

# Mesure de la dénitrification biologique potentielle dans les sols à l'aide de l'acétylène

**Trodoux E.** Université du travail de Charleroi (ISIPH)  
Boulevard Solvay 31  
B - 6000 Charleroi

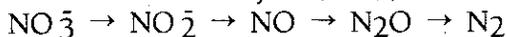
**Tychon B.**  
**Vander Borgh P.** Fondation Universitaire Luxembourgeoise  
Avenue de Longwy 185  
B - 6700 Arlon

**N° CDU** 631.416.1

**Mots clés** Dénitrification, sol, acétylène, nitrates

## Résumé

De nombreuses méthodes ont été établies pour quantifier et définir la cinétique de dénitrification mais elles se sont toutes confrontées à la difficulté de doser l'azote de l'air ( $N_2$ ) qui est l'élément terminal de la chaîne de Payne (1973):



L'utilisation de l'acétylène a résolu ce problème en permettant l'inhibition de la réduction de l'oxyde nitreux ( $N_2O$ ) en  $N_2$ , l'oxyde nitreux étant facilement dosable par chromatographie gazeuse.

La technique utilisée lors de ce travail consiste à prélever un échantillon de sol dans l'horizon de surface. Après homogénéisation, il est placé dans des fioles à pénicilline hermétiques de 120 ml. Une préincubation de 50 h à 20-22°C sous anaérobiose engendre l'élimination des nitrates endogènes présents au départ dans le sol, ce qui permet par la suite d'ajouter des quantités précises de nitrates en vue d'effectuer des bilans de transformation du  $NO_3^-$  en  $N_2O$ . Cette préincubation est suivie d'une incubation sous air, en présence d'acétylène (10 % vol/vol), à 20°C et à 100 % de saturation en eau. Sous ces conditions, la production de  $N-N_2O$  et la disparition de  $N-NO_3^-$  sont mesurées, permettant ainsi de quantifier les bilans de transformation.

En reportant les résultats obtenus pour 1 ha de sol (pour les 20 premiers cm), 12 kg d'azote sur les 20 présents au départ ont dénitrifié sur une période de 5 jours. De plus, cette disparition suit une cinétique à allure précise. Si ces estimations s'avéraient correspondre à la réalité, les mécanismes en cause seraient alors de la plus grande importance, tant pour l'agriculture en améliorant l'utilisation de l'azote, que pour l'environnement et la pollution de l'air et de l'eau.

---

### 1. Introduction

La majeure partie des nitrates ( $NO_3^-$ ) présents dans le sol provient essentiellement de la matière organique et des engrais azotés. Les nitrates possèdent plusieurs voies d'évolution:

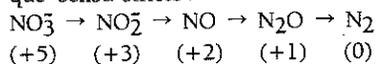
- Ils sont assimilés par les plantes et les micro-organismes en vue de la synthèse protéique; c'est la réduction assimilatrice.
- Ils sont lessivés par les eaux de ruissellement et d'infiltration, du fait de leur grande solubilité et de leur faible capacité à se fixer sur le complexe argilo-humique.
- Ils sont réduits en azote gazeux : oxyde

nitrique ( $NO$ ), oxyde nitreux ( $N_2O$ ), azote ( $N_2$ ) par dénitrification, une faible partie pouvant être réduite en ammonium.

L'ensemble de ces 2 phénomènes porte le nom de réduction dissimilatrice. La dénitrification recouvre en fait 2 processus:

- la *dénitrification chimique*, de faible importance, consiste en la réduction des nitrates en azote gazeux par voie totalement chimique (environnement réducteur, présence de nitrites);
- la *dénitrification biologique*, quant à elle, permet cette réduction par l'intermédiaire de la microflore dénitrifiante généralement libre,

anaérobie facultative et hétérotrophe. Il faut savoir qu'un examen de cette microflore a permis à Payne (1973) de proposer le schéma qui illustre la dénitrification biologique 'sensu stricto':



Chaque étape s'effectue respectivement grâce à l'action de la NO<sub>3</sub>-réductase, NO<sub>2</sub>-réductase, NO-réductase, N<sub>2</sub>O-réductase.

Cette réduction biologique est directement influencée par la teneur et le type de matière organique, le pH, l'oxygène dissous, l'humidité, la température, la concentration en nitrates.

Les études quantitatives sur la dénitrification ont eu un développement important au cours de la dernière décennie. Elles ont pour premier objectif de mieux apprécier les pertes d'azote par cette voie. Le second objectif est d'affiner les connaissances sur l'écologie de cette transformation afin de tenter d'en prévoir l'évolution, voire même de la maîtriser, que ce soit pour mieux utiliser les engrais, éliminer les nitrates en excès dans les sols ou pour réduire la pollution atmosphérique par les oxydes d'azote gazeux. En dépit de ces recherches et de la connaissance historique du processus de dénitrification (Dehérain et Maquenne, 1882), les propriétés cinétiques et quantitatives sont encore à ce jour au stade embryonnaire. Il paraissait dès lors primordial de mettre au point une méthode de quantification au laboratoire avec l'avantage de maîtriser les paramètres limitants tout en sachant que ces mesures ne représentent que des observations d'activités potentielles. La technique utilisée est basée sur la découverte de Fedérova et al. (1973) qui a montré l'inhibition de la réduction du N<sub>2</sub>O en N<sub>2</sub> par l'acétylène. Dans la mesure où l'on peut admettre que la dénitrification biologique se fait selon le schéma classique de Payne, on dispose alors d'un moyen pour mesurer l'activité des micro-organismes par le fait que le N<sub>2</sub>O est plus facilement dosable par chromatographie que le N<sub>2</sub>, principal constituant de l'air. Cette technique est valable pour autant que le blocage au stade N<sub>2</sub>O soit complet et que les réactions amenant la formation de N<sub>2</sub>O ne soient pas perturbées par la présence de l'acétylène. Plusieurs auteurs ont travaillé dans ce sens mais leurs conclusions ne sont pas toujours concordantes. Ces mêmes auteurs ont pu montrer que l'inhibition de la

