

Utilisation de l'azote 15 en science du sol

Application à l'étude de transferts d'azote entre les formes minérales et organiques dans un sol calcaire

G. GUIRAUD - Ch. MAROL

Département de Biologie - Service de Radioagronomie
C.E.N. Cadarache, 13115 Saint-Paul-lez-Durance

RÉSUMÉ

Après un bref rappel du principe régissant l'emploi du traceur, deux exemples d'utilisation de l'azote 15 en sciences du sol sont donnés.

— L'évolution d'un apport de nitrates marqués a été suivie dans un sol calcaire, avec ou sans enfouissement de paille. Il a été observé un priming effect et différentes hypothèses sont formulées. La nitrification nette est environ trois fois moins importante que la nitrification brute ;

— Lors d'une incubation avec du ray-grass marqué des dosages réguliers ont permis de suivre la minéralisation de l'azote du ray-grass, son influence sur la minéralisation de l'azote du sol et les pertes. Il y a une nitrification supplémentaire de l'azote du sol mais tout l'azote 15 est retrouvé. Une addition complémentaire de glucose entraîne des pertes de même qu'une culture de ray-grass mais cette dernière conduit cependant à des rendements bien plus élevés que dans le témoin.

I. — INTRODUCTION.

A l'idée d'isotope est généralement associée celle de radio-activité. Dans la majorité des cas, il en est ainsi car les isotopes radio-actifs sont les plus utilisés. Ceci tient essentiellement à des raisons pratiques, leur mise en œuvre étant a priori plus aisée que celle des isotopes stables.

Des six isotopes connus de l'azote, seuls ceux de masse 14 et 15 sont stables et l'isotope radio-actif de masse 13 qui a la période la plus longue, 10 mn, ne permet que des expériences très limitées dans le temps et se déroulant obligatoirement au voisinage immédiat d'un cyclotron (GERSBERG **et coll.**, 1976) La nécessité d'utiliser des isotopes

stables explique qu'il n'y ait eu jusqu'en 1960 que très peu d'investigations (FAUST, 1982), bien que l'azote 15 ait été découvert dès 1929 (NAUDE, 1929). Les dosages isotopiques ne pouvaient être effectués que par spectrométrie de masse, technique difficile qui demeure délicate et onéreuse malgré les progrès réalisés en la matière. Le développement de la spectroscopie optique, plus facile et moins onéreuse (GUIRAUD et FARDEAU, 1980), donnera un nouvel essor, d'autant qu'il est noté une baisse du prix des composés marqués, autre obstacle à leur utilisation. Un avantage supplémentaire réside dans la possibilité de réaliser des analyses isotopiques avec des quantités d'azote moléculaire de l'ordre du μg (MARTIN et coll., 1981). L'inconvénient majeur de la spectrométrie optique se situe dans l'imprécision des mesures pour les faibles teneurs, excluant par exemple l'utilisation de cette technologie lors des essais agronomiques au champ où l'emploi d'engrais faiblement marqués, voire même appauvris, est un impératif économique.

L'utilisation des isotopes stables comme traceur dans les recherches biologiques repose sur deux hypothèses fondamentales (HAUCK et BREMNER, 1976) :

- 1) Les composés complexes ont, dans leur état naturel, une composition isotopique constante ;
- 2) Les organismes vivants ne peuvent distinguer les deux isotopes qu'avec difficulté.

Dans nos expériences, on suppose ces deux conditions remplies car les teneurs isotopiques mesurées (de l'ordre de 1 % et plus) n'ont aucun rapport avec les variations connues de l'abondance isotopique naturelle qui sont beaucoup plus petites (MARIOTTI, 1982).

Parmi les multiples essais autorisés par l'azote 15, ceux qui se rapportent à la mesure du coefficient réel d'utilisation d'un engrais comptent parmi les plus nombreux. Classiquement, le coefficient d'utilisation est calculé à partir de la différence de prélèvement entre deux cultures, l'une sans apport d'azote, l'autre ayant reçu un engrais azoté. Cette méthode surestime en général l'utilisation de l'engrais ; ainsi, dans une expérience sur betterave sucrière, le coefficient apparent d'utilisation est de 112 %, valeur inacceptable, alors que le coefficient réel n'est que de 77 % (LINDEMANN, 1981). Celui-ci est obtenu, sans parcelle témoin, en mesurant simplement le pourcentage de l'azote 15 retrouvé dans les racines et les verts par rapport à la quantité de ^{15}N apporté. Nous n'insisterons pas sur cette méthodologie qui, vu son importance, se trouve abondamment décrite dans la littérature (HAUCK et BYSTROM, 1970, GUIRAUD et BERLIER, 1971, AIEA, 1974). Par contre, les essais faisant état des transferts continuels de l'azote du sol entre les formes minérales et organiques sont moins nombreux, bien que les isotopes permettent d'en rendre compte alors que les techniques classiques ne peuvent déceler que les résultats nets. L'objet de cette note est de répondre à ces préoccupations par la présentation de résultats obtenus dans deux modes d'approche de la question posée selon que le traceur est introduit sous une forme minérale ou organique.

II. — ÉVOLUTION DE L'AZOTE AJOUTÉ SOUS UNE FORME MINÉRALE.

II.1. MATERIEL ET METHODES.

Le sol utilisé est brun calcaire et ses caractéristiques principales sont données dans le tableau 1 ; il contient 7 ppm d'azote nitrique. Douze kilos de ce sol séché à l'air, répartis en lots de 1 kilo, ont été placés à l'obscurité à 25 °C et à l'humidité constante de 20 % par rapport au poids du sol, soit sensiblement la capacité de rétention. On dispose de trois traitements : sol témoin, sol additionné de 203 ppm N-NO₃, à 33,63 % de ^{15}N en excès et réparti de manière homogène, sol additionné de la même quantité d'azote nitrique marqué et de 1 % en poids de paille de blé dont le rapport C/N est peu différent de 80 et la teneur en azote total de 0,45 %.

