	Bambato	16
			RP	Tanaff	17
		peu salés	RB - MA	Bignona	2
			RB - MA	Niaguissé	13
			RB	Diango	18
			RB	Boungilinn	19
		salés	RP - MR	Enanpor	21
Divers	salés	RP	Kaolack	20	
		RP	Thiaroye	23	

RP = rizière plane

MA = rizière aménagée sur une ancienne mangrove

RB = rizière cultivée en billons

MR = sol de mangrove récemment défriché.

échantillons SE et S (SE/S) est très voisin de 1 et varie de 0,5 à 1,4. L'influence des racines est donc bien limitée à la mince pellicule de terre qui y adhère.

Dans l'ensemble, l'activité dénitrifiante potentielle de la rhizosphère est élevée, quel que soit le sol considéré. Le test de corrélation des rangs de SPEARMAN indique une corrélation positive hautement significative entre le poids sec de matériel végétal et l'activité dénitrifiante potentielle de R. Comme l'exsudation racinaire est liée à la quantité de matériel végétal (MACURA, 1966), la dénitrification potentielle serait donc en relation avec la quantité d'exsudats racinaires. Ces derniers sont, en effet, constitués de substances immédiatement assimilables donatrices d'hydrogène.

TABLEAU II

Croissance du riz et effet rhizosphère sur l'activité dénitrifiante potentielle des sols de rizières du Sénégal

Growth of rice and rhizosphere effect on the potential denitrifying activity of paddy soils from Senegal

N°	Sols Localité	Matériel végétal riz (20 graines) poids sec (g)	Vitesse de dénitrification (ppm N dégagé/h)			Rapport des vitesses de dénitrification		Différence entre les temps de dénitrification de S et R (h)
			R	SE	S	R/S	SE/S	
1	Boutolot	2,1	2,20	0,30	0,30	7,3	1,0	230
2	Bignona	1,3	1,75	0,20	0,25	7,0	0,8	210
7	Loudia	4,3	2,50	0,45	0,45	5,5	1,0	160
8	Oussouye	4,4	4,00	0,75	0,95	4,2	0,8	90
9	Dar-Salam	5,4	2,05	0,65	0,65	3,1	1,0	80
10	Djibelor	7,1	7,60	2,25	3,45	2,2	0,6	30
11	Djibelor	6,7	3,25	0,35	0,35	9,3	1,0	110
12	Djibelor	3,8	1,15	0,15	0,12	9,6	1,2	320
13	Niaguissé	1,3	0,70	0,30	0,35	2,0	0,8	160
14	Sibink	4,0	2,55	0,35	0,40	6,4	0,9	180
15	Goudomp	4,8	2,55	0,50	0,50	5,1	1,0	170
16	Bambato	4,3	11,00	2,30	2,75	4,0	0,8	30
17	Tanaff	7,8	5,25	0,65	0,75	7,0	0,8	110
18	Diango	2,4	2,25	0,60	0,65	3,5	0,9	100
19	Bounkilinn	2,6	2,00	0,35	0,40	5,0	0,9	55
20	Kaolack	3,9	2,75	0,15	0,30	9,1	0,5	150
21	Enanpor	3,6	2,85	0,15	0,20	14,2	0,7	230
23	Thiaroye	6,0	3,70	1,05	1,30	2,8	0,8	30
24	Djibelor	6,2	7,50	2,25	2,40	3,1	0,9	25
25	Ross-Bethio	4,9	1,80	0,65	0,60	3,0	1,1	50
26	Boundoum	1,2	3,75	0,50	0,65	5,8	0,8	50
27	Ntiagar	4,3	1,30	0,47	0,33	3,9	1,4	150
28	Keur-Diallo	2,1	1,85	0,35	0,35	5,3	1,0	200

D'autre part, la différence entre les temps de dénitrification totale de S et de R et la teneur initiale des sols en carbone organique, présentent une corrélation des rangs inverse hautement significative. Ce résultat est bien illustré par les figures 1 et 2 concernant les sols n° 10 et 14, dont la teneur en carbone organique a pour rangs respectifs 2 et 18. Plus un sol est riche en carbone organique, moins l'effet rhizosphère du riz sur l'activité dénitrifiante potentielle sera marqué.

Ces résultats sont à rapprocher de ceux décrits par de nombreux auteurs et qui concernent l'apport, lors de la dénitrification, d'un substrat carboné : celui-ci n'a presque pas d'effet quand la teneur en carbone est élevée, mais augmente considérablement l'activité dénitrifiante potentielle des sols pauvres en carbone organique.

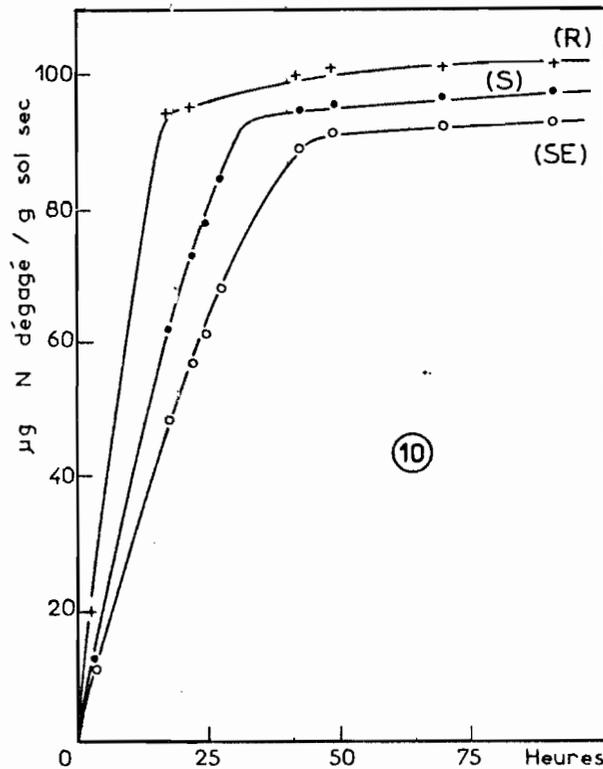


FIG. 1. — Effet rhizosphère du riz sur la dénitrification potentielle du sol de rizière n° 10 (teneur en carbone organique : 56,8 %): µg d'N dégagé par g de sol sec, après apport de 100 µg d'N-NO₃⁻ sous forme de KNO₃ et incubation anaérobie à 30 °C à l'humidité équivalente;

+ — + (R) rhizosphère; ● — ● (S) sol non planté; ○ — ○ (SE) sol éloigné.

3. NOMBRE DE BACTÉRIES DÉNITRIFIANTES.

Le nombre de bactéries dénitrifiantes augmente sensiblement dans la rhizosphère dans presque tous les cas (tableau III). En effet, le rapport R/S est toujours supérieur à 1 sauf pour le sol n° 27, et atteint le chiffre 514 pour le sol n° 11; nous n'avons pas trouvé cependant de corrélation des rangs avec le poids sec de matériel végétal. Le rapport SE/S est souvent inférieur à 1 sauf dans 6 cas sur 23, et varie de 0,01 à 4,00. On assiste donc souvent à un appauvrissement en germes dénitrifiants du sol éloigné par rapport au sol non planté.

Nous avons trouvé une corrélation des rangs positive et faiblement significative entre le nombre de bactéries dénitrifiantes et l'activité dénitrifiante potentielle dans

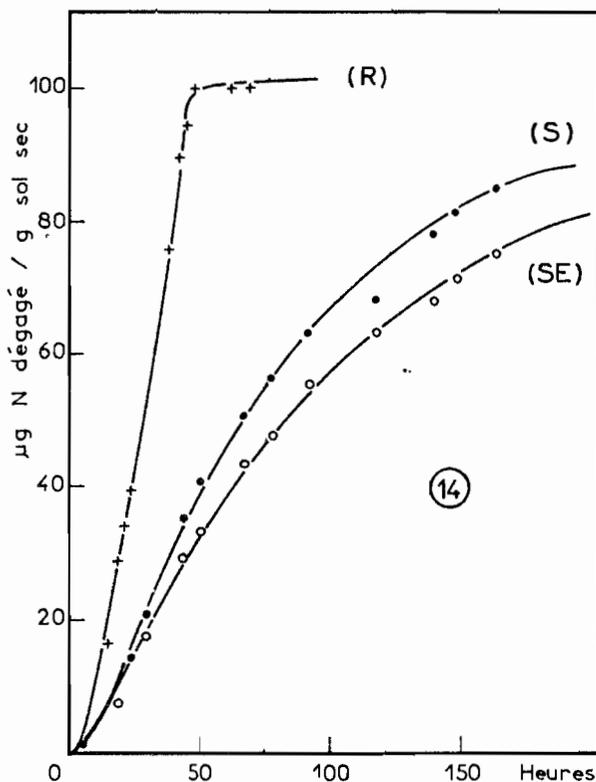


FIG. 2. — Effet rhizosphère du riz sur la dénitrification potentielle du sol de rizière n° 14 (teneur en carbone organique = 15,9 ‰) : µg d'N dégagé par g de sol sec, après apport de 100 µg d'N-NO₃⁻ sous forme de KNO₃ et incubation anaérobie à 30 °C à l'humidité équivalente;

+—+ (R) rhizosphère; ●—● (S) sol non planté; ○—○ (SE) sol éloigné.

le cas de la rhizosphère R, pas de corrélation pour le sol non planté S et une corrélation positive hautement significative pour le sol éloigné SE.

CONCLUSIONS

Nous avons mis en évidence un effet rhizosphère positif dans les conditions de la mesure : le riz stimule la dénitrification potentielle en mettant des substances donatrices d'électrons à la disposition de la microflore dénitrifiante qui est également en augmentation dans la rhizosphère. Cette stimulation est d'autant plus marquée que le sol est plus pauvre en carbone organique. Peut-on en conclure

TABLEAU III

Effet rhizosphère du riz sur la numération des bactéries dénitrifiantes : bactéries/g sol sec
 Rhizosphere effect of rice on the number of denitrifying bacteria : bacteria/g dry soil

N°	Localité	S	SE	R	R/S	SE/S
1	Boutolat	800	1 400	16 000	20,0	1,75
2	Bignona	13 000	1 400	16 000	1,2	0,10
7	Loudia	3 500	3 000	35 000	10,0	0,85
8	Oussouye	110 000	25 000	170 000	1,5	0,22
9	Dar-Salam	500 000	7 000	1 700 000	3,4	0,01
10	Djibelor	35 000	13 000	350 000	10,0	0,37
11	Djibelor	35 000	11 000	*18 000 000	514,0	0,31
12	Djibelor	3 000	450	250 000	83,3	0,15
13	Niaguise	17 500	900	120 000	6,8	0,05
14	Sibink	50 000	4 500	200 000	4,0	0,09
15	Goudomp	11 000	8 000	250 000	22,7	0,72
16	Bambato	14 000	35 000	90 000	6,4	2,50
17	Tanaff	35 000	25 000	1 600 000	45,7	0,71
18	Diango	5 000	11 000	1 600 000	320,0	2,20
19	Boukilinn	6 000	6 000	20 000	3,3	1,00
20	Kaolack	20 000	35 000	450 000	22,5	1,75
21	Enanpor	90 000	5 000	250 000	2,8	0,05
23	Thiaroye	35 000	14 000	35 000	1,0	0,40
24	Djibelor	900 000	250 000	900 000	1,0	0,27
25	Ross-Berthio	8 000	6 000	140 000	17,5	0,75
26	Boundoum	200 000	80 000	500 000	2,5	0,40
27	Ntiagar	150 000	13 000	40 000	0,2	0,08
28	Keur-Diallo	40 000	160 000	170 000	4,2	4,00

que la dénitrification soit intense dans la rhizosphère du riz *in situ*? Rien n'est moins certain car le riz possède des canaux aërières permettant d'approvisionner ses racines en oxygène qui inhibe la dénitrification. La prolifération des germes dénitrifiants dans la rhizosphère aux dépens des substances carbonées facilement assimilables présentes dans les exsudats racinaires, pourrait donc avoir lieu en aërobie, condition dans laquelle ces germes ne dissimilent pas le nitrate. Une expérimentation complémentaire sur des plantes vivantes est donc nécessaire pour savoir si, dans la rhizosphère du riz, la dénitrification est stimulée ou inhibée par rapport au sol non planté.

REMERCIEMENTS

L'auteur remercie MM. M. MOURARET et F. PICHINOTY pour les conseils qu'ils lui ont prodigués ainsi que MM. W. SY et M. N'DAO pour leur collaboration technique.

BIBLIOGRAPHIE

- ALBERDA T., 1953. — Growth and root development of lowland rice and its relation to oxygen supply. *Plant and Soil*, **5**, 1-28.
- ARMSTRONG W., 1969. — Rhizosphere oxidation in rice : an analysis of intervarietal differences in oxygen flux from the roots. *Physiol. Plant.*, **22**, 296-303.
- BAUZON D., VAN DEN DRIESSCHE R. et DOMMARGUES Y., 1969. — L'effet litière: I. Influence *in situ* des litières forestières sur quelques caractéristiques biologiques des sols. *Æcol. Plant.*, **4**, 99-122.
- DOMMARGUES Y., COMBREMONT R., BECK G. et OLLAT C., 1969. — Note préliminaire concernant la sulfato-réduction rhizosphérique dans un sol salin tunisien. *Rev. Ecol. Biol. Sol.*, **6**, 115-129.
- GARCIA J.-L., RAIMBAULT M., JACQ V., RINAUDO G. et ROGER P., 1973. — Activités microbiennes dans les sols de rizières du Sénégal : relations avec les caractéristiques physico-chimiques et influence de la rhizosphère. *Rev. Ecol. Biol. Sol* (sous presse).
- LUXMOORE R.J. and STOLSY L.H., 1970. — Oxygen diffusion in the soil-plant system. *Agron. J.*, **62**, 322-324.
- MACURA J., 1966. — Interactions nutritionnelles plantes-bactéries et bases expérimentales de la bactérisation des graines. Rapport général. *Ann. Inst. Pasteur*, supplément **111**, 9-38.
- Mc GARITY J.W., 1961. — Denitrification studies on some south australian soils. *Plant and Soil*, **14**, 1-21.
- MAHMOUD S.A.Z. and IBRAHIM A.N., 1970. — Studies on the rhizosphere microflora of rice. *Acta Agron. Acad. Hung.*, **19**, 71-78.
- PICHINOTY F., 1965. — L'inhibition par l'oxygène de la dénitrification bactérienne. *Ann. Inst. Pasteur*, supplément **109**, 248-255.
- RAALTE M.H. Van, 1941. — On the oxygen supply of rice roots. *Ann. Jard. Bot. Buitenz.*, **51**, 43-57.
- ROSS R.J., MARTIN A.E. and HENZELL E.F., 1964. — A gas-tight growth chamber for investigating gaseous nitrogen changes in the soil : plant : atmosphere system. *Nature*, **204**, 444-447.
- STARKEY R.L., 1959. — Interrelationships between microorganisms and plant roots in the rhizosphere. *Bact. Rev.*, **22**, 154-176.
- STEFANSON R.C. and GREENLAND D.J., 1970. — Measurement of nitrogen and nitrous oxide evolution from soil-plant systems using sealed growth chambers. *Soil Sci.*, **109**, 203-206.
- WOLDENDORP J.W., 1963. — The influence of living plants on denitrification. *Meded. Landbhoogesch. Wageningen*, **63**, 13, 1-100.
- WU M.M.H., 1967. — Microbiological studies of the rhizosphere of rice in the poorly drained paddy soil. *Soils Fertil. Taiwan*, 23-31.

2 - Influence sur l'activité induite

articles 10 et 11

EFFET RHIZOSPHERE DU RIZ SUR LA DENITRIFICATION

J.-L. GARCIA

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

(Accepted 29 May 1974)

Résumé—La comparaison des activités N_2O -réductase provoquées par une préincubation en présence de N_2O dans un sol planté en riz et dans le même sol non planté, montre un effet positif de la rhizosphère du riz sur la dénitrification, résultant de l'existence de zones anaérobies, de la présence d'exsudats racinaires et d'un nombre élevé de bactéries dénitrifiantes dans la rhizosphère.

Summary—A positive rhizosphere effect of rice on denitrification was demonstrated by comparing induced activities of N_2O -reductase in planted and non-planted soils. This effect may be attributed to the development of anaerobic zones, the presence of root exudates and large numbers of denitrifiers in the rhizosphere.

INTRODUCTION

La stimulation par les plantes de la dénitrification potentielle dans le sol a été clairement prouvée, notamment par Woldendorp (1963), Brar (1972) et Stefansson (1972). Dans le cas du riz, nous avons montré l'existence d'un effet stimulant de la plante sur l'activité dénitrifiante potentielle de sols de rizières du Sénégal (Garcia, 1973); cette stimulation, strictement localisée à la mince pellicule de sol adhérent aux racines, est d'autant plus marquée que le sol est plus pauvre en carbone organique; d'autre part, la densité des bactéries dénitrifiantes augmente sensiblement dans la rhizosphère du riz. Mais il convient de rappeler qu'en présence de l'oxygène excrété par les racines du riz, ces bactéries sont capables de se développer sans dissimiler le nitrate, donc que leur présence en plus ou moins grand nombre ne reflète pas nécessairement l'importance du processus de dénitrification. Dans le but de clarifier ce point, nous avons utilisé la nouvelle méthode d'estimation de la dénitrification par la réduction de N_2O , récemment mise au point (Garcia, 1974), en induisant une activité N_2O -réductase en présence de plants de riz et en la comparant à celle qui est mesurée dans le même sol non planté.

MATERIEL ET METHODES

Nous avons utilisé un sol de rizière de la station expérimentale de Djibelor; il s'agit d'un limon argilo-sableux dont les teneurs en carbone et en azote sont respectivement de 36 et 2,7%; le pH est de 5,5. On a évité la dessiccation complète du sol qui a été tamisé humide à 2 mm et conservé en chambre froide, de manière à limiter l'effet perturbateur de la réhumectation sur l'activité bactérienne. Dans trois séries de 15 microcolonnes de verre recouvertes de papier

d'aluminium, on introduit 17 g de sol (15 g de sol poids sec), on sature en eau et on ensemence avec une graine de riz prégermée (variété IR8), dans le cas du sol rhizosphérique. Trois autres séries de 15 microcolonnes de sol non ensemencées constituent le sol non rhizosphérique. Pour les séries no. 1 (plantée) et no. 2 (non plantée), le sol est placé directement dans des microcolonnes de verre de 14 × 200 mm. Pour les séries no. 3 et 5 (plantées) et no. 4 et 6 (non plantées), le sol est placé dans un fin grillage en acier inoxydable dont la maille mesure 300 µm de côté; l'ensemble est disposé dans un tube à essais de 18 × 180 mm. Les six séries de tubes sont placées dans une pièce climatisée, sous une rangée de lampes à vapeur de mercure dont l'intensité d'éclairement est de 20.000 lx. Une photopériode comportant 14 heures d'éclairement est maintenue pendant 3 semaines. Après ce laps de temps, on modifie les microcolonnes de sol de la façon suivante (Fig. 1) en vue de leur préincubation en présence de N_2O :

Séries no. 1 et 2: on place un tube à essais de 16 × 160 mm au-dessus de chaque microcolonne de sol, à laquelle il est relié par un joint de caoutchouc; ce tube emprisonne ainsi une certaine quantité d'air au-dessus du sol.

Séries no. 3 et 4: dans une atmosphère d'azote très pur (boîte à gants anaérobie), on retire le grillage contenant le sol du tube à essais de 18 × 180 mm et on le place dans un tube à essais de 20 × 200 mm, qu'on obstrue à l'aide d'un bouchon de caoutchouc, après avoir sectionné le plant de riz au niveau du sol; le grillage contenant le sol est ainsi contenu dans une atmosphère dépourvue d'oxygène.

Séries no. 5 et 6: on procède comme pour les séries no. 1 et 2, mais avec un tube à essais de 20 × 200 mm qui recouvre l'extrémité supérieure du tube contenant

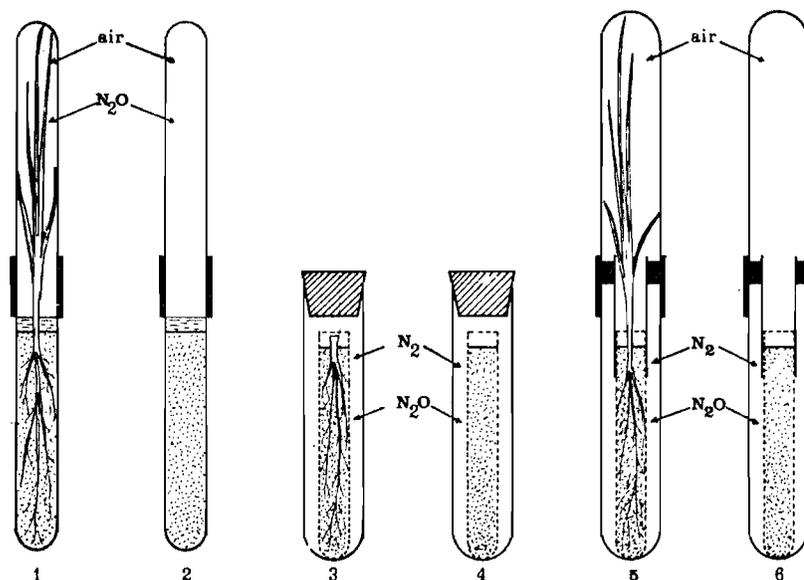


Fig. 1. Dispositif expérimental pour la préincubation des sols plantés et non plantés, en présence de N_2O .

le sol, auquel il est relié par un joint de caoutchouc; ce tube emprisonne ainsi une certaine quantité d'air au-dessus du sol. On procède ensuite comme pour les séries no. 3 et 4 en enlevant les deux-tiers inférieurs du tube à essais renfermant le sol maintenu par le grillage (ce tube avait été coupé et relié au tiers supérieur par un joint de caoutchouc, avant la mise en culture) et en plaçant la partie inférieure du dispositif dans un tube à essais de 20×200 mm renfermant de l'azote très pur, et relié à la partie supérieure par un joint de caoutchouc. Les six séries de tubes sont de nouveau placées dans les mêmes conditions d'éclairage et de température, après introduction à travers le joint ou le bouchon de caoutchouc, à l'aide d'une seringue, de 2,5 ml de N_2O (208 parties/10⁶ N- N_2O) dans l'air au-dessus du sol pour les séries no. 1 et 2, et dans l'atmosphère de N_2 entourant le sol maintenu par le grillage pour les séries no. 3, 4, 5 et 6.

Trois jours plus tard, le sol est recueilli et introduit dans des flacons sérum de 250 ml, à raison du contenu de 3 tubes par flacon et de 5 répétitions par série. La dénitrification est évaluée par la méthode de réduction de N_2O (García, 1974) dont nous rappelons brièvement la technique: les flacons sérum étant parfaitement bouchés, on effectue un vide poussé pendant 10 min., suivi d'un remplissage d'hélium très pur; l'opération est répétée deux fois avec un vide de 5 min. Puis on incube les flacons en position horizontale à 37°C. Après 30 min., on introduit 2 ml de N_2O (55,5 parties 10⁶ N- N_2O), puis on effectue des mesures de N_2O dans des prélèvements de l'atmosphère des flacons au chromatographe toutes les 2-3 h jusqu'à disparition totale de ce gaz. En fin d'expérience, les plantules de riz sont récupérées, lavées, séchées et pesées.

Tableau 1. Effet rhizosphère du riz sur la dénitrification

No. série	1	2	3	4	5	6
Vitesse de réduction de N_2O (parties/10 ⁶ h ⁻¹)	1.7	0	3.45	0.9	3.5	0.9

RESULTATS

Le poids sec de matériel végétal est en moyenne de 265 mg pour 3 plants de riz. Les résultats concernant la vitesse de réduction de N_2O sont rapportés au g de sol sec (Tableau 1). Une activité N_2O -réductase est décelable dès le début de l'incubation dans tous les cas, sauf dans la série no. 2 où elle est nulle. En ce qui concerne les séries de tubes plantés, on observe une activité N_2O -réductase pratiquement identique dans les dispositifs no. 3 et 5, et deux fois plus faible dans le dispositif no. 1. Dans le cas des séries de tubes non plantés, l'activité est identique dans les dispositifs no. 4 et 6. Enfin, en comparant les séries plantées et non plantées, on constate que l'activité N_2O -réductase est presque quatre fois plus forte dans les tubes plantés.

DISCUSSION

Dans le dispositif no. 1, le N_2O introduit dans l'atmosphère confinée au-dessus du sol planté, est donc parvenu au contact du sol probablement par la même voie que l'oxygène qui est habituellement exsudé par les racines de riz; mais puisqu'il y a eu induction d'une activité N_2O -réductase dans le sol rhizosphérique,

laquelle est strictement inhibée par O_2 (Pichinoty et D'Ornano, 1961), c'est que le N_2O a probablement atteint une zone de sol où l'influence de O_2 ne s'est pas manifestée. D'autre part, comme l'activité N_2O -réductase du sol rhizosphérique dans le dispositif no. 1 est sensiblement plus élevée que celle du sol non planté dans les dispositifs no. 4 et 6, cette zone atteinte par le N_2O est également sous l'influence des exsudats racinaires. Il y a donc dans la rhizosphère du riz, des zones anaérobies dans lesquelles les processus biologiques qui sont inhibés par O_2 peuvent se manifester avec une plus grande intensité que dans le sol non planté, par suite de la présence d'une plus grande quantité de substances directement assimilables et d'une densité bactérienne plus élevée (Garcia, 1973). Pour le sol non planté de la série no. 2, aucune activité N_2O -réductase initiale n'a pu être décelée, et l'activité potentielle qui se développe après un temps de latence d'une dizaine d'heures est très faible. Le N_2O n'a donc pu diffuser que très faiblement à travers la microcolonne de sol. Par contre dans les dispositifs no. 4 et 6, le N_2O mis au contact direct du sol en atmosphère anaérobie, au travers du grillage, a induit une activité N_2O -réductase en relation avec une plus grande surface de diffusion. La plus grande activité mesurée dans les dispositifs no. 3 et 5 par rapport au dispositif no. 1, montre que la zone de sol en contact avec le N_2O est plus étendue dans le cas de l'utilisation du grillage que dans le cas de la diffusion de ce gaz à partir des racines de riz.