N<sub>2</sub>O-réductase est plus ou moins complète suivant qu'on opère sous gaz inerte ou sous air ambiant et suivant les concentrations en acétylène et en nitrates utilisés.

Enfin, l'acétylène possède sur la microflore du sol d'autres effets tels que l'inhibition de la nitrification. Dans les mesures de bilan de transformation NO<sub>3</sub><sup>-</sup> → N<sub>2</sub>O, cette propriété va également être utilisée car elle permet de ne pas modifier la quantité initiale de nitrates présente dans le sol, ce qui ne serait pas le cas si la nitrification n'était pas stoppée.

## 2. Matériel et méthode

### 2.1. Principales caractéristiques du sol utilisé

Le sol (tableau 1) est prélevé dans l'horizon de surface (0-20 cm).

### 2.2. Méthode

Une quantité de sol frais connue (18 g) est placée dans des fioles à pénicilline hermétiques de 120 ml de volume. L'ensemble de ces fioles vont subir deux grands types d'opération.

#### 2.2.1. Préincubation

L'objectif de la préincubation est d'arriver à produire un sol exempt en NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Ceci est réalisé en utilisant de l'acétylène dans des conditions favorisant la dénitrification.

Le rôle de l'acétylène lors de la préincubation consiste à bloquer la nitrification et donc à empêcher toute production de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Quant aux nitrates présents au départ dans le sol, ils sont dénitrifiés en travaillant sous anaérobiose grâce à un dégazage des fioles par un flux de N<sub>2</sub>.

#### Conditions de préincubation

- dégazage des fioles contenant le sol avec un flux de N<sub>2</sub> pendant 15 minutes;

Tableau 1 Caractéristiques physico-chimiques du sol

|                         |      |
|-------------------------|------|
| C <sub>org</sub> (% MS) | 2,0  |
| N <sub>k</sub> (% MS)   | 0,4  |
| C/N                     | 5,0  |
| Mat. org. (%)           | 3,6  |
| Argiles (%)             | 5,4  |
| Limons fins (%)         | 14,1 |
| Limons grossiers (%)    | 14,4 |
| Sables fins (%)         | 57,0 |
| Sables grossiers (%)    | 9,1  |

- extraction de 10 ml d'air à l'intérieur de la fiole étanche (seringue à gaz);
- ajout de 10 ml de C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> (seringue à gaz);
- préincubation de 50 h à 20-22°C.

### 2.2.2. Incubation

La préincubation terminée, il est dès lors possible d'ajouter des concentrations connues en NO<sub>3</sub><sup>-</sup> et d'effectuer des bilans de transformation NO<sub>3</sub><sup>-</sup> → N<sub>2</sub>O de manière précise puisque l'acétylène empêche toute production de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> par nitrification et inhibe la N<sub>2</sub>O-réductase.

L'introduction d'une quantité connue de nitrates s'effectue après avoir laissé les fioles ouvertes pendant 120 minutes pour le renouvellement de leur atmosphère.

### Conditions d'incubation

- sous air;
- une concentration en acétylène de 10,4 % (vol/vol); la quantité de C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> ajoutée étant substituée à la même quantité d'air;
- température d'incubation entre 20 et 22°C;
- 100 % de saturation en eau du sol;
- agitation pendant 1 heure pour une meilleure diffusion de l'acétylène.

Dans ces conditions, il n'existe pas de lessivage de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ni d'assimilation végétale. L'assimilation microbienne et la dénitrification chimique peuvent être considérées comme négligeables. La principale voie d'évolution des NO<sub>3</sub><sup>-</sup> est donc la *dénitrification biologique*.

## 2.3. Dosage

### 2.3.1. Dosage du N<sub>2</sub>O

Les prélèvements de gaz pour dosage sont effectués grâce à des tubes 'Venocject' sous vide (7 ml) utilisés comme support matériel lors de prise de sang. Cette technique s'avère bien adaptée pour l'étude de la cinétique de production du N<sub>2</sub>O. Les échantillons gazeux prélevés grâce à ces tubes Venocject dans les fioles à pénicilline sont dosés par chromatographie en phase gazeuse en vue de déterminer la teneur en N<sub>2</sub>O.

L'oxyde nitreux est dosé à l'aide d'un chromatographe HP 5880 A équipé d'un détecteur à capture d'électrons (ECD) à Ni<sup>63</sup>. La séparation du N<sub>2</sub>O et de l'air est effectuée sur une colonne en nickel de 3 m de long et de 3,2 mm de diamètre intérieur, remplie de 'Sphero-card' (80/100 mesh). Le Sphero-card joue le rôle de tamis moléculaire de haute pureté. Les conditions de fonctionnement sont les suivantes : gaz vecteur = N<sub>2</sub>, débit = 30 ml/min, températures de l'injecteur, du four, du détecteur : 130° C, 130° C, 320° C. Volume injecté d'échantillon = 50 ml. Moyen d'injection : seringue à gaz.