Un kilo de chaque traitement est prélevé après 1, 3, 6 et 12 mois d'évolution. A l'issue d'un séchage à l'air de 8 jours, l'azote minéral est extrait par agitation dans une solution de KCl normale (rapport solution/sol = 10). L'azote ammoniacal est déterminé par distillation

alcaline avec MgO et, sur ce même échantillon, une autre distillation après addition d'alliage de DEWARDA permet de titrer l'azote nitrique.

Chaque analyse est exécutée en triple et les déterminations isotopiques sont faites avec un spectromètre Varian Mat modèle GD 150 (GUIRAUD et PACCHIANI, 1973).

Les quantités d'azote retrouvées sous forme ammoniacale sont toujours très faibles et négligeables vis-à-vis des quantités d'azote nitrique ; on considérera donc, dans la suite de l'exposé, que les termes nitrification et minéralisation ont la même signification, même si le passage transitoire par la forme ammoniacale est évident.

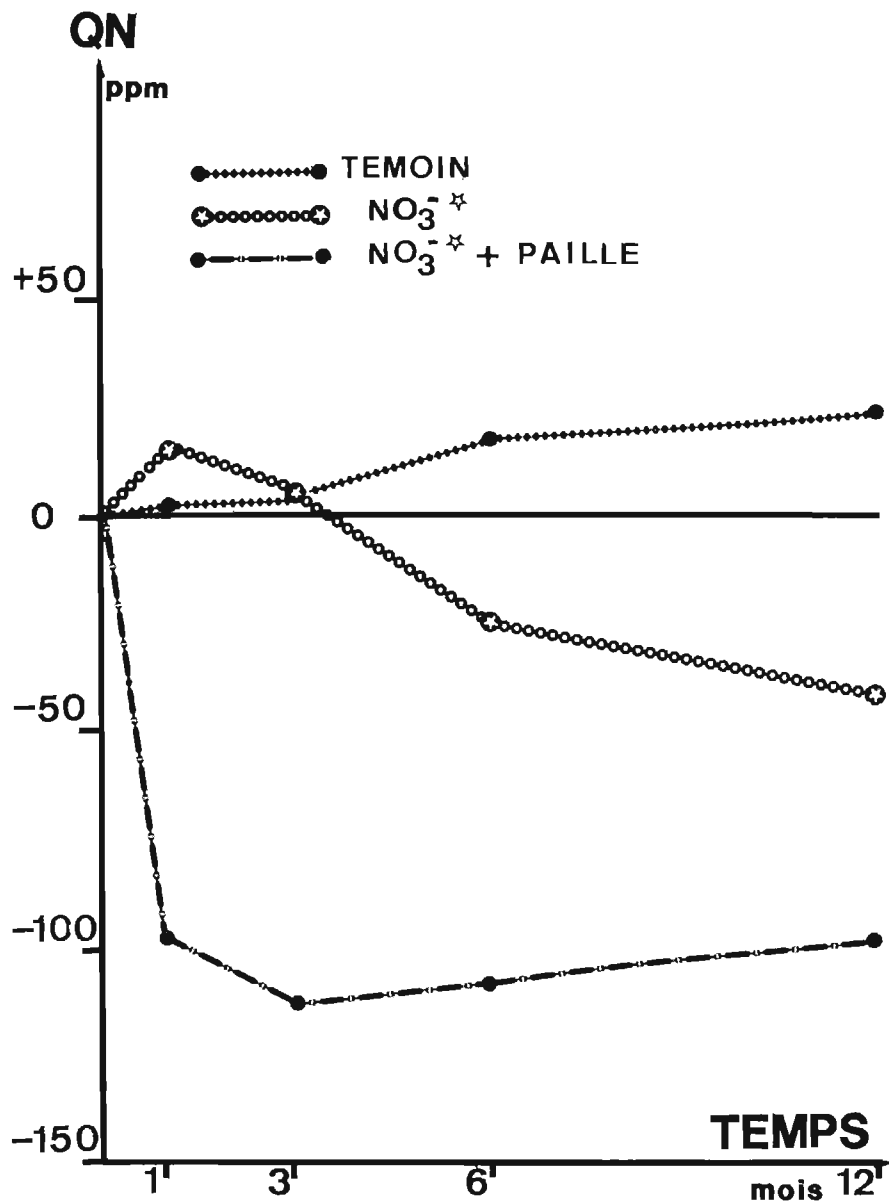


FIGURE I. — Minéralisation nette (en ppm)

Net mineralization

	GRANULOMETRIE %.			CO ₃ CA %		PH		N _T %.	C _{org} %.
	A	L	S	TOTAL	ACTIF	EAU	KCl		
SOL CADARACHE	133	514	353	21,3	5	8,1	7,6	1,13	7,9

TABLEAU 1. — *Caractéristiques du sol utilisé*
Soil characteristics

II.2. DISCUSSION.

La nitrification nette (fig. 1) est obtenue en calculant pour chaque intervalle de temps la différence entre les teneurs initiales et finales en nitrates. Il apparaît une minéralisation régulière de l'azote du témoin, alors que l'addition de nitrates stimule initialement la minéralisation (priming effect), puis les quantités diminuent fortement. En présence de paille, il se manifeste une forte décroissance durant les trois premiers mois, mais ensuite les quantités augmentent légèrement.

En définitive, après un an d'incubation, la minéralisation nette est de + 24 ppm pour le témoin, de - 41 pour le sol additionné de NO₃ et de - 98 ppm pour le sol ayant reçu de la paille en plus.

L'apport d'engrais marqué permet cependant de distinguer entre nitrification nette et nitrification brute qui peut être déterminée à partir de la mesure des excès isotopiques par la formule de dilution isotopique :

$$M_2 = M_1 \left(\frac{E_1}{E_2} - 1 \right)$$

M₁ (210 ppm) représente la quantité initiale de nitrates, E₂ (32,51 ‰) leur excès et E₁ l'excès des nitrates mesuré lors du prélèvement (tableau 2).

Ainsi apparaît une minéralisation très intense grandement favorisée par l'addition de paille (figure II). Cependant, la formule employée ne peut s'appliquer ici en toute rigueur, étant donné la variation continue des nitrates dans les divers échantillons au cours du temps. Ce point est important et doit être souligné : en effet, si l'emploi des isotopes est susceptible d'apporter des renseignements fondamentaux qui ne peuvent pas être obtenus d'une autre façon, leur emploi inconsidéré et l'utilisation sans vérification des formules les plus classiques peuvent conduire à de très graves erreurs d'interprétation des résultats.

Pour tenir compte de la variation observée des quantités de nitrates, on peut supposer en première approximation, qu'elle est linéaire au cours des périodes envisagées (0-1 mois ; 1-3 mois ; 3-6 mois ; 6-12 mois) ; les résultats sont les suivants (figure III). Les valeurs obtenues sont largement inférieures aux précédentes, surtout pour le traitement en présence de paille où de 200 ppm (20 ‰ de la quantité initiale totale d'azote !) elles se limitent à 80 ppm seulement.

Cette minéralisation est très intense le premier mois, ceci provenant d'un développement de la microflore causé par la réhumectation du sol qui avait été séché au laboratoire avant le début de l'essai ; elle est toujours supérieure, mais de quelques ppm seulement en présence de paille, et enfin, même en période de disparition rapide des nitrates du sol (cas du sol avec paille durant le premier mois), la nitrification est toujours active.

La comparaison des valeurs obtenues pour l'azote minéral dans le traitement témoin et dans le traitement avec addition de nitrates permet de faire quelques observations concernant le « priming effect », c'est-à-dire l'influence de l'apport d'engrais sur l'azote du sol.

En général, le priming effect est mesuré en comparant les minéralisations nettes des deux traitements ; on a vu dans l'essai décrit ici (figure 1) une surminéralisation de 13 ppm le premier mois, mais ensuite un effet négatif. Cependant, la minéralisation nette est la résultante de deux phénomènes antagonistes qui sont la minéralisation, d'une part, et la somme réorganisation + dénitrification d'autre part. Pour caractériser plus précisément ce priming effect, il est plus intéressant de comparer les minéralisations brutes, mais cela ne peut se faire qu'en proposant des hypothèses pour le témoin, car, sans ¹⁵N, il n'est pas possible de calculer la minéralisation brute.

Concernant le traitement témoin, trois hypothèses peuvent être suggérées :

- 1) Les fuites sont négligeables ;
- 2) Les fuites sont identiques à celles du traitement nitrates ;

		TEMPS (en mois)					
		0	1	3	6	12	
TRAITEMENTS	Témoïn	QN					
		ppm	7	9	11	24	31
	NO ₃ *	QN					
		ppm	210	225	216	185	169
		E %	32,51	28,7	28,5	25,3	22,9
	NO ₃ * + paille	QN					
ppm		210	113	97	102	112	
	E %	32,51	27,4	24,1	21,2	16,9	

TABLEAU 2. — Evolution des nitrates
Nitrate evolution

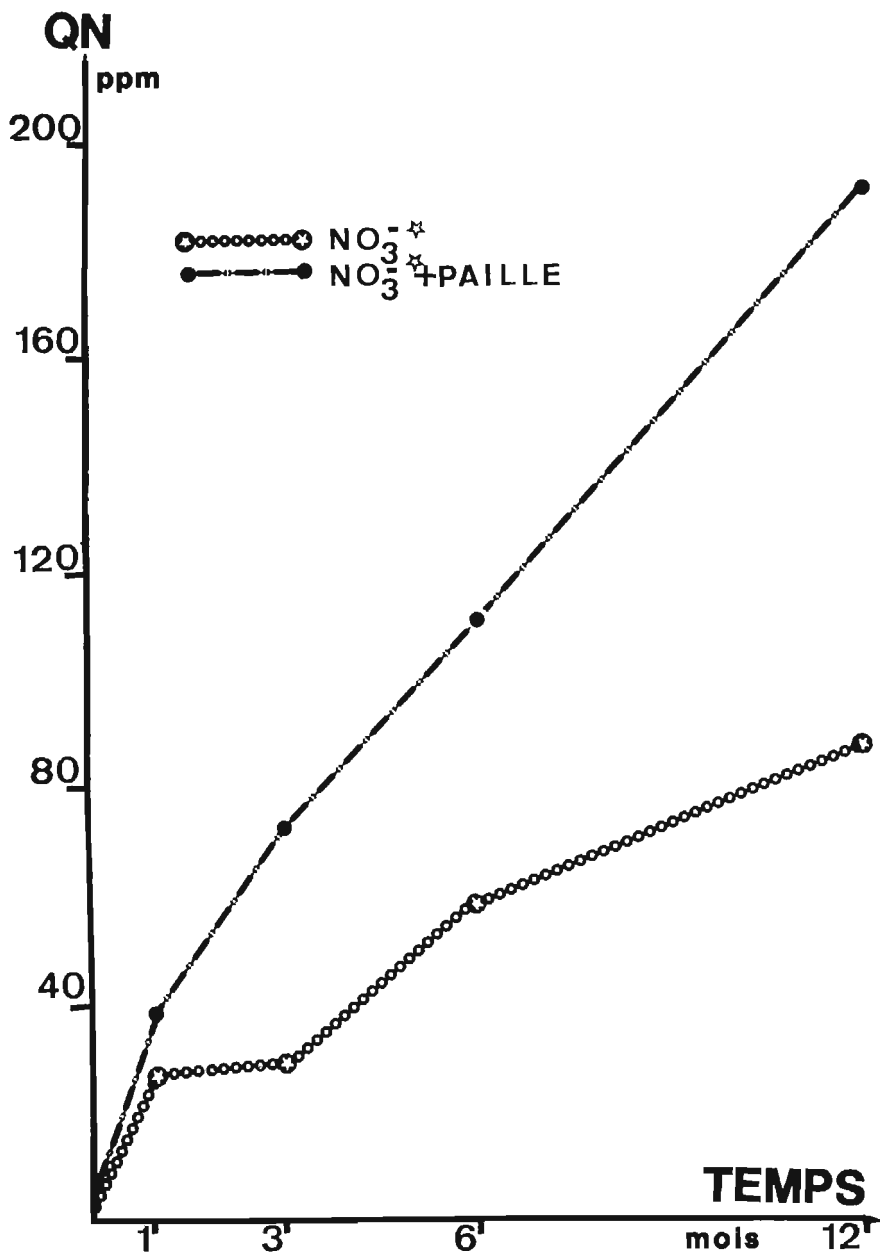


FIGURE II. — Minéralisation brute calculée par la formule de dilution isotopique (en ppm)

Gross mineralization by isotopic dilution

3) Les fuites sont proportionnelles à la quantité d'azote minéral présente dans les deux traitements.

Par fuite nous entendons l'azote minéral qui a été dénitrifié ou réorganisé sans faire de distinctions entre les deux voies.

Hypothèse 1) Dans ce cas, la minéralisation nette mesurée pour le témoin est considérée comme égale à la minéralisation brute et l'on peut comparer ces valeurs à celles obtenues pour le traitement avec nitrates (figure IV courbe 1). Il apparaît ainsi un priming effect, très nettement marqué le premier mois, de 25 ppm environ (75 kg/ha^{-1}), qui s'atténue par la suite, mais se poursuit cependant et atteint après un an 50 ppm.

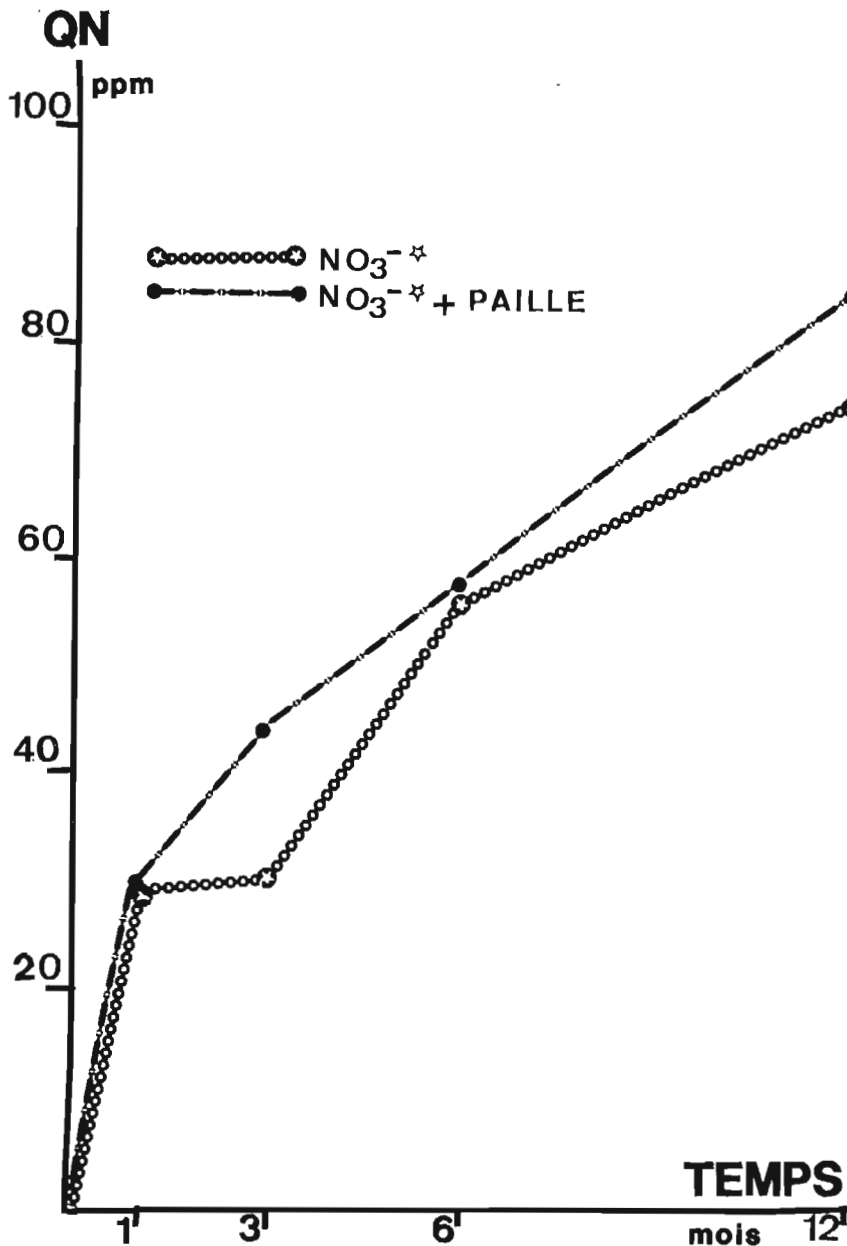


FIGURE III. — Minéralisation brute réelle (en ppm)

Real gross mineralization

Hypothèse 3) Il faut alors ajouter une quantité d'azote venant des fuites proportionnelle aux quantités de nitrates de chaque traitement (figure IV courbe 3). Durant le premier mois, il apparaît un priming effect (toujours de l'ordre de 25 ppm), mais ensuite aucune action de l'addition des nitrates n'est notée ni dans un sens ni dans l'autre.

Il semble bien que, durant le premier mois, on observe, dans nos conditions expérimentales au laboratoire, le phénomène qui a été bien souvent observé au champ, avec ou sans traceur, mais il est de moindre importance que les chiffres parfois avancés.

Suivant les hypothèses formulées, les conséquences ultérieures sont différentes et pourraient expliquer les résultats contradictoires relevés dans la littérature.

L'apport du traceur permet de mettre en évidence, même sans paille, des nitrifications brutes qui sont très supérieures aux nitrifications nettes et cette nitrification se produit même pendant les périodes d'intense organisation. Il a été observé un priming effect mais son importance réelle dépend d'hypothèses qui ne pourront être vérifiées qu'en apportant des faibles quantités d'azote ne perturbant pas le milieu.

III. — ÉVOLUTION DE L'AZOTE AJOUTÉ SOUS FORME ORGANIQUE.

III.1. MATERIEL ET METHODES.

Du ray-grass marqué à l'azote 15 ($N = 2,53\%$; ^{15}N excès : $11,49\%$; $C/N = 16$), obtenu au cours d'une culture sur sol en vase de végétation, a été broyé puis mélangé intimement au même sol brun (tableau 1) dans l'expérience décrite en II.

Cinq lots de 1 kg ainsi traités et des pots témoins de même poids ont été placés à l'obscurité, à $25^{\circ}C$, et, par pesée régulière, maintenus sensiblement à la capacité de rétention. Des échantillons ont été prélevés à 1, 3, 12 et 24 mois et, après séchage à l'air, l'azote minéral est extrait par une solution de KCl comme indiqué précédemment.

L'azote organique est fractionné par hydrolyse acide suivant la méthode ci-dessous, dérivée de celle de STEWART et al. (1963).

Sur le culot d'extraction (séparé par centrifugation et après rinçage à deux reprises avec de l'eau désionisée), on fait une agitation de 48 h avec HCl 12 N suivie d'une hydrolyse avec HCl 6 N pendant 16 h. On récupère ainsi deux fractions, séparées par une nouvelle centrifugation :

- Un résidu solide qui fournit la fraction insoluble dans l'acide (Nia) déterminée par Kjeldahl ;
- Une fraction liquide. Sur une aliquote de celle-ci, on mesure, par distillation directe en milieu alcalin, la fraction azotée soluble dans l'acide et distillable (N sad). Par Kjeldahl sur une autre partie aliquote, on obtient la fraction azotée soluble dans l'acide. En retranchant la fraction N sad de cette dernière, on détermine la fraction azotée soluble dans l'acide et qui est non distillable (N sand).

III.2. DISCUSSION.

a) Azote minéral :

Les premières observations que l'on peut faire concernent l'azote minéral. Si l'on excepte le premier mois, l'azote retrouvé sous forme ammoniacale est toujours très faible et il sera négligé. En deux ans (tableau 3), la nitrification nette est de 29 ppm dans le traitement témoin et atteint 209 ppm avec l'apport d'engrais vert ; la teneur isotopique des nitrates, dans ce second cas, permet de connaître l'origine de cet azote, c'est-à-dire s'il provient de l'azote du sol ou au contraire de l'azote du ray-grass enfoué. On peut ainsi calculer (figure V) qu'après deux ans, près de la moitié de l'azote du ray-grass se trouve nitrifiée (111 ppm). Cette nitrification, rapide le premier mois, se poursuit ensuite

	TEMPS Mois	0	1	3	12	24
TEMOIN	Q N ppm	7	9	11	31	36
RAY-GRASS	Q N ppm	7	68	127	189	216
	E %	0	7,58	7,78	6,20	5,88
	% ¹⁵ N Départ	0	18	34	40	44

UTILISATION ¹⁵N

TABLEAU 3. — Azote nitrique dans le sol

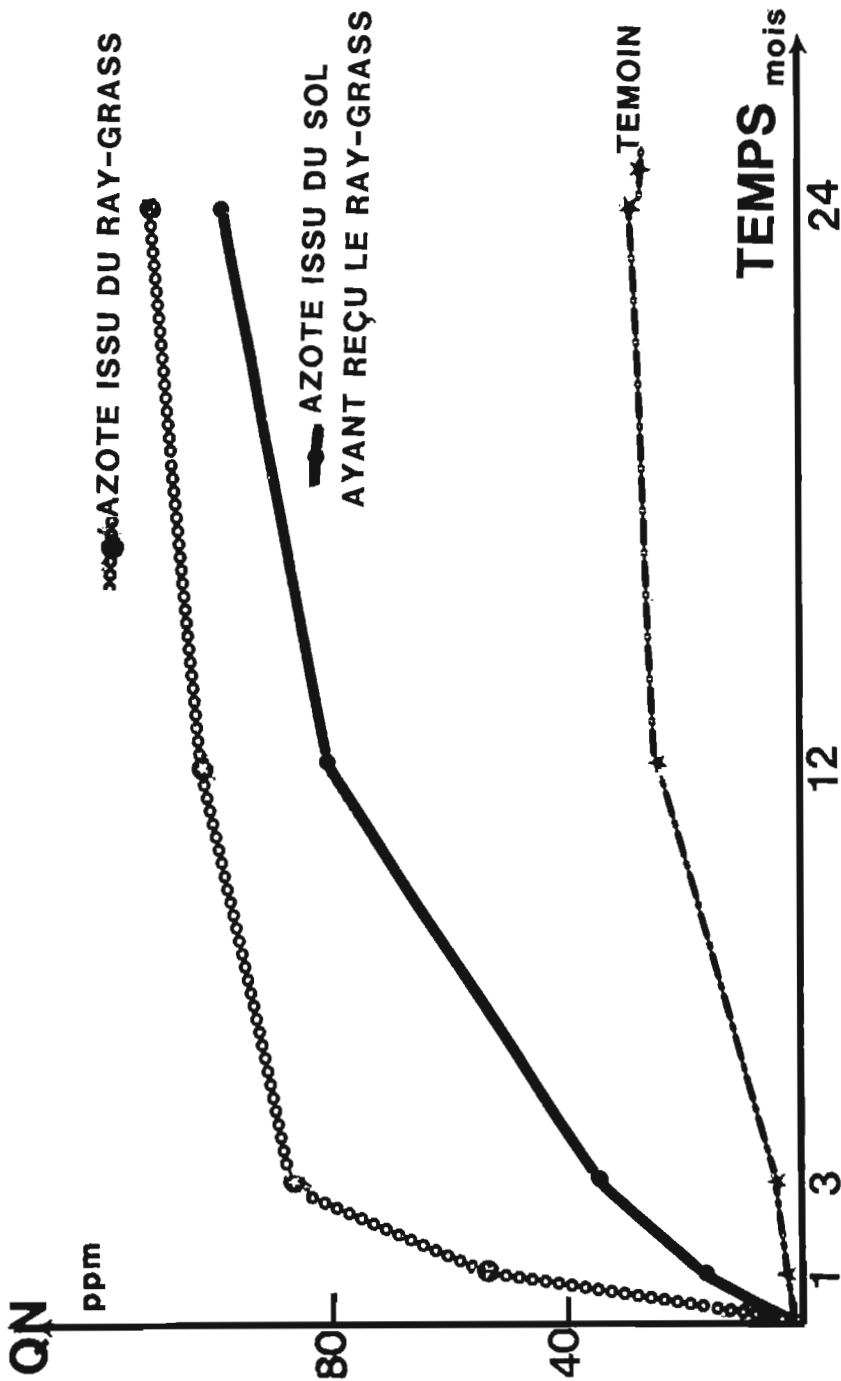


FIGURE V. — Nitrification de l'azote du sol et du ray-grass (en ppm)
Nitrification of soil and ray-grass nitrogen

avec une amplitude moindre ; elle représente environ 3 fois plus d'azote minéral que dans le traitement témoin. Le point le plus important concerne le fait qu'elle s'accompagne d'une minéralisation intense de l'azote du sol, toujours largement supérieure aussi à celle observée dans le témoin où elle persiste à peu près régulièrement durant toute la période d'incubation.

		TEMOIN	+ RAY-GRASS marqué**
NH ₄ ⁺	Q N*	/	/
	N ¹⁵ N		
NO ₃ ⁻	Q N	36	216
	Q ¹⁵ N		E % 5,88 12,70
N _{sd}	Q N	320	374
	Q ¹⁵ N		E % 0,94 3,52
N _{sand}	Q N	595	601
	Q ¹⁵ N		E % 1,95 11,69
N _{ia}	Q N	153	147
	Q ¹⁵ N		E % 0,78 1,15
Total	N	1104	1338
	¹⁵ N		29,06

TABLEAU 4. — Répartition de l'azote entre les différentes fractions organiques après 2 années d'enfouissement de ray-grass marqué

(* Les quantités sont exprimées en ppm)

N_{sd} : Azote soluble dans l'acide directement distillable.

N_{sand} : Azote soluble dans l'acide non directement distillable.

N_{ia} : Azote insoluble dans l'acide.

N balance sheet after 2 years (* in ppm)

N_{sd} : Distillableacid-soluble N.

N_{sand} : Non distillableacid-soluble N.

N_{ia} : Acid insoluble N.

Ce phénomène correspond au « priming effect » et l'on peut admettre qu'il a pour origine le développement de la flore minéralisatrice induit par l'apport de matière organique à rapport C/N faible.

Sans l'apport du traceur, on pourrait même penser que la quasi-totalité de l'azote de l'engrais vert est susceptible de nitrifier puisque l'augmentation, 180 ppm, représente 75 % de l'azote ainsi apporté.

b) Azote organique :**b 1) Fractionnement :**

Les résultats du fractionnement par hydrolyse acide après 2 ans d'incubation sont rassemblés dans le tableau 4.

Les bilans chimiques (N total de chaque fraction) laissent supposer qu'après 2 ans l'azote du ray-grass enfoui ne se retrouve que sous forme nitrique et soluble acide distillable (N_{sd}). Alors que les quantités totales d'azote des fractions solubles dans l'acide non distillable et insoluble dans l'acide (N_{sand} et N_{ia}) du témoin et du traitement ray-grass sont égales, la présence d'azote 15 dans chacune d'entre elles indique qu'il y a eu transfert entre ces différentes formes.

C'est la fraction quantitativement la plus importante qui est la plus marquée. On est donc obligé d'admettre que tout ou partie de cette forme possède un turn-over très rapide et qu'elle est en relation directe avec les nitrates.

Si l'on compare les excès isotopiques des différentes formes d'azote observés dans cette expérience avec enfouissement de matière organique marquée à ceux déterminés après un apport de nitrate marqué à un sol additionné ou non de paille non marquée, on constate que l'ordre est le même, à savoir nitrate, N_{sand}, N_{sd} et N_{ia}.

Il est délicat de proposer une explication certaine de ce résultat, mais l'hypothèse la plus probable est que chacune des fractions organiques est, en réalité, composée de deux sous-fractions à vitesse de renouvellement différente : l'une se « marque », l'autre non. La valeur de l'excès isotopique atteint dans chacune d'elles permet d'apprécier la fraction mobile en faisant l'hypothèse que celle-ci possède l'excès de la forme minérale.

Cette hypothèse semble d'ailleurs raisonnable dans la mesure où dans cette expérience, comme dans celle précédemment citée, les cinétiques d'organisation sont relativement limitées, même après deux ans d'incubation. Ainsi (tableau 5), dans la fraction azote soluble dans l'acide non distillable, on trouve 11,7 ppm d'azote 15 ; si on suppose que l'azote a le même excès isotopique que les nitrates à ce moment-là, la quantité totale d'azote correspondante est de 199 ppm, soit 33 % de l'azote de cette fraction. Les valeurs pour les deux autres fractions sont encore plus faibles et, au total, ce serait seulement 25 % de l'azote organique qui serait concerné. Ces résultats illustrent, comme cela a déjà été signalé précédemment, que le fractionnement chimique n'est pas à l'image du turn-over de l'azote du sol car des composés réunis dans une même fraction ont des comportements totalement différents vis-à-vis de la microflore du sol.

b2) Effet résiduel :

Pour mesurer l'effet résiduel de cet enfouissement « d'engrais vert » pendant deux années, il a été procédé, d'une part, à une culture de ray-grass et, d'autre part, à une incubation supplémentaire en ajoutant 1 % de glucose.

Pour la culture de ray-grass (tableau 6), les nitrates présents dans le traitement ray-grass enfoui favorisent la végétation, mais il est très important de noter les prélèvements d'azote puisque ceux-ci sont multipliés par 5 par rapport au témoin.

Les bilans d'azote total et d'azote quinze après la culture sont largement déficitaires. Il manque $1338 - 1200 = 138$ ppm N et $29,06 - 22,09 = 6,97$ ppm ¹⁵N, soit de l'azote dont l'excès isotopique est légèrement supérieur à 5 %, c'est-à-dire voisin de celui des nitrates.

Cette remarque permet d'affirmer que l'azote perdu a été dénitrifié. Ce résultat montre que, même dans des périodes de consommation intense des nitrates, il peut exister une importante dénitrification touchant jusqu'à la moitié des nitrates présents. Il est probable qu'il faille incriminer l'effet des racines et plus précisément de leur microflore vivant des produits d'excrétion. S'il est difficile de nier l'existence de la dénitrification, il faut tout de même être extrêmement prudent dans sa quantification, étant donné l'erreur importante inévitable dans les mesures chimiques.

	QUANTITE d'AZOTE dans la fraction	QUANTITE d'AZOTE ¹⁵ dans la fraction	QUANTITE d'AZOTE correspondant à la quantité de ¹⁵ N	% de la FRACTION
	ppm	ppm	ppm	
Nsand	601	11,7	199	33
Nsad	374	3,5	59	16
Nia	147	1,1	19	13
TOTAL	1122	16,3	277	25

TABLEAU 5. — Bilan de l'organisation

	TEMOIN	+ RAY-GRASS marqué**
Matière sèche (en g)	1,21	2,12
Parties aériennes	Q N* Q ¹⁵ N	24,65 115,5 E % 5,45 6,29
Racines	Q N Q ¹⁵ N	15,10 26,8 E % 4,49 1,20
Sol	Q N Q ¹⁵ N	997 1058 E % 1,38 14,60
Total	Q N Q ¹⁵ N	1037 1200 22,09

TABLEAU 6. — *Bilan azote après une culture de ray-grass*

* Les quantités sont exprimées en mg (ou ppm, les quantités étant ramenées à 1 kg de sol)
Fate of N after ray-grass harvest (*in ppm)

Il semble que, lors de cette brève culture, l'azote organique contenu dans le sol n'ait pratiquement pas évolué, tout au moins d'une façon globale, puisque l'on retrouve 1058 ppm d'azote avec un excès moyen de 1,38 % alors qu'à l'origine on avait 1122 ppm avec un excès moyen de 1,45 %.

Lors de l'addition de glucose simulant, en première approximation tout au moins, les exsudats racinaires, on ne note pas de grandes variations en ce qui concerne le traitement témoin, mais la situation est radicalement différente dans l'autre traitement au sujet duquel plusieurs remarques peuvent être notées (tableau 7) :

— La quantité de nitrates décroît de même que leur excès isotopique, ce qui montre que la minéralisation se poursuit. Il est difficile de chiffrer avec précision la quantité ainsi nitrifiée puisque son origine n'est pas connue et peut correspondre à des formes plus ou moins marquées. La quantité maximale produite peut être calculée par la formule de dilution isotopique, en supposant que cet azote provient de matière organique non marquée et que l'excès isotopique de la fraction nitrrique a varié proportionnellement à la quantité de nitrates présents ; on obtient ainsi :

$$\frac{216 + 61}{2} \frac{5,88}{5,32} \left(\frac{5,88}{5,32} - 1 \right) = 14,6 \text{ ppm N}$$

— Les fractions organiques solubles dans l'acide se sont enrichies et en azote quatorze et en azote quinze. Pour la fraction Nsand, on constate un accroissement de 98 ppm N et de 4,8 ppm ¹⁵N, soit une forme dont l'excès moyen est de 4,9 %. Aux approximations expérimentales près, il semble bien que ce soit essen-

		NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	Nsad	Nsand	Nia	TOTAL
INCUBATION 2 ANS	Q N ppm	0	216	374	601	147	1338
	E %	0	5,88	0,94	1,95	0,78	/
	Q ¹⁵ N ppm	0	12,70	3,52	11,69	1,15	29,06
INCUBATION 2 ANS + GLUCOSE	Q N ppm	11	61	416	699	127	1314
	E %	0,227	5,32	1,21	2,36	0,91	/
	Q ¹⁵ N ppm	0,25	3,25	5,03	16,49	1,16	26,18

TABLEAU 7. — Bilan d'azote - Incubation avec du glucose - Traitement avec du ray-grass marqué

N balance sheet after 2 years and a further incubation period with glucose

tiellement le pool NO_3 qui ait alimenté cette fraction, car les deux teneurs isotopiques sont du même ordre de grandeur. Ce résultat est compatible avec celui obtenu durant des incubations avec des nitrates marqués où la fraction Nsand est celle possédant l'enrichissement en ^{15}N le plus élevé ; elle est donc en relation étroite avec un des pools les plus « marqués ». Par ailleurs, lors d'incubation avec des nitrates marqués, c'est cette fraction qui révèle toujours l'excès isotopique le plus important ;

- En ce qui concerne la fraction Nsad, le même calcul conduit à un excès moyen de 3,6 ‰, soit nettement inférieur à celui du pool nitrate ; il faut donc qu'il y ait eu un transfert d'une forme organique vers cette fraction et il semble que l'on puisse incriminer la fraction Nia car, alors que son excès isotopique croît, la quantité d'azote diminue.

En utilisant la même hypothèse que précédemment, à savoir que le traceur présent dans cette fraction a pour origine directe les nitrates, il est possible de calculer les quantités d'azote qui sont entrées (E) et sorties (S) de cette fraction. Il suffit pour cela de faire un bilan de l'azote total et de l'azote 15 (tableau 7).

On obtient $S = E + (147 - 127)$ (1)

$$E \frac{5,5}{100} = S \times \frac{0,85}{100} \quad (2)$$

(5,5 et 0,85 représentent l'excès isotopique moyen des deux fractions nitrates et Nia) d'où : $S = 23,62$ ppm N

$E = 3,65$ ppm N.

Nous avons précédemment calculé que la quantité maximale qui a nitrifié est de 14,6 ppm ; il est donc certain qu'une partie de l'azote ayant quitté cette fraction a rejoint une autre forme qui serait donc essentiellement la fraction soluble dans l'acide distillable.

Ces observations corroborent les résultats d'un essai précédent avec de la paille marquée où l'on était arrivé à la même conclusion par des méthodes légèrement différentes.

Alors que le bilan chimique fait apparaître une faible diminution, non significative, le bilan ^{15}N est réellement déficitaire de près de 3 ppm, soit environ 50 ppm d'azote. Ces pertes sont dues à la dénitrification.

IV. — CONCLUSION.

L'utilisation de l'azote 15 dans les recherches touchant à la science du sol s'est largement généralisée depuis une dizaine d'années, tant en France qu'à l'étranger, et les barrières d'ordre aussi bien financière que technologique sont tombées grâce notamment au développement de la spectrométrie optique pour les analyses isotopiques. Cependant, de graves lacunes subsistent et il reste encore beaucoup de recherches à effectuer (THENABADU, 1979).

Ainsi il a été possible de voir dans les exemples cités que le fractionnement par hydrolyse acide, qui est pourtant une technique classique permettant d'obtenir de précieux renseignements, est grandement insuffisant et ne rend pas compte des différences de comportement de certains composés intégrés dans une même fraction.

D'autres moyens d'investigations puissants sont actuellement disponibles (SCHNITZER, 1982), mais il n'en demeure pas moins que la technologie isotopique, que ce soit au niveau du traçage naturel ou du marquage artificiel, est actuellement la meilleure pour commencer à élucider les problèmes liés à la connaissance précise du cycle de l'azote. Cependant, lors de cette étude, nous avons constamment été obligés de faire des

hypothèses qui sont bien souvent criticables (ainsi l'hypothèse de variation linéaire des excès isotopiques sur une période donnée); nous avons aussi utilisé des formules qui, en toute rigueur, ne sont pas applicables (utilisation de la formule de dilution isotopique pour calculer la minéralisation brute). Il en résulte que, nonobstant les difficultés techniques de l'analyse isotopique, il faut toujours être très attentif à l'interprétation des résultats obtenus avec l'emploi de l'azote ¹⁵.

SUMMARY

NITROGEN ¹⁵ UTILIZATION IN SOIL SCIENCE

APPLICATION TO THE STUDY OF NITROGEN EVOLUTION BETWEEN MINERAL AND ORGANIC FORMS IN CALCAREOUS SOIL

In a calcareous soil nitrogen transformations are considered according to addition of traces in mineral or organic form.

— *The evolution of nitrate N applied to a calcareous soil has been followed with and without the addition of straw. It is well established that the use of ¹⁵N makes it possible to compare the gross and net nitrification rates (fig. I and III). The observed « priming effect » (fig. IV) should be interpreted in terms of the modifications in the nitrification-immobilization kinetics resulting from heavy fertilization rates. The net nitrification amounts to a third of the gross nitrification which goes on even in periods of high immobilization conditions;*

— ¹⁵N-labelled rye-grass with a $\frac{C}{N}$ ratio of 16 was added at a rate of 1%

W

(—) to a calcareous soil kept for two years at a constant moisture content.

W

Regular measurements of total and nitrate N made it possible to follow the mineralization of N in the rye-grass as well as its influence on the mineralization of soil N and to evaluate the N losses.

At the completion of the experiment about 40% of the N in the rye-grass was transformed nitrate N. An increase in the mineralization of soil N in the treated soil was observed when compared to the reference soil with no rye-grass added (Fig. VI). The recovery of the added ¹⁵N was complete and no denitrification loss was observed in spite of large amounts of nitrate N present (200 ppm) (Tab. 2).

In a second stage the residual soil was either given an application of glucose or cropped to rye-grass in a pot experiment.

After a 3-weeks incubation period most of the nitrate N was incorporated into the nondistillable acid-soluble N fraction (NDASN) and ¹⁵N losses amounted to about 10% (Tab. 5).

The pot experiment showed higher dry matter yield and total N recovery values in the pots with added rye-grass to the soil as compared to the reference pots (Tab. 4). Losses amounted to about 25% on the initial ¹⁵N values. This last result stresses the role of the crop in the denitrification process.

Bibliographie

- AIEA (1974). — Isotopes studies on wheat fertilization. Technical reports series n° 157. Vienna.
- FAUST H. (1982). — Stable isotopes in agriculture in Stable isotopes (Proc. 4th Int. Conf. Jülich, March 23-28, 1981). Amsterdam Elsevier, 421-431.
- GERBERG R., KROHN K., PEEK N., GOLDMAN C.R. (1976). — Denitrification studies with ^{15}N labeled nitrate Science, 192, 1220-1231.
- GUIRAUD G., BERLIER Y. (1971). — Etude au moyen de ^{15}N de l'influence de la paille sur l'utilisation par les plantes des engrais azotés. Recent Advances in plant nutrition Gordon and Breach Sciences Publishers, vol. 2, 407-415.
- GUIRAUD G., PACCHIANI L. (1973). — Acquisition et traitement en temps réel de données numériques d'analyses isotopiques d'azote par spectrométrie de masse. *Analusis*, 2 (4), 282-286.
- GUIRAUD G., FARDEAU J.-C. (1980). — Détermination isotopique par spectrométrie optique de composés faiblement enrichis en azote 15. *Analusis*, 8, n° 4, 148-152.
- HAUCK R.D., BREMNER J.-M. (1976). — Use of tracers for soil nitrogen research. *Adv. In Agron.* 28, 219-266.
- HAUCK R.D., BYSTROM M. (1970). — ^{15}N -A selected bibliography for agricultural scientists. The Iowa State University Press, Ames, Iowa.
- LINDEMANN Y., GUIRAUD G., CHRISTMANN J., AUGÉ G. (1981). — Estimation en plein champ du coefficient d'utilisation par les betteraves sucrières de l'azote minéral apporté. Colloque Humus-Azote, Reims, 175-180.
- MARIOTTI A. (1982). — Apport de la géochimie isotopique à la connaissance du cycle de l'azote. Thèse d'Etat, Université P.-M.-Curie, Paris-VI.
- MARTIN F., MAUDINAS B., CHEMARDIN M., GADAL P. (1981). — Preparation of submicrogram nitrogen samples for isotope analysis by the GSI emission spectrometer. *IJARI* 32, 215-217.
- NAUDE S.M. (1929). — An isotope of nitrogen, mass 15. *Phys. Rev.* 34, 1498.
- SCHNITZER M. (1982). — Quo vadis soil organic matter research ? 12th Int. Cong. of Soil Science New-Delhi, vol. 5, 67-78.
- STEWART B.A., PORTER L.K., JOHNSON D.D. (1963). — Immobilization and mineralization of nitrogen in several organic fractions of soil. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 27, 302-304.
- THENABADU M.V. (1979). — Isotope studies on loss of nitrogen fertilizers from soils. *Isotopes and radiation in research on soil plant relationships AIEA, Vienna*, 125-135.