HAL
open science

Calcul des flux d'azote dans les sols par traçage isotopique 15 N

Bruno Mary, Sylvie Recous

To cite this version:

Bruno Mary, Sylvie Recous. Calcul des flux d'azote dans les sols par traçage isotopique 15 N. INRA. Utilisation des isotopes stables pour l'étude du fonctionnement des plantes, 70, INRA Editions, 1995, Les Colloques de l'INRA, 2-7380-0606-X. hal-02776941

HAL Id: hal-02776941

https://hal.inrae.fr/hal-02776941

Submitted on 22 Mar 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Utilisation des isotopes stables pour l'étude du fonctionnement des plantes,
Paris (France) 16-17 décembre 1993
Ed. INRA, Paris 1995 (Les Colloques, n°70) pp 277-297

Calcul des flux d'azote dans les sols par traçage isotopique ^{15}N

B. MARY et S. RECOUS

Résumé - La minéralisation d'azote dans les sols est en fait la résultante de deux processus opposés et simultanés : la minéralisation (brute) et l'organisation (brute). Bien que ces processus soient tous les deux sous le contrôle de l'activité des micro-organismes du sol, ils sont en partie indépendants. Prévoir la disponibilité en azote minéral d'un sol suppose donc de déterminer et de modéliser chacun de ces processus. L'utilisation conjointe du traceur ^{15}N et de modèles de calcul permet d'accéder avec précision à ces flux d'azote dans différentes conditions : sol nu avec ou sans apport de résidus organiques, en conditions contrôlées ou *in situ*. Le calcul de la minéralisation brute repose sur le principe de la **dilution isotopique** du compartiment d'azote ammoniacal ; le calcul de l'organisation brute d'azote minéral est basé sur **l'enrichissement isotopique** du compartiment organique du sol. Les flux peuvent être calculés par des équations algébriques "classiques". Cependant, l'existence d'une préférence des micro-organismes pour la forme minérale NH_4^+, l'existence de processus de recyclage rapide d'azote provenant de la biomasse microbienne ("reminéralisation") font que les équations analytiques de calcul des flux sont souvent insuffisantes. Dans ce cas, il est nécessaire de recourir à une méthode d'**analyse compartimentale** utilisant une technique de résolution numérique couplée à une méthode d'ajustement non linéaire. Nous montrons l'intérêt d'une telle approche.

Mots clés : traçage isotopique ^{15}N, analyse compartimentale, minéralisation, organisation, azote du sol

Summary - Calculation of N transformation rates in soils using ^{15}N tracing techniques. Nitrogen mineralization in soils is the balance between two opposite and simultaneous processes : (gross) mineralization and (gross) immobilization. Both processes are controlled by the heterotrophic microbial activity, but their respective intensities can vary with time. Predicting mineral N availability in soil therefore requires to be able to measure and model each of these processes. Accurate determination of mineralization and immobilization fluxes can be made by using ^{15}N tracing techniques. Application of the isotopic dilution principle to the

labelled ammonium pool in soil allows to determine gross mineralization. Immobilization can be evaluated by labelling the soil mineral N and measuring the isotopic enrichment of the organic N pool. Calculations can be made with "classical" equations. However, these equations are often partially valid because of the preferential NH_4^+ uptake (compared to NO_3^-) by soil microorganisms and the existence of rapid recycling of N from microbial biomass. In this case, we propose to use a compartmental analysis method which includes a numerical integration method and a non linear fitting technique. This paper shows the interest of this approach to determine the rates of N transformations.

Key words : ^{15}N tracing techniques, compartmental analysis, mineralization, immobilization, soil mineral N

1. Introduction

La minéralisation nette d'azote minéral dans un sol est la différence entre la production d'azote minéral par minéralisation et la consommation microbienne par organisation. De nombreux travaux effectués au laboratoire avec le traceur ^{15}N ont montré que ces processus bruts (minéralisation et organisation) se produisent simultanément dans le sol. Plusieurs études récentes réalisées au champ confirment que ces processus sont simultanés et chacun de forte intensité (Schimel *et al.*, 1989 ; Jackson *et al.*, 1989 ; Davidson *et al.*, 1991 ; Recous *et al.*, 1992 ; Tietema et Wessel, 1992). Nous avons indiqué qu'au cours du cycle cultural, ces phénomènes sont probablement en bonne partie indépendants, même s'ils résultent tous les deux de l'action de micro-organismes hétérotrophes (Mary et Recous, 1994). Mieux prévoir la minéralisation nette suppose donc de prendre en compte ces deux flux séparément.

Plus généralement, l'objectif est de modéliser les principaux processus du cycle de l'azote dans le sol : minéralisation de l'azote organique, organisation de l'azote minéral, nitrification de l'ammonium, dénitrification biologique, volatilisation d'ammoniac (Figure 1). Pour déterminer ces flux, et tout particulièrement les flux de minéralisation et d'organisation, l'utilisation du ^{15}N et des méthodes de traçage isotopique est indispensable. Nous comparons dans cet article différentes méthodes de calcul des flux d'azote.

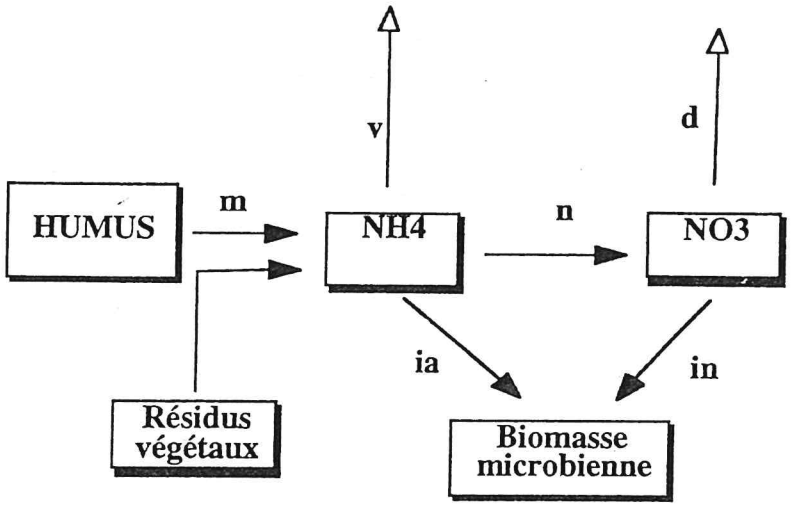

Figure 1. Représentation simplifiée des principaux flux d'azote dans le sol.
m : minéralisation de l'azote organique (humus et résidus organiques libres); v : volatilisation de l'ammoniac ; n : nitrification ; d : dénitrification ; i_a : organisation microbienne de l'azote ammoniacal ; i_n : organisation microbienne de l'azote nitrique.