Les résultats de l'analyse quantitative sont tributaires de nombreux paramètres, en particulier de la qualité des étalons. Ils sont fabriqués par injection d'un volume connu de N<sub>2</sub>O dans un récipient physiquement et chimiquement inerte, le tout étant agité par une puce magnétique. En effectuant plusieurs

**Tableau 2** Cinétique de production de N<sub>2</sub>O et de disparition de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>

| Heures | kg N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> initial/ha | kg N-(NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) restant par ha | Coef. variation | kg N-N <sub>2</sub> O dégagés sous forme gazeuse/ha | kg N-N <sub>2</sub> O solubilisés/ha | Rendement opératoire (%) |
|--------|--|--|-----------------|---|--------------------------------------|--------------------------|
| 0      | 20,9   | 20,9   | 0,00            | 0,00  | 0,00                                 | 100,0                    |
| 1      | 20,9   | 14,3   | 0,02            | 0,00  | 0,00                                 | 68,3                     |
| 2      | 20,9   | 14,1   | 0,04            | 0,05  | 0,0014                               | 67,7                     |
| 3      | 20,9   | 13,8   | 0,07            | 0,05  | 0,0016                               | 66,1                     |
| 4      | 20,9   | 13,9   | 0,09            | 0,02  | 0,0005                               | 66,8                     |
| 20     | 20,9   | 10,9   | 0,00            | 6,00  | 0,18                                 | 81,8                     |
| 30     | 20,9   | 4,2  | 0,02            | 6,90  | 0,20                                 | 53,8                     |
| 47     | 20,9   | 1,8  | 0,10            | 7,20  | 0,21                                 | 44,0                     |
| 57     | 20,9   | 1,0  | 0,07            | 9,40  | 0,28                                 | 51,2                     |
| 70     | 20,9   | 0,9  | 0,06            | 10,50   | 0,31                                 | 55,8                     |
| 90     | 20,9   | 3,0  | 0,00            | 9,50  | 0,28                                 | 61,1                     |
| 120    | 20,9   | 2,2  | 0,06            | 10,80   | 0,32                                 | 63,5                     |
| 140    | 20,9   | 0,2  | 0,02            | 12,20   | 0,36                                 | 61,2                     |
| 238    | 20,9   | 1,7  | 0,05            | 5,80  | 0,17                                 | 36,7                     |

lois cette opération pour des concentrations différentes, on obtient une droite d'étalonnage qui sert de base à l'ensemble des mesures.

L'ensemble des dosages ont été effectués en collaboration avec le département 'Traitement des eaux et pollution' de l'ULB.

### 2.3.2. Dosage des nitrates

L'extraction des nitrates du sol est réalisée par adjonction de 100 ml d'une solution de KCl 0,5 N à 18 g de sol, le tout étant agité et laissé décanter 3 h avant dosage. La méthode de dosage des  $\text{NO}_3^-$  est basée sur le principe du flux continu et l'appareillage de base est l'autoanalyser 'technicon'.

Les nitrates sont réduits en nitrites, lesquels réagissent en milieu acide avec la sulfanilamide et forment un complexe de diazotation qui, couplé avec le chlorhydrate de N-1-naphthyléthylène - diamine, produit une coloration pourpre dosé à 550 nm de longueur d'onde. Cette technique dose simultanément les nitrates et les nitrites ( $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ ).

## 3. Résultats et discussions

### 3.1. Vérification de l'élimination des nitrates endogènes lors de la préincubation

Une durée d'incubation de 50 h à tempéra-

ture ambiante est nécessaire pour éliminer les nitrates initiaux, cette constatation ayant été vérifiée aussi bien pour une concentration initiale en N -  $\text{NO}_3^-$  de 0,02 mg/l, que de 2,36 mg/l.

### 3.2. Cinétique de production de l'oxyde nitreux et disparition des nitrates

Cette étude s'est effectuée pour une concentration initiale en nitrates de 20,9 kg N -  $\text{NO}_3^-$  par ha observée dans les 20 premiers cm du sol. Le tableau 2 donne le rendement opératoire calculé par

$$E = \frac{A+(C+D)}{B} \times 100$$

avec:

A = kg/ha N - ( $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ ) restant;

B = kg/ha N -  $\text{NO}_3^-$  initiaux;

C = kg/ha N -  $\text{N}_2\text{O}$  dégagés sous forme gazeuse;

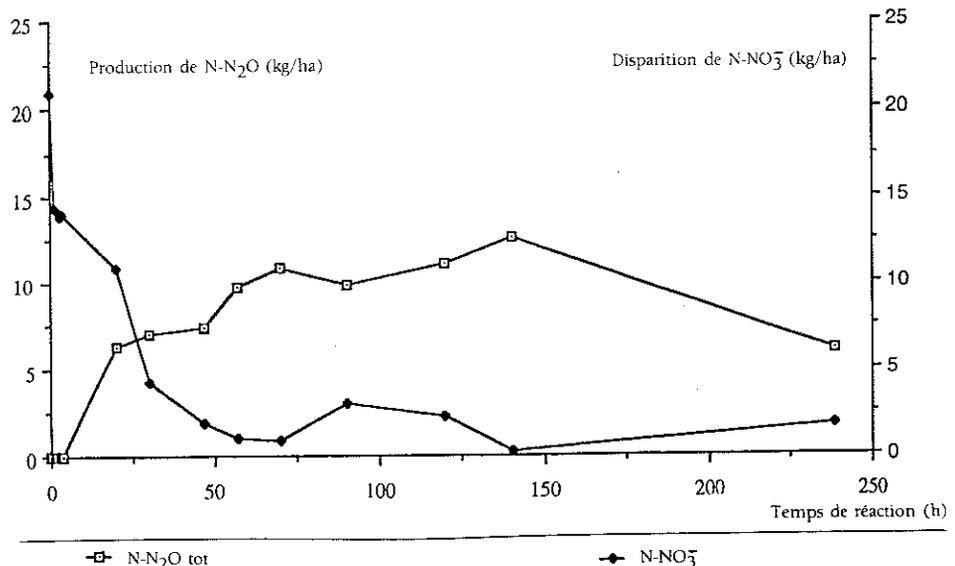
D = kg/ha N -  $\text{N}_2\text{O}$  solubilisés, calculés par la loi d'Henry;

E = rendement opératoire exprimé en %.

Rappelons que l'ensemble des expériences a été faite avec des fioles contenant 18 g de sol. Les résultats ont été ensuite exprimés en kg/ha.

L'ensemble des résultats du tableau 2 correspond à une moyenne effectuée sur 4 échan-

Figure 1 Cinétique de production de N- $\text{N}_2\text{O}$  et de disparition de N- $\text{NO}_3^-$



tillons pour les nitrates et sur 8 pour le N<sub>2</sub>O.

### 3.2.1. Cinétique de disparition des nitrates (figure 1)

Lors de la première heure d'incubation, 32 % des nitrates ajoutés ont disparu. Cette forte diminution, appelée *flush respiratoire*, s'explique par le fait que l'apport de nitrates stimule l'activité des micro-organismes dénitrifiants qui ont dû subir une phase de carence lors de la préincubation. De fait, une expérience a permis de montrer que le *flush respiratoire* n'était présent que si on faisait précéder l'incubation d'une préincubation. Ce *flush respiratoire* est suivi d'une phase de latence (2 à 7 h) correspondant à une phase d'adaptation des micro-organismes au milieu. Entre 7 et 70 h, la cinétique suit une loi de décroissance du 1<sup>er</sup> ordre.

Entre 70 et 90 h, on constate une production de NO<sub>3</sub> accompagnée simultanément d'une diminution de la teneur en N<sub>2</sub>O. Vu les coefficients de variation très faibles, 0,06 pour 70 h et 0 pour 90 h, l'erreur expérimentale est donc à écarter.

La production de nitrates et la diminution de la teneur en N<sub>2</sub>O étant dues probablement à une levée de l'inhibition de la nitrification et de la N<sub>2</sub>O-réductase par l'acétylène. Quel est le processus mis en jeu et pourquoi y a-t-il levée de cette inhibition, sont deux questions auxquelles il est difficile de répondre avec les éléments dont on dispose. La variation d'un facteur limitant est un élément à ne pas écarter.

### 3.2.2. Cinétique de production du N<sub>2</sub>O (figure 1)

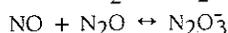
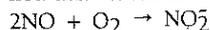
Une courte phase de latence apparaît entre 0 et 4 h à laquelle on peut donner plusieurs interprétations:

- temps nécessaire à l'épuisement de l'oxygène dissous;
- remise en état fonctionnel des micro-organismes dénitrifiants après une période de carence en nitrates, ce qui correspond à une adaptation de la microflore dénitrifiante à son milieu;
- réalisation des états intermédiaires entre la réduction des nitrates et la production de N<sub>2</sub>O;
- durée nécessaire pour inhiber la N<sub>2</sub>O-réductase. Cette hypothèse est peu probable, selon Ryden (1979) car l'inhibition de la N<sub>2</sub>O-réductase s'effectue entre 15 et 30

minutes maximum.

Une comparaison avec la cinétique de disparition des NO<sub>3</sub> permet de montrer que le *flush respiratoire* de la première heure n'est accompagné d'aucune production de N<sub>2</sub>O. On ignore sous quelle forme les nitrates ont été réduits.

En considérant le schéma de Payne NO<sub>3</sub> → NO<sub>2</sub> → NO → N<sub>2</sub>O (la réduction du N<sub>2</sub>O en N<sub>2</sub> étant inhibé par l'acétylène) les seuls intermédiaires de réduction possibles sont les nitrites et l'oxyde nitrique. Un dosage des nitrites seuls après 1 heure d'incubation a pu montrer que la teneur était nulle. Le seul intermédiaire de réduction possible n'est autre que l'oxyde nitrique. Pourtant aucun chromatogramme ne renseigne la production de ce composé, ceci pouvant s'expliquer par le fait que les conditions expérimentales chromatographiques ne soient pas appropriées au dosage du NO. De plus l'oxyde nitrique s'oxyde en NO<sub>2</sub> en présence de l'air donnant lieu aux réactions suivantes:



La phase de latence est suivie d'une phase linéaire (4 à 20 h) couramment observée pour la dénitrification (Nömmick, 1956, Bremmer, 1958, Germon, 1980). Elle peut s'expliquer par le fait que l'azote apporté se répartit dans le sol des fioles; les micro-organismes dénitrifiants disposent alors d'un substrat respiratoire et peuvent synthétiser les différents enzymes de la dénitrification: ils produisent de l'oxyde nitreux.

Entre 20 et 47 h, la production est ralentie. La vitesse de dénitrification semble limitée par une enzyme dont la synthèse et/ou l'activité seraient stoppées ou ralenties. Cette phase est confirmée pour différentes concentrations en nitrates (tableau 3).

**Tableau 3** Quantité de N-N<sub>2</sub>O produits après 45 h d'incubation pour différentes concentrations initiales

| kg N-NO <sub>3</sub> initiaux par ha | kg N-N <sub>2</sub> O produits après 45 h d'incubation par ha |
|--------------------------------------|---|
| 1670                                 | 11,3  |
| 1250                                 | 10,1  |
| 620                                  | 9,1   |
| 250                                  | 9,6   |
| 100                                  | 9,4   |
| 21                                   | 8,5   |

Comme le montrent ces résultats, une forte variation de concentration en nitrates n'engendre qu'une très faible variation de production de N<sub>2</sub>O après 45 h. Après cette période, les courbes de production N<sub>2</sub>O et de disparition de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> montrent une allure symétrique. Entre 70 et 90 h, au moment même où nous observons une production de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, il y a une diminution de la teneur en N<sub>2</sub>O. Vient ensuite une nouvelle phase de production de N<sub>2</sub>O entre 90 et 150 h, production proportionnelle à la disparition nitrique. Enfin au-delà de 150 h, ce qui peut être appelé une 'phase de déclin' est mesurée. Elle s'explique par le fait que les micro-organismes s'adaptent à l'acétylène; l'inhibition de la N<sub>2</sub>O-réductase est donc progressivement levée. Elle peut aussi provenir de l'épuisement du carbone assimilable par les micro-organismes dénitrifiants. Cette dernière phase est confirmée par une augmentation de la teneur en NO<sub>3</sub><sup>-</sup> pendant la même période.

### 3.3. Défauts de bilans

Des défauts de bilans de l'ordre de 20 à 40 % apparaissent.

Ces écarts peuvent avoir plusieurs origines:  
- une réduction dissimilatrice des nitrates en ions ammonium.

Ce processus est difficile à chiffrer car aucune mesure n'a été effectuée dans ce sens. Les études dans ce domaine sont rares et peu concluantes.

- une mauvaise inhibition de la N<sub>2</sub>O-réductase.

Elle peut être due à une mauvaise diffusion de l'acétylène dans le sol. Chaque fiole est pourtant agitée pour favoriser cette diffusion, mais le système d'agitation a la conséquence de rendre le sol extrêmement compact vu la forte teneur en eau (100 % de degré de saturation). Dans ce cas, la diffusion de l'acétylène au niveau de la solution du sol est réduite.

Elle peut aussi provenir de l'adaptation des micro-organismes dénitrifiants à la présence

d'acétylène, son pouvoir inhibiteur perdant de ce fait de l'importance.

La dernière hypothèse, souvent proposée par la littérature, est le rôle de l'acétylène comme source carbonée pour les micro-organismes. Dès lors, la concentration en C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> dans le milieu diminue, ce qui engendre une levée de l'inhibition de la N<sub>2</sub>O-réductase. Cette hypothèse paraît peu probable vu les fortes teneurs en C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> (10,4 % V/V) utilisées.

- Il est possible qu'une partie de l'oxyde nitrique produit ne soit pas réduite en N<sub>2</sub>O. Il y aurait donc dégagement d'oxyde nitrique non détecté par chromatographie gazeuse.

NO<sub>3</sub><sup>-</sup> → NO<sub>2</sub> → NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (1) → N<sub>2</sub>O (2)  
- Pertes au niveau des septums des fioles à pénicilline.

Des essais sur de longues durées ont été effectués par dosage chromatographique. Les pertes,

**Tableau 4** Influence du degré de saturation en eau sur la production de N-N<sub>2</sub>O

| Degré de saturation (%) | Incubation (jours) | kg N-N <sub>2</sub> O gazeux (par ha) |
|-------------------------|--------------------|---------------------------------------|
| 18                      | 1                  | —                                     |
|                         | 2                  | 0,038                                 |
| 48                      | 1                  | 0,057                                 |
|                         | 2                  | 0,057                                 |
| 78                      | 1                  | 0,246                                 |
|                         | 2                  | 0,264                                 |
| 100                     | 1                  | 5,176                                 |
|                         | 2                  | 10,010                                |

**Tableau 5** Effet de la température sur la dénitrification

| Température (°C ± 1°C) | kg N-N <sub>2</sub> O produit après 30 h d'incubation pour 1 ha |
|------------------------|---|
| 4                      | 0,09  |
| 15                     | 7,01  |
| 20-22                  | 7,32  |
| 37                     | 11,33   |
| 47                     | 10,20   |

**Tableau 6** Evolution de l'azote nitrique résiduel, de l'N-N<sub>2</sub>O produit et du rendement opératoire après 150 heures d'incubation et une concentration initiale de 104 kg/ha de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>

|  | sans C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> | 10 % C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> | 20 % C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> |
|--|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| N-(NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> )résiduel (kg/ha) | 87,5                               | 70,5                               | 47,2                               |
| N-N <sub>2</sub> O dégagé et solubilisé (kg/ha)                                  | 4,9                                | 10,4                               | 21,6                               |
| Rendement opératoire   | 88,4                               | 77,3                               | 65,7                               |

s'il y en avait, étaient inférieures à 3 %. Les pertes au niveau des tubes 'Venोजect' pour une incubation de 10 jours sont en moyenne de 15 % avec de très grands écarts autour de cette valeur (entre 5 et 44 %). Pour limiter les pertes, les tubes ont été placés sous eau. Cette technique a réduit les pertes moyennes à 5 %.

Il est à noter que l'ensemble des rendements opératoires sont augmentés de 31 % si le flush respiratoire est écarté. Ce flush est un processus 'artificiel' causé par la préincubation.

### 3.4. Mise en évidence de facteurs limitant la dénitrification

#### 3.4.1. Degré de saturation en eau du sol

Il faut que la teneur en eau du sol dépasse une certaine valeur pour que la dénitrification puisse s'effectuer. Nous avons donc étudié la production du N<sub>2</sub>O à différentes humidités du sol.

Le degré de saturation en eau d'un sol est par définition:

$$\theta = \frac{\theta_x - \theta_n}{\theta_s - \theta_n}$$

avec:  $\theta_s$  = degré de saturation maximum;

$\theta_n$  = degré de saturation après séchage;

$\theta_x$  = degré de saturation de l'échantillon.

Comme le confirment les résultats du tableau 4, la présence d'eau dans le sol est primordiale pour la dénitrification biologique.

Ces résultats diffèrent légèrement de ceux de Nömmick (1956) qui considère qu'il n'y a pas de production d'azote gazeux en-dessous de 80 % de saturation en eau (expérience réalisée sans acétylène avec N<sup>15</sup>). Cette différence peut s'expliquer par l'existence de microsites anaérobiques dans les sols non saturés en eau et qui restent favorables à la dénitrification. De plus il semblerait que la présence d'acétylène contribue aussi à augmenter artificiellement l'importance de ces microsites.

#### 3.4.2. Température

La production de N<sub>2</sub>O est directement liée à la température, la température affectant le niveau de tous les processus vitaux des bactéries (tableau 5).

Il faut noter que pour une température de 4°C, tous les échantillons (8) ont dénitrifié.

Comme le montrent les résultats, la gamme de températures est extrêmement large ce qui permet de classer les bactéries dénitrifiantes à la fois dans les mésophiles, psychrophiles et thermophiles.

La littérature est assez partagée sur le minimum de température pour les dénitrifiants. Il semble être compris entre 0 et 4°C.

#### 3.4.3. Influence de l'acétylène sur les bilans de transformation

En appliquant la technique décrite auparavant pour différentes concentrations en acétylène, il a été possible de montrer que (tableau 6):

1. La présence d'acétylène stimule la disparition des nitrates. Ces résultats sont en accord avec ceux de Germon (1980), mais en contradiction avec ceux de Ryden (1979) qui considère que l'acétylène n'a pas d'effet sur la réduction des nitrates.

2. La production de N<sub>2</sub>O semble être proportionnelle à la concentration en acétylène.

3. Il apparaît une opposition dans nos résultats : augmentation de la quantité de N<sub>2</sub>O produit et diminution du rendement opératoire; ceci pouvant s'expliquer par deux processus:

- il est clair que l'acétylène favorise la disparition des nitrates, ce qui signifie que la teneur en nitrates à l'intérieur des fioles diminue. Cette diminution ayant une influence directe sur la N<sub>2</sub>O-réductase. En effet, selon Blackmer (1978), pour de faibles concentrations en NO<sub>3</sub>, on observe un effet stimulateur important des NO<sub>3</sub> sur l'activité de la N<sub>2</sub>-réductase. Cet effet est expliqué par la stimulation de la synthèse de cette enzyme dès qu'on se trouve à de faibles concentrations en NO<sub>3</sub>.

L'augmentation de la concentration en acétylène favorisant l'inhibition et la diminution de la teneur en nitrates défavorisant cette inhibition sont deux processus imbriqués à effet contraire.

- cette expérience s'étant déroulée sur une incubation de 150 h, il est fort possible que le phénomène d'adaptation de la N<sub>2</sub>O-réductase à l'acétylène intervienne de façon non négligeable, ce qui signifierait que le N<sub>2</sub>O produit serait de plus en plus réduit en N<sub>2</sub> (non dosé).

## Conclusion

Cette méthode, mise au point lors de ce travail, s'avère très intéressante pour comprendre le phénomène de dénitrification et pour quantifier les pertes d'azote par cette voie. Elle a permis de mettre en évidence que:

- le matériel des fioles à pénicilline (120 ml) et des tubes 'Vénoject' s'avère bien adapté à l'étude des cinétiques de dénitrification;
- la préincubation de 50 h en anaérobiose entraîne la disparition des nitrates endogènes qui pourraient perturber le bilan;
- la technique des dosages simultanés des nitrates et du  $N_2O$  en vue des bilans de transformation indique que la méthode permet de suivre des cinétiques de longue durée (10 jours) et que l'inhibition de la  $N_2O$ -éductase est pratiquement complète (en ne considérant pas le flush respiratoire qui apparaît comme un phénomène artificiel causé par la préincubation). Il est intéressant de noter qu'aucune des deux cinétiques ne suit une allure linéaire mais une cinétique à plusieurs phases. De plus, ces résultats permettent de considérer que la dénitrification est le phénomène dominant dans la réduction dissimilatrice des nitrates;
- la présence d'acétylène stimule la dénitrification et cela d'autant plus que la concentration en acétylène est forte. De plus, la diminution de l'effet inhibiteur de l'acétylène sur la  $N_2O$ -réductase après 1 semaine d'incubation a pu être mise en évidence.

Bien que cette technique ouvre des perspectives intéressantes pour les recherches sur la dénitrification, ces deux constatations montrent deux aspects négatifs de la méthode. Il paraît donc nécessaire de poursuivre les recherches au niveau de l'influence de l'acétylène sur l'ensemble de la microflore du sol et de déterminer précisément les conditions pour que cette utilisation ne pose problème;

- les effets de la température et de l'humidité ont été clairement identifiés et sont en accord avec les recherches antérieures effectuées par de nombreux chercheurs.

Depuis la découverte par Fédérova (1973) de l'inhibition de la  $N_2O$ -réductase par l'acétylène, le problème du dosage du  $N_2$  (principal constituant de l'air) a semblé être résolu puisque le  $N_2O$  est facilement dosable par chromatographie. Mais de nombreuses recherches ont pu montrer que le blocage de la réduction  $N_2O \rightarrow N_2$  était très ambigu (problématique) et que l'acétylène avait des effets secondaires gênants tels que l'accélération, le ralentissement de phénomènes microbiologiques et la formation de microsites anaérobiques. Il est donc certain que cette technique est loin d'être totalement maîtrisée pour l'utiliser comme méthode de routine. Pourtant son faible coût et sa simplicité d'utilisation sont des avantages importants devant la

technique du bilan  $^{15}\text{N}$  (isotope stable de l'azote). L'utilisation du marquage isotopique, en permettant de mieux suivre l'évolution de l'azote tant dans le sol que dans les végétaux et l'atmosphère, permet une meilleure précision dans les bilans. Mais l'utilisation des isotopes stables coûte cher et les moyens à mettre en œuvre sont importants. Il serait donc intéressant de poursuivre les recherches au niveau de l'inhibition de la  $\text{N}_2\text{O}$ -réductase par des inhibiteurs plus *spécifiques* et *moins perturbateurs* que l'acétylène. Dans un article de 1955, Allison concluait : '*Bien que les principaux mécanismes de perte d'azote soient connus, les études quantitatives restent certainement inadaptées*'. Même si cet article a plus de 30 ans, il est à l'heure actuelle très difficile d'établir des bilans azotés corrects dans un sol.

### Bibliographie

- ALLISON, F.E. 1955. The enigma of soil nitrogen balance sheet. *Adv. Agron.*, **7**, 213-250
- BLACKMER, A.M. and BREMMER, J.-M. 1978. Inhibitory effect of nitrate on reduction of  $\text{N}_2\text{O}$  to  $\text{N}_2$  by soil microorganisms. *Soil Biol. Biochem.*, **10**, 187-191
- BREMMER, J.M. and al., 1958. Denitrification in soils. Factors affecting denitrification. *J. Agric. Sci.*, **51**, 40-51
- DENIS, J. 1983. Dénitrification en colonnes de sol au laboratoire. Effets de quelques paramètres. Comparaison de deux méthodes de mesure. Mémoire de fin d'études. Ecole nationale d'ingénieurs des travaux agricoles, Dijon Quetigny
- DENIS, J. 1984. Dénitrification potentielle en sols cultivés. Production et réduction de l'oxyde nitreux sur 16 sols de Bourgogne. Mémoire DEA. Université Claude Bernard, Lyon I
- FEDEROVA, R.I. and al., 1973. Evaluation of the method of 'gas metabolism' for detection extra terrestrial life. *Izv - Akad. Nank. SSSR (Sér. biol.)*, **6**, 797-806
- GERMON, J.-C. 1980. Etude quantitative de la dénitrification biologique dans le sol à l'aide de l'acétylène I et II. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, **131 B**, 69-90.
- NÖMMIK, H. 1956. Investigation on denitrification in soil. *Acta. Agricul. Scand.*, **13**, 195-228
- PAYNE, W.J. 1973. Reduction of nitrogenous oxide by microorganisms, *Bact. Rev.*, **37**, 409-429
- PINOCHET, X. 1982. Dénitrification potentielle sur sols cultivés. Influence de différentes formes de carbone du sol. Mémoire DEA Université Claude Bernard, Lyon I
- RYDEN, J.-C. and al., 1979. Direct measurement of denitrification loss from soils. *Soil sci.soc.Am.J.*, **43**, 104-110

### Samenvatting

#### **Bepaling van de potentiële biologische denitrifikatie in gronden met behulp van acetyleen**

Talrijke methoden werden ontwikkeld om de denitrifikatiekinetiek te bepalen en te kwantificeren, maar men werd tot nu toe telkens gekonfronteerd met de moeilijkheid om stikstof ( $\text{N}_2$ ) als eindelement van de Payne ketting (1973) in de lucht te doseren:  
 $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$   
 Door het gebruik van acetyleen wordt het

mogelijk de reductie van distikstofoxide (lachgas  $N_2O$ ) in  $N_2$  te voorkomen; en deze  $N_2O$  kan gemakkelijk via gaschromatografie gedoseerd worden.

Deze techniek bestaat uit het nemen van een oppervlakte grondstaal (A<sub>0</sub> horizont). Na homogenisatie wordt dit staal in hermetisch gesloten penicilline flesjes van 120 ml geplaatst. Een pre-incubatie van 50 uren op 20-22°C onder anaërobe omstandigheden veroorzaakt de eliminatie van de endogene nitraten oorspronkelijk aanwezig in de grond, wat nadien de toevoeging van welbepaalde hoeveelheden nitraten toelaat, om de omzettingbalans van  $NO_3^-$  in  $N_2O$  uit te voeren. Nadien volgt een aërobe incubatie in aanwezigheid van acetyleen (10 % vol/vol)

op 20°C in 100 % waterverzadiging. Onder die voorwaarden wordt de N- $N_2O$  productie en het verwijderen van N- $NO_3^-$  gemeten, wat de bepaling van de omzettingbalans toelaat. Uit de extrapolatie van de bekomen resultaten tot 1 ha grond (laag 0 - 20 cm) blijkt dat 12 van de 20 kg stikstof die oorspronkelijk voorhanden waren, werden gedenitrificeerd in 5 dagen. Daarenboven volgt dit proces een welbepaalde kinetiek. Indien deze schattingen overeenkomen met de werkelijkheid, zouden de beschouwde mechanismen van het grootste belang zijn, zowel voor de landbouw (verbetering van de stikstofbenutting) als voor het leefmilieu en de lucht- en waterverontreiniging.

---

### Summary

#### *Estimation of potential biological denitrification by means of acetylen*

Numerous methods to quantify and define kinetics of denitrification have been established, but they all have been confronted with the  $N_2$ -measure, because  $N_2$  is both the final Payne chain component and the air nitrogen:



Acetylen use gives a solution to this problem by inhibiting the  $N_2O \rightarrow N_2$  reaction,  $N_2O$  being easily dosed by gaseous chromatography.

An homogenised soil sample of the surface horizon (20 cm) is put into a 120 ml penicillin bottle. In the first step, soil is placed under anaerobic conditions during 50 hours at 20-22°C to get rid of the nitrate which is naturally present in the soil. This first step called 'preincubation' allows afterwards to

work with definite quantities of nitrate in order to quantify the transformation balance of  $NO_3^-$  to  $N_2O$ . The second step called 'incubation' occurs under air with 10 % vol/vol acetylen at 20-22°C and 100 % water saturation.

Under these conditions, N- $N_2O$  production and N- $NO_3^-$  disappearance are measured and the transformation rate isolated.

The results of this experiment, extrapolated to a surface of 1 ha, show that 12 of the 20 kg of N- $NO_3^-$  present in the soil are denitrified after 5 days. Supposing this estimation approaches reality, denitrification would be of the utmost importance even for agriculture (nitrogen use) as for environment (regarding air and water pollution).

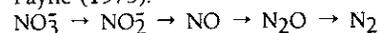
---

### Zusammenfassung

#### *Messung der potentielle biologischen Denitrifikation bei Anwendung des Acetylens*

Zahlreiche Methoden wurden entwickelt, um die Kinetik der Denitrifikation zu quantifizieren und genau zu beschreiben. Jedoch stossen sämtliche Methoden auf das Problem der Bestimmung des Stickstoffsgehaltes der Luft;

der Stickstoff ist das Endglied der Kette von Payne (1973):



Die Anwendung des Acetylens hat das Problem gelöst, indem es die Reduktion des

N<sub>2</sub>O zu elementarem Stickstoff (N<sub>2</sub>) verhindert. Das N<sub>2</sub>O kann leicht mit Hilfe der Gaschromatographie gemessen werden.

Die in dieser Arbeit angewandte Technik besteht darin, eine Bodenprobe aus dem Oberflächehorizont zu entnehmen.

Nach der Homogenisierung wird die Probe in einen hermetisch geschlossenen 120 ml Behälter mit Penicilin überführt. Eine Vorinkubation von 50 Stunden bei 20-20°C unter Anaerobiose bedingt die Entfernung der Nitrate, welche anfänglich im Boden waren.

Dies ermöglicht es später, eine genaue Nitratquantität zuzufügen, um die Umwandlungsbilanz des NO<sub>3</sub> zu N<sub>2</sub>O zu bestimmen. Auf dieser Vorinkubation folgt eine Inkubation unter Luftbedingungen mit Vorkommen Acetylens (10 %) auf 20°C und mit 100 %

Wassersättigung. Unter diesen Bedingungen werden die Produktion von N-N<sub>2</sub>O und der Abbau von N-NO<sub>3</sub> gemessen, welche die Quantifizierung der Umwandlungsbilanz ermöglichen.

Die auf eine Fläche von 1 ha (für die oberen 20 cm) übertragenen Ergebnisse ergeben, dass von den anfänglich vorhandenen 20 kg Stickstoff, in 5 Tagen 12 kg denitrifiziert werden. Desweiteren folgt der Abbau einer ganz bestimmten Kinetik.

Falls diese Schätzungen der Wirklichkeit entsprechen, wären die besprochenen Mechanismen demnach von grosser Bedeutung, sowohl für die Landwirtschaft (Verbesserung der Stickstoffbewertung) als auch für die Umwelt (hinsichtlich Wasser- und Luftverschmutzung).