CONCLUSION

L'effet rhizosphère du riz sur la dénitrification est donc très nettement positif; il résulte de l'existence

dans la rhizosphère, de zones anaérobies, de la présence d'exsudats racinaires et d'un nombre élevé de bactéries dénitrifiantes. La dénitrification est donc possible dans la rhizosphère du riz: mais a-t-elle vraiment lieu *in situ* lors de la croissance de la plante en rizière? L'adaptation au champ de la méthode de réduction de N_2O actuellement en cours, nous permettra de répondre prochainement à cette question.

Remerciements—L'auteur exprime ses remerciements à M. M. Mouraret pour ses conseils ainsi qu'à Mm. W. Sy et J. Bakhom pour leur assistance technique.

REFERENCES

- BRAR S. S. (1972) Influence of roots on denitrification. *Pl. Soil* **36**, 713-715.
- GARCIA J.-L. (1973) 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. (1974) Réduction de l'oxyde nitreux dans les sols de rizières du Sénégal: mesure de l'activité dénitrifiante. *Soil Biol. Biochem.* **6**, 79-84.
- PICHINOTY F. et D'ORNANO L. (1961) Recherches sur la réduction du protoxyde d'azote par *Micrococcus denitrificans*. *Ann. Inst. Pasteur* **101**, 418-426.
- STEFANSON R. C. (1972) Soil denitrification in sealed soil-plant systems. I. Effect of plants, soil water content and soil organic matter content. *Pl. Soil*, **33**, 113-127.
- WOLDENDORP J. W. (1963) The influence of living plants on denitrification. *Meded. Landbouwk. Wageningen* **63** (13), 1-100.

Soil Biol. Biochem. Vol. 9, pp. 193 to 196. Pergamon Press 1977. Printed in Great Britain.

A DEVICE TO STUDY METABOLIC GASES IN THE RICE RHIZOSPHERE

M. RAIMBAULT, G. RINAUDO, J.-L. GARCIA and M. BOUREAU
ORSTOM, Laboratory of Soil Microbiology, BP 1386, Dakar, Senegal

(Accepted 7 July 1976)

Summary—A simple apparatus was developed to study metabolic gases in the rice rhizosphere. With this device, a positive rhizosphere effect of rice was demonstrated on three soil microbial activities: N_2 fixation, CH_4 formation and denitrification.

INTRODUCTION

Several devices have been used to study metabolic gases in the soil-plant system. Ross *et al.* (1964) and Martin and Ross (1968) developed a gas-lysimeter for a N balance study, using labelled fertilizer. Stefanson used sealed growth chambers to study the effects of plants on denitrification (1970) and N_2 fixation (1973), during long-term incubation.

The $C_2H_2-C_2H_4$ assay has been applied to measure N_2 fixation in the rhizosphere. The *in situ* measurement of nitrogenase activity developed by Balandreau and Dommergues (1971) was of particular interest because it did not disturb the soil-plant system. This method was used in the case of rice (Balandreau *et al.*, 1975; 1976); it utilized the peculiarity of rice to allow gaseous exchange between the external atmosphere and the rhizosphere (Luxmoore *et al.*, 1970).

To study biological phenomena involving the consumption or evolution of gases in the rice rhizosphere, such as N_2 fixation, CH_4 formation and denitrification, we have developed a simple piece of equipment that allows comparative measurements of these processes during a short period of incubation in the rhizosphere of 3-week old rice plants and unplanted soil.

MATERIALS AND METHODS

One seed of rice variety IR 8 was sown in a 14×200 mm Pyrex tube containing 13 g clay soil collected from a rice field. The C and N contents of this soil were 1.35 and 0.6% respectively and its pH was 6.3. For comparison soil only was placed in a second identical tube. The tubes were maintained under artificial illumination with a light intensity of 20,000 lux and a 14 h photoperiod. Three weeks later, the contents of each tube were transferred to a device made from two glass tubes joined together by fusion (Fig. 1). The top Pyrex tube (200×14 mm i.d.) had a wider upper end (60×16 mm i.d.). The lower Pyrex tube (180×18 mm i.d.) was joined by fusion to the upper Pyrex tube and had two side arms closed by Vacutainer stoppers (Becton Dickinson, ref. 4827 0-0) and Vigreux points above the lower side arm, in order to hold the soil core (Fig. 1).

After joining the lower part of the culture tube to the upper part, a partial vacuum was applied to the lower compartment using a 10 ml syringe inserted

through one of the Vacutainer stoppers. The vacuum caused the water-saturated soil core of the culture tube to slide into the top compartment of the device. The vacuum was released when the lower end of the soil core reached the joint between the two compartments. The lower compartment was then flushed with pure N_2 for 5 min. The N_2 was admitted through hypodermic needles inserted in the Vacutainer stoppers.

Then the soil core was allowed to slide into the lower compartment until it rested on the Vigreux points. A few ml of a solution made of $\frac{1}{3}$ solid paraffin and $\frac{2}{3}$ paraffin oil was applied to the top of the soil core, at a temperature slightly higher than the melting point of the paraffin. Pure N_2 was again flushed into the lower compartment. A 1 cm layer of water was

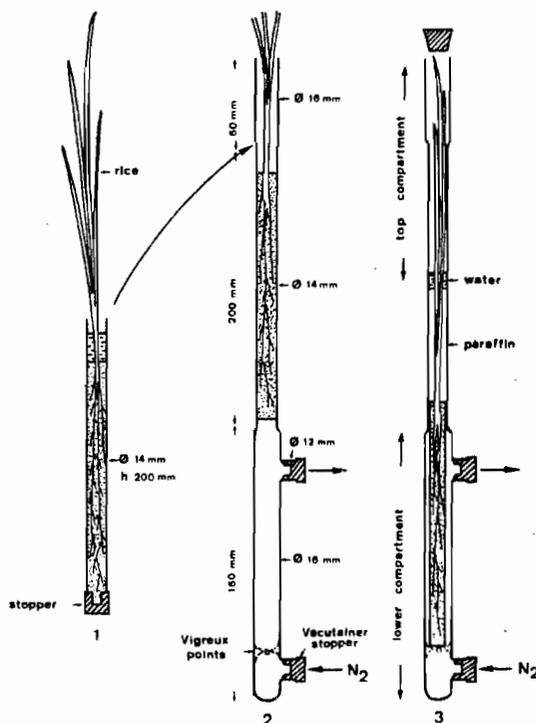


Fig. 1. Device to study metabolic gases in the rice rhizosphere. 1—Culture tube. 2—Transfer of the soil core of the culture tube into the top compartment of the device. 3—Device ready for use.

added above the solidified paraffin to test for leaks by the appearance of bubbles during flushing and to detect any possible defects in the apparatus. The gaseous volume in the device was about 22 ml per compartment. The efficiency of flushing with N_2 was checked by withdrawing and analysing gas samples for presence of O_2 by gas chromatography. Where needed the top part of the tube was sealed with a rubber stopper.

N_2 fixation

N_2 fixation was estimated by C_2H_2 - C_2H_4 assay. The upper part of the apparatus was closed by a Vacutainer stopper and 2.2 ml C_2H_2 (10% of the total volume) were injected simultaneously into the two compartments. For diurnal measurements, the devices were illuminated at the beginning of the light period during 6.5 h; measurements during the dark period were also performed during the 5 h before illumination period. These measurements were made with simultaneous removal of 0.5 ml samples from the atmospheres of the two compartments with a 1 ml plastic syringe. Analysis (6 replicates) were made with a flame ionisation chromatograph (Varian Aerograph 1200) using the following conditions: Porapak R 100-120 mesh, 150×0.3 cm stainless steel column monitored about $60^\circ C$; injector temperature, $105^\circ C$; detector temperature, $180^\circ C$; N_2 flow, $30 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$; H_2 flow, $30 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$; compressed air flow, $300 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

CH_4 formation

The top compartment was closed by a rubber stopper. Every hour, 0.5 ml gas samples were withdrawn from both compartments. These samples were analysed by flame ionisation gas chromatography as described for N_2 fixation. The results represented the total amount of CH_4 evolved in the two compartments, the greater part (about 80%) being in the lower compartment, and were the mean of 10 replicates.

To prevent CH_4 formation, 1 ml (5%) C_2H_2 was injected into the lower compartment before measurements were made (Raimbault, 1975). To study CH_4 formation under light, the soil cores of the culture tubes were placed in the devices after 2 h illumination and were incubated under light during measurement. To measure activity during the dark period, the soil cores were transferred 2 h before illumination began and incubated continued in the dark.

Denitrification

Denitrifying activity was estimated by a N_2O reduction method (Garcia, 1974). Unlike the previous measurements, the apparatus was only used to incubate rhizosphere soil (R) and unplanted soil (S) in the presence of N_2O so as to induce N_2 -reductase in the soils under ecological conditions.

To do this, 2.5 ml N_2O were injected into the lower compartment through one of the Vacutainer stoppers. The plant canopy was exposed to air (the upper compartment was left open) and the samples were illuminated under standard conditions for 14 h. Then the soil cores were extracted and put into 250 ml serum flasks, with 3 cores per flask and 5 replicates. The flasks were evacuated and flushed with He to ensure anaerobiosis and 80 parts 10^6 N- N_2O (2.5 ml) and

1 ml krypton as an internal standard was injected into the flasks with plastic syringes. Measurements of N_2O reduction were made with a thermal conductivity gas chromatograph Varian Aerograph 90 P4 (Garcia, 1974) during the next 24 h.

RESULTS AND DISCUSSION

N_2 fixation

Figure 2 shows C_2H_2 reduction rates of rice rhizosphere soils incubated during the dark period (RD), at the beginning of the light period (RL) and those for unplanted soils (S). Most of the C_2H_4 produced (about 90%) had diffused through the soil core in the lower compartment of the apparatus.

The C_2H_2 reduction rates are linear after a 2 h lag. Because of the small amounts of C_2H_4 evolved (10 nmoles C_2H_4 corresponded to $0.224 \mu\text{l } C_2H_4$), we assumed that this initial lag was caused by poor C_2H_2 or C_2H_4 diffusion between the atmosphere and the soil during the first hours of incubation.

N_2 fixation in unplanted soils was very slight (0.6 nmoles $C_2H_4 \cdot h^{-1}$) compared to planted soils. For R, a greater activity was observed during the light period (21.6 nmoles C_2H_4 evolved $\cdot h^{-1}$) than during darkness (8.8 nmoles C_2H_4 evolved $\cdot h^{-1}$). One of possible causes would be more organic C exudation as a result of photosynthesis.

These agree with those of Balandreau *et al.* (1975). However, we noted that the activity they measured in darkness was very weak due to the technique they used, where C_2H_2 was injected only in the presence of the plant canopy. Their method only allowed the demonstration of activity if stomata were open, whereas the activity we measured during the dark period, represented about 50% of the maximum diurnal activity.

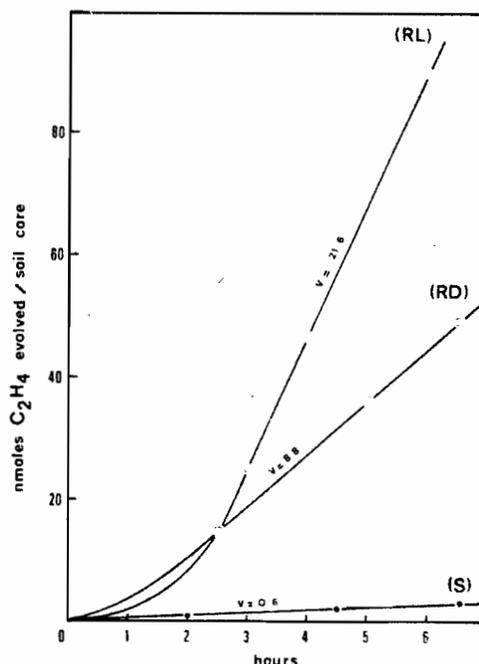


Fig. 2. N_2 fixation estimated by the C_2H_2 - C_2H_4 assay. (RL) rhizosphere incubated at the beginning of the light period; (RD) rhizosphere incubated during the dark period; (S) unplanted soil.

CH₄ formation

Our apparatus satisfactorily measured CH₄ formation in planted soils. Figure 3 shows that rice seedlings during the light period produced practically twice as much CH₄ ($8 \mu\text{l CH}_4 \text{ evolved} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{soil core}^{-1}$) as during dark incubation ($4.2 \mu\text{l CH}_4 \text{ evolved} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{soil core}^{-1}$).

With 5% C₂H₂, CH₄ evolution was completely inhibited as demonstrated previously (Raimbault, 1975). CH₄ formation in unplanted soils could not be estimated since CH₄ evolution was approximately the same with the addition of C₂H₂ as without (Fig. 3). In unplanted soils, CH₄ remained confined in the soil during the 3 weeks of flooding, but diffused into the atmosphere surrounding the soil core when placed in the lower compartment of the device. If so, gas evolution measured by this method will not agree with the CH₄ actually produced during incubation. On the other hand, in planted soils, CH₄ would diffuse through the gas spaces of the rice seedlings during the 3 weeks growth. This lack of accumulation permitted us to report the measured amounts as CH₄ production in the device during the incubation of the samples.

To measure the activity of unplanted soil, we made a vacuum in sealed test tubes enclosing the soil core, followed by flushing with pure N₂. This was repeated several times. A linear evolution rate of $0.7 \mu\text{l CH}_4 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{soil core}^{-1}$ was then measured. These results show the strong positive effect of the rice rhizosphere on CH₄ formation.

Denitrification

Reduction of N₂O was much greater in the rice rhizosphere soil than in the unplanted soil (Fig. 4). The initial denitrifying activity that represented in-

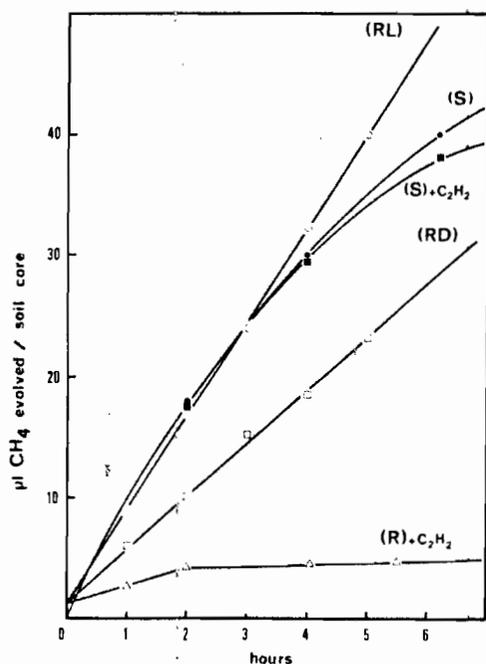


Fig. 3. CH₄ formation. (RL) rhizosphere incubated during the light period; (RD) rhizosphere incubated during the dark period; (S) unplanted soil.

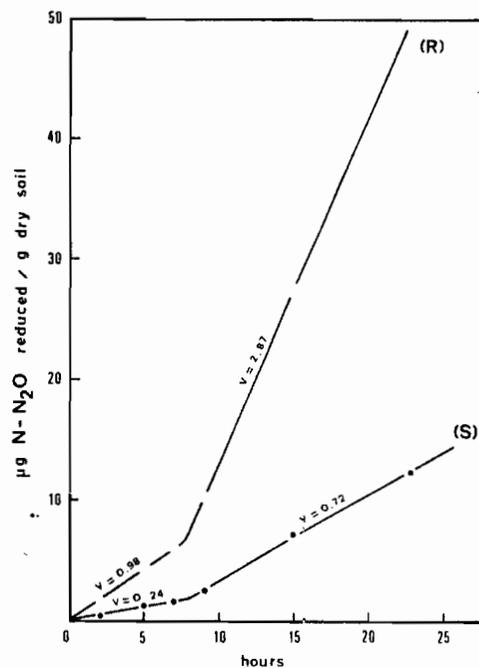


Fig. 4. Denitrification estimated by the N₂O reduction method. (R) rhizosphere; (S) unplanted soil.

duced activity in ecological conditions, was measured during the first 6 h of incubation (Garcia, 1974). This activity was found to be 4 times higher for R than for S; these results agreed with those of a previous experiment in which the soils were preincubated in a stainless steel sieve of 30 μm to permit the diffusion of N₂O (Garcia, 1975).

On the other hand, the potential denitrifying activity developed by *de novo* synthesis of enzyme induced by the injected N₂O, was measured during the last 18 h of incubation in the flasks (Garcia, 1974). This potential activity was also found to be 4 times higher for R than for S. This confirms the positive effect of the rice rhizosphere on denitrification. As the rice seedlings were incubated with their canopies in open air during the light period—during a period of O₂ formation—the induction of a higher N₂O reductase activity in R than in S, strictly inhibited by O₂, shows again the existence of an anaerobic zone in the rice rhizosphere under the influence of root exudates. Such exudation of organic C could represent one possible cause of the increase in denitrification in the rhizosphere of rice.

CONCLUSION

This device to study gaseous metabolism in the rice rhizosphere permitted the demonstration of a strong positive effect of the rice rhizosphere on three microbial activities involving the evolution or consumption of gas: N₂ fixation, CH₄ formation and denitrification. As CH₄ formation and denitrification are strictly anaerobic processes, the rice rhizosphere effect resulted from the existence of anaerobic zones directly influenced by root exudates. Concerning N₂ fixation, the diffusion of air through the rice seedlings permitted the activity of both anaerobic and aerobic micro-

organisms. Finally, in this apparatus gas diffusion was independent of movement within the rice plant and through stomata.

REFERENCES

- BALANDREAU J. and DOMMERCUES Y. (1971) Mesure *in situ* de l'activité nitrogénasique. *C.r. Acad. Sci., Paris* **273D**, 2020-2023.
- BALANDREAU J., RINAUDO G., FARES-HAMID I. and DOMMERCUES Y. (1975) Nitrogen fixation in the rhizosphere of rice plants. In *Nitrogen Fixation by Free-living Microorganisms* (W. D. P. Stewart, Ed.) Vol. 6, pp. 57-70. Cambridge University Press, Cambridge.
- BALANDREAU J., RINAUDO G., OUMAROV M. M. and DOMMERCUES Y. (1976) Asymbiotic N_2 fixation in paddy soils. In *Proceeding of the International Symposium on N_2 Fixation*. Pullman (in press).
- GARCIA J.-L. (1974) Réduction de l'oxyde nitreux dans les sols de rizières du Sénégal: mesure de l'activité dénitrifiante. *Soil Biol. Biochem.* **6**, 79-84.
- GARCIA J.-L. (1975) Effect rhizosphère du riz sur la dénitrification. *Soil Biol. Biochem.* **7**, 139-141.
- LUXMOORE R. J., STOLZY L. H. and LETEY J. (1970) Oxygen diffusion in the soil-plant system. *Agron. J.* **62**, 317-332.
- MARTIN A. E. and ROSS P. J. (1968) A nitrogen-balance study using labelled fertilizer in a gas lysimeter. *Pl. Soil* **28**, 182-186.
- RAIMBAULT M. (1975) Etude de l'influence inhibitrice de l'acétylène sur la formation biologique du méthane dans un sol de rizière. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)* **126A**, 247-258.
- ROSS P. J., MARTIN A. E. and HENZELL E. F. (1964) A gas tight growth chamber for investigating gaseous nitrogen changes in the soil: plant: atmosphere system. *Nature* **204**, 444-447.
- STEFANSON R. C. (1970) Sealed growth chambers for studies of the effects of plants on the soil atmosphere. *J. agric. Engng. Res.* **15**, 295-301.
- STEFANSON R. C. (1973) Relative rates of denitrification and nonsymbiotic nitrogen fixation in the soil-plant system. *Soil Biol. Biochem.* **5**, 869-880.

III - E T U D E M I C R O B I O L O G I Q U E

A - GENERALITES

La respiration des composés oxygénés minéraux de l'azote est un privilège du monde bactérien. Les algues vertes ou les cyanophycées, les champignons et quelques espèces de levures utilisent, en aérobiose, le nitrate comme aliment azoté. Mais aucun de ces organismes ne peut croître, en anaérobiose, aux dépens de NO_3^- comme accepteur d'électrons respiratoire.

La réduction du nitrate en oxyde nitreux et azote est dénommée dénitrification. Ce processus présente tous les attributs d'une véritable respiration cellulaire :

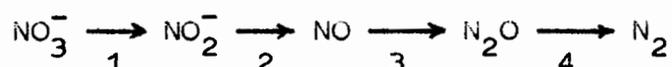
1- Le transfert des électrons entre le NADH_2 et NO_3^- n'est pas direct et met en jeu divers transporteurs comprenant en particulier un cytochrome de type b et des quinones (John et Whatley, 1970). Chez P.denitrificans, la nitrite-réductase utilise deux cytochromes de type c (Miyata et Mori, 1969); la réduction de l'oxyde nitrique met en jeu un cytochrome de type b et un de type c (Miyata, 1971) tandis que des cytochromes de types b et c participeraient au mécanisme de transport d'électrons dans la réduction de l'oxyde nitreux en N_2 (Matsubara, 1975).

2- Des phosphorylations oxydatives couplées au transport des électrons par ces chaînes se produisent pour la réduction du nitrate (John et Whatley, 1970) et du nitrite (Ohnishi et Mori, 1960).

3- Le cycle de Krebs joue le rôle de voie d'oxydation terminale de l'acétate chez les bactéries dénitrifiantes chimio-organotrophes aussi bien en anaérobiose en présence de nitrate qu'en aérobiose (Forget et Pichinoty, 1965).

4- La nitrate-réductase A, qui se trouve à l'état particulaire dans les extraits, est solidaire de la membrane cytoplasmique (Forget, 1971). Il semblerait qu'il en soit de même pour l'oxyde nitreux-réductase (Payne et coll., 1971).

Le mécanisme de la réduction du nitrate en azote a été établi chez plusieurs bactéries. Il comporte comme étapes intermédiaires le nitrite, l'oxyde nitrique et l'oxyde nitreux :



Chaque réaction est l'oeuvre d'une enzyme spécifique. Les réactions 1, 2, 3 et 4 sont catalysées respectivement par les nitrate-, nitrite-, oxyde nitrique- et oxyde nitreux-réductases. La nitrate-réductase A a été solubilisée et purifiée (Forget, 1971); il s'agit d'une molybdo-ferroprotéine non hémique. Son mécanisme d'action est encore mal connu, mais le molybdène joue un rôle essentiel dans la réaction (Forget et Dervartanian, 1972). Une nitrate-réductase B a également été mise en évidence (Pichinoty et Piéchaud, 1968); l'enzyme est soluble, n'utilise pas le chlorate comme substrat et ce composé inhibe son activité. Mais elle n'a encore jamais été purifiée. Selon l'organisme, la nitrite-réductase est, soit une hémoprotéine possédant deux hèmes de type c et d (Matsubara et Iwasaki, 1971), soit une cuproprotéine (Suzuki et Iwasaki, 1962); ces deux enzymes sont solubles. L'oxyde nitrique-réductase est mal connue; elle serait soluble chez P.perfectomarinus (Payne et coll., 1971) et particulière chez P.denitrificans (Miyata et coll., 1969) et A.faecalis (Matsubara et Iwasaki, 1972) dont le cytochrome cd présente également une activité oxyde nitrique-réductase. L'oxyde nitreux-réductase, enfin, n'a jamais pu être extraite des cellules sous une forme active; seuls Payne et coll. (1971) ont pu purifier partiellement une fraction provenant d'un extrait de P.perfectomarinus et mesurer une faible activité oxyde nitreux-réductase.

A de très rares exceptions près, les bactéries dénitrifiantes sont incapables de faire fermenter les sucres et ne peuvent croître, en anaérobiose, qu'en présence de NO_3^- , NO_2^- ou N_2O . Aucune d'entre elles n'est anaérobie stricte. En aérobie, la dénitrification ne se produit pas car l'oxygène réprime la biosynthèse et inhibe le fonctionnement de plusieurs enzymes (Pichinoty, 1973).

Nous avons tout d'abord voulu confirmer la séquence des produits de la dénitrification établie chez plusieurs bactéries en l'étudiant chez deux organismes isolés dans des sols de rizière du

Sénégal : une bactérie sulfo-oxydante chimio-lithotrophe, Thiobacillus denitrificans RT, en collaboration avec Baldensperger qui l'a isolée et une bactérie thermophile sporulée apparentée à Bacillus thermodenitrificans . Ces deux études ont été effectuées sur des cellules entières et des extraits non purifiés, à l'aide du respiromètre de Warburg et de la chromatographie en phase gazeuse.

Nous avons ensuite analysé la microflore dénitrifiante des sols de rizière du Sénégal en étudiant plus particulièrement des souches pures appartenant au genre Bacillus que nous avons isolées en utilisant des concentrations élevées de nitrite (5 g/l) et un milieu complexe.

B - ETUDE DE LA SEQUENCE DES PRODUITS DE LA DENITRIFICATION

1 - Thiobacillus denitrificans RT

article 12

2 - Bacillus thermodenitrificans

article 13

Arch. Microbiol. 103, 31–36 (1975)
© by Springer-Verlag 1975

Reduction of Oxidized Inorganic Nitrogen Compounds by a New Strain of *Thiobacillus denitrificans*

JACQUES BALDENSPERGER and JEAN-LOUIS GARCIA
Laboratory of Soil Microbiology, ORSTOM, Dakar, Sénégal

Received September 1, 1974

Abstract. Denitrification by *Thiobacillus denitrificans* "RT" strain was investigated using manometry and gas chromatography.

1. From nitrate, resting cells produced only nitrogen anaerobically with thiosulfate as the electron donor. The data suggest that nitrate was assimilated and dissimilated by the same nitrate reductase, assayed with benzyl-viologen as the electron donor.

2. From nitrite, whole cells produced nitric oxide, nitrous oxide and nitrogen, using thiosulfate as the electron donor; nitrogen was the final product of the reduction. Crude extract reduced nitrite to nitrogen with p-phenylenediamine and dimethyl-p-phenylene diamine as the electron donors, and produced nitric oxide, nitrous oxide and nitrogen with tetramethyl-p-phenylene-diamine as the electron

donor. Nitrite was reduced to nitric oxide and nitrous oxide by crude extract using ascorbate-phenazine methosulfate as the electron donor.

3. From nitric oxide, whole cells produced nitrous oxide and nitrogen using thiosulfate as the electron donor, nitrogen was the final reduction product. Nitric oxide was reduced to nitrous oxide by crude extract with the ascorbate-phenazine methosulfate system.

4. Whole cells reduced nitrous oxide to nitrogen with thiosulfate as the electron donor.

It was not possible to detect any nitrous oxide reductase activity in crude extract.

5. A scheme was formulated as a possible mechanism of denitrification by *Thiobacillus denitrificans* "RT" strain.

Key words: *Thiobacillus denitrificans* — Reduction of Nitrate — Nitrite — Nitric Oxide — Nitrous Oxide.

A new strain of denitrifying chemolithotrophic sulfuroxidizer, *Thiobacillus denitrificans* "RT" strain, was isolated from a rice soil in the estuary of the river Senegal, using a thiosulfate anaerobic medium with nitrate as the sole nitrogen source.

The purpose of this paper is to report investigations of the respiratory nitrate reduction chain of the organism.

Materials and Methods

Organism. *Thiobacillus denitrificans* "RT" was isolated by enrichment cultures in the anaerobic liquid medium of Baalsrud and Baalsrud (1954) devoid of ammonium nitrogen. Except for its ability to use nitrate as sole nitrogen source, our isolate had similar morphological and physiological characteristics with *Thiobacillus denitrificans* "Oslo" strain from K. S. Baalsrud.

Media. Stock cultures of *Thiobacillus denitrificans* "RT" were maintained anaerobically on agar plates. The solid medium contained (g/l): $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, 5.0; KH_2PO_4 , 1.2; K_2HPO_4 , 2.0; KNO_3 , 2.0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0.6;

Non Standard Abbreviations. PDA = p-phenylene-diamine; DMPDA = N:N-dimethyl-p-phenylene-diamine; TMPDA = N:N:N':N'-tetramethyl-p-phenylene-diamine; PMS = phenazine methosulfate; BV = benzyl-viologen.

Special Agar Noble (DIFCO Laboratories), 16.0; trace metal solution, 1.0 ml.

All components except K_2HPO_4 and the trace metal solution were sterilized 20 min at 120°C in 800 ml of distilled water. The dipotassium hydrogen phosphate and the trace metal solution, each dissolved in 100 ml of distilled water, were sterilized separately by filtration and added before solidification.

The trace metal solution had the following composition (g/l): MgO , 10.75; $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 38.0; CaCO_3 , 2.0; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 1.44; $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, 1.12; $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, 0.25; $\text{CoCl}_2 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, 0.25; $\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 0.25; B_3H_3 , 0.66; concentrated HCl, 51.3 ml.

Carbon dioxide was provided as carbon source in culture jars by "Gaspak" disposable gas generator envelopes (BBL, Cockeysville, Maryland, U.S.A.).

Isolated colonies were subcultured every 3 weeks, and if stored at 5°C remained viable for at least 4 months.

Anaerobic cultures were grown in liquid medium "DB" containing (g/l): $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, 5.0; KH_2PO_4 , 2.0; KNO_3 , 2.0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0.6; NaHCO_3 , 1.5; trace metal solution, 1.0 ml. The first four materials were sterilized (20 min, 120°C) together in 800 ml of distilled water, while bicarbonate and trace metal solution, each dissolved in 100 ml of distilled water, were sterilized separately by filtration and added after cooling.

Anaerobic growth was conducted at 33°C under nitrogen, and the cells were harvested in a "Sharples" continuous

centrifuge, washed three times at 4°C in 0.03 M phosphate buffer pH 6.8, and stored frozen prior to further use. Cell yield was about 200 mg (dry weight) per liter.

Aerobic growth was conducted either with ammonium (medium "A") or with nitrate (medium "B") as nitrogen source.

Medium "A" contained (g/l): $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, 5.0; KH_2PO_4 , 1.2; K_2HPO_4 , 2.0; NH_4Cl , 1.0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0.6; trace metal solution, 1.0 ml.

Medium "B" had the same composition except for NH_4Cl replaced by KNO_3 at the final concentration of 1 g/l.

All materials except dipotassium hydrogen phosphate and trace metal solution were sterilized 20 min 120°C in 800 ml of distilled water. Trace metal solution and K_2HPO_4 , each dissolved in 100 ml of distilled water, were sterilized by filtration and added separately to the bulk of medium after cooling. The aerobic cultures were maintained at pH 6.8 by titrating sterile 10% (w/v) Na_2CO_3 into the fermentor by means of a pH stat unit. Cells were harvested and washed as for anaerobic cultures, with similar cell yield.

Preparation of Cell-Free Extracts. The washed pellets were resuspended in 0.03 M phosphate buffer pH 6.8 and passed twice through a French pressure cell at 20000 PSI. A few crystals of Deoxyribonuclease were added to the preparation which was left for 10 min at room temperature before centrifugation at $36000 \times g$ for 90 min. The supernatant was used as "crude extract" for enzymatic studies. Protein concentration was about 35 mg/ml, and crude extracts could be stored at -20°C for at least 6 months without significant loss of activity.

Hydrogenase solution was prepared from cells of *Desulfovibrio desulfuricans* "Hildenborough" strain grown in Postgate's medium C (Postgate, 1966). After three successive washings in 0.02 M phosphate buffer pH 6, 35 g (wet weight) of cells were resuspended in 18 ml of 0.05 M phosphate buffer pH 7.6. The cell paste was stirred 10 min under nitrogen at 4°C and centrifuged 90 min at $36000 \times g$. The clear supernatant was used as hydrogenase fraction in the reducing mixture for manometric measurements of nitrate reduction by crude extracts of *Thiobacillus denitrificans* "RT".

Determination of Growth Rates. Growth rates were calculated in aerated conditions using a Bio-Log II biophotometer (Bonet, Maury, Jouan) and in anaerobic conditions by measuring periodically the optical density at 450 nm of 1 ml samples from 1 l cultures.

Reduction of Oxidized Inorganic Nitrogen Compounds by Washed Cells Suspensions. Reduction of nitrate, nitrite, nitric oxide and nitrous oxide by washed cells was assayed manometrically with thiosulfate as the electron donor using a model V 166 Warburg apparatus, and gas determinations were performed with a Varian Aerograph model 90 P4 gas chromatograph as previously described (Garcia, 1974).

Enzyme Assays. Nitrate reductase activity was measured in crude extracts manometrically with BV as the electron donor (Pichinoty and Piéchaud, 1968). Nitrite reductase was assayed using PDA, DMPDA, TMPDA and the PMS-ascorbate system as electron donors (Miyata and Mori, 1968; Miyata *et al.*, 1969; Pichinoty, 1969b; Iwasaki and Matsubara, 1972). Reduction of nitric oxide was measured with PMS-ascorbate (Miyata *et al.*, 1969). Nitrous oxide reductase was assayed with PDA, DMPDA, TMPDA, PMS-ascorbate, as electron donors, and with NADH, FAD

and FMN according to Payne *et al.* (1971). Gas determinations were performed as for cell suspensions. *Nitrogen content* of washed cell suspension was determined by micro-Kjeldahl. *Protein* was measured by the method of Lowry *et al.* (1951) using bovine serum albumine as the reference protein.

Results

Growth Rates in Different Growth Conditions. The same generation time of 5 hrs was measured in aerated conditions of growth with ammonium (medium A) or with nitrate (medium B) as the nitrogen source, and in anaerobic cultures on nitrate (medium DB).

Nitrate Reduction by Whole Cells. Washed cell suspensions of anaerobically grown *Thiobacillus denitrificans* "RT" reduced nitrate with thiosulfate as the electron donor, with a QN_2 of 183 $\mu\text{lN}_2/\text{mg}$ total microbial nitrogen/hr, and only nitrogen could be detected during the reaction.

If grown in aerobic conditions with either nitrate or ammonium as the nitrogen source, washed cells incubated anaerobically with nitrate did not evolve nitrogen with thiosulfate as the electron donor.

Nitrate Reductase in Crude Extracts. Nitrate reductase was assayed in crude extracts with the hydrogen—hydrogenase—BV system as the electron donor, as described by Pichinoty and Piéchaud (1968).

In all growth conditions, nitrate reductase and chlorate reductase activities of crude extracts were not additive; and 95% inhibition of chlorate activity was observed with 1 mM sodium azide (see Table 1).

Crude extracts from cells grown with nitrate as the sole nitrogen source in anaerobic conditions (medium DB) had a specific nitrate reductase activity of 127 $\mu\text{moles NO}_3^-$ reduced/mg protein/hr.

This activity was much lower in crude extracts from aerobically grown cells on nitrate (medium B) or ammonium (medium A) (see Table 2).

When crude extracts were centrifuged for 2 hrs at $140000 \times g$, about 95% of the nitrate reductase was recovered in the pellet fraction, and the specific activity of the particles was increased to 330 $\mu\text{moles NO}_3^-$ reduced/mg protein/hr.

Nitrite Reduction by Whole Cells. Washed cell suspensions from growth in anaerobic conditions with nitrate (medium DB) reduced nitrite with thiosulfate as the electron donor, and evolution of a mixture of NO, N_2O and N_2 was detected by gas chromatography. During the first 2 hrs of reaction, evolution rates of 12 μlNO , 10 $\mu\text{lN}_2\text{O}$ and 2.6 $\mu\text{l N}_2/\text{mg N/hr}$ were measured.

After 12 hrs of incubation of washed cell suspensions with nitrite and thiosulfate, only nitrogen could be detected in the reaction flasks.

Table 1. Rates of hydrogen uptake by crude extracts of *Thiobacillus denitrificans* "RT"

Growth conditions		H ₂ uptake (μl/hr) with addition of			
		NO ₃ ⁻	ClO ₃ ⁻	NO ₃ ⁻ + ClO ₃ ⁻	ClO ₃ ⁻ + NaN ₃ ⁻
NO ₃ ⁻ as the terminal electron acceptor	NO ₃ ⁻ as the nitrogen source ^a	570	780	540	12
O ₂ as the terminal electron acceptor	NO ₃ ⁻ as the nitrogen source ^b	216	288	243	30
	NH ₄ ⁺ as the nitrogen source ^c	234	360	276	18

Manometric measurements at 37°C under hydrogen, phosphate buffer pH 7, 350 μmoles; hydrogenase, 0.2 ml; BV, 500 μg; KNO₃, 50 μmoles; KClO₃, 50 μmoles; NaN₃, 3 μmoles; final volume 3 ml.

^a 0.05 mg protein. ^b 8 mg protein. ^c 13 mg protein.

Table 2. Specific nitrate-reductase and chlorate-reductase activities of cell-free extracts from *Thiobacillus denitrificans* "RT"

	NO ₃ ⁻ as the terminal electron acceptor		O ₂ as the terminal electron acceptor	
	NO ₃ ⁻ as the nitrogen source		NO ₃ ⁻ as the nitrogen source	NH ₄ ⁺ as the nitrogen source
V(NO ₃ ⁻) μmole/mg prot./hr	127		0.3	0.2
V(ClO ₃ ⁻) μmole/mg prot./hr	232		0.5	0.4
V(ClO ₃ ⁻)/V(NO ₃ ⁻)	1.8		1.7	2.0

Experimental conditions as for Table 1.

Nitrite Reduction by Crude Extract. Reduction of nitrite by extracts from anaerobically grown cells of *Thiobacillus denitrificans* "RT" was assayed using PDA, DMPDA, TMPDA and the PMS—ascorbate system as electron donors.

After thermal equilibration, the side arm containing the nitrite solution was tipped into the vessel, and the chemical reaction allowed during 30 min before the enzyme fraction was tipped from the second side arm. Maximum gas evolution was observed with DMPDA as the electron donor (see Fig. 1). Gas chromatographic analysis of the atmospheres of the reaction flasks showed that only nitrogen was evolved from nitrite reduction by crude extract with PDA and DMPDA, but that a mixture of 80% NO, 4% N₂O and 16% N₂ was produced with TMPDA as the electron donor.

When nitrite reduction was assayed using the PMS—ascorbate system as the electron donor, gas chromatography showed that NO and N₂O were produced, but as simultaneous reduction of nitric oxide occurred, nitrous oxide was the final product of the reaction (Fig. 2A).

Reduction of Nitric Oxide by Whole Cells. A 10% NO concentration was used in the flask atmosphere for gas chromatographic measurements of NO reduction by whole cells with thiosulfate as the electron donor. During the first 3 hrs, a NO reduction rate of 94 μlNO reduced/mg N/hr was measured, and production of N₂O and N₂ was detected. Nitrogen was the final product of nitric oxide reduction by whole cells.

Reduction of Nitric Oxide by Crude Extract. Nitric oxide reduction by crude extract was assayed by gas chromatography, using the PMS—ascorbate system as the electron donor.

When a 10% nitric oxide concentration was used in the reaction flasks, a maximum activity of 146 μl NO reduced/mg prot/hr was measured (see Fig. 2B).

Nitric oxide was not reduced enzymatically by crude extracts of *Thiobacillus denitrificans* "RT" with PDA, DMPDA, TMPDA or NADH as electron donors.

A chemical production of N₂ with traces of N₂O was detectable by gas chromatography between NO and PDA or DMPDA, a slight reaction occurred between NO and TMPDA.

Reduction of Nitrous Oxide by Whole Cells. Washed cell suspensions from growth in anaerobic conditions in medium DE reduced nitrous oxide to nitrogen with thiosulfate as the electron donor, at the rate of 61 μl N₂O reduced/mg total microbial N/hr.

Reduction of Nitrous Oxide by Crude Extracts. It was not possible to detect any nitrous oxide reductase activity in crude extracts of *Thiobacillus denitrificans* "RT" either with PDA, DMPDA, TMPDA, PMS—ascorbate as electron donors, or with NADH, FAD and FMN as described by Payne *et al.* (1971).

Discussion

Our isolate, *Thiobacillus denitrificans* "RT", was characterized by its ability to assimilate nitrate in both

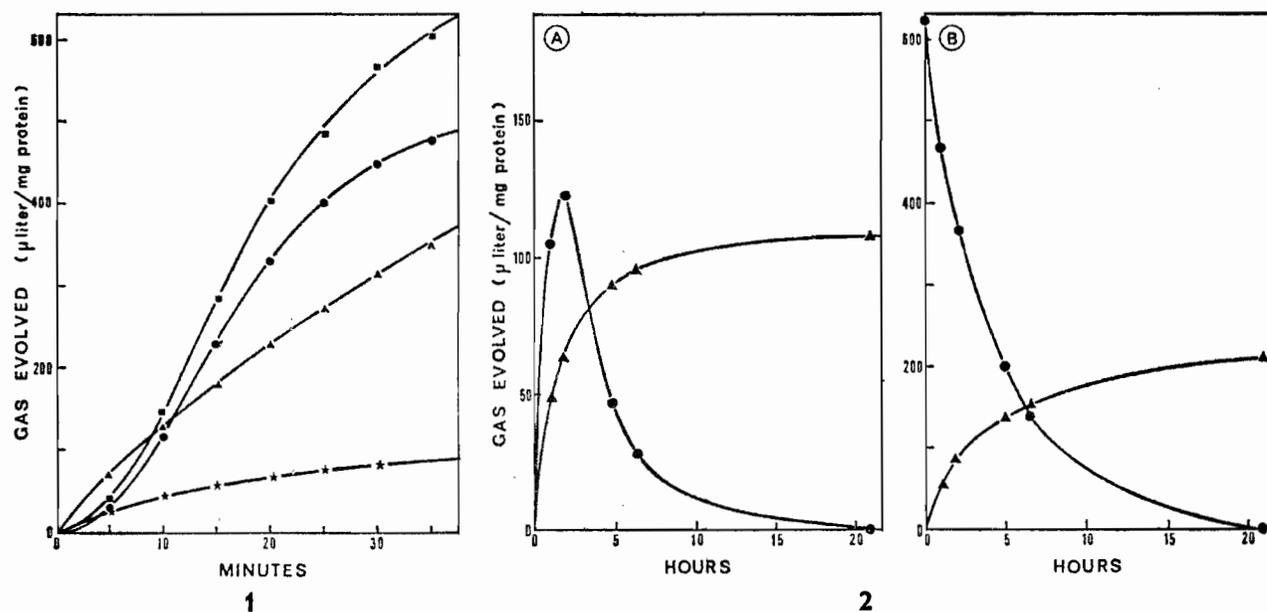


Fig. 1. Manometric measurements of nitrite reduction by crude extract from anaerobically grown cells with PDA, DMPDA, TMPDA or the PMS-ascorbate system as the electron donors, 37°C. Experimental conditions with amines: First side arm: 0.5 M PDA, 0.3 ml; or 0.5 M DMPDA, 0.1 ml; or 0.5 M TMPDA, 0.3 ml. Second side arm: crude extract, 0.04 ml (0.6 mg prot.). Center well: 40% (w/v) KOH, 0.1 ml. Vessel: 0.33 M phosphate buffer pH 7, 1 ml; 0.1 M KNO_2 , 0.5 ml; distilled water, up to 3 ml of liquid phase. Gas phase: pure helium. First side arm was tipped into the vessel to allow the chemical reaction, after 15 min gas evolution stopped and the crude extract was tipped from the second side arm. ●—● PDA- NO_2^- ; ■—■ DMPDA- NO_2^- ; ▲—▲ TMPDA- NO_2^- . Experimental conditions with PMS-ascorbate: side arm: 0.1 M NaNO_2 , 0.3 ml. Center well: 40% (w/v) KOH, 0.2 ml. Vessel: 0.5 M phosphate buffer pH 6.2, 0.6 ml; 0.1 M sodium ascorbate, 0.3 ml; 1 mM PMS, 0.3 ml; crude extract, 0.2 ml (3 mg prot.); distilled water, up to 3 ml of liquid phase. Gas phase: pure N_2 . *—* PMS-ascorbate NO_2^- .

Fig. 2A and B. Gas chromatography measurements of nitrite reduction and nitric oxide reduction by crude extract from anaerobically grown cells, using the PMS-ascorbate system as the electron donor. 125 ml serum flasks incubated at 37°C. 0.5 M phosphate buffer pH 6.2, 6 ml; 0.1 M sodium ascorbate, 3 ml; 1 mM PMS, 3 ml; distilled water, 12 ml (A) or 15 ml (B). Gas phase: pure helium. After thermal equilibration, 3 ml of a 0.1 M NaNO_2 solution were added with a syringe in flask A, and 12 ml of pure NO were added with a syringe in flask B. After 1 hr of reaction, 2 ml of crude extract (21 mg prot.) were added with a syringe in each flask. ●—● NO evolution; ▲—▲ N_2O evolution

aerobic and anaerobic conditions of growth. According to Vishniac and Santer (1957) only one aerobic *Thiobacillus* strain has been reported to assimilate nitrate, but all denitrifying strains require ammonium as the assimilatory nitrogen source (Baalsrud and Baalsrud, 1954; Hutchinson *et al.*, 1967).

More recently, Taylor *et al.* (1971) reported an isolate growing anaerobically without ammonium, but this characteristic was not emphasized.

According to Pichinoty and Piéchaud (1968), nitrate reductase A is present when: (1) nitrate reductase and chlorate reductase activities are not additive; (2) the reduction of chlorate is inhibited by 1 mM sodium azide.

These conditions were realized for all extracts of *Thiobacillus denitrificans* "RT" with nitrate either as

the terminal electron acceptor (medium DB) or as the nitrogen source (medium B) (see Table 1).

Our data suggest that for *Thiobacillus denitrificans* "RT" nitrate may be reduced by the same protein in both assimilatory and dissimilatory nitrate reductase complex. The idea of only one nitrate reductase has been proposed by Nicholas and Wilson (1964) for *Neurospora crassa*, and by Pichinoty (1966) and Van't Riet *et al.* (1968) for *Aerobacter aerogenes*.

As for *Thiobacillus denitrificans* "Oslo" (Adams *et al.*, 1971), *Aerobacter aerogenes* (Pichinoty, 1963), *Escherichia coli* K-12 (Showe and De Moss, 1968) and *Micrococcus denitrificans* (Pichinoty, 1969a; Forget, 1971) nitrate reductase A was localized in a particulate fraction of the cell-free extracts of *Thiobacillus denitrificans* "RT".

As in aerobic conditions growth rates were identical with ammonium or with nitrate as the sole nitrogen source, the assimilatory function of nitrate reductase was not completely inhibited by air in *Thiobacillus denitrificans* "RT".

Anaerobically grown cells suspensions reduced nitrite with thiosulfate as the electron donor and produced, during the beginning of the reaction, a mixture of 48% NO, 40% N₂O and 12% N₂, and nitrogen was the final reaction product. We suggest that this accumulation of intermediates is due to a strong inhibitory effect of nitrite on further steps of the dissimilatory nitrate reduction system.

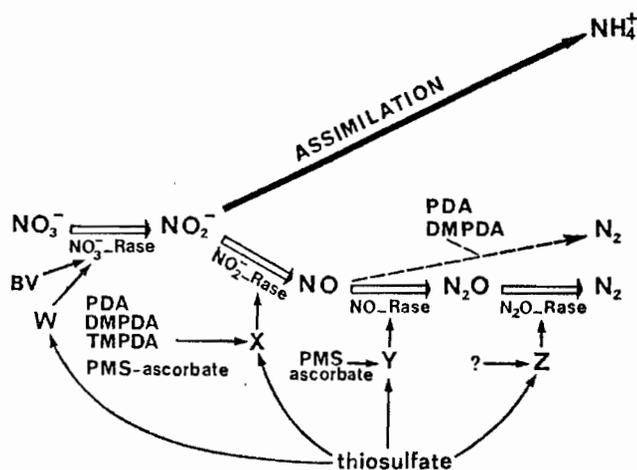
Unlike the isolate of Taylor and Hoare (1971), *Thiobacillus denitrificans* "RT" reduced nitric oxide with thiosulfate as the electron donor to nitrous oxide and nitrogen. The failure of these authors may be accounted for by an inadequate NO concentration in the gas phase when nitric oxide was produced chemically in the Warburg vessels. According to Miyata *et al.* (1969), a 10% NO concentration was necessary to obtain maximum NO reduction rates.

As anaerobically grown cells suspensions reduced nitrous oxide to nitrogen with thiosulfate as the electron donor, we may assume that nitric oxide and nitrous oxide are intermediate products of nitrite reduction by *Thiobacillus denitrificans*. A similar statement was made by Matsubara and Mori (1968) for *Pseudomonas denitrificans*.

Cell free extract from anaerobically grown cells on nitrate produced NO, N₂O and N₂ from nitrite with TMPDA as the electron donor. Nitrous oxide was not detected in nitrite-TMPDA reducing fractions from *Pseudomonas denitrificans* (Miyata and Mori, 1968), *Micrococcus denitrificans* and *Pseudomonas aeruginosa* (Pichinoty, 1969b).

Since our data were in agreement with author's assertion that nitrous oxide was not produced by a chemical reaction between nitric oxide and amines, we may suggest that a nitric oxide-TMPDA reducing activity was present in extracts of *Thiobacillus denitrificans* "RT". However, we were unable to give evidence of enzymatic NO-TMPDA reduction, as nitric oxide was converted into nitrogen by reacting with the phenyl-amino or imino group of the amine, as shown by Miyata and Mori (1968).

This chemical nitrogen production from TMPDA and NO account for the nitrogen evolution detected during enzymatic nitrite reduction with TMPDA as the electron donor, while we were unable to detect any nitrous oxide reducing activity in crude extracts, either with amines, PMS-ascorbate or with NADH as the electron donor systems.



Scheme 1. Hypothetical scheme for a possible mechanism for denitrification by *Thiobacillus denitrificans* "RT". \Rightarrow Normal denitrification process; \rightarrow nonenzymatic reaction; \rightarrow other enzymatic reaction, or electron transport system. NO_3^- -Rase = nitrate reductase; NO_2^- -Rase = nitrite reductase; NO -Rase = nitric oxide reductase; N_2O -Rase = nitrous oxide reductase; W, X, Y and Z unknown components of electron transport system

Matsubara and Mori (1968) reported that nitrous oxide reductase was lost during disruption of cells of *Pseudomonas denitrificans*, but more recently Payne *et al.* (1971) isolated a nitrous oxide reducing fraction from *Pseudomonas perfectomarinus* grown at the expense of N₂O.

With the PMS-ascorbate system, cell-free extract of *Thiobacillus denitrificans* "RT" strain reduced nitrite to $\text{NO} + \text{N}_2\text{O}$, and nitric oxide to nitrous oxide.

As a conclusion from the experimental data at the present stage, we can formulate Scheme 1 as a possible mechanism of dissimilatory reduction of nitrate to nitrogen in *Thiobacillus denitrificans* "RT" showing resemblance to the scheme proposed by Matsubara (1970) for *Pseudomonas denitrificans*.

References

- Adams, C. A., Warnes, G. M., Nicholas, D. J. D.: A sulphite-dependent nitrate reductase from *Thiobacillus denitrificans*. *Biochim. biophys. Acta* (Amst.) **235**, 398–406 (1971)
- Baalsrud, K., Baalsrud, K. S.: Studies on *Thiobacillus denitrificans*. *Arch. Mikrobiol.* **20**, 34–62 (1954)
- Forget, P.: Les nitrate-réductases bactériennes. Solubilisation, purification et propriétés de l'enzyme A de *Micrococcus denitrificans*. *Europ. J. Biochem.* **18**, 442–450 (1971)
- Garcia, J.-L.: Réduction de l'oxyde nitreux dans les sols de rizières du Sénégal: mesure de l'activité dénitrifiante. *Soil Biol. Biochem.* **6**, 79–84 (1974)

- Hutchinson, M., Johnstone, K.I., White, D.: Taxonomy of anaerobic thiobacilli. *J. gen. Microbiol.* **47**, 17–23 (1967)
- Iwasaki, H., Matsubara, T.: A nitrate reductase from *Achromobacter cycloclastes*. *J. Biochem. (Tokyo)* **71**, 645–652 (1972)
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biochem.* **193**, 265–275 (1951)
- Matsubara, T.: Studies on denitrification. XII. Gas production from amines and nitrite. *J. Biochem. (Tokyo)* **67**, 229–235 (1970)
- Matsubara, T., Mori, T.: Studies on denitrification. IX. Nitrous oxide, its production and reduction to nitrogen. *J. Biochem. (Tokyo)* **64**, 863–871 (1968)
- Miyata, M., Matsubara, T., Mori, T.: Studies on denitrification. XI. Some properties of nitric oxide reductase. *J. Biochem. (Tokyo)* **66**, 759–765 (1969)
- Miyata, M., Mori, T.: Studies on denitrification. VIII. Production of nitric oxide by denitrifying reaction in the presence of tetramethyl-p-phenylene-diamine. *J. Biochem. (Tokyo)* **64**, 849–861 (1968)
- Nicholas, D.J.D., Wilson, P.J.: A dissimilatory nitrate reductase from *Neurospora crassa*. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **86**, 466–476 (1964)
- Payne, W.J., Riley, P.S., Cox, C.D., Jr.: Separate nitrite, nitric oxide and nitrous oxide reducing fractions from *Pseudomonas perfectomarinus*. *J. Bact.* **106**, 356–361 (1971)
- Pichinoty, F.: Recherches sur la nitrate-réductase d'*Aerobacter aerogenes*. Propriétés, spécificité d'action et inhibition par l'oxygène. *Ann. Inst. Pasteur* **104**, 394–418 (1963)
- Pichinoty, F.: Propriétés, régulation et fonctions physiologiques des nitrate-réductases bactériennes A et B. *Bull. Soc. franç. Physiol. Vég.* **12**, 97–104 (1966)
- Pichinoty, F.: Les nitrate-réductases bactériennes. (I) Substrats, état particulaire et inhibiteurs de l'enzyme A. *Arch. Mikrobiol.* **68**, 51–64 (1969a)
- Pichinoty, F.: La dénitrification bactérienne. I. Utilisation des amines aromatiques comme donneuses d'électrons dans la réduction du nitrite. *Arch. Mikrobiol.* **69**, 314–329 (1969b)
- Pichinoty, F., Piéchaud, M.: Recherche des nitrate-réductases bactériennes A et B: Méthodes. *Ann. Inst. Pasteur* **114**, 77–98 (1968)
- Postgate, J.R.: Media for sulfur bacteria. *Lab. Pract.* **15**, 1239–1244 (1966)
- Showe, M.K., De Moss, J.A.: Localization and regulation of synthesis of nitrate reductase in *Escherichia coli*. *J. Bact.* **95**, 1305–1313 (1968)
- Taylor, B.F., Hoare, D.S.: *Thiobacillus denitrificans* as an obligate chemolithotroph. II. Cell suspension and enzymatic studies. *Arch. Mikrobiol.* **80**, 262–276 (1971)
- Taylor, B.F., Hoare, D.S., Hoare, S.L.: *Thiobacillus denitrificans* as an obligate chemolithotroph. I. Isolation and growth studies. *Arch. Mikrobiol.* **78**, 193–204 (1971)
- Van't Riet, J., Stouthamer, A.H., Planta, R.J.: Regulation of nitrate assimilation and nitrate respiration in *Aerobacter aerogenes*. *J. Bact.* **96**, 1455–1464 (1968)
- Vishniac, W., Santer, M.: The Thiobacilli. *Bact. Rev.* **21**, 195–213 (1957)

Dr. J. Baldensperger
Centre ORSTOM, B.P. 1386
Dakar, Sénégal

Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)
1977, 128 A, 447-458

ÉTUDE DE LA DÉNITRIFICATION CHEZ UNE BACTÉRIE THERMOPHILE SPORULÉE

par J.-L. Garcia

Laboratoire de Microbiologie du Sol, ORSTOM, BP 1386, Dakar (Sénégal)

SUMMARY

DENITRIFICATION IN A SPORULATING THERMOPHILIC BACTERIUM

Denitrification in a thermophile isolated on nitrite containing-medium (5 g/l) was studied by means of Warburg respirometry and gas chromatography. This strain seems to denitrify nitrite more rapidly than nitrate. Extracts of cells grown anaerobically on nitrate have dissimilatory nitrate reductase (type A); extracts of cells grown aerobically without nitrate have raised levels of the two types of nitrate reductase A and B. The optimal temperature for enzyme A activity is 60° C. Nitrite reductase activity was measured using yeast extract as electron donor. For nitric oxide reductase activity, yeast extract is as efficient an electron donor as sodium lactate. Nitrous oxide reductase activity was found only in the 4000 *g* supernatant showing the particulate nature of the enzyme. A mixture of FAD, FMN and NADH served as electron donor. Using acetylene as an inhibitor of nitrous oxide reduction in both whole cells and extracts, we showed that this gas is an intermediate compound in the reduction of NO to N₂.

KEY-WORDS: Denitrification, Reductase, Thermophily; Sporulating bacterium, Soil.

INTRODUCTION

Les bactéries dénitrifiantes thermophiles ont été relativement peu étudiées. Ambroz, le premier, a isolé en 1913 un bacille sporulé qu'il nomma *Denitrobacterium thermophilum* [1]. Au cours d'une étude systématique du genre *Bacillus*, Smith, Gordon et Clark [21] n'ont trouvé que 4 souches

Manuscrit reçu le 14 décembre 1976, accepté le 23 avril 1977.

dénitrifiantes sur 216 appartenant à l'espèce *B. stearothermophilus*. En 1968, Wolff et Barker [22] ont proposé de scinder cette espèce en trois groupes : seules les souches du groupe 1 (*B. kaustophilus* ou *B. thermodenitrificans*) réduisent le nitrate avec production de gaz. De Barjac et Bonnefoi [4] n'ont pas trouvé de différences notables entre les 5 souches dénitrifiantes de *B. stearothermophilus* qu'ils ont étudiées ; leurs observations corroborent celles de Smith et coll. [21].

Nous avons isolé à partir de sols de rizière du Sénégal une quarantaine de bactéries dénitrifiantes thermophiles. L'une de celles-ci a été étudiée dans le but de préciser la séquence des produits de la dénitrification.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Microorganisme.

La souche TnBA₁ a été isolée à 65° à partir d'un sol de rizière de Casamance (Sénégal), par culture d'enrichissement en milieu complexe [5] renfermant 5 g/l de KNO₂ comme accepteur final d'électrons. C'est un bacille sporulé immobile, à spore ovale et déformante, oxydase⁺ et Gram⁻, qui semble correspondre à l'espèce *B. thermodenitrificans* [22] puisqu'il ne croît pas en milieu complexe contenant 3 % de NaCl, n'hydrolyse ni la gélatine ni l'amidon, ne forme pas d'acétyl-méthyl-carbinol ni d'indole, et produit de l'acide en anaérobiose sur arabinose, mannitol et xylose sans en produire sur lactose, rhamnose et cellobiose. Cependant, contrairement à la définition de l'espèce *B. stearothermophilus* [4] qui englobe le groupe *B. thermodenitrificans*, la souche TnBA₁ croît bien sur gélose nutritive à pH 6.

Cultures.

Toutes les cultures ont été faites à 55°. Pour obtenir des suspensions cellulaires, nous avons utilisé le même milieu que celui qui a servi à l'isolement [5] et procédé de la manière suivante. A partir d'une gélose inclinée (agar nutritif Difco, 23 g ; agar, 10 g ; eau distillée, 1 000 ml) âgée de 8 h environ, onensemence un ballon de 250 ml contenant 100 ml de milieu. Les cultures aérobies sont soumises à un barbotage d'air ; les cultures anaérobies sont effectuées sous N₂O ou sous N₂ lorsque le milieu contient KNO₃ ou KNO₂ (5 g/l). Après 8 h d'incubation, onensemence un ballon de 2 l contenant 1,4 l de milieu agité magnétiquement ; cet ensemencement est réalisé automatiquement au cours de la nuit à l'aide d'un dispositif très simple : la sonnerie d'un réveil déclenche mécaniquement l'ouverture du tuyau de jonction entre les deux ballons. Après 4 à 5 h, on récolte les cellules par centrifugation (14° ; 20 min, 4 000 g) ; une centrifugation trop rapide risque d'entraîner une lyse des cellules. Ces dernières sont ensuite lavées deux fois dans les mêmes conditions de centrifugation avec une solution saline [5] puis recueillies dans 5 à 10 ml de tampon phosphate 0,066 M, pH 7,4 [5] ; la solution de lavage et le tampon sont maintenus à 55° avant usage.

Préparation des extraits.

Les extraits sont obtenus par deux passages successifs dans une cellule de French à 20 000 PSI puis centrifugation à 4 000 ou 38 000 g pendant 30 min à 14°. La teneur en protéine [11] est environ 25 µg/ml. Les extraits sont utilisés immédiatement.

Réduction des oxydes de l'azote par les suspensions cellulaires.

La réduction du nitrate, du nitrite, de l'oxyde nitrique et de l'oxyde nitreux par les cellules lavées, a été étudiée à l'aide de la chromatographie en phase gazeuse. On utilise 1 ml de suspension bactérienne dans des flacons serum de 125 ml contenant 25 ml du milieu de culture sans accepteur d'électrons, 1 ml d'une solution de chloramphénicol (concentration finale : 100 µg/ml). Les flacons sont mis sous vide pendant 5 min puis gazés à l'hélium N45 (Sté l'Air Liquide, Paris) ; l'opération est répétée trois fois. On introduit ensuite, à l'aide de seringues en plastique, 2 ml de krypton N35 (qui sert d'étalon interne) et l'un des 4 composés azotes suivants : KNO_3 , 50 mg ; KNO_2 , 50 mg ; NO, 10 ml ; ou N_2O , 10 ml. Puis on met les flacons en incubation à 60° dans un bain-marie agité. Des analyses de l'atmosphère des flacons sont effectuées toutes les 40 min pendant 3 h à l'aide d'un chromatographe à conductibilité thermique « Varian Aerograph » 90 P4, suivant les conditions décrites ailleurs [8, 9]. Les résultats — deux répétitions — sont rapportés au mg d'azote total déterminé par microkjeldhal.

Mesure des activités enzymatiques.

L'activité nitrate-réductase a été mesurée à 60° par une méthode manométrique [20] avec le benzyl-viologène comme donneur d'électrons. Les amines aromatiques utilisées habituellement comme donneurs d'électrons pour doser la nitrite-réductase dissimilatrice, n'ont pu être employées ici car elles donnent lieu à une réaction chimique importante avec le nitrite à 60°. L'extrait de levure « Difco » a été utilisé comme donneur d'électrons [17]. La réduction de l'oxyde nitrique a été mesurée au chromatographe à l'aide du lactate de sodium [18] ou de l'extrait de levure comme donneurs d'électrons, dans des fioles de 13 ml incubées dans un bain-marie à agitation à 60° et munies d'un septum : elles contiennent : tampon phosphate 0,066 M pH 7,4, 1 ml ; lactate de sodium 0,5 M, 0,3 ml ; extrait, 1 ml ; NO, 1 ml ; krypton, 0,2 ml ; atmosphère d'hélium pur. On mesure l'activité oxyde nitreux-réductase au chromatographe à 60° en utilisant l'extrait de levure à concentration élevée (10 %) ou le mélange FAD, FMN et NADH [19] comme donneurs d'électrons ; l'acétylène (10 % de la phase gazeuse) a été utilisé comme inhibiteur de l'enzyme [3, 23].

RÉSULTATS

1) *Étude de la dénitrification par les suspensions cellulaires*

Nous n'avons jamais trouvé d'activité dénitrifiante lorsque les cellules lavées étaient remises en suspension dans du tampon phosphate 0,066 M contenant l'un des composés suivants comme donneur d'électrons : glucose, saccharose, DL-lactate et succinate. Par contre, une activité significative se manifeste lorsque l'on emploie le milieu de culture additionné de 100 µg/ml de chloramphénicol et l'un des quatre accepteurs d'électrons : KNO_3 , KNO_2 , NO ou N_2O .

Les résultats (tableau I) ont été obtenus après croissance de la souche en présence de nitrate ou de nitrite (aux concentrations de 2 et 5 ‰) ou de N_2O . Une accumulation de NO a pu être observée dans le cas de NO_2^- avec des cellules provenant d'une culture anaérobie avec nitrate. D'autre part, l'oxyde nitrique est réduit à une vitesse beaucoup plus grande lorsque les cellules proviennent d'une culture sur nitrite à haute

TABLEAU I. — Activité dénitrifiante à 60°
des suspensions cellulaires (vitesses maximales)
après croissance anaérobie à 55°.

Culture anaérobie avec	Accepteur d'électrons	Production μl gaz/mg N/h			Réduction μl gaz/mg N/h	
		NO	N ₂ O	N ₂	NO	N ₂ O
NO ₃ ⁻	NO ₃ ⁻	0	0	89	—	—
	NO ₂ ⁻	78	17	116	—	—
	NO	—	46	46	115	—
	N ₂ O	—	—	767	—	741
NO ₂ ⁻ à 2 ‰	NO ₃ ⁻	0	195	472	—	—
	NO ₂ ⁻	0	0	1 050	—	—
	NO	—	22	289	394	—
	N ₂ O	—	—	2 526	—	2 593
NO ₂ ⁻ à 5 ‰	NO ₃ ⁻	0	409	1 135	—	—
	NO ₂ ⁻	0	0	2 275	—	—
	NO	—	0	600	1 445	—
	N ₂ O	—	—	5 070	—	5 041
N ₂ O	NO ₃ ⁻	0	0	40	—	—
	NO ₂ ⁻	0	0	35	—	—
	NO	—	0	78	—	—
	N ₂ O	—	—	1 758	—	1 776

concentration. L'accumulation de N₂O est souvent transitoire car l'activité oxyde nitreux-réductase des cellules est très élevée, surtout dans le cas d'une culture sur nitrite ou N₂O. La production de N₂ est beaucoup plus importante avec les cellules provenant d'une culture sur nitrite à haute concentration.

En utilisant l'acétylène (10 % de la phase gazeuse) comme inhibiteur de la réduction de N₂O, on observe l'accumulation de ce gaz quel que soit l'accepteur d'électrons, la production de N₂ étant considérablement réduite. La figure 1 représente l'influence de C₂H₂ sur l'activité dénitrifiante de cellules provenant d'une culture anaérobie sur nitrite à 5 ‰ ; l'acétylène n'inhibe que la réduction de N₂O.

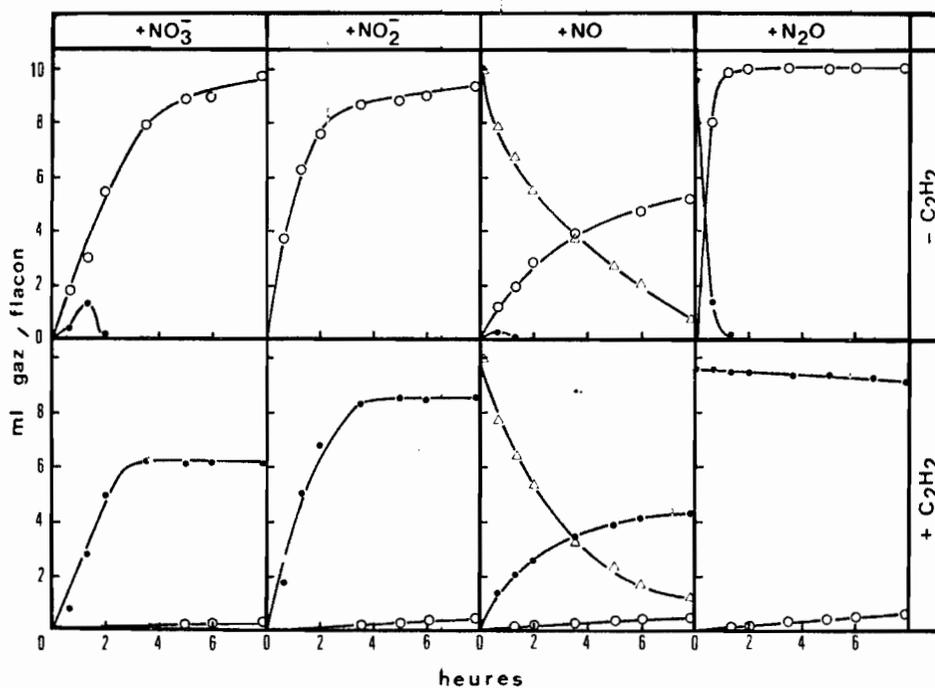


FIG. 1. — Influence de l'acétylène sur l'accumulation des composés gazeux de la dénitrification par une suspension cellulaire issue d'une culture anaérobie avec nitrite à 5 ‰

Incubation : bain-marie agité à 60°.

—△— : NO ; —●— : N₂O ; —○— : N₂.

2) Activités enzymatiques

a) Nitrate-réductase.

Les nitrate-réductases A et B ont été recherchées dans les extraits provenant respectivement d'une culture anaérobie avec nitrate et d'une culture aérobie sans nitrate. Dans le premier cas, seule la nitrate-réductase de type A a été identifiée. Dans le second cas, nous avons trouvé les enzymes A et B. D'autre part, nous avons constaté un niveau de base relativement élevé pour les deux enzymes lorsque la bactérie croît en aérobie et en l'absence de nitrate : cette activité est seulement 15 fois plus faible que celle des cellules induites en anaérobie (tableau II). L'activité maximale se situe au voisinage de 60° (fig. 2). Nous avons également mesuré l'activité des extraits provenant de cultures sur nitrite et sur N₂O : elle est nettement plus faible que celle obtenue sur nitrate (tableau III).

b) Nitrite-réductase.

La concentration d'extrait de levure qui permet d'obtenir une activité maximale est très élevée et comprise entre 5 et 10 % (fig. 3 B). D'autre

part, l'activité nitrite-réductase est proportionnelle à la concentration d'enzyme (fig. 3 A). L'influence des conditions de culture sur l'activité spécifique des extraits est indiquée dans le tableau III.

c) *Oxyde nitrique-réductase.*

L'activité oxyde nitrique-réductase a été mesurée au chromatographe à 60° avec le lactate de sodium comme donneur d'électrons. Ce gaz est réduit

TABLEAU II. — Activités spécifiques nitrate- et chlorate-réductases des extraits, exprimées en μmoles de substrat réduit/mg de protéine/h.

Activité spécifique	Culture aérobie sans NO_3^-	Culture anaérobie avec NO_3^-
$V(\text{NO}_3^-)$	13,5	211
$V(\text{ClO}_3^-)$	8,7	278
$V(\text{ClO}_3^-)/V(\text{NO}_3^-)$	0,64	1,30

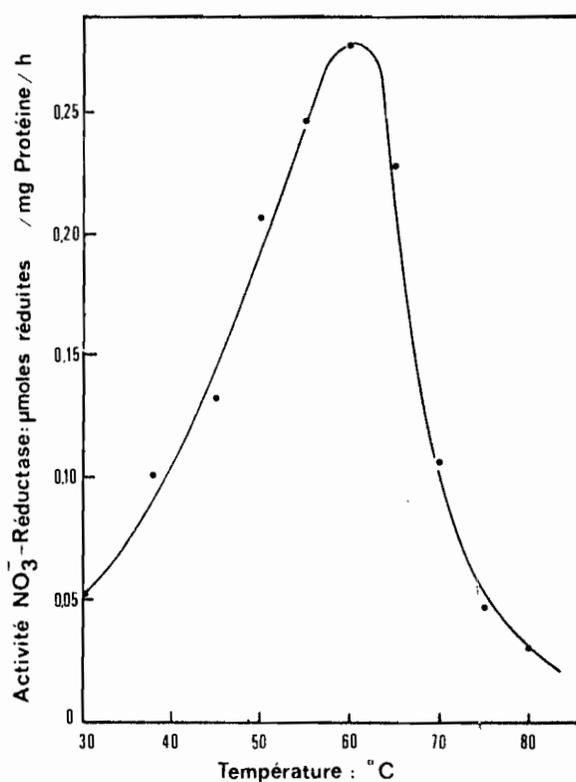


FIG. 2. — Influence de la température sur l'activité nitrate-réductase.

BACTÉRIE THERMOPHILE ET DÉNITRIFICATION 453

jusqu'au stade de N_2O . L'activité la plus faible a été observée avec les cultures sur N_2O (tableau III).

d) *Oxyde nitreux-réductase.*

L'activité de l'oxyde nitreux-réductase a pu être mesurée au chromatographe à 60° , à l'aide du mélange FAD, FMN et NADH. Cette enzyme

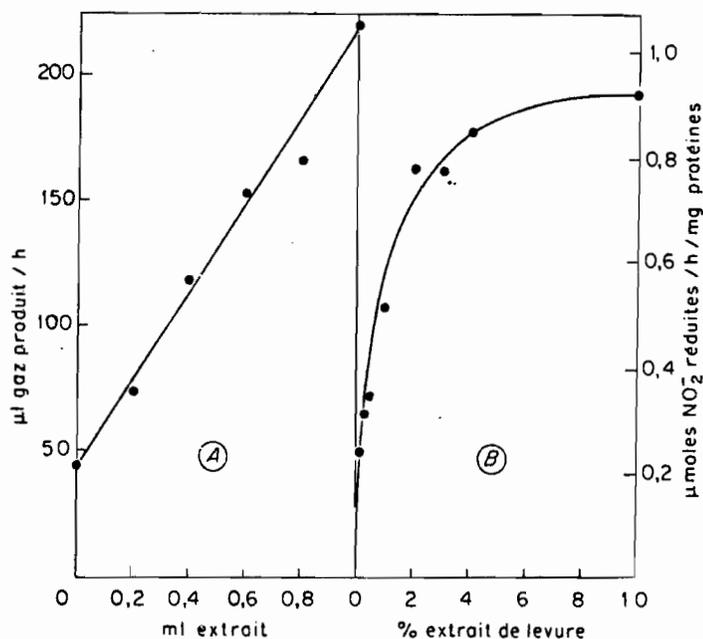


FIG. 3. — Influence des quantités d'extraits (A) et d'extrait de levure (B) sur l'activité nitrite-réductase à 60° .

Fiole : tampon phosphate 0,33 M, pH 7,4, 1 ml ; extrait de levure, 0,2 ml ; extrait d'une culture anaérobie avec KNO_2 , x ml. Diverticule : KNO_2 0,25 M, 0,2 ml. Puits central : KOH 40 %, 0,2 ml. Volume total de la phase liquide amené à 3 ml avec de l'eau. Phase gazeuse : N_2 pur.

TABLEAU III. — Activités spécifiques mesurées à 60° des extraits provenant de cultures anaérobies avec nitrate, nitrite ou oxyde nitreux et exprimées en μ moles de substrat réduit/mg de protéine/h.

Activité enzymatique	Extrait d'une culture avec		
	NO_3^-	NO_2^-	N_2O
Nitrate-réductase	475	214	140
Nitrite-réductase	2,60	1,76	0,70
Oxyde nitrique-réductase	1,00	1,50	0,15
Oxyde nitreux-réductase	0,19	0,22	1,19

doit être liée à de très grosses particules puisqu'elle sédimente au-delà de 4 000 *g*. L'oxyde nitreux est réduit équimoléculairement en N₂. En présence d'acétylène, la production de N₂ est fortement inhibée. L'activité oxyde nitreux-réductase est nettement plus élevée dans le cas des cultures anaérobies avec N₂O que dans le cas de cultures anaérobies avec nitrate ou nitrite (tableau III).

e) *Utilisation de l'extrait de levure comme donneur d'électrons par les différentes enzymes.*

En utilisant l'extrait de levure à concentration élevée (10 %), nous avons pu mesurer l'activité des enzymes de la dénitrification à l'aide du respiromètre de Warburg pour les nitrate-et nitrite-réductases et de la chromatographie en phase gazeuse pour l'oxyde nitrique-et l'oxyde nitreux-réductases (tableau IV). Si l'on ajoute à la fois l'extrait de levure et le mélange FAD, FMN et NADH, on obtient, avec NO₂⁻ comme substrat respiratoire et un extrait (surnageant à 4 000 *g*) provenant d'une culture anaérobie sur nitrite à 5 ‰, les trois composés gazeux habituels de la dénitrification, NO, N₂O et N₂, ce dernier gaz constituant le produit ultime de la réaction (fig. 4 A). En présence d'acétylène à 10 %, la production de N₂ est fortement inhibée (fig. 4 B).

TABLEAU IV. — Activités spécifiques d'un extrait provenant d'une culture anaérobie avec nitrate, mesurées à 60° avec l'extrait de levure (10 ‰) comme donneur d'électrons et exprimées en μmoles de substrat réduit/mg de protéine/h.

Enzyme	Activité spécifique
Nitrate-réductase	0,83
Nitrite-réductase	2,60
Oxyde nitrique-réductase	1,51
Oxyde nitreux-réductase	0,34

DISCUSSION

La bactérie étudiée dénitrifie plus rapidement le nitrite que le nitrate ; les suspensions cellulaires provenant d'une culture sur nitrite ont également une activité dénitrifiante beaucoup plus élevée que celles provenant d'une culture sur nitrate.

Downey et ses collaborateurs [5, 6, 7, 10] ont étudié la nitrate-réductase d'une bactérie thermophile, *B. stearrowthermophilus* ; celle-ci se trouve à l'état particulière dans les extraits. La bactérie étudiée synthétise les deux nitrate-réductases A et B en aérobiose sans nitrate. Le fait que le niveau de base des enzymes est alors seulement quinze fois plus faible que l'activité induite en anaérobiose sur nitrate, n'est pas courant. Downey et Numer

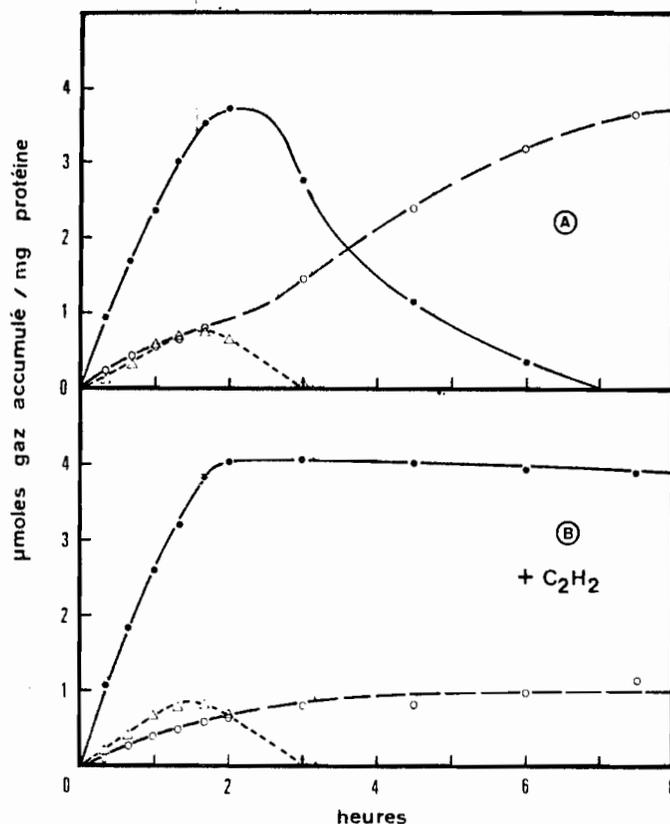


FIG. 4. — Influence de l'acétylène sur l'accumulation des composés gazeux de la dénitrification par un extrait (surnageant à 4 000 g) provenant d'une culture anaérobie avec nitrite à 5 ‰.

Extrait, 1 ml (16,75 mg protéine) ; extrait de levure, 0,3 g (0,4 ml) ; FMN et FAD, 0,5 µmole (0,2 ml) ; NADH, 1 µmole (0,2 ml). Incubation : en anaérobiose à 60° sous He ; Kr, 0,2 ml ; C_2H_2 , \pm 1 ml (10 % de la phase gazeuse) ; KNO_2 0,25 M, 0,2 ml (introduit au temps zéro à l'aide d'une seringue).

--Δ-- : NO ; —●— : N_2O ; —○— : N_2 .

[7] n'ont pas trouvé d'activité dans les cultures aérobies sans nitrate de *B. stearotherophilus*. Les cultures étant réalisées à 55°, la teneur en oxygène du milieu est assez faible car la solubilité de ce gaz est réduite à température élevée ; cela explique au moins en partie le niveau de base élevé des enzymes. Il n'a pas été possible de déceler l'enzyme B dans l'extrait provenant d'une culture anaérobie sur nitrate car dans ce cas elle se trouve masquée par l'enzyme A [20].

L'extrait de levure a permis de mesurer l'activité nitrite-réductase des extraits, mais son efficacité est faible si on la compare à celle obtenue avec le benzyl-viologène pour la nitrate-réductase. Par contre, l'extrait de levure constitue un donneur d'électrons aussi efficace que le lactate

pour l'oxyde nitrique-réductase ; avec le lactate, la fraction soluble à 4 000 g accumule N_2O dans la phase gazeuse, tandis qu'avec l'extrait de levure on observe une accumulation de N_2 , l'oxyde nitreux représentant un stade transitoire.

Nous avons vu que l'oxyde nitreux-réductase est solidaire de particules ayant une taille élevée. Payne et coll. [19] ont été les premiers à démontrer ce fait chez une bactérie mésophile, *Pseudomonas perfectomarinis*, en introduisant une méthode originale de mesure par l'emploi du mélange FAD, FMN et NADH comme donneur d'électrons. Avant eux, Matsubara [13, 14] et Matsubara et Mori [16] chez *P. denitrificans*, ainsi que Matsubara et Iwasaki [15] chez *Alcaligenes faecalis*, n'avaient pas réussi à mesurer cette activité dans un extrait.

En règle générale, nous avons constaté que l'activité des enzymes de la dénitrification était maximale quand il s'agissait d'extraits provenant d'une culture contenant l'inducteur. Pour l'oxyde nitrique-réductase, le meilleur inducteur est le nitrite, la bactérie ne se développant pas sur NO. Dans tous les cas, quel que soit l'accepteur d'électrons présent dans le milieu de culture, nous avons constaté l'induction séquentielle de toutes les enzymes de la dénitrification.

Enfin, l'emploi de l'acétylène comme inhibiteur de la réduction de N_2O nous a permis de montrer, aussi bien avec des cellules entières qu'avec des extraits, que l'oxyde nitreux constitue un intermédiaire entre NO et N_2 chez cette bactérie thermophile. Cela avait été déjà établi chez plusieurs autres bactéries dénitrifiantes [2, 12, 15, 19].

RÉSUMÉ

La dénitrification par une bactérie dénitrifiante thermophile isolée sur nitrite (5 g/l) a été étudiée au respiromètre de Warburg et à l'aide de la chromatographie en phase gazeuse. Cette souche dénitrifie plus rapidement le nitrite que le nitrate. Les extraits provenant de cultures anaérobies avec nitrate possèdent la nitrate-réductase dissimilatrice de type A ; dans les extraits provenant de cultures aérobies sans nitrate, on trouve les nitrate-réductases de type A et B avec un niveau de base élevé. La température correspondant à l'activité maximale de l'enzyme A est de 60° C. L'activité nitrite-réductase a été mesurée à l'aide de l'extrait de levure comme donneur d'électrons. L'extrait de levure est un donneur d'électrons aussi efficace que le lactate de sodium pour l'oxyde nitrique-réductase. L'oxyde nitreux-réductase a été dosée en présence du mélange FAD, FMN et NADH ; elle se trouve solidaire de particules de taille élevée. L'emploi de l'acétylène comme inhibiteur de la réduction de N_2O a permis de montrer, à l'aide de cellules entières et d'extraits, que ce gaz constitue une étape intermédiaire entre NO et N_2 .

MOTS-CLÉS : Dénitrification, Réductase, Thermophilie ; Bactérie sporulée, Sol.

REMERCIEMENTS

L'auteur exprime ses remerciements à MM M. Mouraret et F. Pichinoty pour leurs conseils ainsi qu'à MM J. Bakhoum et C. Barrier pour leur assistance technique.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] AMBROZ, A., *Denitrobacterium thermophilum* spec. nova ein Beitrag zur Biologie der thermophilen Bakterien. *Cbl. Bakt.*, 1913, **37**, 3-16.
- [2] BALDENSPERGER, J. & GARCIA, J.-L., Reduction of oxidized inorganic nitrogen compounds by a new strain of *Thiobacillus denitrificans*. *Arch. Microbiol.*, 1975, **103**, 31-36.
- [3] BALDERSTON, W. L., SHERR, B. & PAYNE, W. J., Blockage by acetylene of nitrous oxide reduction in *Pseudomonas perfectomarinus*. *Appl. env. Microbiol.*, 1976, **31**, 504-508.
- [4] de BARJAC, H. & BONNEFOI, A., Essai de classification biochimique de soixante-quatre *Bacillus* des groupes II et III, représentant onze espèces différentes. *Ann. Inst. Pasteur*, 1972, **122**, 463-473.
- [5] DOWNEY, R. J., Nitrate reductase and respiratory adaptation in *Bacillus stearothermophilus*. *J. Bact.*, 1966, **91**, 634-641.
- [6] DOWNEY, R. J., KISZKISS, D. F. & NUNER, J. H., Influence of oxygen on development of nitrate respiration in *Bacillus stearothermophilus*. *J. Bact.*, 1969, **98**, 1056-1062.
- [7] DOWNEY, R. J. & NUNER, J. H., Induction of nitrate reductase under conditions of nitrogen depletion. *Life Sci.*, 1967, **6**, 855-861.
- [8] 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.
- [9] GARCIA, J.-L., Évaluation de la dénitrification dans les rizières par la méthode de réduction de N₂O. *Soil Biol. Biochem.*, 1975, **7**, 251-256.
- [10] KISZKISS, D. F. & DOWNEY, R. J., Localization and solubilization of the respiratory nitrate reductase of *Bacillus stearothermophilus*. *J. Bact.*, 1972, **109**, 803-810.
- [11] LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. & RANDALL, R. J., Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biochem.*, 1951, **193**, 265-275.
- [12] MATSUBARA, T., Studies on denitrification. — XII. Gas production from amines and nitrite. *J. Biochem. (Tokyo)*, 1970, **67**, 229-235.
- [13] MATSUBARA, T., Studies on denitrification. — XIII. Some properties of the N₂O-anaerobically grown cell. *J. Biochem. (Tokyo)*, 1971, **69**, 991-1001.
- [14] MATSUBARA, T., The participation of cytochromes in the reduction of N₂O to N₂ by a denitrifying bacterium. *J. Biochem. (Tokyo)*, 1975, **77**, 627-632.
- [15] MATSUBARA, T. & IWASAKI, H., Enzymatic steps of dissimilatory nitrite reduction in *Alcaligenes faecalis*. *J. Biochem. (Tokyo)*, 1971, **69**, 859-868.
- [16] MATSUBARA, T. & MORI, T., Studies on denitrification. — IX. Nitrous oxide, its production and reduction to nitrogen. *J. Biochem. (Tokyo)*, 1968, **64**, 863-871.
- [17] NAJJAR, V. A. & CHUNG, C. W., Enzymatic steps in denitrification, in « Inorganic nitrogen metabolism », 1955 (Symposium, McCollum Pratt Institute, Baltimore) (W. D. McElroy & B. Glass) (p. 260-291). John Hopkins Press, Baltimore, 1956.
- [18] MIYATA, M., MATSUBARA, T. & MORI, T., Studies on denitrification. XI. Some properties of nitric oxide reductase. *J. Biochem. (Tokyo)*, 1969, **66**, 759-765.

- [19] PAYNE, W. J., RILEY, P. S. & COX, C. D. Jr, Separate nitrite, nitric oxide and nitrous oxide reducing fractions from *Pseudomonas perfectomarinus*. *J. Bact.*, 1971, **106**, 356-361.
- [20] PICHINOTY, F. & PIÉCHAUD, M., Recherche des nitrate-réductases bactériennes A et B : méthodes. *Ann. Inst. Pasteur*, 1968, **114**, 77-98.
- [21] SMITH, N. R., GORDON, R. E. & CLARK, F. E., Aerobic sporeforming bacteria. *Monogr. U. S. Dep. Agric.*, 1952, n° 16.
- [22] WOLF, J. & BARKER, A. N., The genus *Bacillus* : aids to the identification of its species, in « Identification method for microbiologists » (B. M. Gibbs & D. A. Shapton) part B, (p. 93-109). Academic Press, London, 1968.
- [23] YOSHINARI, T. & KNOWLES, R., Acetylene inhibition of nitrous oxide reduction by denitrifying bacteria. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 1976, **69**, 705-710.

C - ANALYSE DE LA MICROFLORE DENITRIFIANTE DES SOLS DE RIZIERE
DU SENEGAL

1 - Mise en évidence de bactéries tolérant des concentra-
tions élevées de nitrite

article 14

Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)
1977, 128 A, 433-446

ANALYSE DE DIFFÉRENTS GROUPES
COMPOSANT LA MICROFLORE DÉNITRIFIANTE
DES SOLS DE RIZIÈRE DU SÉNÉGAL

par J.-L. Garcia

*Laboratoire de Microbiologie du Sol, ORSTOM,
BP. 1386, Dakar (Sénégal)*

SUMMARY

ANALYSIS OF VARIOUS GROUPS OF DENITRIFYING MICROFLORA
IN SENEGALESE PADDY SOILS

Denitrifying mesophilic and thermophilic bacteria were looked for in rice paddies of Senegal by culturing samples in medium with high concentrations of nitrate or nitrite (5 g/l) as respiratory substrate. These cultures revealed the existence of two populations.

1) a population of denitrifying mesophiles which tolerate high concentrations of nitrite, these organisms being mostly spore-formers and relatively numerous in these soils ; growth studies showed them to be very diverse: a) « nitrite-dependent » bacteria unable to reduce NO_3^- ; b) bacteria highly nitrite-tolerant with rapid growth on 5 g/l nitrite ; c) bacteria slightly nitrite-tolerant with weak or no growth on more than 3 g/l nitrite ; d) NO -tolerant bacteria which use nitric oxide as respiratory substrate for growth ; e) N_2O -deficient bacteria unable to grow on nitrous oxide ;

2) a population of denitrifying thermophilic spore-formers which are numerous in some soils and tolerate nitrite more or less well.

Measuring of the denitrifying activity of washed cells demonstrated that, in general, cells grown anaerobically on nitrite show much more activity than cells grown anaerobically on nitrate. This nitrite-tolerant population seems fairly heterogeneous, but it consists mostly of spore-forming species of the genus *Bacillus*.

KEY-WORDS: Denitrification, Soil, Nitrite ; Mesophily, Thermophily, *Bacillus*, Rice soils, Senegal.

INTRODUCTION

Il existe trois types de bactéries nitrato-réductrices : celles qui réduisent le nitrate avec production de gaz (N_2O et N_2), celles qui réduisent ce composé seulement jusqu'au stade du nitrite, et celles enfin qui réduisent le nitrite avec production de gaz, mais non le nitrate, et qui sont dites « nitrito-dépendantes ». Quelques espèces seulement de ce dernier type ont été décrites : 2 *Achromobacter* [8, 14], 1 *Alcaligenes odorans* var. *viridans* [3], plusieurs *Pseudomonas* [13] et 1 *Flavobacterium* [10]. Vangnai et Klein [13] estiment que ces microorganismes peuvent jouer un rôle important dans le métabolisme azoté des sols.

Les bactéries « nitrito-dépendantes » tolèrent généralement des concentrations élevées de nitrite, pouvant atteindre 0,5 % [13], alors que la majorité des autres bactéries dénitrifiantes connues sont incapables de croître en présence de 0,1 % de KNO_2 [1, 2, 9]. Nous avons effectué des numérations de ces organismes dans les sols de rizière du Sénégal. De nombreuses souches ont été isolées. La croissance et l'activité dénitrifiante de certaines d'entre elles ont été étudiées.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Échantillons de sol.

Des numérations et des isollements de bactéries dénitrifiantes ont été effectués sur des sols de rizière du Sénégal conservés durant plusieurs années à l'état sec [7] ou fraîchement prélevés et conservés à l'état humide à 4° C pendant 24 à 48 h. Ces sols proviennent des rizières de la Casamance et de la région du fleuve Sénégal.

Numérations.

Les numérations ont été effectuées selon la méthode du nombre le plus probable. On ensemence 5 tubes par dilution de sol, contenant un milieu faiblement gélosé ; on utilise KNO_3 ou KNO_2 (5 g/l) comme substrat respiratoire.

Deux milieux ont été employés :

1) *un milieu de base A* : $Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$, 3,58 g ; KH_2PO_4 , 0,98 g ; $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, 0,03 g ; $FeSO_4$, 6 mg ; $CaCl_2$, 20 mg ; NH_4Cl , 0,5 g ; extrait de levure (Difco), 1 g ; succinate de sodium, 10 g ; agar (Difco), 2 g ; eau déminéralisée, 1 000 ml ; pH ajusté à 7,0 ;

2) *un milieu complexe B* [4] : « Biotrypcase » (Biomérieux), 20 g ; extrait de levure (Biomérieux), 5 g ; $FeCl_3 \cdot 6 H_2O$, 7 mg ; $MnCl_2 \cdot 4 H_2O$, 15 mg ; $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, 15 mg ; saccharose, 5 g ; agar (Difco), 2 g ; eau déminéralisée, 1 000 ml ; pH ajusté à 7,0 avec KOH.

Après ensemencement, on recouvre le milieu contenu dans des tubes à essais de 12 × 120 mm par un bouchon de 2 ml d'agar à 5 ‰.

Deux groupes de bactéries dénitrifiantes ont ainsi été dénombrées : celles qui croissent à 30° sur les deux milieux et celles qui croissent à 60° sur milieu complexe B. Dans le premier cas, l'incubation dure 15 jours et dans le second cas, 48 h. On compte comme positifs les tubes où sont apparues des bulles de gaz [12].

Parallèlement, c'est-à-dire à l'aide de dilutions plus poussées provenant d'une même suspension de sol, des numérations des bactéries qui réduisent NO_3^- en NO_2^- ont été effectuées sur milieu non gélosé et additionné de nitrate (5 g/l), dans des tubes à essais de 12×120 mm munis de bouchons « Vacutainer » (Becton Dickinson, Grenoble) et mis en incubation sous vide, en milieu de base A pour les bactéries mésophiles et en milieu complexe B pour les bactéries thermophiles. Les tubes sont comptés comme positifs s'il y a apparition d'une coloration rose après addition du réactif de Griess en fin d'incubation (présence de nitrite).

Isolement de souches pures.

Des bactéries dénitrifiantes mésophiles tolérant 5 g/l de nitrite ont été isolées, soit en milieu de base A non gélosé, soit en milieu complexe B, à partir de sol sec ou fraîchement prélevé en sol nu ou dans la rhizosphère du riz. Des bactéries dénitrifiantes thermophiles ont été isolées en milieu complexe B non gélosé, à partir de sols secs, en présence de nitrate ou de nitrite (5 g/l).

Dans tous les cas, les incubations ont été effectuées sous vide, en ballons de 250 ml contenant 50 ml de milieu. Les étalements ont été réalisés sur gélose nutritive (Difco) en boîtes de Petri, et les souches conservées à 4° en tube incliné, sur gélose nutritive renforcée par l'addition de 10 g/l d'agar dans le cas des bactéries thermophiles.

Étude de la croissance.

La croissance de quelques-unes des souches isolées a été étudiée en anaérobiose (atmosphère de N_2) en milieu complexe B contenant des concentrations de nitrite comprises entre 0,05 et 0,6 ‰, à 37 ou 60°, à l'aide d'un biophotomètre enregistreur « Biolog II » (de Bonnet-Maury et Jouan, Jouan-Quétin, Paris).

Mesure de l'activité dénitrifiante.

En vue de la mesure de l'activité dénitrifiante des cellules lavées, les souches mésophiles choisies sont cultivées pendant 24 h à 30°, en anaérobiose, en milieu complexe B contenant 5 g/l de KNO_3 ou KNO_2 . La culture est ensuite centrifugée (20 min, 16 000 g) et les cellules sont lavées deux fois avec une solution de NaCl à 2 ‰ puis recueillies dans 10 ml de tampon phosphate 0,33 M, pH 7,0. Pour mesurer l'activité dénitrifiante, on utilise 1 ml de suspension bactérienne dans des flacons sérum de 125 ml contenant 25 ml de tampon et 50 mg de succinate de sodium. Les flacons sont mis sous vide pendant 5 min puis gazés à l'hélium N45 (Sté l'Air Liquide) ; l'opération est répétée trois fois. On introduit ensuite, à l'aide de seringues en plastique, 2 ml de krypton N35 qui sert d'étalon interne et l'un des quatre accepteurs d'électrons suivants : KNO_3 , 50 mg ; KNO_2 , 50 mg ; NO , 10 ml ; ou N_2O , 10 ml. Puis on place les flacons dans un bain-marie agité, à la température de 30°. Des analyses de l'atmosphère des flacons sont effectuées toutes les 30 min à l'aide d'un chromatographe à conductibilité thermique « Varian Aerograph 90 P4 » suivant les conditions décrites par ailleurs [5, 6].

Les résultats (deux répétitions) sont rapportés au mg d'azote total déterminé par micro-Kjeldahl.

La croissance de la souche thermophile choisie après isolement sur nitrite à 5 ‰ est obtenue en milieu complexe B contenant 5 g/l de KNO_3 ou KNO_2 . Elle se produit à 55° en 21 h environ si l'on procède de la manière suivante : on enseme un ballon de 250 ml contenant 100 ml de milieu à partir d'une gélose inclinée (gélose nutritive, 23 g ; agar, 10 g ; eau déminéralisée, 1 000 ml) âgées de 8 h environ. Après 8 h d'incubation anaérobie sous N_2 , on enseme un ballon de 2 l contenant 1,4 l de milieu ; cet enseme est réalisé automatiquement au cours de la nuit à l'aide d'un dispositif très simple : la sonnerie d'un réveil déclenche mécaniquement l'ouverture du tuyau de jonction entre les deux ballons. Après 5 h, on récolte

les cellules par centrifugation (14°, 20 min, 4 000 *g*) puis on les lave deux fois dans les mêmes conditions avec une solution saline [4] ; on les recueille enfin dans 10 ml de tampon phosphate 0,066 M, pH 7,4 [4] ; la solution de lavage et le tampon sont maintenus à 55° avant usage. Lors de la mesure de l'activité dénitrifiante, on remplace le tampon phosphate et le succinate par le milieu complexe B sans accepteur d'électrons, contenant 100 µg/ml de chloramphénicol et on effectue l'incubation des flacons à 60°.

RÉSULTATS

I. — Numérations

La densité des bactéries dénitrifiantes mésophiles évaluée en milieu de base A dans 9 sols de rizière conservés à l'état sec, montre une nette prédominance des bactéries dénombrées sur nitrite (D_2) par rapport à celles dénombrées sur nitrate (D_1) ; en effet, le rapport D_2/D_1 est dans tous les cas nettement supérieur à 1 (tableau I). Le nombre de bactéries mésophiles nitrate-réductrices produisant du nitrite (D_3) est très élevé par rapport à D_1 .

TABLEAU I. — Densité des bactéries mésophiles (nombre par g de sol sec) dans des sols de rizière conservés à l'état sec, évaluée en milieu de base A.

Origine des sols	D_1	D_2	D_3 (millions)	D_2/D_1	D_3/D_1
Bambato	3 400	50 000	320	14,7	94 118
Boundoum	10 000	22 000	5	2,2	500
Boungkilinn	1 600	14 000	7	8,7	4 375
Diango	2 200	12 000	3,4	5,4	1 545
Djibelor	1 400	4 000	30	2,8	21 428
M'Bang	800	7 000	5	8,7	6 250
Oussouye	2 800	180 000	90	64,3	32 143
Sébikotane	800	8 000	10	10	12 500
Tanaff	1 200	26 000	120	21,7	100 000

D_1 = bactéries dénombrées sur nitrate et produisant du gaz.
 D_2 = bactéries dénombrées sur nitrite à 5‰ et produisant du gaz.
 D_3 = bactéries nitrate-réductrices produisant du nitrite.

La densité des bactéries dénitrifiantes mésophiles dans le sol nu (S) et la rhizosphère du riz (R), évaluée en milieu de base A dans 12 sols de rizière fraîchement prélevés et conservés humides, montre, par contre, une prédominance des bactéries dénombrées sur nitrate (D_1) par rapport

MICROFLORE DÉNITRIFIANTE D'UNE RIZIÈRE

437

à celles dénombrées sur nitrite (D_2) ; en effet, le rapport D_2/D_1 est le plus souvent inférieur à 1 ou voisin de 1 (tableau II). Le nombre de bactéries mésophiles nitrato-réductrices produisant du nitrite (D_3) est, dans ce cas, toujours plus élevé que celui des bactéries dénitrifiantes dénombrées sur nitrate (D_1), mais le rapport D_3/D_1 est plus faible, en général, que celui obtenu pour les sols conservés à l'état sec. Le rapport des densités de bac-

TABLEAU II. — Densité des bactéries mésophiles (nombre par g de sol sec) dans le sol nu (S) et la rhizosphère du riz (R) à partir d'échantillons frais de sols de rizière de la vallée du fleuve Sénégal, évaluée en milieu de base A.

Origine des sols		D_1	D_2	D_3 (millions)	D_2/D_1	D_3/D_1
Boundoum Nord	S	79 500	4 500	102	0,06	1 283
	R	405 000	24 000	1,012	0,06	2,5
Richard-Toll Canal D-1	S	1 062 000	106 000	6,195	0,10	5,8
	R	47 000	47 000	339,6	1,00	7 225
Savoigne 1	S	359 000	18 000	202	0,05	562
	R	986 000	47 900	507	0,05	514
Richard-Toll Canal D-2	S	68 500	13 700	2,74	0,20	40
	R	22 000	73 500	5	3,34	227
Savoigne 2	S	290 900	30 900	0,454	0,11	1,5
	R	174 800	116 500	68	0,67	389
Boundoum barrage	S	106 000	14 000	136,4	0,13	1 287
	R	522 000	134 000	89,5	0,25	171,5
Balky	S	1 224 500	184 000	9,2	0,15	7,5
	R	69 000	7 000	0,495	0,10	7,2
Kassack Sud	S	2 195 000	170 700	73,2	0,08	33,3
	R	2 222 000	5 000 000	500	2,25	225
Grande digue	S	103 450	163 800	51,7	1,58	500
	R	51 700	86 200	155,2	1,67	3 002
Ross-Béthio	S	11 480	147 600	8,2	12,86	714,3
	R	21 840	109 200	45,5	5,00	2 083
Dagana	S	309 400	200 200	31,85	0,65	103
	R	22 120	189 600	55,3	8,57	2 500
Fanaye	S	707 000	353 500	323,2	0,50	457
	R	220 400	394 400	371,2	1,79	1 684

D_1 , D_2 et D_3 : cf. légende du tableau I.

téries dénombrées dans la rhizosphère et le sol nu (R/S) est variable suivant les sols dans le cas des ensembles D_1 et D_2 mais le plus souvent supérieur à 1 dans le cas de l'ensemble D_3 (tableau III).

TABLEAU III. — Rapport des densités de bactéries mésophiles dénombrées dans la rhizosphère du riz et le sol nu (R/S).

Origine des sols	D_1	D_2	D_3
Boundoum Nord	5,0	5,3	0,01
Richard-Toll Canal D1	0,04	0,4	54,8
Savoigne 1	2,7	2,7	2,5
Richard-Toll Canal D-2	0,3	5,4	1,8
Savoigne 2	0,6	3,8	149,6
Boundoum barrage	4,9	9,6	1,9
Balky	0,1	0,04	0,2
Kassack Sud	1,0	29,3	6,8
Grande digue	0,5	0,5	3,0
Ross-Béthio	1,9	0,7	5,5
Dagana	0,07	0,9	1,7
Fanaye	0,3	1,1	1,1

D_1 , D_2 et D_3 : cf. légende du tableau I.

Comparons les densités des bactéries dénitrifiantes mésophiles dénombrées en milieu de base A et en milieu complexe B dans des sols conservés à l'état sec. On observe une augmentation des valeurs des ensembles D_1 et D_2 , le premier de ceux-ci augmentant moins que le second (tableau IV). Des observations similaires ont été faites avec des sols fraîchement prélevés (tableau IV).

La densité des bactéries dénitrifiantes thermophiles évaluée en milieu complexe B dans 18 sols de rizière conservés à l'état sec, montre une très nette prédominance des bactéries dénombrées sur nitrite (DT_2) par rapport à celles dénombrées sur nitrate (DT_1) ; en effet, le rapport DT_2/DT_1 n'est qu'une seule fois inférieur à 1 et atteint une valeur maximale de 1.120 (tableau V). Le nombre de bactéries thermophiles nitrato-réductrices produisant du nitrite (DT_3) est presque toujours supérieur à celui des bactéries dénitrifiantes dénombrées sur nitrate (DT_1), mais le rapport DT_3/DT_1 est nettement plus faible que celui obtenu avec les bactéries mésophiles dénombrées sur sol sec.

TABLEAU IV. — Comparaison, dans des sols de rizière conservés à l'état sec ou fraîchement prélevés, des densités de bactéries dénitrifiantes mésophiles (nombre par g de sol sec) obtenues en milieu de base A et milieu complexe B.

Nature et origine des sols		Milieu de base A			Milieu complexe B			B/A		
		D ₁	D ₂	D ₂ /D ₁	D ₁	D ₂	D ₂ /D ₁	D ₁	D ₂	
Sols secs	Goudomp	3 400	2 600	0,76	30 000	500 000	16,70	8,8	192,3	
	Boukiliinn	9 000	6 000	0,66	350 000	240 000	0,68	38,8	40,0	
	Kalaban	4 000	2 200	0,55	170 000	500 000	2,90	42,5	227,3	
Sols frais	Richard -Toil	S	1 062 000	106 200	0,10	323 800	152 400	0,47	0,3	1,4
	Canal D-1	R	47 000	47 000	1,00	2 058 000	882 300	0,42	438,0	187,7
	Savoigne 1	S	359 000	18 000	0,05	218 400	2 069 000	9,47	0,6	114,9
		R	986 000	47 900	0,05	2 528 700	1 609 200	0,63	2,5	33,6

D₁ et D₂ : cf. légende du tableau I.
 S = sol nu.
 R = rhizosphère du riz.

II. — Isolement de souches pures dénitrifiantes nitrito-tolérantes

Nous avons isolé 44 souches pures dénitrifiantes mésophiles en présence de nitrite à 5 ‰, à partir de sols de rizière du Sénégal conservés à l'état sec ou fraîchement prélevés, en milieux simple ou complexe : 73 % de ces souches sont sporulées ; 57 % font fermenter le glucose en milieu minéral additionné de 5 g/l du sucre et de 1 g/l d'extrait de levure, en ampoules scellées sous vide ; 15 % seulement présentent une croissance vigoureuse ; et 11 % des souches croissent à 55°.

Seules deux souches sont « nitrito-dépendantes », c'est-à-dire qu'elles ne croissent pas en anaérobiose en présence de nitrate ; 48 % des souches croissent bien en présence de nitrite à 5 ‰ ; les autres souches tolèrent seulement 3 g/l de nitrite ; 23 % des souches croissent en anaérobiose en présence de NO (10 % de la phase gazeuse) comme substrat respiratoire. Enfin, 11 % des souches ne croissent pas aux dépens de N₂O.

Nous avons isolé 17 souches dénitrifiantes thermophiles dans des sols de rizière du Sénégal conservés à l'état sec, en milieu complexe B contenant du nitrate ; 28 souches dénitrifiantes thermophiles ont été isolées à partir des mêmes sols en milieu complexe B contenant 5 ‰ de KNO₃. Des analyses effectuées au chromatographe après 24 et 48 h de croissance anaérobie en milieu liquide complexe, en flacons sérum de 125 ml, sur nitrate ou nitrite à 5 ‰, montrent que toutes les souches isolées sur nitrite sont capables de réduire le nitrate en N₂O et N₂ mais cela beaucoup moins vigoureusement que le fait le nitrite. Réciproquement, toutes les

TABLEAU V. — Densité des bactéries thermophiles
(nombre par g de sol sec) dénombrées en milieu complexe B
dans des sols de rizière conservés à l'état sec.

Origine des sols	DT ₁	DT ₂	DT ₃	DT ₂ /DT ₁	DT ₃ /DT ₁
Bambato	1 600	180 000	14 000	112,5	8,7
Bema	350	12 000	3 400	34,3	9,7
Boundoum Nord	25	3 500	14 000	140,0	560,0
Boungilinn	2 200	5 000	240 000	2,3	109,0
Diaogo	130	800	12 000	6,2	92,3
Djibelor	7 000	10 000	120 000	1,4	17,1
Kamobeul	110	2 200	800	20,0	7,3
Kassack	400	400	40 000	1,0	100,0
Loudia	50	280	4 000	5,6	80,0
M'Bang	250	36 000	1 200	144,0	4,8
Niaguise	22 000	7 000	120 000	0,3	5,5
Oussouye	5 000	70 000	22 000	14,0	4,4
Richard-Toll CSS	60	5 000	18 000	83,4	300,0
Richard-Toll Canaï D	170	2 800	1 000	16,5	5,9
Rindiao	25	28 000	400	1 120,0	16,0
Sébikotane	17 000	180 000	40 000	10,6	2,3
Tanaff	7 000	320 000	1 200	45,7	0,2
X	35	10 000	1 000	285,7	28,6

DT₁ = bactéries dénombrées sur nitrate et produisant du gaz.
DT₂ = bactéries dénombrées sur nitrite à 5‰ et produisant du gaz.
DT₃ = bactéries nitrato-réductrices produisant du nitrite.

souches isolées sur nitrate sont capables de croître en anaérobiose sur nitrite à 5 ‰.

Toutes ces souches pures sont actuellement en cours d'étude en vue de leur identification.

III. — Étude de la croissance

Les souches étudiées ont été choisies en fonction de leur comportement à l'égard du nitrite. Les résultats sont représentés sur la figure 1. La souche nitrito-faiblement tolérante, sporulée, ne présente pas de croissance en 48 h au-delà de 3 ‰ de nitrite, mais elle pousse bien sur nitrate. La souche nitrito-fortement tolérante, sporulée, croît sur nitrite à 6 ‰, mais sa

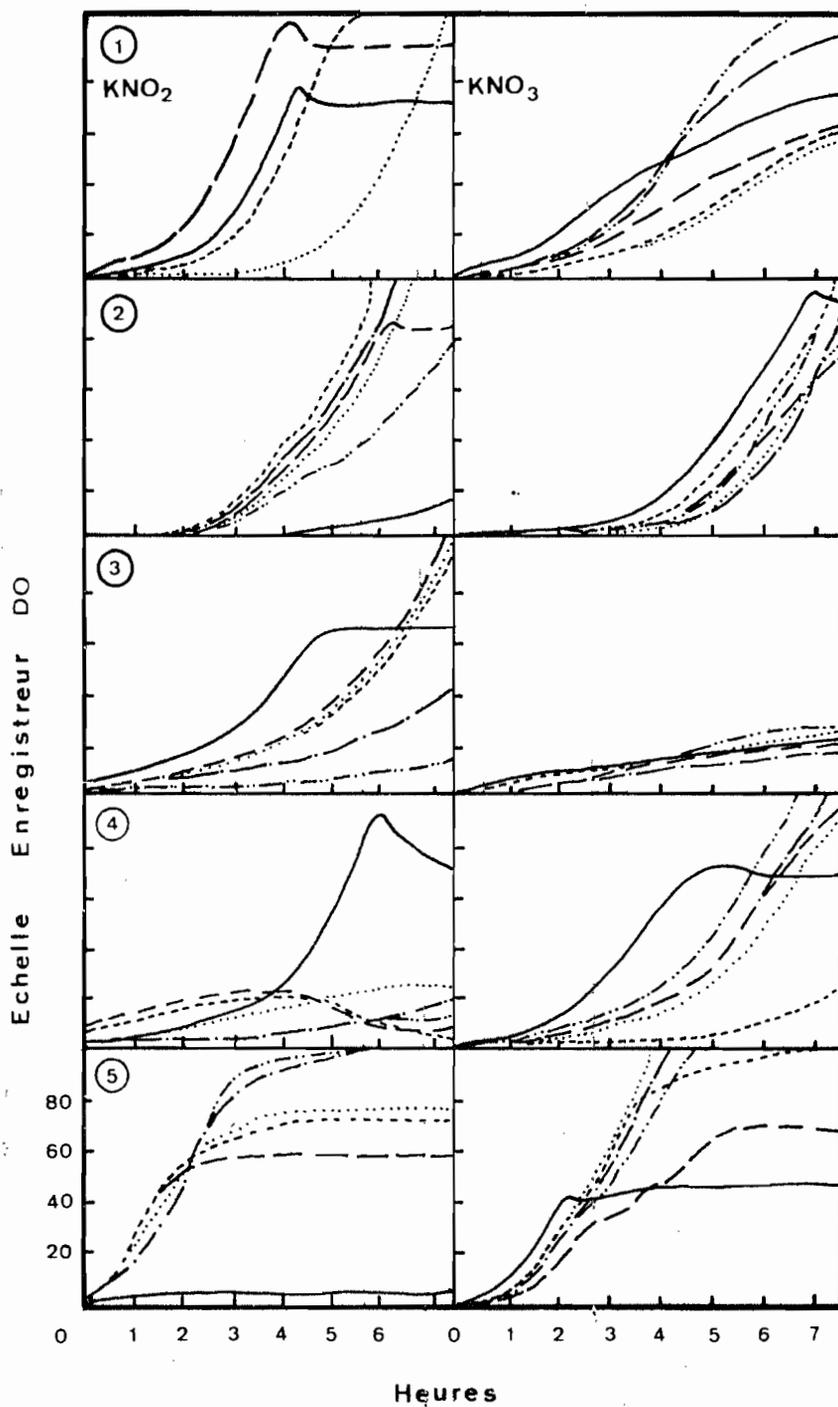


FIG. 1 — Étude au biophotomètre de la croissance des souches caractéristiques, en anaérobiose, sur KNO_3 ou KNO_2 comme substrat respiratoire.

1) Bactérie faiblement nitrito-tolérante ; 2) bactérie fortement nitrito-tolérante ; 3) bactérie « nitrito-dépendante » ; 4) *B. azotoformans* ; 5) bactérie thermophile.

Concentrations : — = 0,5 g/l ; - - - = 1,0 g/l
 - - - - = 2,0 g/l ; · · · · = 3,0 g/l
 - - - - - = 5,0 g/l ; - - - - - = 6,0 g/l.

croissance sur nitrate est moins rapide. La souche « nitrito-dépendante », non sporulée, tolère bien le nitrite mais ne présente qu'une croissance très faible sur nitrate. La souche de *Bacillus azoloformans* [11] n'a poussé qu'en présence de 0,5 g/l de nitrite. Enfin, la souche thermophile sporulée, isolée sur nitrite, croît bien en présence de nitrite à 6 ‰.

IV. — Mesure de l'activité dénitrifiante

Le tableau VI rend compte des activités nitrate-, nitrite-, oxyde nitrique- et oxyde nitreux-réductases maximales des cellules lavées de bactéries mésophiles, après culture anaérobie sur nitrate ou nitrite à 5 ‰. Rapportées au mg d'azote, ces activités sont en général plus élevées pour les cellules issues d'une culture sur nitrite dans le cas des bactéries nitrito-tolérantes. L'activité oxyde nitreux-réductase de la bactérie fortement nitrito-tolérante est élevée, et il n'y a accumulation de N_2O avec aucun des substrats respiratoires. Par contre, l'oxyde nitreux s'accumule sur nitrate, nitrite et oxyde nitrique pour les cellules de la bactérie faiblement nitrito-tolérante ayant poussé sur nitrate, et uniquement sur NO pour celles provenant d'une culture sur nitrite. Les cellules de la bactérie fortement nitrito-tolérante sont nettement plus actives que celles de la bactérie faiblement nitrito-tolérante. L'activité maximale a été obtenue sur N_2O dans les deux cas.

Les cellules de *B. azoloformans* ont accumulé N_2O sur nitrite. Enfin, les cellules de la bactérie « nitrito-dépendante » n'ont pas réduit le nitrate et ont accumulé N_2O seulement sur NO.

Les activités dénitrifiantes maximales de la bactérie thermophile figurent dans le tableau VII. L'activité des cellules issues d'une culture sur nitrite est nettement supérieure à celle des cellules issues d'une culture sur nitrate ; ces dernières accumulent N_2O sur NO_3^- et NO, tandis que l'oxyde nitreux produit par les premières sur NO_3^- est ensuite rapidement réduit en N_2 . L'activité maximale a été obtenue sur N_2O pour les deux cultures.

DISCUSSION

Notre étude montre qu'il existe dans les sols de rizière du Sénégal des bactéries dénitrifiantes qui tolèrent des concentrations de nitrite très élevées. Dans leur majorité, ces bactéries sont sporulées et appartiennent au genre *Bacillus*. Elles représentent une fraction importante de la microflore dénitrifiante totale. On notera que les ensembles D_1 et D_2 ne sont pas exclusifs puisque la plupart des organismes nitrate- et nitrite-réducteurs ainsi que les organismes nitrito-tolérants sont inclus dans les deux. Inversement, un organisme peut être exclu de D_2 aussi bien par sa sensibilité au nitrite que par son incapacité de les réduire. De même, un organisme peut être exclu de D_1 par son inaptitude à réduire le nitrate ou par son inaptitude à réduire le nitrite. L'emploi d'un milieu complexe riche permet la croissance d'un nombre beaucoup plus élevé de bactéries nitrito-tolérantes.

MICROFLORE DÉNITRIFIANTE D'UNE RIZIÈRE

443

TABLEAU VI. — Activité dénitrifiante maximale (μl de gaz accumulé/mg N/h) des cellules lavées de bactéries mésophiles, mesurée à 37° par chromatographie en phase gazeuse.

Souche	Culture anaérobie sur	Accepteur d'électrons	Gaz accumulés		
			NO	N ₂ O	N ₂
Bactérie fortement nitrito-tolérante	nitrate	NO ₃ ⁻	0	0	74
		NO ₂ ⁻	0	0	159
		NO	—	0	48
		N ₂ O	—	—	352
	nitrite	NO ₃ ⁻	0	0	55
		NO ₂ ⁻	0	0	415
		NO	—	0	153
		N ₂ O	—	—	770
Bactérie faiblement nitrito-tolérante	nitrate	NO ₃ ⁻	0	25	31
		NO ₂ ⁻	0	49	0
		NO	—	35	22
		N ₂ O	—	—	40
	nitrite	NO ₃ ⁻	0	0	78
		NO ₂ ⁻	0	0	73
		NO	—	157	19
		N ₂ O	—	—	191
Bactérie « nitrito-dépendante »	nitrite	NO ₃ ⁻	0	0	0
		NO ₂ ⁻	0	0	76
		NO	—	82	0
		N ₂ O	—	—	34
<i>B. azotoformans</i>	nitrate	NO ₃ ⁻	0	180	305
		NO ₂ ⁻	0	356	280
		NO	—	0	101
		N ₂ O	—	—	397

Tableau VII. — Activité dénitrifiante maximale des cellules thermophiles lavées, mesurée à 60° par chromatographie en phase gazeuse.

Culture anaérobie sur	Accepteur d'électrons	μl de gaz accumulé/mg N/h		
		NO	N ₂ O	N ₂
nitrate	NO ₃ ⁻	0	0	89
	NO ₂ ⁻	78	17	116
	NO	—	46	46
	N ₂ O	—	—	767
nitrite	NO ₃ ⁻	0	409	1 135
	NO ₂ ⁻	0	0	2 275
	NO	—	0	600
	N ₂ O	—	—	5 070

Cette population de bactéries nitrito-tolérantes est très diversifiée puisqu'on y rencontre des germes incapables de réduire NO₃⁻, des germes oxyde nitrique-tolérants qui croissent en présence de NO et des germes oxyde nitreux-déficlients incapables de croître en présence de N₂O. La tolérance envers le nitrite varie suivant les souches, et l'on peut distinguer des bactéries nitrito-fortement tolérantes qui croissent rapidement en présence de 5 g/l de KNO₃ et des bactéries faiblement nitrito-tolérantes dont la croissance est faible ou nulle au-delà de 3 g/l.

Les bactéries dénitrifiantes thermophiles sont relativement nombreuses dans certains sols de rizière. La numération en présence de nitrite donne des valeurs plus élevées que la numération en présence de nitrate. Toutes les souches croissent en présence de nitrite à concentration élevée. Ces bactéries thermophiles sont toutes sporulées et appartiennent au genre *Bacillus* ; leur étude détaillée est en cours, mais le groupe apparaît déjà très hétérogène. Il semble en être de même pour les bactéries mésophiles sporulées. Enfin, parmi les bactéries non sporulées, moins nombreuses, figurent sans doute des espèces appartenant au genre *Pseudomonas*.

Ces bactéries nitrito-tolérantes qui se trouvent en grand nombre dans les sols de rizière, doivent jouer un rôle dans le processus de la dénitrification. Il est rare de déceler des nitrites dans ces sols dans lesquels, pourtant, le nombre de bactéries nitrate-réductrices produisant NO₂⁻ est extrêmement élevé. Ces bactéries pourraient jouer un rôle effectif dans la réduction dissimilatrice du nitrate, les bactéries nitrito-tolérantes prenant le relais pour réduire le nitrite en gaz, au fur et à mesure de sa formation.

RÉSUMÉ

Des numérations de bactéries dénitrifiantes mésophiles et thermophiles ont été effectuées dans des sols de rizière du Sénégal à l'aide de nitrate ou de nitrite à concentration élevée (5 g/l) comme substrat respiratoire. Elles ont révélé l'existence de deux populations de bactéries.

1) On observe une population de bactéries dénitrifiantes mésophiles, tolérant des concentrations élevées de nitrite. Ces organismes sont en majorité sporulés et relativement nombreux dans ces sols. Des études de croissance ont démontré leur grande diversité : *a)* des bactéries « nitrito-dépendantes » incapables de réduire NO_2^- ; *b)* des bactéries fortement nitrito-tolérantes, qui présentent une croissance rapide en présence de 5 g/l de KNO_2 ; *c)* des bactéries faiblement nitrito-tolérantes dont la croissance est faible ou nulle au-delà de 3 g/l de KNO_2 ; *d)* des bactéries NO-tolérantes, utilisant pour leur croissance l'oxyde nitrique comme substrat respiratoire ; *e)* des bactéries N_2O -déficientes, incapables de croître en présence de N_2O .

2) On observe, de plus, une population de bactéries dénitrifiantes thermophiles sporulées, nombreuses dans certains sols, et qui tolèrent plus ou moins bien le nitrite.

Des mesures de l'activité dénitrifiante de cellules lavées ont montré qu'en général les cellules issues d'une culture anaérobie sur nitrite ont une activité nettement plus grande que celle des cellules issues d'une culture anaérobie avec nitrate. Cette population nitrito-tolérante semble assez hétérogène, mais elle comprend principalement des espèces sporulées appartenant au genre *Bacillus*.

MOTS-CLÉS : Dénitrification, Sol, Nitrite ; Mésophilie, Thermophilie, *Bacillus* ; Rizière, Sénégal.

REMERCIEMENTS

L'auteur exprime ses remerciements à MM M. Mouraret et F. Pichinoty pour leurs conseils ainsi qu'à MM J. Bakhoum et C. Barrier pour leur assistance technique.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BOLLAG, J. M., ORCUTT, M. L. & BOLLAG, B., Denitrification by isolated soil bacteria under various environmental conditions. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 1970, **34**, 875-879.
- [2] BOVELL, C., The effect of sodium nitrite on the growth of *Micrococcus denitrificans*. *Arch. Microbiol.*, 1967, **59**, 13-19.
- [3] CHATELAIN, R., Réduction du nitrite par *Alcaligenes odorans* var. *viridans*. *Ann. Inst. Pasteur* 1969, **116**, 498-500.

- [4] DOWNEY, R. J., Nitrate reductase and respiratory adaptation in *Bacillus stearothermophilus*. *J. Bact.*, 1966, **91**, 634-641.
- [5] 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.
- [6] GARCIA, J.-L., Évaluation de la dénitrification dans les rizières par la méthode de réduction de N₂O. *Soil biol. Biochem.*, 1975, **7**, 251-256.
- [7] GARCIA, J.-L., RAIMBAULT, M., JACQ, V., RINAUDO, G. & ROGER, P., Activités microbiennes dans les sols de rizières du Sénégal : relations avec les propriétés physicochimiques et influence de la rhizosphère. *Rev. Ecol. biol. Sol*, 1974, **11**, 169-185.
- [8] GAWEL, L. J., The respiration characteristics of Ocean Bay sediments and selected marine isolates. Doct. Thesis Oregon State Univ., Corvallis.
- [9] PAYNE, W. J., Reduction of nitrogenous oxides by microorganisms. *Bact. Rev.*, 1973, **37**, 409-452.
- [10] PICHINOTY, F., BIGLIARDI-ROUVIER, J., MANDEL, M., GREENWAY, B., METENIER, G. & GARCIA, J.-L., The isolation and properties of a denitrifying bacterium of the genus *Flavobacterium*. *Antonie v. Leeuwenhoek*, 1976, **42**, 349-354.
- [11] PICHINOTY, F., de BARJAC, H., MANDEL, M., GREENWAY, B. & GARCIA, J.-L., Une nouvelle bactérie sporulée, dénitrifiante, mésophile : *Bacillus azotiformans* n. sp. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 1976, **127 B**, 351-361.
- [12] STANIER, R. Y., PALLERONI, N. J. & DOUDOROFF, M., The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. *J. gen. Microbiol.*, 1966, **43**, 159-171.
- [13] VANGNAI, S. & KLEIN, D. A., A study of nitrite-dependent dissimilatory micro-organisms isolated from Oregon soils. *Soil biol. Biochem.*, 1974, **6**, 335-339.
- [14] YOUATT, J. B., Denitrification of nitrite by a species of *Achromobacter*. *Nature (Lond.)*, 1954, **173**, 826-827.

2 - Etude systématique de souches pures isolées

a - Bactéries mésophiles

Quinze souches pures choisies parmi une quarantaine d'isollements ont été étudiées en collaboration avec Pichinoty. Les cultures d'enrichissement ont été faites en anaérobiose, en milieu complexe peptoné (Biotrypcase) contenant 0,5 pour cent de KNO_2 , sans pasteurisation préalable (article 14).

Ces bactéries se présentent sous la forme de bâtonnets, à gram variable, immobiles ou faiblement mobiles avec le plus souvent quelques flagelles latéraux. Les spores sont elliptiques et déformantes. Ces organismes appartiennent donc au groupe II du genre Bacillus.

Les quinze souches dénitrifient NO_3^- et NO_2^- , donnent une réaction positive au test à l'oxydase, ont un cytochrome c, la catalase, l'alanine-deshydrogénase, la nitrite-réductase respiratoire et une nitrate-réductase d'un type particulier qui n'utilise pas le chlorate comme substrat et qui n'est pas non plus inhibée par ce composé (fig.1). L'une d'entre elles possède cependant l'enzyme A. Aucune d'elles ne croît à 45° et n'utilise le tétrathionate ou le fumarate comme accepteur d'électrons. Cependant ce groupe comporte de nombreux caractères variables. La tolérance à l'égard du nitrite peut atteindre 35 g par l de KNO_2 . Neuf souches font fermenter plus ou moins vigoureusement le glucose. Trois souches sont incapables de croître, en anaérobiose, en présence de N_2O . Huit souches croissent sous une atmosphère contenant 10 % de NO et 90 % de N_2 . Trois souches produisent un pigment brun sur tyrosine et aucune ne produit du poly- β -hydroxybutyrate.

La moyenne du G+C % de leur ADN est de $40,5 \pm 0,9$. Ces bactéries diffèrent nettement de B.azotoformans (15) et de B.brevis.

Comme nous l'avons vu précédemment (article 14), ces organismes présentent une activité dénitrifiante plus élevée lorsqu'ils

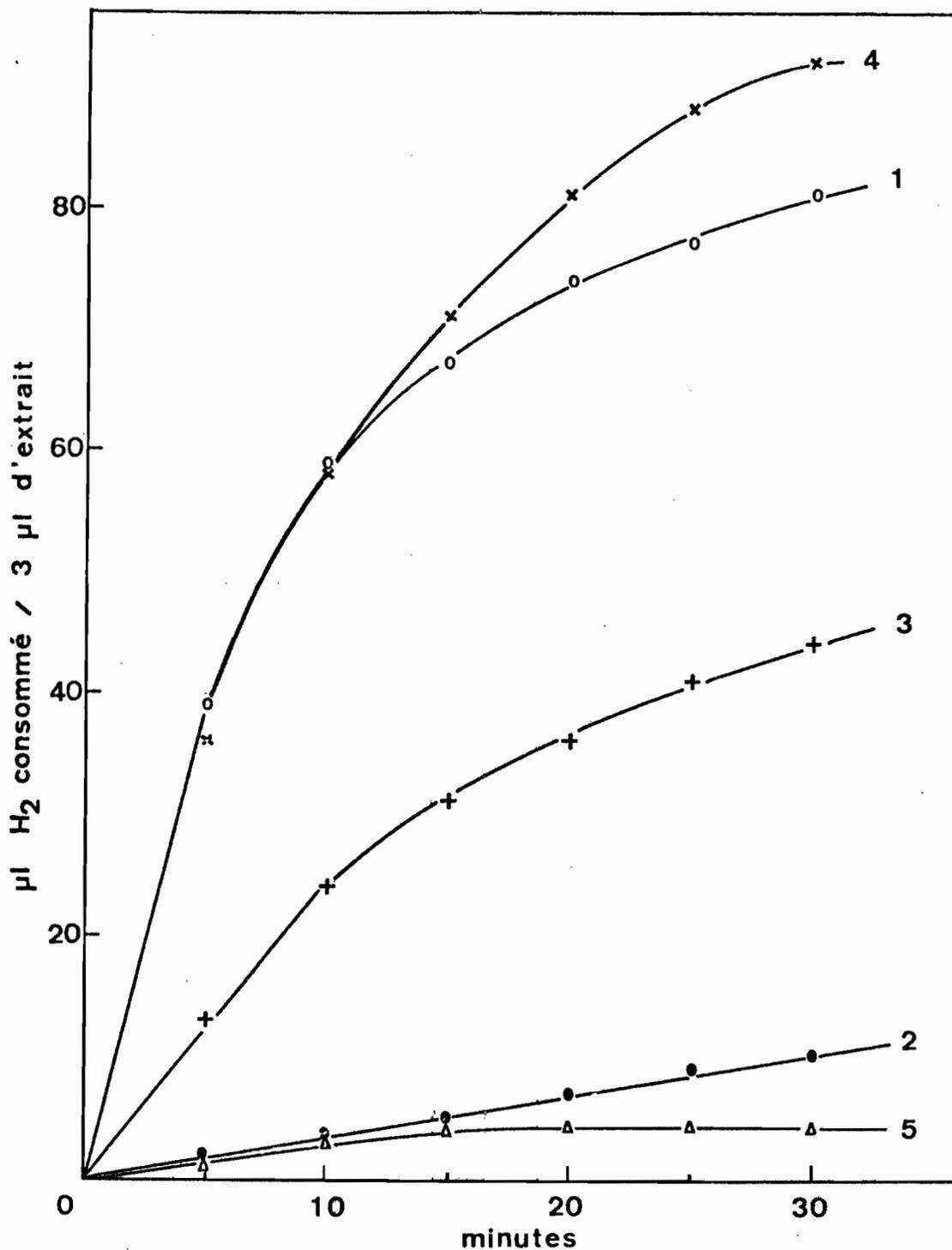


Fig.1 - Recherche de la nitrate-réductase dans un extrait provenant d'une culture anaérobie avec nitrate de la souche OnG1 suivant la méthode de Pichinoty et Piéchaud (1968). 1- NO_3^- ; 2- ClO_3^- ; 3- $\text{NO}_3^- + \text{ClO}_3^-$; 4- $\text{NO}_3^- + \text{ClO}_3^-$ incubé 30 min avec l'extrait ; 5- $\text{ClO}_3^- + \text{azoture}$.

proviennent d'une culture anaérobie avec nitrite (5 g/l) que lorsqu'ils proviennent d'une culture anaérobie avec nitrate. La croissance en présence de nitrate, rapportée au mg d'azote (dosé par micro-Kjeldhal) par ml est cependant généralement plus importante qu'en présence de nitrite (tableaux I et II).

En utilisant l'acétylène pour inhiber la réduction de N_2O en N_2 , nous avons pu montrer avec une suspension cellulaire provenant d'une culture anaérobie en présence de nitrate pour l'une des souches (OnG₁) que l'oxyde nitreux est un composé intermédiaire dans la réduction du nitrate, du nitrite et de l'oxyde nitrique en N_2 (fig.2).

b - Bactéries thermophiles

Comme nous l'avons vu précédemment (article 14), 45 souches dénitrifiantes thermophiles ont été isolées dans des sols de rizière du Sénégal conservés à l'état sec, en milieu complexe contenant du nitrate ou du nitrite (5 g/l). Des analyses effectuées au chromatographe après 24 et 48 h de croissance anaérobie en milieu liquide complexe, en présence de nitrate ou nitrite à 5 p.mille, montrent que toutes les souches isolées sur nitrite sont capables de réduire NO_3^- en N_2O et N_2 mais beaucoup moins vigoureusement que NO_2^- . Réciproquement, toutes les souches isolées sur nitrate sont capables de croître en anaérobiose sur nitrite à 5 p.mille.

Une série de tests biochimiques appliqués à l'ensemble des souches a permis d'aboutir à des résultats qui ne concordent pas avec la classification de l'espèce B.stearothermophilus de Wolf et Barker (1968). En effet, ces auteurs ont scindé l'espèce en trois groupes : les bactéries du groupe 1 croissent sur NaCl à 3 %; les bactéries du groupe 2 réduisent le nitrate et le nitrite en gaz (B.thermodenitrificans); les bactéries du groupe 3 produisent de l'acide en anaérobiose à partir du lactose. Or, parmi nos 45 souches qui devraient appartenir au groupe 2 des dénitrifiantes, 31 sont capables de croître sur NaCl à 3 % et 5 produisent de l'acide en anaé-

Tableau I - Dénitrification des composés oxygénés minéraux de l'azote par les suspensions cellulaires des souches nitrito-tolérantes. Les activités sont exprimées en μ l de gaz produit par mg d'azote et par heure.

souche	culture anaérobie avec	croissance mg N/ml	gaz produit	substrat respiratoire			
				NO_3^-	NO_2^-	NO	N_2O
nG ₁	NO_3^-	6,75	N_2O N_2	0 74	0 159	0 48	352
	NO_2^-	4,44	N_2O N_2	0 55	0 445	0 153	770
nG ₂	NO_3^-	3,40	N_2O N_2	0 194	0 181	0 232	1493
	NO_2^-	7,80	N_2O N_2	0 676	0 772	0 223	1952
AnG	NO_3^-	4,43	N_2O N_2	0 146	0 291	0 174	2287
	NO_2^-	3,95	N_2O N_2	242 342	251 519	0 445	2626
InS ₁	NO_3^-	3,81	N_2O N_2	0 158	0 328	0 109	792
	NO_2^-	3,49	N_2O N_2	0 279	0 282	0 173	1404
LSn	NO_3^-	4,20	N_2O N_2	0 73	0 108	0 171	604
	NO_2^-	4,87	N_2O N_2	0 528	0 1041	0 205	2416

Tableau II - Dénitrification des composés oxygénés minéraux de l'azote par les suspensions cellulaires des souches nitrito-tolérantes . Les activités sont exprimées en μ l de gaz produit par mg d'azote et par heure.

Souche	culture anaérobie avec	croissance mg N/ml	gaz produit	substrat respiratoire			
				NO_3^-	NO_2^-	NO	N_2O
MBnG	NO_3^-	8,35	N_2O N_2	25 34	49 0	35 22	40
	NO_2^-	5,04	N_2O N_2	0 78	0 73	157 19	191
XnA	NO_3^-	11,50	N_2O N_2	717 537	505 603	22 198	196
	NO_2^-	2,43	N_2O N_2	0 606	184 1018	0 646	2188
RTnA	NO_3^-	11,00	N_2O N_2	164 605	226 389	20 130	89
	NO_2^-	5,37	N_2O N_2	213 226	249 783	0 213	1788
3BRn	NO_3^-	5,00	N_2O N_2	0 70	0 92	0 144	1198
	NO_2^-	4,64	N_2O N_2	0 493	0 1030	0 230	2351
3OnA	NO_3^-	6,23	N_2O N_2	0 74	0 61	0 135	1226
	NO_2^-	7,67	N_2O N_2	0 311	0 490	0 160	1482

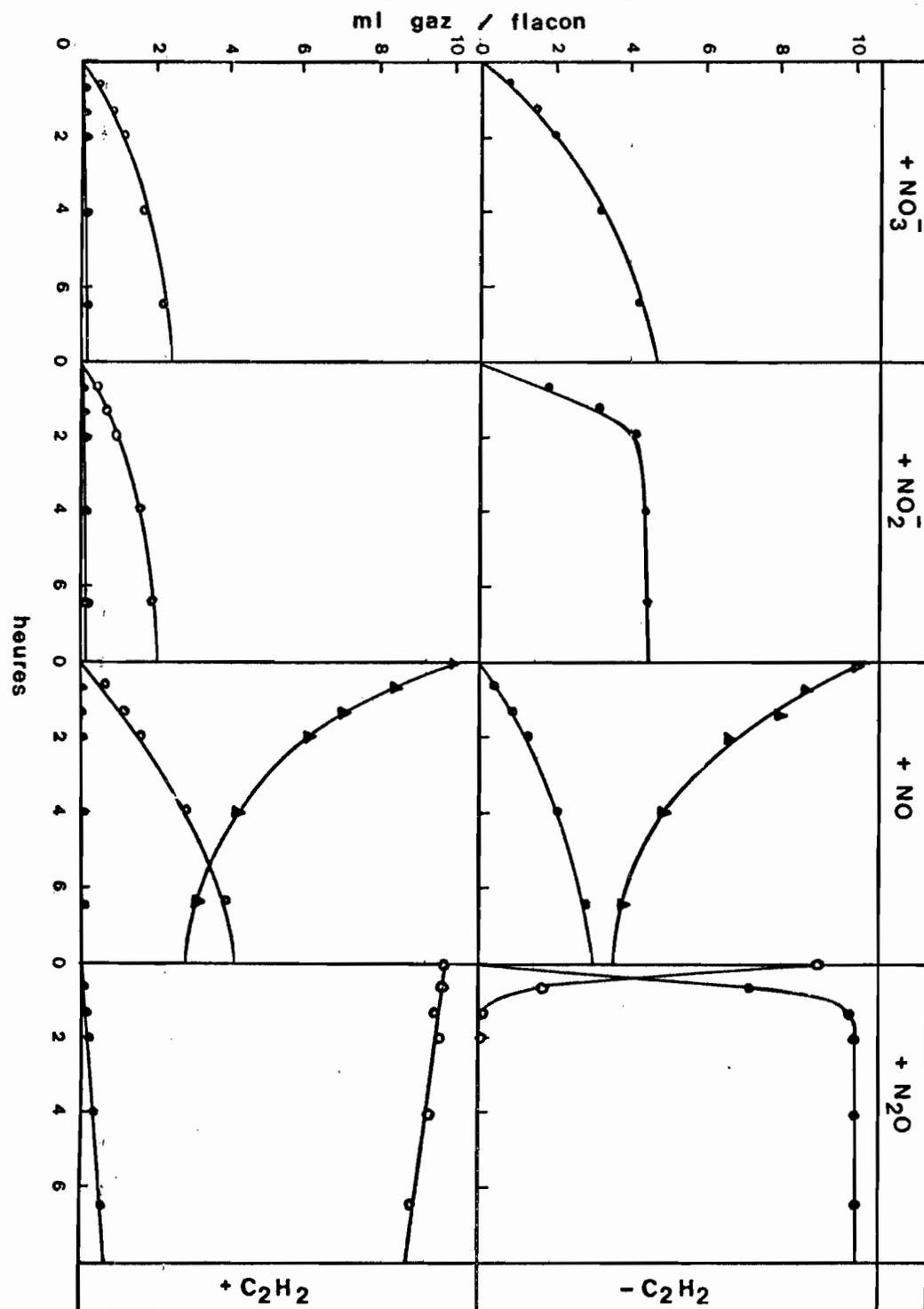


Fig.2 - Influence de l'acétylène sur l'accumulation des composés gazeux pendant la dénitrification des composés oxygénés minéraux de l'azote par une suspension cellulaire de la souche OnG1 provenant d'une croissance anaérobie avec nitrate, mesurée par chromatographie en phase gazeuse (c.f. article 14).

●—● N₂ ; ○—○ N₂O ; ▲—▲ NO .

robiose à partir du lactose.

D'autre part, selon De Barjac et Bonnefoi (1972), B. stearothermophilus ne pousserait pas sur gélose à pH 6 et serait incapable de produire de l'acétyl méthyl carbinol. Or absolument toutes nos souches ont poussé sur gélose nutritive à pH 6; d'autre part, 4 souches ont produit de l'A.M.C. Toutes les souches sont indole-négatives et donnent une réaction positive au test à l'oxydase. Ceci nous conduit à proposer une classification provisoire (tableau III) en attendant les résultats d'une analyse plus complète effectuée actuellement par De Barjac à l'Institut Pasteur de Paris.

D - ETUDE DE LA DENITRIFICATION CHEZ DIVERS ORGANISMES

L'aptitude à dénitrifier est un caractère multienzymatique qui a une signification taxonomique importante et que présentent seulement une vingtaine d'espèces anaérobies facultatives connues, pour la plupart non sporulées et à gram négatif. Les bactéries dénitrifiantes chimio-organotrophes appartiennent principalement aux genres Pseudomonas, Alcaligenes, Paracoccus et Bacillus. Dans le passé, les bactéries dénitrifiantes avaient toujours été isolées du sol par culture d'enrichissement, en anaérobiose, dans un milieu minimal ou complexe contenant KNO_3 . Durant ces trois dernières années nous avons réalisé, avec Pichinoty, de nombreuses cultures d'enrichissement en présence de N_2O . L'emploi de l'oxyde nitreux à la place du nitrate présente divers avantages. Ce gaz existe à l'état pur dans le commerce; il est totalement dépourvu de toxicité et très soluble dans l'eau. On évite ainsi l'accumulation transitoire de nitrite qui est toxique pour certains germes. Les bactéries dénitrifiantes dites nitrito-dépendantes sont dépourvues de nitrate-réductase et ne peuvent être isolées en présence de nitrate. L'emploi de N_2O nous a ainsi permis d'isoler plusieurs espèces bactériennes nouvelles ou mal connues. Mon travail a porté principalement sur l'étude de la dénitrification chez ces organismes.

Tableau III - Classification des souches dénitrifiantes thermophiles isolées dans les sols de rizière du Sénégal.

Croissance sur NaCl 3 %							
positive				négative			
Production anaérobie d'acide sur lactose							
positive		négative			positive		négative
A-,G-	A+,G-	A-,G-	A+,G-	A-,G+	A+,G+	A-,G-	A+,G-
TnO ₁ TnS TnR ₁ TnCSS ₂	TnRT ₂	TMP TBE TCSS TB ₂ TnKA ₁ TnMP TnBA ₂ TnK ₁ TnK ₂ TnB ₂ TnCSS ₁ TnL	TL TB ₁ TK TnT ₁ TnMB ₂ TnR ₂	TnO ₂ TnB ₁ TnRT ₁ TnD	TnKE	TS TRT TO TnT ₂ TnT ₃ TnBA ₁ TnBE ₁ TD ₂	TT TD ₁ TR TX

A = hydrolyse de l'amidon

G = hydrolyse de la gélatine

T = souche thermophile isolée sur nitrate

Tn = souche thermophile isolée sur nitrite

1 - Bacillus

Les auteurs spécialisés admettaient jusqu'à présent la participation importante d'organismes du genre Bacillus dans le processus de dénitrification sans toutefois apporter de précision sur leur identité. Nous avons pu démontrer effectivement cette importance dans les sols de rizière du Sénégal en isolant toute une série de nouvelles souches. Pichinoty, de son côté, a pu isoler à partir de différents échantillons de sols préalablement pasteurisés, de la région provençale, 17 souches d'une nouvelle bactérie sporulée mésophile qu'il a dénommée B.azotoformans (15). L'organisme se présente sous la forme de bâtonnets à gram négatif, mobiles, à spore elliptique et déformante; il exige de nombreux facteurs de croissance, ne fait pas fermenter le glucose et ne croît, en anaérobiose, qu'en présence de NO_3^- , NO_2^- , N_2O , $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$ ou fumarate. Le nitrate, le nitrite et l'oxyde nitreux sont réduits en N_2 (tableau IV). La teneur en guanine + cytosine de l'ADN est proche de 39 %.

B.licheniformis est l'une des bactéries dénitrifiantes les plus anciennement connues. Elle est gram-positif et présente des spores ovales non déformantes. Nous avons réévalué avec Pichinoty, le pouvoir dénitrifiant de cet organisme par l'emploi de techniques modernes telles que la chromatographie en phase gazeuse et la recherche des enzymes dans les extraits. Au total 15 souches ont été examinées; deux d'entre elles avaient été récemment isolées du sol (16). Les 15 souches croissent, en anaérobiose, dans un milieu peptoné contenant NO_3^- , mais ne croissent pas dans les mêmes conditions si l'on remplace le nitrate par du nitrite ou par N_2O . Les suspensions cellulaires issues de cultures anaérobies contenant NO_3^- réduisent rapidement NO en N_2O , mais ne réduisent pas (ou réduisent très lentement) N_2O en N_2 . La production de N_2O et N_2 à partir de NO_3^- ou NO_2^- est nulle ou négligeable (tableau V). Les extraits de cellules induites contiennent la nitrate-réductase A à un niveau élevé; mais leur activité nitrite-réductase, mesurée en présence de tétraméthyl-p-phénylène-diamine comme donneuse d'électrons, est nulle ou négligeable.

Tableau IV - Dénitrification des composés oxygénés minéraux de l'azote par les suspensions cellulaires de deux souches de Bacillus azotoformans .

culture anaérobie avec	accepteur d'électrons	souche	Production µl gaz/h/mg N			Réduction µl gaz/h/mg N	
			NO	N ₂ O	N ₂	NO	N ₂ O
NO ₃ ⁻	NO ₃ ⁻	1	0	32	26		
		2	0	180	305		160
	NO ₂ ⁻	1	6	61	0		
		2	0	356	280		365
	NO	1		95	56	209	
		2		faible	101	147	
	N ₂ O	1			5		7
		2			397		397
N ₂ O	NO ₃ ⁻	1	0	63	48		
		2	0	0	99		
	NO ₂ ⁻	1	74	82	40		
		2	52	3,5	99		
	NO	1		81	59	289	
		2		faible	99	313	
	N ₂ O	1			732		737
		2			1990		1995

Tableau V - Dénitrification du nitrate, du nitrite, de l'oxyde nitrique et de l'oxyde nitreux par les suspensions cellulaires de 12 souches de Bacillus licheniformis cultivées en anaérobiose avec NO_3^- . Les activités maximales sont exprimées en μl de gaz (22° , pression atmosphérique) produit ou consommé par mg d'azote (dosé par micro-Kjeldhal) et par heure.

	Accepteur d'électrons				
	NO_3^-	NO_2^-	NO	N_2O	
	Vitesse de réduction ou de production du gaz				
Souches	N_2O produit	N_2O produit	NO réduit	N_2O produit	N_2O réduit
5272	11	8	218	108	4
53172	0	3,7	411	118	8
2	10	13	361	149	12
3	0	1	147	46	6
4	0	1,2	83	25	9
5	15	18	371	148	7
6	0	1,4	76	29	6
7	0	1	45	6	18
8	2,7	4,5	132	62	0
9	0,6	2,5	122	44	3
10	0	0	192	40	32
11	0	4,7	324	105	0

Après 8 jours d'incubation à 32° ou 40°, on observe fréquemment un dégagement gazeux dans les tubes de bouillon contenant du glycérol ou du glucose et NO_3^- , munis d'une clochette renversée. Le gaz produit est probablement de l'azote puisqu'il n'est pas absorbé par KOH. Cette dénitrification avait déjà été signalée par Verhoeven en 1952. Son mécanisme demeure incognu. Une réaction chimique de type Van Slyke entre l'acide nitreux et les groupes $-\text{NH}_2$ des acides aminés paraît peu probable puisqu'elle exigerait un pH acide. Or, au contraire, le milieu s'alcalinise au cours de la croissance.

2 - Pseudomonas

De nombreuses espèces de ce genre dénitrifient : P.aeruginosa, P.fluorescens (biotypes B, C, D et F), P.pseudomallei, P.mallei (Stanier et coll., 1966), P.stutzeri-P.stanieri, P.mendocina, P.caryophylli (Palleroni et coll., 1970), P.solanacearum (biotypes 3 et 4) (Hayward, 1964), P.perfectomarinus (Rhodes et coll., 1963), P.nautica (Baumann et coll., 1972).

a - Une étude de 14 souches de P.stutzeri isolées à partir de divers types de sols, a confirmé la variabilité remarquable bien connue des bactéries appartenant à ce groupe (17). Toutes ces souches ont la nitrate-réductase A et la nitrite-réductase respiratoire. La dénitrification des composés oxygénés minéraux de l'azote a été étudiée quantitativement avec des suspensions cellulaires non proliférantes de deux souches. Les activités spécifiques figurent dans le tableau VI. Les cellules issues de cultures anaérobies contenant NO_3^- , réduisent NO_3^- , NO_2^- et NO en N_2O et N_2 ; elles réduisent lentement N_2O en N_2 . Les cellules issues de cultures anaérobies sous N_2O réduisent aussi NO_3^- , NO_2^- et NO en N_2O et N_2 mais elles réduisent rapidement N_2O en N_2 . Il semble donc que l'oxyde nitreux-réductase soit induite à un taux maximal seulement lorsque la croissance a lieu en présence de N_2O .

Tableau VI - Dénitrification des composés oxygénés minéraux de l'azote par les suspensions cellulaires de deux souches de Pseudomonas stutzeri.

culture anaérobie avec	accepteur d'électrons	souches	Production μl gaz/h/mg N			Réduction μl gaz/h/mg N	
			NO	N ₂ O	N ₂	NO	N ₂ O
NO ₃ ⁻	NO ₃ ⁻	1	0	19	13		
		2	0	37,5	24,5		
	NO ₂ ⁻	1	0	3,5	0,5		
		2	0	37,5	8,5		
	NO	1		13	7	31	
		2		29	20	83	
	N ₂ O	1			4		2
		2			33		29
N ₂ O	NO ₃ ⁻	1	0	27	111		
		2	0	7	90		
	NO ₂ ⁻	1	0	14	66		
		2	0	6	77		
	NO	1		10,5	17	57	
		2		19	faible	32,5	
	N ₂ O	1			443,5		422
		2			1107		1122

b - Une bactérie apparentée à P.lemoignei a été isolée par Pichinoty à partir d'un sol anoxique dans un milieu minimal contenant du succinate (18). Elle se présente sous la forme de petits bâtonnets légèrement incurvés, à gram négatif, non sporulés et immobiles. Cependant des clones mobiles possédant un seul flagelle polaire ont pu être isolés à partir du parent immobile. L'organisme croît seulement en présence de l'un des accepteurs d'électrons suivants : NO_3^- , NO_2^- , N_2O , $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$ et O_2 . Il n'exige aucun facteur de croissance, est chimio-organotrophe et utilise seulement quelques alcools et acides organiques comme source de carbone et d'énergie. L'ADN contient 62,2 % de G+C. La bactérie réduit le nitrate et le nitrite avec une faible production de gaz mais dénitrifie vigoureusement l'oxyde nitrique (tableau VII). Elle appartient au genre Pseudomonas et est apparentée à P.lemoignei ; mais elle se différencie de cette espèce par plusieurs caractères importants, dont le pouvoir dénitrifiant et un G+C % nettement plus élevé. Il s'agit probablement d'une espèce nouvelle. Malheureusement nous n'avons jamais réussi à la réisoler.

c - Une bactérie dénitrifiante apparentée à P.pickettii a été isolée du sol d'une rizière de la vallée du Fleuve Sénégal par enrichissement dans un milieu minimal contenant du succinate (19). Les cellules se présentent sous la forme de petits bâtonnets à gram négatif, non sporulés, mobiles par les moyens d'un ou deux flagelles polaires. Elles produisent un bactériophage. Leur métabolisme est obligatoirement respiratoire et elles croissent en présence de NO_3^- , NO_2^- , N_2O ou O_2 . L'organisme n'exige aucun facteur de croissance, est chimio-organotrophe et peut utiliser dans les conditions aérobies comme source de carbone et d'énergie 80 substrats différents. La nitrate-réductase B et la nitrite-réductase respiratoire sont présentes. Les suspensions cellulaires issues de cultures anaérobies avec nitrate ou N_2O réduisent NO_3^- , NO_2^- et NO en N_2O et N_2 (tableau VIII). L'ADN contient 64,3 % de G+C. L'organisme s'apparente à P.pickettii mais s'en différencie par 16 caractères distincts. Ce dernier organisme n'a été isolé qu'à partir de spécimens cliniques.

Tableau VII - Dénitrification des composés oxygénés minéraux de l'azote par les suspensions cellulaires de la souche apparentée à Pseudomonas lemoignei et provenant d'une culture anaérobie en présence de N_2O .

accepteur d'électrons	Production $\mu\text{l gaz/h/mg N}$			Réduction $\mu\text{l gaz/h/mg N}$	
	NO	N_2O	N_2	NO	N_2O
NO_3^-	0	0,1	0,1		
NO_2^-	0	0,1	0,8		
NO		0,04	0,75	0,75	
N_2O			20		20

Tableau VIII- Dénitrification des composés oxygénés minéraux de l'azote par les suspensions cellulaires de la souche apparentée à Pseudomonas pickettii .

culture anaérobie avec	accepteur d'électrons	Production $\mu\text{l gaz/h/mg N}$			Réduction $\mu\text{l gaz/h/mg N}$	
		NO	N_2O	N_2	NO	N_2O
NO_3^-	NO_3^-	0	154	168		
	NO_2^-	0	144	135		
	NO		99	36	290	
	N_2O			15		12
N_2O	NO_3^-	0	21	41		
	NO_2^-	17,5	81	204		
	NO		27	faible	56	
	N_2O			86		87

3 - Alcaligenes

Le genre Alcaligenes regroupe toutes les bactéries qui se présentent sous la forme de petits bâtonnets, à gram négatif, non sporulés, mobiles par les moyens de flagelles péritriches, qui n'ont pas d'activité fermentaire et dont le G+C % de l'ADN est compris entre 58 et 70. Au mode de flagellation près, cette définition est celle du genre Pseudomonas. Nous avons étudié la dénitrification chez une bactérie isolée par Pichinoty d'une terre de jardin par culture d'enrichissement dans un milieu minimal liquide contenant du L-malate de sodium (20). La nitrate-réductase A et la nitrite-réductase respiratoire sont présentes. Les suspensions cellulaires provenant de cultures anaérobies en milieu complexe contenant NO_3^- ou N_2O , réduisent NO_3^- et NO_2^- en N_2O et N_2 sans accumuler NO ; elles produisent aussi N_2O à partir de NO et réduisent quantitativement N_2O en N_2 (Tableau IX). La teneur en G+C de l'ADN est de 66 %.

4 - Flavobacterium

Cette bactérie a été isolée du sol par Pichinoty par culture d'enrichissement dans un milieu contenant de l'extrait de levure (21). Les cellules sont de petits bâtonnets, à gram négatif, non sporulés et non mobiles. Les colonies prennent une coloration jaune vif après exposition prolongée à la lumière; cette coloration est due à la production d'un pigment caroténoïde. L'organisme ne présente pas d'activité fermentaire et croît en présence de NO_2^- , N_2O ou O_2 . Il ne réduit pas le nitrate; il s'agit donc d'une bactérie dénitrifiante nitrito-dépendante (tableau X). Elle n'exige aucun facteur de croissance, est chimio-organotrophe et utilise seulement des hydrates de carbone comme source de carbone et d'énergie. L'ADN contient 40,8 % de G+C. Bien qu'il présente les caractères physiologiques d'une pseudomonade, cet organisme a été placé dans le genre Flavobacterium en raison de sa pigmentation et de sa faible teneur en G+C.

Tableau IX - Dénitrification des composés oxygénés minéraux de l'azote par les suspensions cellulaires de la souche de Alcaligenes denitrificans .

culture anaérobie avec	accepteur d'électrons	Production $\mu\text{l gaz/h/mg N}$			Réduction $\mu\text{l gaz/h/mg N}$	
		NO	N_2O	N_2	NO	N_2O
NO_3^-	NO_3^-	0	119	43		
	NO_2^-	0	118	9		
	NO		158	14	257	
	N_2O			11		12
N_2O	NO_3^-	0	73	24		
	NO_2^-	0	46	40		
	NO		88	4	86	
	N_2O			14		14

Tableau X - Dénitrification des composés oxygénés minéraux de l'azote par les suspensions cellulaires de la souche appartenant au genre Flavobacterium et provenant d'une culture anaérobie en présence de N_2O .

accepteur d'électrons	Production $\mu\text{l gaz/h/mg N}$			Réduction $\mu\text{l gaz/h/mg N}$	
	NO	N_2O	N_2	NO	N_2O
NO_3^-	0	0	0		
NO_2^-	1	faible	0,75		
NO		faible	0,60	0,60	
N_2O			30		30

5 - Agrobacterium

Quatre souches dénitrifiantes appartenant aux espèces A. radiobacter et A. tumefaciens, isolées du sol ou provenant de collections ont été étudiées (22). Les organismes se présentent sous la forme de petits bâtonnets, à gram négatif, dépourvus de capsule, non sporulés, se multipliant par scissiparité. Certains sont mobiles par les moyens de flagelles péritriches peu nombreux, d'autres sont immobiles. Ces souches sont chimio-organotrophes et n'exigent aucun facteur de croissance. Leur métabolisme est toujours respiratoire. Deux souches utilisent, en anaérobiose, le nitrate, le nitrite et l'oxyde nitreux comme accepteurs d'électrons. Les deux autres souches croissent, en anaérobiose, en présence de NO_3^- ou de NO_2^- , mais n'utilisent pas N_2O . La nitrate-réductase de type B est seule présente. Les suspensions cellulaires issues de cultures anaérobies contenant NO_3^- , réduisent NO_3^- , NO_2^- et NO en N_2 et N_2O . Elles réduisent aussi N_2O en N_2 pour deux d'entre elles (tableau XI). Les teneurs en G+C de l'ADN restent comprises entre 58 et 59,2 %. Le travail de Pichinoty confirme les conclusions des autres auteurs : A. radiobacter ne peut pas être distingué biochimiquement de A. tumefaciens ; la seconde espèce peut être considérée comme une variété pathogène de la première.

6 - Paracoccus

Six souches de P. denitrificans provenant d'une collection ou isolées du sol par culture d'enrichissement ont été étudiées (23). Elles se présentent sous la forme de cocci, non sporulés, à gram négatif mais forment cependant des bâtonnets dans les cultures jeunes. Elles sont prototrophes, chimio-organotrophes, méthylotrophes et chimio-lithotrophes; elles sont, en effet, capables de croître en milieu minéral sous une atmosphère contenant H_2 , N_2O (ou O_2) et CO_2 . Elles croissent également, en anaérobiose, en présence de NO_3^- , NO_2^- ou N_2O . Elles synthétisent la nitrate-réductase respiratoire A. Les cellules issues de cultures anaérobies contenant NO_3^- ou N_2O , rédui-

Tableau XI - Dénitrification des composés oxygénés minéraux de l'azote par les suspensions cellulaires de la souche d'Agrobacterium radiobacter provenant d'une culture anaérobie en présence de nitrate.

accepteur d'électrons	Production $\mu\text{l gaz/h/mg N}$			Réduction $\mu\text{l gaz/h/mg N}$	
	NO	N_2O	N_2	NO	N_2O
NO_3^-	0	61	90		
NO_2^-	0	592	25		
NO		97	47	283	
N_2O			25		26

sent NO_3^- en N_2 , NO_2^- en N_2O et N_2 , NO en N_2O et N_2 et N_2O en N_2 . L'oxyde nitreux est également produit à partir de NO_3^- , mais il est rapidement réduit en N_2 . L'activité oxyde nitreux-réductase des deux suspensions est particulièrement élevée (tableau XII).

La teneur en G+C de l'ADN a une valeur moyenne de $66,2 \pm 1,5 \%$. Actuellement, le genre Micrococcus auquel était autrefois rattachée l'espèce étudiée, comprend uniquement des espèces à gram positif (Baird-Parker, 1965). En outre, l'espèce P.denitrificans ne peut être rattachée aux cocci aérobies à gram négatif du genre Nesseria, en raison de sa nutrition, de sa physiologie et de la composition en bases de son ADN. C'est la raison pour laquelle a été créé le nouveau genre Paracoccus (Davis et coll., 1969). Il apparaît clairement que les genres Paracoccus, Pseudomonas et Alcaligenes présentent entre eux d'étroits liens de parenté (Doudoroff, 1974).

Tableau XII - Dénitrification des composés oxygénés minéraux de l'azote par les suspensions cellulaires d'une souche de Paracoccus denitrificans :

culture anaérobie avec	accepteur d'électrons	Production $\mu\text{l gaz/h/mg N}$			Réduction $\mu\text{l gaz/h/mg N}$	
		NO	N_2O	N_2	NO	N_2O
NO_3^-	NO_3^-	0	0	240		
	NO_2^-	0	310	190		635
	NO		15	155	233	20
	N_2O			734		815
N_2O	NO_3^-	0	faible	421		
	NO_2^-	0	24	79		
	NO		13	42	104	
	N_2O			842		886

C O N C L U S I O N S

L'étude de la dénitrification dans les sols de rizière du Sénégal nous a permis de revoir et confirmer certains résultats antérieurs obtenus dans divers sols tempérés ou tropicaux . La mise au point d'une méthode originale d'estimation du processus nous a servi à contrôler les connaissances actuelles et à préciser l'effet rhizosphère du riz sur le phénomène; mais c'est sans conteste l'étude microbiologique qui s'est révélée la plus fertile puisqu'elle a démontré l'existence d'une population de bactéries mésophiles et thermophiles appartenant au genre Bacillus , tolérant des concentrations élevées de nitrite et dont certains représentants peuvent croître en présence d'oxyde nitrique.

L'étude de l'influence des facteurs physico-chimiques sur le processus de dénitrification dans les sols de rizière a tout d'abord confirmé le rôle prépondérant du carbone organique : c'est le facteur majeur qui régit le phénomène quand les conditions d'anoxie sont satisfaisantes. Le pH et la quantité initiale de bactéries dénitrifiantes sont des facteurs secondaires. Les sols de rizière sont souvent des sols de delta, donc généralement plus ou moins salés et cette salinité s'est révélée être également un facteur important puisqu'elle ralentit la dénitrification en agissant essentiellement sur l'activité des bactéries dénitrifiantes dont le nombre est, en outre, en étroite relation avec le pH des sols submergés.

L'étude de la séquence des produits formés au cours de la dénitrification in vitro dans une série de sols de rizière a également permis de confirmer le rôle prépondérant du carbone organique et certaines données essentielles du phénomène; il a été, en effet, possible de montrer que le nitrite ne s'accumule pas en sol acide, que la production d'oxyde nitrique est liée à l'acidité et que l'oxyde nitreux, par contre, s'accumule en sol acide. Une étude complémentaire a permis de constater que l'accumulation de NO n'est pas toujours essentiellement chimique; le comportement particulier d'un des sols testés

en faisant varier la température d'incubation, le pH, la teneur en eau et la concentration en nitrite, semble traduire une participation de l'activité biologique dans la formation d'oxyde nitrique dans ce sol; ce gaz serait donc bien un composé intermédiaire dans la réduction du nitrate en azote.

Le fait que les vitesses de réduction de NO_3^- et N_2O ont montré une forte corrélation de rang lors de cette étude, nous a amené à étudier la réduction de l'oxyde nitreux dans les sols de rizière dans le but de mettre au point une nouvelle méthode d'estimation de la dénitrification à l'aide de la chromatographie en phase gazeuse. Les conditions d'utilisation du chromatographe ayant été fixées, les paramètres de cette méthode se sont révélés être les suivants : sol saturé d'eau incubé à 37° en anaérobiose en présence d'une quantité de N_2O entraînant une vitesse de réduction égale à la moitié de la vitesse maximale obtenue avec 10% d'oxyde nitreux dans l'atmosphère du flacon de mesure; ce choix ayant pour but d'augmenter la sensibilité de la méthode. Il était alors possible de mesurer dans le sol deux activités distinctes : une activité dénitrifiante initiale présente dans le sol au moment du prélèvement ou artificiellement induite lors d'expériences appropriées, détectée pendant les six premières heures de l'incubation et une activité dénitrifiante potentielle induite par l'introduction de N_2O pour la mesure, après la phase de latence correspondant à l'activité initiale. L'existence de ces deux activités a été confirmée par l'emploi du chloramphénicol.

L'activité liée à l'enzyme induite dans un sol saturé se maintient pendant un mois et demi à son niveau initial. Lorsque ce sol est soumis à plusieurs dessiccations suivies de réhumidifications, l'activité augmente d'abord puis diminue rapidement par suite probablement d'un épuisement des substrats carbonés libérés par les humectations et dessiccations successives. Les mesures effectuées après induction de l'activité dans le sol, mettent en évidence un accroissement important de celle-ci puis une diminution qui résulte partiellement de l'épuisement de l'oxyde nitreux au cours de l'incubation. Ces résultats montrent que l'activité mesurée après une longue période d'incubation ne représente qu'une faible fraction de l'activité réelle induite dans le sol à un moment donné par l'accumulation maximum du substrat respiratoire.

Cette méthode a pu être appliquée à des mesures au champ grâce à l'élaboration d'un matériel approprié comprenant entre autres une étuve à ventilation fonctionnant sur batteries, une rampe de gazage utilisant une pompe à vide manuelle et des tubes Vacutainer sous vide permettant le prélèvement d'échantillons gazeux analysés ultérieurement au laboratoire. La distribution des mesures effectuées dans une rizière suit une loi Normale et 10 mesures sont généralement suffisantes pour obtenir une estimation satisfaisante de la moyenne.

Cette méthode nous a tout d'abord permis d'examiner l'effet rhizosphère du riz sur l'activité dénitrifiante. Nous avons préalablement établi, à l'aide du respiromètre de Warburg, que le riz exerce un effet stimulant sur l'activité potentielle; cette stimulation, strictement localisée à la mince pellicule de sol adhérant aux racines est d'autant plus marquée que le sol est plus pauvre en carbone organique. En induisant une activité oxyde nitreux-réductase in vitro dans un sol nu ou planté en riz, dans un dispositif approprié mis au point au laboratoire, il a été possible de montrer un effet très nettement positif de la rhizosphère du riz sur la dénitrification, résultant de l'existence de zones anaérobies, de la présence d'exsudats racinaires et d'un nombre élevé de bactéries dénitrifiantes dans la rhizosphère. L'effet rhizosphère du riz sur l'activité potentielle a pu également être décelé par des mesures au champ; il est maximum dans les premiers stades de la croissance et diminue progressivement avec l'âge des plantes.

La plupart des sols de rizière du Sénégal sont des sols acides dans lesquels l'oxyde nitreux provenant de la dénitrification du nitrate s'accumule avant d'être réduit ultérieurement en N_2 . Une dénitrification dont le sol de rizière a été le siège récemment peut donc être mise en évidence par la mesure d'une activité oxyde nitreux-réductase sans toutefois pouvoir évaluer son intensité réelle. La méthode élaborée peut se révéler très utile pour tester les inhibiteurs de nitrification ou les engrais réputés libérer lentement l'azote. C'est ce que nous avons fait lors d'un apport d'urée à une culture de riz en pots. Nous avons ainsi pu confirmer que l'enfouissement de l'engrais azoté n'entraîne qu'une perte d'azote faible ou nulle,

contrairement à ce qui est observé dans le cas d'une application en surface, une partie de l'azote étant perdue dans la séquence nitrification-dénitrification. Comme ce procédé est en cours de développement en Extrême-Orient, la solution la plus avantageuse pourrait consister à enfouir, avant la submersion, et en un seul apport, un engrais retard approprié comme l'urée enrobée de soufre; son prix de revient dépasse de 30% celui des engrais conventionnels mais ces derniers doivent être apportés en plus grande quantité et en trois apports échelonnés le long de la culture du riz. On réduirait donc les frais en supprimant deux façons culturales ainsi qu'une partie de l'engrais conventionnel.

Il semblerait que dans la rhizosphère du riz, la forme des engrais ou les modalités d'application aient une incidence beaucoup moins marquée qu'en sol nu; ceci est en accord avec les observations antérieures selon lesquelles la culture du riz diminue la perte d'azote par rapport au sol nu. Ceci pourrait résulter de l'absorption de NH_4^+ par les plantes avant qu'il ne soit oxydé puis perdu par dénitrification. Si les conditions de la dénitrification dans la rhizosphère du riz sont nettement plus favorables qu'en sol nu, il semblerait donc que les pertes réelles y soient plus faibles.

En abordant l'étude microbiologique de la dénitrification, nous avons tout d'abord voulu établir la séquence des produits formés au cours du processus chez deux bactéries originales isolées dans des sols de rizière du Sénégal. Thiobacillus denitrificans RT, une bactérie chimio-lithotrophe sulfo-oxydante, semble assimiler et dissimiler le nitrate à l'aide de la nitrate-réductase A; les cellules réduisent le nitrate en N_2 et le nitrite en NO, N_2O et N_2 . Les extraits réduisent NO_2^- en NO et N_2O . Bacillus thermodenitrificans, une bactérie thermophile sporulée, possède la nitrate-réductase dissimilatrice A et synthétise en aérobiose sans nitrate les enzymes A et B à un niveau élevé. Les cellules et les extraits réduisent le nitrate et le nitrite en NO, N_2O et N_2 . L'extrait de levure à concentration élevée sert de donneur d'électrons pour toutes les enzymes de la dénitrification. L'oxyde nitreux-réductase, dosée en présence du mélange FAD, FMN et NADH, se trouve solidaire de particules de taille élevée. L'emploi de

l'acétylène comme inhibiteur de la réduction de N_2O a permis de montrer que ce gaz constitue une étape intermédiaire entre NO et N_2 .

Ces deux études confirment donc la séquence établie préalablement chez d'autres espèces bactériennes qui admet respectivement les oxydes nitrique et nitreux comme composés intermédiaires de la réduction du nitrate en azote.

L'analyse de différents groupes composant la microflore dénitrifiante des sols de rizière du Sénégal devait nous permettre, par l'emploi d'un milieu de culture complexe riche, de mettre en évidence une population de bactéries mésophiles, sporulées, tolérant des concentrations élevées de nitrite et représentant une fraction importante de la microflore dénitrifiante totale. Des études de croissance ont démontré la grande diversité de ces bactéries nitrito-tolérantes; certaines d'entre elles, dites nitrito-dépendantes, sont incapables de réduire le nitrate; d'autres utilisent l'oxyde nitrique pour leur croissance alors que d'autres encore sont incapables de croître en présence de N_2O . La tolérance au nitrite est variable selon les souches qui dénitrifient, en général, plus rapidement le nitrite que le nitrate.

L'étude systématique d'une partie de ces souches a montré que si elles ont un G+C % presque invariable, leur phénotype varie beaucoup. Bâtonnets à gram variable, immobiles ou faiblement mobiles à l'aide de quelques flagelles latéraux, ces bactéries présentent des spores elliptiques et déformantes et appartiennent par conséquent au groupe II du genre Bacillus. La nitrate-réductase de la plupart d'entre elles présente la particularité de ne pas utiliser le chlorate comme substrat, ce composé n'inhibant pas l'activité de l'enzyme comme pour l'enzyme B. La tolérance à l'égard du nitrite peut atteindre 35 g par litre de KNO_2 . La moitié des souches font fermenter plus ou moins vigoureusement le glucose. Ces organismes semblent également exister dans les sols tempérés de Métropole. D'autres isollements sont nécessaires pour pouvoir créer une ou plusieurs espèces nouvelles car ces bactéries diffèrent nettement de B.azotoformans et B.brevis.

Avec B.azotoformans isolé par Pichinoty dans un sol de Provence, ces organismes constitueraient en fait les véritables bacilles sporulés dénitrifiants du sol. La participation importante de germes de ce genre au processus de dénitrification était soupçonnée depuis longtemps sans que l'on en puisse isoler les véritables auteurs. Et nous avons également démontré, avec Pichinoty, que B.licheniformis, l'une des plus anciennes bactérie dénitrifiante connue, réduit seulement le nitrate en nitrite et l'oxyde nitrique en oxyde nitreux. La production de gaz en présence de nitrate est très faible; elle se produit dans des cultures âgées sans que l'on puisse expliquer ce phénomène.

Une population de bactéries thermophiles a également été isolée dans les sols de rizière du Sénégal. Elle tolère des concentrations élevées de nitrite. Les souches isolées sur nitrite dénitrifient plus rapidement le nitrite que le nitrate. Cette population est hétérogène et son étude systématique est en cours dans un autre laboratoire.

En collaboration avec Pichinoty, plusieurs nouvelles espèces de bactéries dénitrifiantes ont été isolées et étudiées. Outre B.azotoformans qui synthétise la nitrate-réductase A, ne fait pas fermenter le glucose et réduit NO_3^- en N_2O et N_2 et NO_2^- en NO , N_2O et N_2 , deux nouvelles espèces dénitrifiantes ont été reconnues dans le genre Pseudomonas qui en possède le plus grand nombre : une espèce apparentée à P.pickettii isolée dans un sol de rizière du Sénégal, synthétise la nitrate-réductase B et réduit NO_3^- et NO_2^- en N_2O et N_2 ; elle peut utiliser 80 substrats comme source de carbone et d'énergie; une espèce apparentée à P.lemoinei, isolée dans l'étang de Berre, synthétise la nitrate-réductase A et réduit NO_3^- et NO_2^- en N_2O et N_2 ; elle utilise seulement quelques alcools et acides organiques comme source de carbone et d'énergie. Une souche dénitrifiante appartenant au genre Flavobacterium a été isolée à partir d'un sol de Provence; elle produit un pigment caroténoïde jaune vif et ne réduit pas le nitrate. Le nitrite est réduit en NO , N_2O et N_2 . La bactérie utilise seulement des hydrates de carbone comme source de carbone et d'énergie. Des souches dénitrifiantes appartenant à l'espèce Agrobacterium radiobacter ont été isolées d'un sol de France; elles synthétisent la nitrate-réductase B et réduisent NO_3^- et NO_2^- en N_2O et N_2 .

Enfin, l'on a réisolé et approfondi l'étude d'espèces dénitrifiantes connues : P. stutzeri synthétise la nitrate-réductase A et réduit NO_3^- et NO_2^- en N_2O et N_2 ; Paracoccus denitrificans, bactérie chimio-organotrophe, chimio-lithotrophe et méthylotrophe, synthétise la nitrate-réductase A et réduit NO_3^- en N_2 et NO_2^- en N_2O et N_2 ; Alcaligenes denitrificans synthétise la nitrate-réductase A, réduit NO_3^- et NO_2^- en N_2O et N_2 et n'assimile aucun hydrate de carbone.

Il semblerait donc que, contrairement à ce que l'on pensait, la nitrate-réductase de type A ne soit pas le seul enzyme en cause dans la réduction dissimilatrice du nitrate par les bactéries dénitrifiantes.

B I B L I O G R A P H I E

- BAIRD-PARKER, A.C. (1965) The classification of staphylococci and micrococci from world-wide sources. J.Gen.Microbiol. 38, 363-387 .
- BALDERSTON, W.L., SHERR, B. & PAYNE, W.J. (1976) Blockage by acetylene of nitrous oxide reduction in Pseudomonas perfectomarinus. Appl.Env.Microbiol. 31 , 504-508 .
- BARJAC, H. de et BONNEFOI, A. (1972) Essai de classification biochimique de soixante-quatre "Bacillus" des groupes II et III, représentant onze espèces différentes. Ann.Inst.Pasteur 122, 463-473 .
- BAUMANN, L., BAUMANN, P., MANDEL, M. & ALLEN, R.D. (1972) Taxonomy of aerobic marine eubacteria. J.Bact. 110, 402-429 .
- DAVIS, D.H., DOUDOROFF, M. & STANIER, R.Y. (1969) Proposal to reject the genus Hydrogenomonas : taxonomic implications. Int.J.Syst.Bact. 19 , 375-390 .
- DOUDOROFF, M. (1974) Genus Paracoccus Davis, in Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, eighth ed. (R.E. Buchanan & N.E. Gibbons, eds.), pp. 438-440. The Williams & Wilkins Co, Baltimore.
- FORGET, P. (1971) Les nitrate-réductases bactériennes. Solubilisation, purification et propriétés de l'enzyme A de Micrococcus denitrificans . Europ.J.Biochem. 18 , 442-450 .
- FORGET, P. & DERVARTANIAN, D.V. (1972) The bacterial nitrate reductases : EPR studies on nitrate reductase A from Micrococcus denitrificans . Biochim.Biophys.Acta 256 , 600-606 .
- FORGET, P. et PICHINOTY, F. (1965) Le cycle tricarboxylique chez une bactérie dénitrifiante obligatoire. Ann.Inst.Pasteur 108, 364-377 .
- HAYWARD, A.C. (1964) Characteristics of Pseudomonas solanacearum. J.Appl.Bact. 27 , 265-277 .
- IWASAKI, H. & MATSUBARA, T. (1972) A nitrite reductase from Achromobacter cycloclastes . J.Biochem. (Tokyo) 71 , 645-652 .

- JOHN, P. & WHATLEY, F.R. (1970) Oxidative phosphorylation coupled to oxygen uptake and nitrate reduction in Micrococcus denitrificans . Biochim.Biophys.Acta 216 , 342-352 .
- MATSUBARA, T. (1970) Studies on denitrification. XII. Gas production from amines and nitrite. J.Biochem. (Tokyo) 67, 229-235 .
- MATSUBARA, T. (1975) The participation of cytochromes in the reduction of N_2O to N_2 by a denitrifying bacterium. J.Biochem.(Tokyo) 77 , 627-632 .
- MATSUBARA, T. & IWASAKI, H. (1971) Enzymatic steps of dissimilatory nitrite reduction in Alcaligenes faecalis . J.Biochem. (Tokyo) 69 , 859-868 .
- MATSUBARA, T. & IWASAKI, H. (1972) Nitric oxide-reducing activity of Alcaligenes faecalis cytochrome cd . J.Biochem. (Tokyo) 72, 57-64 .
- MIYATA, M. (1971) Studies on denitrification. XIV. The electron donating system in the reduction of nitric oxide and nitrate. J.Biochem. (Tokyo) 70 , 205-213 .
- MIYATA, M., MATSUBARA, T. & MORI, T. (1969) Studies on denitrification. XI. Some properties of nitric oxide reductase. J.Biochem. (Tokyo) 66 , 759-765 .
- OHNISHI, T. & MORI, T. (1960) Oxidative phosphorylation coupled with denitrification in intact cell systems. J.Biochem. (Tokyo) 48 , 406-411 .
- PALLERONI, N.J., DOUDOROFF, M., STANIER, R.Y., SOLANES, R.E. & MANDEL, M. (1970) Taxonomy of the aerobic pseudomonads : the properties of the Pseudomonas stutzeri group . J.Gen.Microbiol. 60 215-231 .
- PAYNE, W.J., RILEY, P.S. & COX, C.D.Jr. (1971) Separate nitrite, nitric oxide and nitrous oxide reducing fractions from Pseudomonas perfectomarinus . J.Bact. 106 , 356-361 .
- PICHINOTY, F. (1973) La réduction bactérienne des composés oxygénés minéraux de l'azote. Bull.Inst.Pasteur 71 , 317-395 .
- PICHINOTY, F. et PIECHAUD, M. (1968) Recherche des nitrate-réductases bactériennes A et B : méthodes . Ann.Inst.Pasteur 114 , 77-98 .
- RHODES, M., BEST, A. & PAYNE, W.J. (1963) Electron donors and cofactors for denitrification by Pseudomonas perfectomarinus . Canad J.Microbiol. 9 , 799-807 .

- STANIER, R.Y., PALLERONI, N.J. & DOUDOROFF, M. (1966) The aerobic pseudomonads : a taxonomic study . J.Gen.Microbiol. 43, 159-271
- SUZUKI, H. & IWASAKI, H. (1962) Studies on denitrification. VI. Preparations and properties of crystalline blue protein and cytochrome c ; and role of copper in denitrifying enzyme from a denitrifying bacterium. J.Biochem. (Tokyo) 52, 193-199.
- TUSNEEM, M.E. & PATRICK, W.H.Jr. (1971) Nitrogen transformations in waterlogged soil. Louisiana State Univ.Agric.Expt.Sta.Bull. 657 , 1-75 .
- VANGNAI, S. & KLEIN, D.A. (1974) A study of nitrite-dependant dissimilatory micro-organisms isolated from Oregon soils. Soil Biol.Biochem. 6 , 335-339 .
- VERHOEVEN, W. (1952) Aerobic sporeforming nitrate reducing bacteria. Thesis, Uitgeverij Waltman, Delft .
- WOLDENDORP, J.W. (1963) L'influence des plantes vivantes sur la dénitrification. Ann.Inst.Pasteur 105 , 426-433 .
- WOLDENDORP, J.W. (1963) The influence of living plants on denitrification. Meded.Landbhoogesch.Wageningen 63 , 1-100 .
- WOLF, J. & BARKER, A.N. (1968) The genus Bacillus : aids to the identification of its species. In Identification Method For Microbiologists (B.M. Gibbs & D.A. Shapton, eds.), part B , pp.93-109 , Academic Press, London .
- YOSHINARI, T. & KNOWLES, R. (1976) Acetylene inhibition of nitrous oxide reduction by denitrifying bacteria. Biochem.Biophys.Res. Commun. 69 , 705-710 .