2. Principe des méthodes de traçage isotopique et protocole expérimental

2.1. Définitions

On peut définir un compartiment comme un ensemble de molécules de même nature (exemple : compartiment d'azote ammoniacal) ou de molécules de nature chimique différente mais ayant une même dynamique d'évolution (exemple : compartiment biomasse microbienne). Nous exprimons sa taille en kg N ha^{-1}, ou en mg N kg^{-1} sol.

Les transferts de matière entre compartiments par unité de temps sont appelés "flux", par analogie aux flux de matière ou d'énergie définis en physique. Ils ont la même dimension, puisqu'ils sont exprimés en kg N ha^{-1} $jour^{-1}$. Cependant, la différence vient du fait qu'il s'agit dans notre cas de processus de transformations biochimiques, qui peuvent être effectués sans transport, alors qu'on considère en physique des déplacements de matière ou d'énergie dans l'espace (à travers une surface donnée), sans changement d'état.

2.2. Hypothèses

Les hypothèses généralement admises pour le traçage isotopique sont les suivantes :

1. L'homogénéité des compartiments
2. L'homogénéité de répartition du traceur dans chaque compartiment
3. L'absence de phénomènes de fractionnement isotopique
4. La constance des flux par intervalle de temps de mesure

L'hypothèse 1 est satisfaite lorsque les compartiments peuvent être correctement définis et mesurés. Pour s'appliquer, l'hypothèse 2 nécessite de pouvoir incorporer de façon homogène le traceur dans un (ou plusieurs) compartiment(s) au temps 0. Ceci est parfois difficile, surtout en conditions de champ. En ce qui concerne l'hypothèse 3, les phénomènes de fractionnement isotopique varient selon les processus. La minéralisation semble peu ou pas fractionnante (Mariotti, 1982). Les plus forts coefficients d'enrichissement isotopiques observés concernent la dénitrification (25 à 30 ‰) et la nitritation (en culture pure) qui atteint 35 ‰ (Mariotti *et al.*, 1981). Cependant, des mesures faites sur des sols au laboratoire et au champ font apparaître un moindre fractionnement au cours de la nitrification, puisque le coefficient d'enrichissement isotopique serait inférieur à 20 ‰ (Mariotti *et al.*, 1980). Il faut rappeler d'une part qu'il n'y a fractionnement isotopique que pour des réactions incomplètes, et que d'autre part la variation relative de la composition isotopique du produit formé est toujours inférieure au coefficient d'enrichissement isotopique. En conséquence, les erreurs relatives que l'on peut faire en négligeant l'existence de fractionnements isotopiques sont certainement inférieures à 2 %. Enfin, pour que l'hypothèse 4 soit acceptable, il faut choisir des pas de temps de mesure adaptés aux conditions expérimentales. Cette hypothèse n'est cependant pas indispensable dans le cas des méthodes d'analyse compartimentale, où l'on peut simuler des réactions d'ordre 1 ou de type Michaëlis-Menten (par exemple).

2.3. Méthodes de traçage isotopique

Les méthodes utilisées peuvent être réparties en 3 catégories :

1. Les méthodes de dilution isotopique
2. Les méthodes d'enrichissement isotopique
3. Les méthodes d'analyse compartimentale

La méthode de **dilution isotopique** s'applique dans le cas d'un compartiment initialement marqué, qui est ensuite alimenté par des **flux d'entrée non marqués**. Ce compartiment peut avoir ou non des flux de sortie.

La méthode **d'enrichissement isotopique** est applicable à un compartiment "d'accumulation", c'est-à-dire dont les **flux de sortie sont nuls ou négligeables**. Ce compartiment est alimenté par des flux d'entrée marqués.

Les méthodes d'analyse compartimentale sont de portée plus générale. On peut distinguer les méthodes "analytiques" qui proposent des équations (en général approchées) de résolution du système compartimental, et des méthodes "numériques" qui permettent de simuler n'importe quel système compartimental avec une très bonne précision de calcul.

Nous envisagerons ces 3 méthodes successivement.

2.4. Protocole expérimental

Nous présentons ici des résultats provenant d'une expérimentation faite au laboratoire. Après prélèvement au champ, le sol est tamisé à l'état humide et débarrassé des fragments organiques libres visibles. Les agrégats de sol d'une taille comprise entre 2 et 3 mm sont placés dans un cristallisoir où ils forment un massif constitué d'environ 4 couches d'agrégats. Ils reçoivent un apport uniforme de paille de blé finement broyée (de taille 20 µm), à une dose équivalente à 500 mg C kg^{-1} de sol sec. Un apport d'eau et de solution azotée est effectué simultanément, pour amener l'humidité du sol à une valeur favorable à la décomposition aérobie (correspondant à un potentiel hydrique de -30 kPa). L'apport d'azote est effectué soit sous forme $^{15}NH_4^+$ [apport de 25 mg N kg^{-1} sol sous forme $(NH_4)_2SO_4$ ayant un excès isotopique de 9,21 %], soit sous forme $^{15}NO_3^-$ (apport de 25 mg N kg^{-1} sol sous forme KNO_3 ayant un excès isotopique de 9,72 %). L'incubation est conduite pendant 14 jours à 15°C. Un deuxième apport azoté, identique au premier, est réalisé à t = 7 jours.

Les mesures effectuées portent sur la quantité de C minéralisé, les quantités et les excès isotopiques des 2 formes minérales ($N\text{-}NH_4^+$ et NO_3^-), la quantité et l'excès isotopique de l'azote organique. Les résultats obtenus sont présentés au tableau 1. Pendant cette courte incubation, l'azote organisé est supposé entièrement contenu dans la biomasse microbienne, et non encore humifié.

3. Méthode de dilution isotopique

En ce qui concerne les flux d'azote dans le sol, cette méthode est applicable au pool d'ammonium échangeable ou au pool de nitrate du sol, lorsque l'un de ces pools a été marqué.

Tableau 1. Quantités de N-NH_4 (A), de N-NO_3 (N), excès isotopiques de l'ammonium (Ea), du nitrate (En) et de l'azote organique (Eo) mesurés dans le sol au cours de l'incubation dans les traitements avec apport de $^{15}NH_4$ ou $^{15}NO_3$. Les flèches indiquent les dates d'apport de $^{15}NH_4$ ou $^{15}NO_3$.

Traitement $^{15}NH_4$

	Jours	A mg N/kg	N mg N/kg	Ea %	En %	Eo %
→	0,00	25,69	4,11	8,959	0,378	0,003
	1,79	16,62	10,25	8,328	5,248	0,028
	3,19	9,22	14,39	7,543	6,451	0,062
	4,94	2,22	16,01	5,354	6,933	0,093
	6,77	0,81	14,55	1,951	6,932	0,113
→	6,98	25,89	14,65	9,310	6,905	0,124
	8,77	17,09	19,94	8,802	7,638	0,158
	10,10	10,65	23,71	8,388	7,968	0,171
	11,73	6,50	26,29	7,805	8,183	0,182
	13,73	3,98	28,06	6,819	8,159	0,205

Traitement $^{15}NO_3$

	Jours	A mg N/kg	N mg N/kg	Ea %	En %	Eo %
→	0,00	1,28	30,12	0,192	8,071	0,003
	1,79	1,00	27,79	0,410	8,101	0,018
	3,19	1,04	24,71	0,651	7,975	0,039
	4,94	0,59	20,25	0,820	7,848	0,073
	6,77	0,79	16,22	0,877	7,355	0,105
→	6,98	0,76	43,74	0,930	9,076	0,107
	8,77	0,89	40,29	0,988	8,806	0,122
	10,10	0,50	39,03	1,134	8,972	0,135
	11,73	0,63	37,12	1,258	8,843	0,156
	13,73	0,54	36,30	1,356	8,830	0,147

3.1. Application au calcul de la minéralisation brute d'azote avec un marquage $^{15}NH_4^+$

Après un apport ponctuel et réparti de façon homogène de $^{15}NH_4^+$ dans le sol, il est possible d'estimer le flux d'entrée dans le compartiment NH_4^+, c'est-à-dire le flux de minéralisation (appelé également minéralisation brute ou ammonification). Pour calculer ce flux, il est nécessaire de mesurer les variations des quantités de $N\text{-}NH_4^+$ et les variations de l'excès isotopique du pool d'ammonium échangeable au cours du temps. On constate en effet une diminution de l'excès isotopique du $N\text{-}NH_4^+$, en raison de la dilution de l'ammonium échangeable par le flux de minéralisation d'azote organique du sol, non marqué.

Depuis la première théorisation par Kirkham et Bartolomew (1954), cette approche a été tentée par d'assez nombreux auteurs, au laboratoire (Guiraud, 1984 ; Nishio *et al.*, 1985 ; Bjarnason, 1988 ; Nishio et Fujimoto, 1989) ou *in situ* (Blackburn, 1979 ; Labroue *et al.*, 1985 ; Barraclough et Smith, 1987 ; Davidson *et al.*, 1991). Nous développons ici les formules de calcul, pour le modèle décrit à la figure 1.

Soit :

A	la quantité de $N\text{-}NH_4^+$ échangeable (moles) au temps t
A^*	la quantité de $^{15}N\text{-}NH_4^+$ échangeable (moles) au temps t
a_a	l'abondance isotopique du $N\text{-}NH_4^+$ (atomes %) au temps t
e_a	l'excès isotopique du $N\text{-}NH_4^+$ (atomes %) au temps t
a_o	l'abondance isotopique naturelle de l'azote du sol (atomes %)

Sur chaque intervalle de temps $[t_1, t_2]$, les équations de conservation de masse s'écrivent :

$$\frac{dA}{dt} = m - (n + i_a + v) \tag{1}$$

$$\frac{dA^*}{dt} = m \cdot a_o - (n + i_a + v) \cdot a_a \tag{2}$$

On déduit de ces 2 relations l'équation différentielle de dilution :

$$\frac{da_a}{dt} = -\frac{m \cdot (a_a - a_o)}{A} \tag{3}$$

qui peut aussi s'écrire :

$$\frac{de_a}{dt} = -\frac{m \cdot e_a}{A} \tag{4}$$

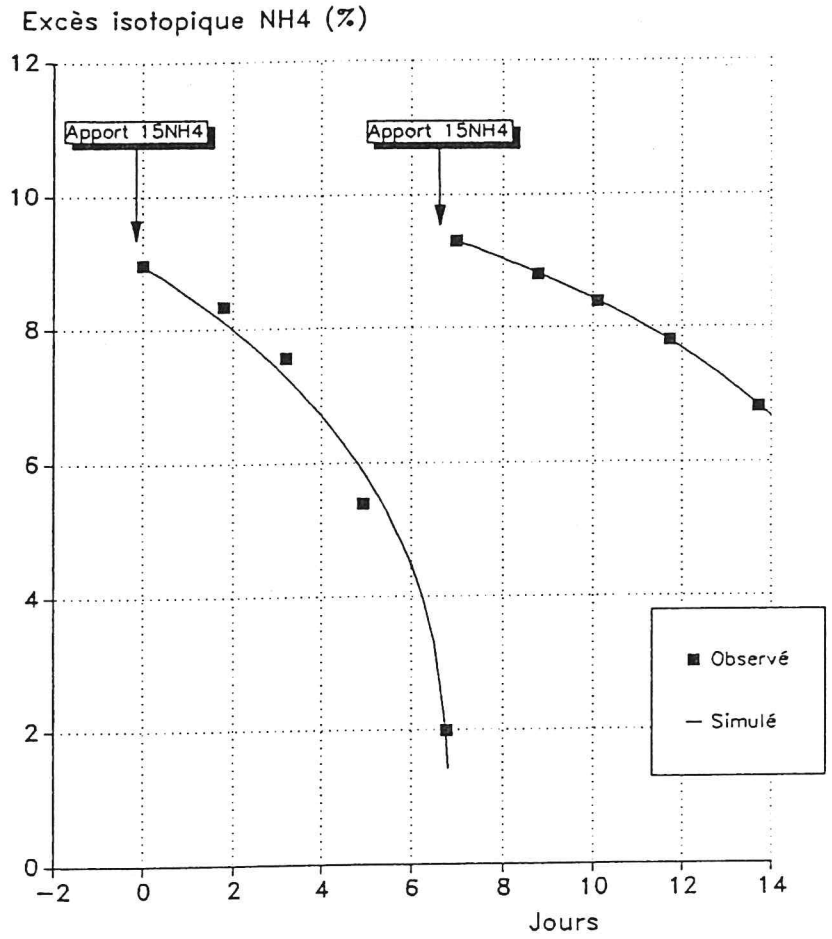

Figure 2. Cinétique de dilution isotopique de l'ammonium échangeable dans le sol, dans le traitement avec 2 apports de $^{15}NH_4$.

Dans le cas où la quantité d'ammonium et son excès isotopique varient peu pendant l'intervalle de temps t, l'équation (9) peut se simplifier comme suit :

$$m = \frac{\overline{A}}{\Delta t} \cdot \left(1 - \frac{e_{a2}}{e_{a1}}\right) \tag{10}$$

C'est l'équation "classique" de dilution isotopique (Guiraud, 1985).

L'excès isotopique moyen du N-NH_4^+ pendant l'intervalle de temps t est défini par :

$$\overline{e_a} = \frac{\int_{t_1}^{t_2} e_a \cdot dt}{\Delta t} \tag{11}$$

L'intégration des équations (1), (2) et (4) donne, dans le cas général [1] :

$$A = A_1 \cdot (1 + \alpha \cdot t) \tag{5}$$

$$e_a = e_{a1} \cdot (1 + \alpha \cdot t)^{\beta} \tag{6}$$

avec

$$\alpha = \frac{(m - n - i_a - v)}{A_1} \tag{7}$$

$$\beta = \frac{-m}{(m - n - i_a - v)} \tag{8}$$

La quantité de $N\text{-}NH_4^+$ (A) évolue de façon linéaire pendant chaque intervalle de temps [t_1, t_2] puisque les flux ont été supposés constants. Son excès isotopique (e_a) décroît selon une fonction puissance [1].

La décroissance de l'excès isotopique de l'ammonium selon une fonction puissance est effectivement constatée dans l'expérimentation que nous avons présentée, faite au laboratoire (Figure 2). Elle peut aussi s'observer dans des expérimentations faites au champ (Morvan, communication personnelle).

A partir des équations (5) et (6), il est possible de calculer le flux de minéralisation pendant chaque intervalle de temps [t_1, t_2] :

$$m = -\frac{\Delta A}{\Delta t} \cdot \frac{ln(e_{a2}/e_{a1})}{ln(A_2/A_1)} \tag{9}$$

Cette équation est assez similaire à celle qui avait été proposée par Kirkham et Bartholomew (1954). Cependant, la formule proposée par ces auteurs faisait intervenir l'abondance isotopique au lieu de l'excès isotopique ; cette formulation est incorrecte, comme l'ont confirmé Blackburn (1979) ainsi que Wessel et Tietema (1992). D'autre part, la formule de Kirkham et Bartholomew fait intervenir la quantité d'azote minéral au lieu de la quantité d'azote ammoniacal ; ceci est également incorrect, puisque la minéralisation d'azote non marqué par le sol se traduit d'abord par la formation d'azote ammoniacal, et non de nitrate. La dilution isotopique résultant de la minéralisation affecte donc le pool d'ammonium, et non l'ensemble de l'azote minéral.

---

1 Sauf dans le cas particulier où le pool d'ammonium est à l'état stationnaire, où l'on a :

$$e_a = e_{a1} \cdot e^{\beta t} \qquad \text{avec} \qquad \beta = \frac{-m}{A}$$

Compte tenu de l'équation (5), on obtient :

$$\overline{e_a} = \frac{\Delta A^*}{(1+\beta)\cdot \Delta A} \qquad (12)$$

Les résultats expérimentaux que nous avons obtenus sur le traitement $^{15}NH_4^+$ (correspondant à la figure 2) nous permettent de calculer le flux de minéralisation **m** (Figure 4). La vitesse de minéralisation diminue d'une valeur initiale moyenne de 0,85 mg N kg^{-1}sol j^{-1} à une valeur de 0,35 mg N kg^{-1}sol j^{-1} après 10 jours. La minéralisation cumulée à t = 14 jours a été de 9,2 mg N kg^{-1}sol.

3.2. Application au calcul de la nitrification avec un marquage $^{15}NO_3^-$

D'une façon similaire, on peut déterminer le flux d'entrée dans le compartiment NO_3^- (c'est-à-dire le flux de nitrification), en réalisant un apport ponctuel et réparti de façon homogène de $^{15}NO_3^-$ dans le sol. On utilise pour cela la courbe d'évolution de l'excès isotopique du pool de nitrate du sol au cours du temps. On constate en effet une diminution régulière de l'excès isotopique du N-NO_3^- au cours du temps, qui résulte de la dilution du compartiment nitrate par le flux de nitrification de l'azote ammoniacal, non marqué.

Soit :
- N la quantité de N-NO_3^- (moles) au temps t
- N^* la quantité de ^{15}N-NO_3^- en excès (moles) au temps t
- e_n l'excès isotopique du N-NO_3^- (atomes %) au temps t

Le même type de calcul s'applique, donnant des formules similaires [2]:

$$N = N_1 \cdot (1+\lambda \cdot t) \qquad (13)$$

$$e_n = e_{n1} \cdot (1+\lambda \cdot t)^{\mu} \qquad (14)$$

$$N^* = N_1^* \cdot (1+\lambda \cdot t)^{1+\mu} \qquad (15)$$

avec

$$\lambda = \frac{(n - i_n - d)}{N_1} \qquad (16)$$

---

2 Sauf dans le cas particulier où le pool de nitrate est à l'état stationnaire, où l'on a :

$$e_n = e_{n1} \cdot e^{\mu t} \qquad \text{avec} \qquad \mu = \frac{-n}{N}$$

$$\mu = \frac{-n}{(n - i_n - d)} \tag{17}$$

La quantité de N-NO_3^- (N) évolue de façon linéaire pendant chaque intervalle de temps [t_1, t_2], puisque les flux ont été supposés constants. Son excès isotopique (e_n) et la quantité de traceur ^{15}N (N^*) décroissent selon une fonction puissance [2].

La décroissance de l'excès isotopique du nitrate selon une fonction puissance est effectivement constatée dans notre expérimentation (Figure 3). La dilution isotopique est toutefois beaucoup moins grande que celle observée pour l'ammonium, car la quantité de nitrate reste importante alors que la quantité d'ammonium tend vers 0 (Tableau 1).

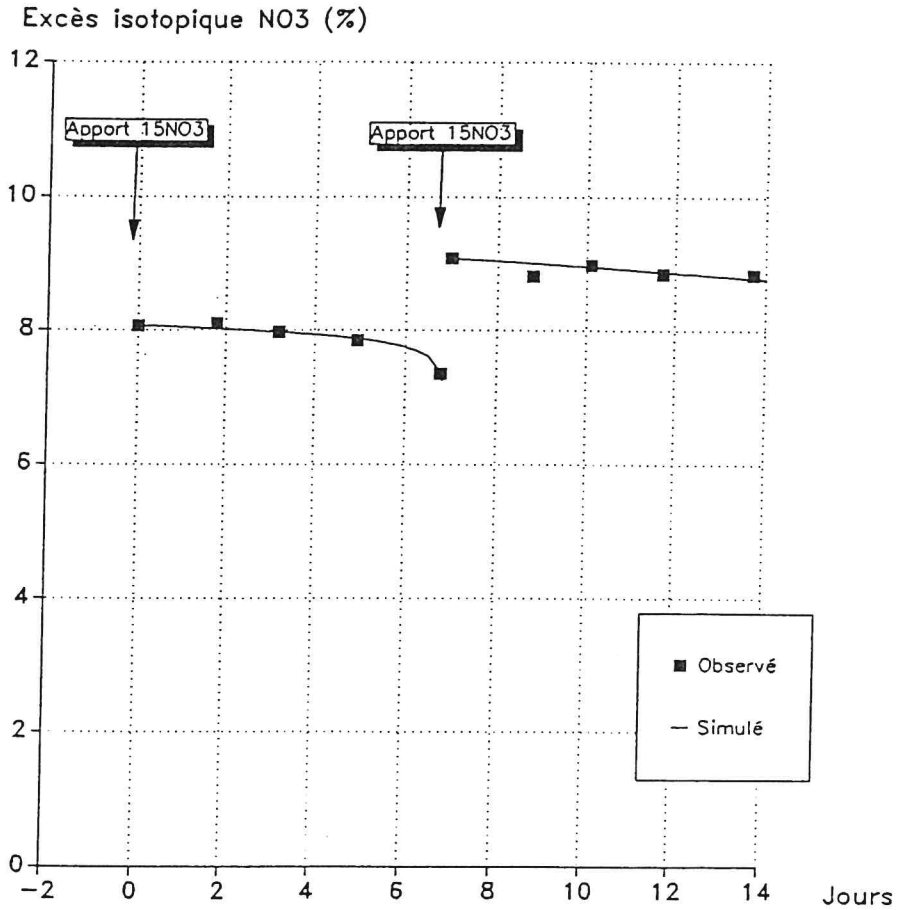

Figure 3. Cinétique de dilution isotopique de l'azote nitrique dans le sol, dans le traitement avec 2 apports de $^{15}NO_3$.

A partir des équations (13) et (14), on peut calculer le flux de nitrification :

$$n = -\frac{\Delta N}{\Delta t} \cdot \frac{ln(e_{n2}/e_{n1})}{ln(N_2/N_1)} \tag{18}$$

Dans le cas où la quantité de nitrate et son excès isotopique varient peu pendant l'intervalle de temps t, cette équation peut se simplifier comme suit :

$$n = \frac{\overline{N}}{\Delta t} \cdot \left(1 - \frac{e_{n2}}{e_{n1}}\right) \tag{19}$$

C'est également une équation "classique" de dilution isotopique.

On peut ensuite calculer l'excès isotopique moyen du N-NO_3^- pendant l'intervalle de temps t :

$$\overline{e_n} = \frac{\int_{t_1}^{t_2} e_n . dt}{\Delta t} \tag{20}$$

$$\overline{e_n} = \frac{\Delta N^*}{(1+\mu)\Delta N} \tag{21}$$

Dans le cas des résultats expérimentaux que nous avons obtenus sur le traitement $^{15}NO_3^-$, le flux de nitrification moyen **n** a été en moyenne de 0,23 mg N kg^{-1} sol j^{-1} sur la période 0-14 jours (Figure 4) soit 3,2 mg N kg^{-1} sol en 14 jours. Ce flux est faible parce qu'aucun apport de NH_4^+ n'a été réalisé. Il est inférieur à la minéralisation brute mesurée dans le traitement $^{15}NH_4^+$ (9,2 mg N kg^{-1} sol). Cet écart correspond à l'organisation brute du $^{15}NH_4^+$ soit 6 mg N kg^{-1} sol.

4. Méthode d'enrichissement isotopique

Comme nous l'avons déjà mentionné, cette méthode est applicable à un compartiment dont les flux de sortie sont nuls ou négligeables. Cette hypothèse s'applique en première approximation au compartiment N organique dans un sol, dans les premières phases de décomposition de résidus de culture comme les pailles. On estime en effet que les processus de "reminéralisation" correspondant au recyclage de l'azote précédemment organisé peuvent être négligés.

La variation de la quantité de traceur ^{15}N arrivant dans le compartiment N organique pendant l'intervalle de temps dt est alors égale à :

$$\frac{dN_o^*}{dt} = e_a \cdot i_a + e_n \cdot i_n \tag{22}$$

4.1. Application au calcul de l'organisation de l'ammonium avec un marquage $^{15}NH_4^+$

Dans le cas où le nitrate n'est pas marqué ou si l'organisation microbienne du nitrate est nulle, cette équation se simplifie :

$$\frac{dN_o^*}{dt} = e_a \cdot i_a \tag{23}$$

Compte-tenu de l'équation (6), cette équation s'intègre comme suit :

$$N_o^* = A_1^* \cdot \frac{i_a}{i_a + n + v} \cdot \left(1 - (1 + \alpha \cdot t)^{1+\beta}\right) \tag{24}$$

La quantité de ^{15}N organique (N_O*) doit donc augmenter selon cette fonction puissance, toujours dans le cas où les flux sont constants pendant chaque intervalle de temps et à condition que l'organisation du nitrate soit nulle.

A partir des équations précédentes, on peut calculer le flux d'organisation de l'ammonium :

$$i_a = \frac{\Delta N_o^*}{\int_{t_1}^{t_2} e_a \cdot dt} \tag{25}$$

$$i_a = \frac{1}{\overline{e_a}} \cdot \frac{\Delta N_o^*}{\Delta t} \tag{26}$$

En toute rigueur, l'excès isotopique moyen de l'ammonium doit être calculé par la relation (8). Cet excès moyen est parfois calculé comme étant la moyenne arithmétique des excès mesurés au début et à la fin de l'intervalle de mesure (Guiraud, 1985) :

$$\overline{e_a} = \frac{e_{a1} + e_{a2}}{2}$$

Cependant, cette formule n'est qu'une approximation.

Les résultats expérimentaux que nous avons obtenus sur le traitement $^{15}NH_4^+$ permettent de calculer la vitesse d'organisation de l'azote ammoniacal i_a, toujours en supposant que l'organisation du nitrate était nulle. Le flux d'organisation i_a a été d'environ 3 mg N kg^{-1}sol j^{-1} jusqu'à 7 jours, puis a diminué pour atteindre environ 1 mg N kg^{-1}sol j^{-1} après 9 jours (Figure 5). L'organisation cumulée à 14 jours a été de 27,5 mg N kg^{-1}sol, alors que la minéralisation brute cumulée a été de 9,2 mg N kg^{-1}sol. La minéralisation nette (différence entre minéralisation et organisation du NH_4^+) a donc été négative : -18,3 mg N kg^{-1}sol. Ceci résulte bien sûr de la forte organisation microbienne de l'azote associée à la décomposition de la paille.

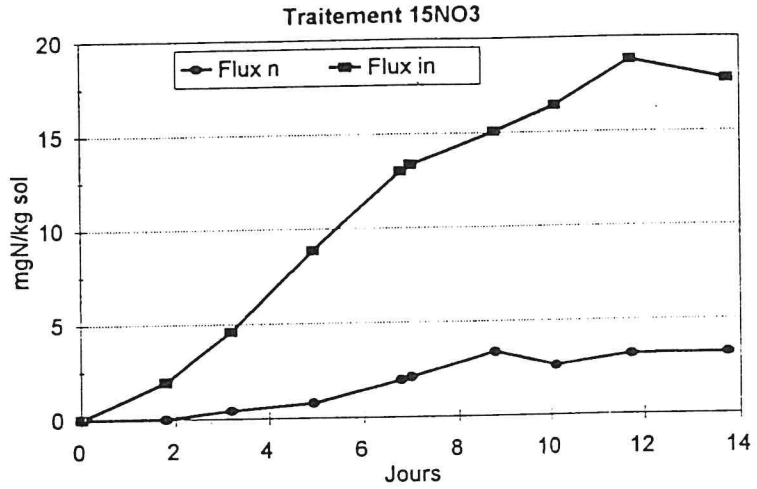

Figure 4. Flux cumulés de nitrification (**n**) et d'organisation du nitrate (i_n) calculés dans le traitement $^{15}NO_3$ d'après les équations (18) et (30).

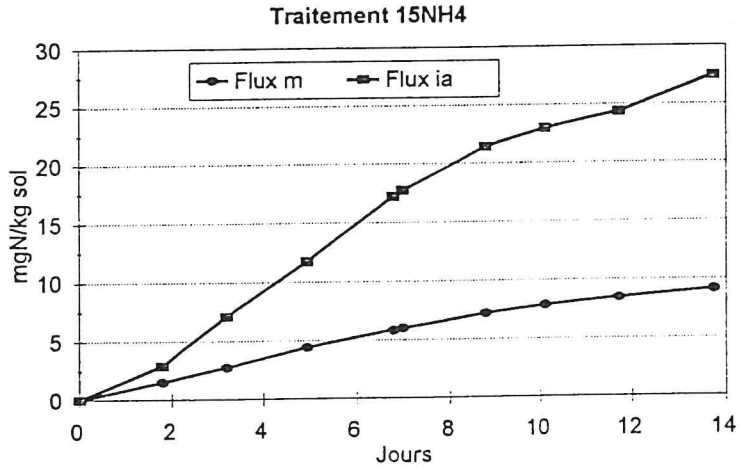

Figure 5. Flux cumulés de minéralisation (**m**) et d'organisation de l'ammonium (i_a) calculés dans le traitement $^{15}NH_4$ d'après les équations (9) et (26).

4.2. Application au calcul de l'organisation du nitrate avec un marquage $^{15}NO_3^-$

Dans le cas où seul le nitrate reste marqué, l'équation (22) s'écrit :

$$\frac{dN_o^*}{dt} = e_n \cdot i_n \tag{27}$$

Son intégration donne :

$$N_o^* = N_1^* \cdot \frac{i_n}{i_n + d} \cdot \left(1 - (1 + \lambda \cdot t)^{1+\mu}\right) \tag{28}$$

A partir de l'équation (27), on peut calculer le flux d'organisation du nitrate :

$$i_n = \frac{\Delta N_o^*}{\int_{t_1}^{t_2} e_n \cdot dt} \tag{29}$$

$$i_n = \frac{1}{\overline{e_n}} \cdot \frac{\Delta N_o^*}{\Delta t} \tag{30}$$

Dans le cas des résultats expérimentaux que nous avons obtenus sur le traitement $^{15}NO_3^-$, le flux d'organisation de l'azote nitrique $\mathbf{i_n}$ a varié entre 1 et 2,4 mg N kg^{-1}sol j^{-1} entre 0 et 12 jours (Figure 4). Le flux d'organisation aurait été négatif entre 12 et 14 jours : ceci montre l'existence de processus de reminéralisation. L'organisation cumulée du nitrate à t = 12 jours, égale à 18,7 mg N kg^{-1}sol, a été nettement inférieure à l'organisation de l'ammonium calculée dans le traitement $^{15}NH_4^+$.

5. Méthode d'analyse compartimentale

Les équations de dilution ou d'enrichissement isotopique que nous venons de présenter ne sont pas toujours applicables. Elles ne sont plus rigoureuses lorsqu'il y a organisation simultanée du NH_4^+ et du NO_3^-. Elles ne sont pas applicables non plus s'il existe un recyclage de l'azote microbien, c'est à dire une reminéralisation.

Pour pallier à cette insuffisance, il est souhaitable de recourir aux méthodes d'analyse compartimentale "numériques", qui couplent 2 techniques mathématiques : une technique de résolution numérique du système différentiel (défini par les équations de conservation de masse de N et ^{15}N), et une technique d'ajustement non linéaire aux moindres carrés. Ces méthodes sont préférables aux méthodes analytiques traditionnelles, pour 2 raisons : d'une part, parce que les solutions données par les méthodes analytiques sont approchées (par exemple, le système décrit à la figure 4 n'est pas intégrable analytiquement) ; d'autre part, parce que les méthodes couplées fournissent des estimations statistiques précieuses : intervalles de confiance sur les paramètres, corrélations entre ces paramètres, qualité d'ajustement du modèle aux données. Une telle analyse

compartimentale a été proposée par Myrold et Tiedje (1986) et Tietema et Wessel (1992). Nous avons réalisé un logiciel permettant d'obtenir les paramètres de flux qui rendent minimal l'écart entre le "modèle" et les données expérimentales, tout en tenant compte de la variabilité expérimentale. Il minimise en effet l'estimateur des moindres carrés pondérés par l'estimation empirique de la variance (Huet *et al.*, 1992), défini par :

$$SCEP = \sum_{i=1}^{n}\left(\frac{1}{\sigma_i^2}\sum_{j=1}^{m}\left(\hat{Y}_{ij} - Y_{ij}\right)^2\right) \qquad (31)$$

où $i=1,n$ désigne le nombre de variables
$j=1,m$ désigne le nombre d'observations
σ_i^2 représente l'estimation empirique de la variance de la variable Y_i.

Deux conditions sont requises pour pouvoir utiliser cette analyse compartimentale :

1. Le nombre de paramètres de flux à estimer (N_f) doit être inférieur ou égal au nombre de variables mesurées (N_v).

2. Les variables mesurées et le protocole expérimental doivent être adéquats.

La condition 1 est facilement compréhensible : il s'agit d'avoir un système "déterminé" ou "surdéterminé", comme pour la résolution d'un système linéaire. Les paramètres seront estimés d'autant mieux que le système sera surdéterminé, c.a.d. que la différence N_v-N_f sera grande. La condition 2 est moins évidente mais peut s'illustrer avec un exemple. Si l'on utilise un marquage $^{15}NO_3^-$, le calcul du flux de minéralisation n'est pas possible même si la condition 1 est remplie. En effet, le pool d'ammonium restera pas ou peu marqué, et la quasi absence de dilution isotopique de ce pool empêchera toute estimation sérieuse de la minéralisation.

Si l'on considère le modèle de la figure 1, il comporte 6 flux à déterminer : **m**, **n**, $\mathbf{i_a}$, $\mathbf{i_n}$, **d**, **v**.

Le flux de volatilisation (**v**) est pratiquement nul dans nos conditions expérimentales. Le bilan ^{15}N est souvent très proche de 100 %, indiquant que les pertes gazeuses sont négligeables ou nulles. Dans ce cas nous avons 4 flux à déterminer. Lorsque ce bilan est incomplet, le flux de dénitrification (**d**) existe et nous avons alors 5 flux à déterminer.

Si l'on retient le traitement expérimental avec marquage initial du $^{15}NH_4^+$, les variables mesurées sont au nombre de 5 : **A**, **N**, $\mathbf{e_a}$, $\mathbf{e_n}$, $\mathbf{e_o}$ (e_o étant l'excès isotopique de l'azote organique). Il est donc théoriquement possible d'estimer les 4 ou 5 flux précédemment cités, tout au moins tant qu'il reste de l'ammonium marqué dans le sol.

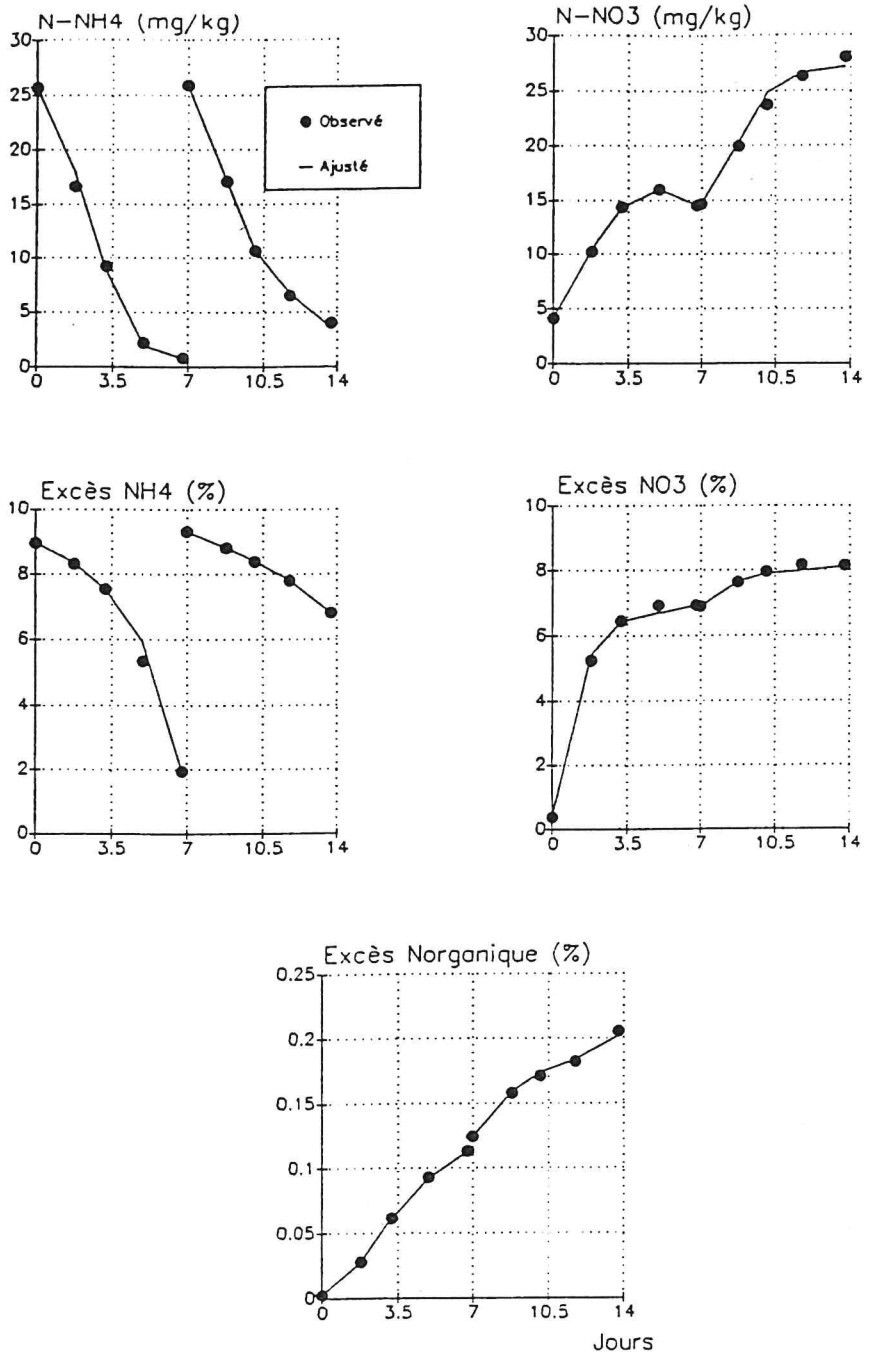

Figure 6. Evolution observée et simulée (par la méthode d'analyse compartimentale) des quantités et des excès isotopiques de NH_4, NO_3 et N organique du sol dans le traitement recevant 2 apports de $^{15}NH_4$.

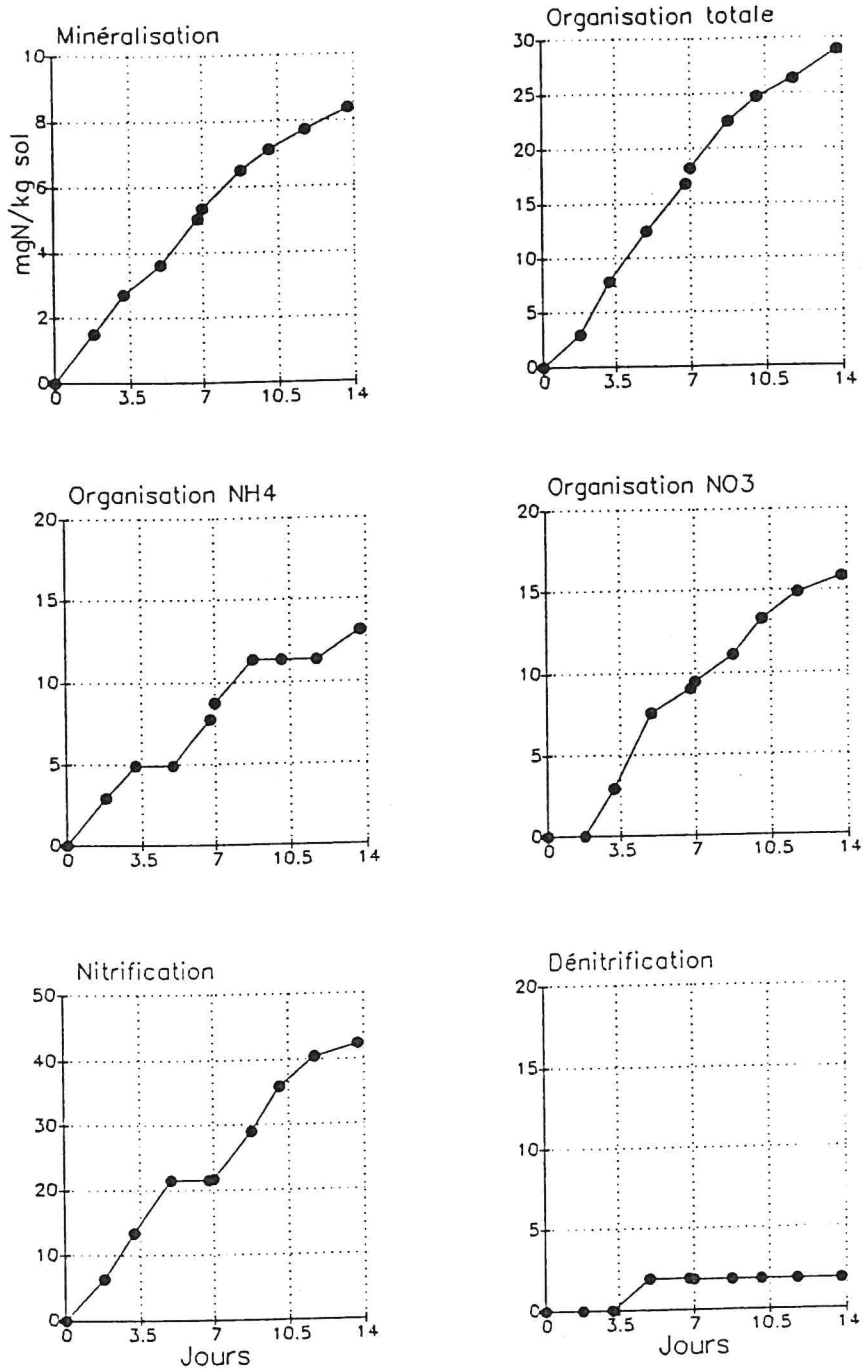

Figure 7. Flux cumulés de minéralisation, organisation de NH_4 et NO_3, nitrification et dénitrification calculés par la méthode d'analyse compartimentale dans le traitement recevant 2 apports de $^{15}NH_4$.

Nous avons pu constater l'intérêt de la méthode d'analyse compartimentale dans le cas du traitement $^{15}NH_4^+$ pour simuler les variables mesurées (Figure 6) et pour estimer simultanément tous les flux d'azote (Figure 7). La bonne adéquation qui est obtenue entre les valeurs simulées et observées des 5 variables confirme la validité du modèle compartimental défini à la figure 1. La cinétique de minéralisation obtenue (Figure 7) est proche de celle précédemment calculée par dilution isotopique (Figure 5). Par contre, le modèle indique qu'il y a une organisation aux dépends de l'ammonium **et** du nitrate, en quantités comparables (Figure 7). L'organisation du nitrate marqué se produit après nitrification de l'ammonium marqué. L'hypothèse d'organisation exclusive de l'ammonium utilisée précédemment n'était donc pas justifiée. L'organisation de l'ammonium calculée par cette première méthode était erronée (Figure 5) : elle est effectivement très différente de celle que nous obtenons par la méthode d'analyse compartimentale.

6. Conclusion

Cet exemple illustre tout l'intérêt de l'analyse compartimentale pour évaluer des flux d'azote dans le sol. Les méthodes de dilution ou d'enrichissement isotopique permettent de fournir des valeurs approchées des flux : ces valeurs sont utilisées avec profit comme valeurs initiales dans le processus itératif d'ajustement non linéaire de la méthode compartimentale. Les avantages de la méthode compartimentale sont notamment :

- la prise en compte de la variabilité des mesures expérimentales (par l'utilisation de l'estimateur *SCEP* : somme des carrés des écarts pondérés par la variance),

- l'ajustement simultané de tous les paramètres de flux (au lieu d'une estimation successive, qui fait reporter les erreurs sur les derniers flux estimés),

- l'obtention d'un intervalle de confiance sur les paramètres : il dépend de la variabilité des mesures, de la qualité d'ajustement du modèle et de la corrélation entre paramètres ; ces deux derniers critères apparaissent également dans les sorties du programme,

- la rapidité de mise en oeuvre du logiciel sur les micro-ordinateurs actuels,

- la possibilité de faire soit des ajustements, soit des simulations (avec différents jeux de données ou de paramètres).

Lorsque le système expérimental le permet, il est particulièrement intéressant de combiner plusieurs traitements identiques d'un point de vue N total, mais qui diffèrent par le marquage ^{15}N, ainsi que l'a proposé Barraclough (1991). Par exemple, un couple de traitements avec apport de (x moles de NH_4 marqué et y

moles de NO_3 non marqué) ou (*x* moles de NH_4 non marqué et *y* moles de NO_3 marqué) fournit 8 variables indépendantes au lieu de 5 avec un seul traitement. Il est alors possible de déterminer les flux avec une grande précision, et d'évaluer éventuellement d'autres flux non pris en compte initialement (tels que la reminéralisation et l'humification de l'azote microbien).

Ce type de démarche peut être étendu à d'autres domaines : l'absorption racinaire du nitrate (Devienne *et al.*, 1994), le métabolisme azoté ou/et le métabolisme carboné dans la plante, en utilisant le traceur ^{13}C ou ^{14}C.

Remerciements

Les auteurs remercient S. Nauwynck pour la réalisation technique de l'expérimentation et O. Delfosse pour les analyses isotopiques.

7. Bibliographie

Barraclough D. et Smith M.J., 1987. The estimation of mineralization, immobilization and nitrification in nitrogen-15 field experiments using computer simulation. Journal of Soil Science, 38 : 519-530.

Barraclough D., 1991. The use of mean pool abundances to interpret ^{15}N tracer experiments. Plant and Soil, 131 : 89-96.

Bjarnason S., 1988. Calculation of gross nitrogen immobilization and mineralization in soil. Journal of Soil Science, 39 : 393-406.

Blackburn T.H., 1979. Method for measuring rates of NH_4^+ turnover in anoxic marine sediments, using a ^{15}N-NH_4^+ dilution technique. Applied and Environmental Microbiology, 37 : 760-765.

Davidson E.A., Hart S.C., Shanks C.A. et Firestone M.K., 1991. Measuring gross nitrogen mineralization, immobilization, and nitrification by ^{15}N isotopic pool dilution in intact soil cores. Journal of Soil Science, 42 : 335-349.

Devienne F., Lamaze T. et Mary B., 1994. Détermination des flux d'absorption racinaire de nitrate à l'aide de marquages ^{15}N. Dans cet ouvrage.

Guiraud G., 1984. Contribution du marquage isotopique à l'évaluation des transferts d'azote entre les compartiments organiques et minéraux dans les systèmes sol-plante. Thèse de Doctorat Université P.M. Curie, 334 p.

Huet S., Jolivet E. et Messean A, 1992. La régression non-linéaire : méthodes et applications en biologie. INRA éditions, 236 p.

Jackson L.E., Schimel J.P. et Firestone M.K., 1989. Short-term partitioning of ammonium and nitrate between plants and microbes in an annual grassland. Soil Biology and Biochemistry, 21 : 409-415.

Kirkham D. et Bartholomew W.V., 1954. Equations for following nutrient transformations in soil utilizing tracer data. Soil Science Society of America Proceedings, 18 : 33-34.

Labroue L., