

Comparaison de deux méthodes de mesure in situ de l'activité réductrice d'acétylène des Cyanobactéries

Tahirou M. TRAORE*
Pierre Armand ROGER **
Pierre Adrien REYNAUD **

* Microbiologiste, professeur à l'E.N.S.
C.P.S. B.P. 241 Bamako, Mali
** Microbiologistes O.R.S.T.O.M.
B.P. 1386, Dakar, Sénégal

Résumé

Deux dispositifs de mesure de l'ARA des Cyanobactéries in situ ont été comparés :

- 1/ cylindres de plastique de 15 cm de diamètre posés sur le sol ;
- 2/ flacons sérum de 500 ml dans lesquels on introduit six carottes de sol de 2,5 cm de diamètre.

L'intervalle de confiance d'une moyenne de dix répétitions est le même (de l'ordre de + 100 % - 50 %) pour les deux dispositifs alors que la surface échantillonnée est six fois plus grande dans la méthode du cylindre. Ce résultat indique que la mesure peut être simplifiée et rendue plus précise en effectuant un échantillonnage de carottes de sol de petite dimension (2 cm de diamètre) et en réunissant ces carottes dans un même dispositif pour l'incubation. Une diminution de l'ARA, liée à l'effet de serre a été mise en évidence dans les mesures effectuées en flacon sur sol non submergé.

Mots-clés : Cyanophycées - A.R.A. - Méthodologie - Précision - Mesures in situ.

Summary

COMPARISON OF TWO METHODS FOR MEASURING ACETYLENE REDUCING ACTIVITY OF CYANOBACTERIA UNDER FIELD CONDITIONS

Two methods of measurement of the algal acetylene reducing activity (ARA) have been compared :

- 1/ transparent plastic cylinders 15 cm in diameter placed on the soil
- 2/ 500 ml serum bottles in each of which were placed 6 core samples 2,5 cm in diameter.

Confidence interval of the mean of ten replicates was about the same (+ 100 % - 50 %) with the two methods although the sampled surface was six times higher with the cylinder than with the bottle. This result indicates that in situ algal ARA measurements can be simplified and improved in accuracy taking small soil core samples and rasmbling the samples in a single vessel for incubation under acetylene. A decrease in A.R.A., related to a « green house effect » was observed in measuring activity of non submerged soil in serum bottles.

Key words : Blue Green Algae - A.R.A. - Methodology - Accuracy - In situ measurements.

1. INTRODUCTION

Depuis sa mise au point, la méthode d'évaluation de la fixation d'azote par la mesure de l'activité réductrice d'acétylène (A.R.A.) a vu son utilisation se développer d'une façon exponentielle (HARDY, 1973)

qui s'explique par une grande facilité d'emploi et un coût peu élevé.

Un certain nombre d'articles récents ont fait le point sur la validité de cette méthode (MATSUGUCHI *et coll.*, 1978 ; WITTY, 1978) et ont mis en évidence ses limitations d'emploi en sol submergé (LEE et WAT-

NABE, 1977 ; MATSUGUCHI, 1978) ou en milieu aquatique (FLETT *et coll.*, 1976).

Les techniques de mesure *in situ* les plus fréquemment utilisées sont celle du « cylindre » (BALANDREAU et DOMMARGUES, 1971) et celle du flacon (STEWART *et coll.*, 1967).

Ce travail se propose de mettre en évidence l'influence intrinsèque du dispositif expérimental utilisé, en comparant ces deux techniques de mesure et de fournir une évaluation de la précision des deux méthodes.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. BIOTOPE ÉTUDIÉ

Les mesures ont été effectuées à Bamako (Mali) en juillet 1977 sur une rizière non submergée, au début du cycle cultural du riz. La variété cultivée est une variété locale de grande taille (1,70 m) fournissant rapidement un couvert végétal dense. Le sol, limono-argileux, est riche en carbone organique (4,7 %) et en phosphore (6,1 ‰). Le pH, voisin de la neutralité en début de cycle (6, 8) augmente après réhumectation et atteint une valeur de 8,0 en fin de cycle. Aucun apport d'engrais n'est effectué lors de la culture.

L'ensemble de ces conditions favorise le développement des Cyanobactéries fixatrices de N₂ (TRAORE *et coll.*, 1978).

2.2. NUMÉRATION DES CYANOBACTÉRIES

La numération des Cyanobactéries a été effectuée par étalement sur milieux gélosés de suspensions-dilutions d'un échantillon moyen de sol obtenu à partir du matériel prélevé pour mesurer l'A.R.A. Les milieux, les conditions d'incubation et le mode de comptage ont été précédemment décrits (REYNAUD et ROGER, 1977).

2.3. MESURE DE L'A.R.A.

2.3.1. Méthode du cylindre

La méthode est dérivée de celle de BALANDREAU et DOMMARGUES (1971). Les mesures sont effectuées dans des cylindres de plastique rigide de 10 cm de haut et de 15 cm de diamètre. Un orifice fermé par un bouchon de caoutchouc permet injections et prélèvements. L'acétylène est injecté à la seringue en quantité connue, suffisante pour obtenir une concentration voisine de 10 % dans le cylindre ; 0,2 ml de propane sont injectés aussitôt après comme traceur. Les prélèvements sont effectués au moyen de tubes « Vacutainers » après 30 minutes d'incubation.

Nous avons utilisé et comparé deux types de cylindres : des cylindres en chlorure de polyvinyle (opaque) fermés à leur partie supérieure par un disque d'« Altuglas » (transparent) et des cylindres fabriqués entièrement en « Altuglas ».

2.3.2. Méthode du flacon

La technique est dérivée de celle de STEWART *et coll.* (1967) ; six carottes de 2,5 cm de diamètre, correspondant au premier centimètre de sol sont disposées dans un flacon sérum de 500 ml. L'acétylène est injecté en quantité connue pour obtenir une concentration de 10 % dans l'atmosphère du flacon. Le flacon est ensuite replacé à l'endroit du prélèvement en respectant l'orientation initiale des carottes. Après une incubation de 30 minutes les prélèvements gazeux sont effectués au moyen de tubes « Vacutainers ».

Pour deux méthodes, les résultats sont exprimés en nanomoles de C₂H₄ par mètre carré et par heure. TRAORE *et coll.* (1977) ont établi que des mesures se succédant toutes les 2 h sur un même échantillon n'avaient pas d'incidence sur les variations de l'A.R.A.

2.4. MÉTHODES STATISTIQUES

Nous avons déterminé la loi de répartition des mesures d'A.R.A au moyen de l'étude de la liaison moyenne-variance. Cette étude a permis de déterminer la transformation à appliquer aux données pour les normaliser et pouvoir calculer l'intervalle de confiance d'une moyenne ou comparer deux moyennes au moyen du test t de Student-Fischer. L'ensemble des calculs a été effectué en utilisant des programmes précédemment mis au point pour une calculatrice HP 97 (ROGER *et coll.*, 1978).

2.5. PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Une première expérience a consisté à étudier les variations journalières de l'A.R.A. des Cyanobactéries (mesurée entre les pieds de riz) 16 j. et 26 j. après le semis. Dix cylindres en C.P.V. + Altuglas et dix flacons ont été utilisés simultanément pour effectuer huit mesures journalières à dix répétitions chacune. La numération des Cyanobactéries a été effectuée sur un échantillon moyen à partir du matériel ayant servi à mesurer l'A.R.A.

Une troisième série de mesures au cours d'une même journée à la fin du cycle cultural a servi à comparer cylindres en C.P.V. + Altuglas et cylindres en Altuglas afin de tester l'influence de l'ombre portée de la paroi opaque en C.P.V. du premier type de cylindre sur l'activité des Cyanobactéries.

3. RÉSULTATS

3.1. COMPARAISON ENTRE FLACONS ET CYLINDRES CPV-ALTUGLAS

3.1.1. Flore algale

On observe entre la première et la seconde série de mesures un doublement du nombre de Cyanobactéries totales (tabl. I) alors que les formes fixatrices augmentent à la fois en valeur absolue et en valeur relative. L'activité fixatrice d'azote suit cette évolution sans qu'il y ait toutefois proportionnalité entre le nombre de Cyanobactéries fixatrices et l'A.R.A.

3.1.2. A.R.A.

Les variations journalières de l'A.R.A sont rapportées au tableau II. L'étude de la liaison moyenne-variance montre que la pente de la droite de régression $\log m$, $\log s^2$ calculée sur les 16 groupes de 10 répétitions pour chacune des méthodes est voisine de 2. Cette valeur, en accord avec les résultats précédemment obtenus (ROGER *et coll.*, 1977) indique que la loi de répartition est assimilable à une loi log-normale. Les calculs statistiques ont donc été effectués après transformation logarithmique des données.

TABLEAU I

Tableau récapitulatif des principaux résultats obtenus

Date	14-7-77	26-7-77
Age du riz en jours	14	26
Etat du sol	Humide	Humide
pH du sol	6,8	7,2
Cyanobactéries totales nb. g ⁻¹ sol sec	3,2.10 ⁵	7,3.10 ⁵
Cyanobactéries fixatrices d'Azote nb. g ⁻¹ sol sec	2,3.10 ⁴	5,7.10 ⁵
Espèce fixatrice dominante	Anabaena sp	Anabaena sp
ARA journalière en nM C ₂ H ₄ .m ⁻² .h ⁻¹ , mesures sous cylindre CPV-Altuglas = A	5,8.10 ⁶	2,4.10 ⁷
ARA journalière en nM C ₂ H ₄ .m ⁻² .h ⁻¹ , mesures en flacon = B	2,1.10 ⁶	7,3.10 ⁶
Rapport A/B	2,8	3,3

TABLEAU II

Variations journalières de l'ARA mesurées en flacon et sous cylindre CPV + Altuglas

	7 h 30	8 h 45	10 h 30	11 h 45	14 h 20	16 h 00	17 h 25	18 h 30	Total	
14-7-77	ARA en nM éthylène.m ⁻² .h ⁻¹ .10 ⁻⁴ cylindres C.P.V. + Altuglas	9,80	29,85	22,80	39,65	77,85	30,50	33,32	11,43	5,8.10 ²
	ARA en nM éthylène.m ⁻² .h ⁻¹ .10 ⁻⁴ flacons	7,40	16,31	11,48	12,54	21,15	12,98	8,31	6,96	2,1.10 ²
	Rapport des deux mesures	1,32	1,83	1,99	3,16	3,68	2,70	4,01	1,64	2,8
	t	0,313	0,536	0,932	1,312	1,920	1,239	1,800	0,708	
26-7-77	ARA en nM éthylène.m ⁻² .h ⁻¹ .10 ⁻⁴ cylindres C.P.V. + Altuglas	45,27	86,71	131,62	290,89	159,45	154,89	77,41	14,71	2,4.10 ³
	ARA en nM éthylène.m ⁻² .h ⁻¹ flacons	27,82	73,14	72,67	54,00	48,80	28,48	13,56	5,65	7,3.10 ²
	Rapport des deux mesures	1,63	1,19	1,81	5,39	3,27	5,44	5,71	2,60	3,3
	t	1,628	0,548	1,707	5,247*	2,893*	4,554*	4,250*	2,085	

* Moyennes significativement différentes (t limite pour P : 0,05 = 2,101)

La comparaison deux à deux des moyennes des mesures simultanées montre une différence significative pour quatre couples (tabl. II). D'une façon générale on obtient des résultats systématiquement inférieurs par la méthode des flacons. Si l'on considère la fixation globale journalière, le rapport des valeurs obtenues par les deux méthodes est voisin de 3 ; au cours de la journée, ce rapport varie entre 1,2 et 5,7 (tabl. II).

3.2. COMPARAISON ENTRE CYLINDRES CPV ALTUGLAS ET CYLINDRES ALTUGLAS

Les variations journalières (tabl. III) ne présentent pas de différence au seuil de signification de 5 %. Le rapport des mesures simultanées varie entre 0,7 et

1,7 au cours de la journée mais l'activité journalière calculée est pratiquement identique.

3.3. PRÉCISION DES DEUX MÉTHODES DE MESURE

L'intervalle de confiance de la moyenne des dix répétitions (tabl. IV) effectuées pour chaque mesure a été calculé pour chacune des 16 mesures réalisées avec les cylindres (Altuglas + CPV) et les flacons. Rappelons que l'intervalle de confiance d'une moyenne de données distribuées suivant une loi log-normale est dissymétrique (ROGER et REYNAUD 1978).

Le tableau n° 4 indique la valeur minimale, la valeur maximale et la valeur moyenne des parties supérieures et inférieures de l'intervalle de confiance pour les deux types de mesures.

TABLEAU III

Variations journalières de l'ARA mesurée sous cylindre Altuglas et cylindre CPV + Altuglas

	8 h 45	10 h 00	11 h 15	13 h 00	15 h 00	Fixation journalière
ARA. nM éthylène.m ⁻² .h ⁻¹ . 10 ⁻⁴ cylindres CPV + Altuglas	9,02	7,72	30,09	20,94	7,18	1,6 .10 ² *
ARA. nM éthylène.m ⁻² .h ⁻¹ . 10 ⁻⁴ cylindres Altuglas	12,64	8,02	38,96	12,40	5,49	1,59.10 ² *
Rapport des deux mesures	0,71	0,96	0,78	1,69	1,31	1,00
t calculé	0,525	0,224	0,315	1,012	0,307	
t limite à 0,05	2,365	2,365	2,447	2,305	2,447	

* nM éthylène m⁻².j⁻¹. 10⁻⁴ (valeurs extrapolées)

TABLEAU IV

Valeurs maximales, minimales et moyennes des parties supérieures (+) et inférieures (-) de l'intervalle de confiance des moyennes de 10 répétitions observées avec les deux dispositifs

Dispositif expérimental	Valeur maximale en % de la mesure	Valeur minimale en % de la mesure	Valeur moyenne en % de la mesure	Nombre de mesures
Cylindre CPV + Altuglas	+ 177,6	+ 43,3	+ 105,3	16
	- 64,0	- 30,2	- 48,4	
Flacon	+ 185,0	+ 46,3	+ 101,6	16
	- 64,9	- 31,6	- 47,7	

4. DISCUSSION

La comparaison des valeurs d'ARA mesurées en flacon et sous cylindre CPV-Altuglas indique une activité relative plus faible dans les flacons, principalement aux heures de forte isolation (Tab. II). Ceci peut être mis en relation soit avec un effet inhibiteur direct des hautes intensités lumineuses (REYNAUD et ROGER, 1978), soit avec un effet de serre provoquant une inhibition par des températures élevées (JONES, 1977). La première hypothèse est reliée au fait que la paroi opaque en CPU du cylindre, protégée par son ombre portée, une partie des Cyanobactéries d'une action directe des hautes intensités lumineuses. Elle est démontrée par la seconde expérience : en début de journée, l'A.R.A. est plus faible dans le cylindre à paroi de CPV ; aux heures de forte isolation l'inverse se produit et l'on observe une diminution nette de l'ARA dans le cylindre en Altuglas. Toutefois les différences enregistrées sont insuffisantes pour expliquer les résultats de la première expérience.

La mesure de la température dans les deux types de dispositifs expérimentaux, au cours de la journée, a montré un maximum de 30° C dans les cylindres et un maximum de 38° C dans les flacons. Rappelons que les mesures ont été faites sur un sol humide non submergé et qu'il n'y avait donc pas d'effet tampon sur la température par l'eau de submersion. Les valeurs maximales mesurées dans le flacon sont

connues pour être inhibitrices de l'ARA (JONES, 1977) et l'effet de serre semble donc être le principal facteur limitant pour les mesures d'ARA en flacon.

Les deux méthodes sont caractérisées par une précision pratiquement identique alors que la surface échantillonnée en une fois par la méthode du cylindre (177 cm²) est nettement plus grande que celle échantillonnée en 6 fois par la méthode du flacon (6 × 4,9 = 29,4 cm²). Ceci indique que pour augmenter la précision des mesures *in situ* de l'ARA algale, mieux vaut augmenter le nombre de sous échantillons que la surface échantillonnée.

5. CONCLUSION

La mesure *in situ* de l'A.R.A. de Cyanobactéries peut être simplifiée et rendue plus précise en effectuant un échantillonnage de carottes de sol de petite taille (2 cm de diamètre) et en réunissant ces carottes dans un même dispositif pour l'incubation. Il importe toutefois d'éviter tout effet de serre dans le dispositif de mesure, l'augmentation de température pouvant provoquer une diminution de l'activité. Dans les conditions expérimentales utilisées, la précision d'une moyenne de dix répétitions est de l'ordre de + 100 %, - 50 %.

Manuscrit reçu au Service des Publications de L'ORSTOM, le 19 novembre 1979.

BIBLIOGRAPHIE

- BALANDREAU (J.), DOMMERGUES (Y.), 1971. - Mesure *in situ* de l'activité nitrogénasique. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 273 : 2020-2023.
- BERTHET (P.), GERARD (G.), 1970. - Note sur l'estimation de la densité des populations édaphiques. In : Phillipson, J. : Méthodes d'études de l'écologie du sol, Unesco 1970. Imp. pop. Genève : 189-193.
- FLETT (R.J.), HAMILTON (R.D.), et CAMPBELL (N.E.R.), 1976. - Aquatic acetylene-reduction techniques : solution to several problems. *Can. J. Microbiol.*, 21 : 43-51.
- HARDY (R.W.F.), BURNS (R.C.), HOLSTEN (R.D.), 1973. - Applications of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. *Soil Biol. Biochem.*, 5 : 47-81.
- JONES (K.), 1977. - The effects of light intensity on acetylene reduction by blue-green algal mats in sub-tropical grassland. *New Phytol.*, 78 : 427-431.
- LEE (K.K.), WATANABE (I.), 1977. - Problems of acetylene reduction technique applied to water saturated paddy soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 34 : 654-660.
- MATSUGUCHI (T.), 1978. - Problems of acetylene reduction techniques applied to paddy soils (en Japonais). *Kagaku to Seibutsu* 16 : 328-335.
- MATSUGUCHI (T.), SHIMOMURA (T.) et LEE (S.K.), 1978. - Reexamination of assay conditions for heterotrophic nitrogen fixation (C₂H₂) in paddy soil. In U. Granhall ed. Environmental role of nitrogen-fixing blue-green algae and symbiotic bacteria. *Ecol. Bull.* (Stockholm), 26 : 137-147.
- REYNAUD (P.A.), ROGER (P.A.), 1977. - Milieux sélectifs pour la numération des algues eucaryotes, procaryotes et fixatrices d'azote. *Rev. Ecol. Biol. Sol.*, (14), 3 : 421-428.
- ROGER (P.A.), REYNAUD (P.A.), DUCERF (P.E.), TRAORE (T.M.), RINAUDO (G.E.), 1977. - Mise en évidence de la distribution log-normale de l'activité réductrice d'acétylène *in situ*. *Cah. ORSTOM, sér. Biol.*, vol. XII, n° 2 : 133-139.
- ROGER (P.A.) et REYNAUD (P.A.), 1978. - La numération des algues en sol submergé : Loi de distribution des organismes et densité d'échantillonnage. *Rev. Ecol. Biol. Sol.*, 15, n° 2 : 219-234.
- ROGER (P.A.), REYNAUD (P.A.), MONNIAUX (J.), 1978. - Normalisation des données et calcul de la précision des mesures en écologie microbienne du sol. *Cah. ORSTOM, sér. Biol.*, vol. XIII n° 2 : 171-180.

- STEWART (W.D.P.), FITZGERALD (G.P.T.), BURRIS (R.H.), 1967. - *In situ* studies on N₂ fixation using the acetylene reduction technic. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, USA (58) : 2071-2078.
- TRAORE (T.M.), REYNAUD (P.A.), ROGER (P.A.), 1977. - Note sur le réemploi d'un même échantillon pour les mesures journalières de réduction de l'acétylène par les Cyanophycées. *Cah. ORSTOM, sér. Biol.*, vol. XII, n° 2 : 141-144.
- TRAORE (T.M.), ROGER (P.A.), REYNAUD (P.A.), SASSON (A.), 1978. - Etude de la fixation de N₂ par les Cyanobactéries dans une rizière Soudano-Sahélienne. *Cah. ORSTOM, sér. Biol.*, XIII, n° 2 : 181-186.
- WITTY (J.F.), 1978. - Overestimate of N₂ fixation in the soil by the acetylene reduction method. Abstract of papers in Steenbock-Kettering international symposium on nitrogen fixation, June 12-16, 1978. Wisconsin, U.S.A. B 50.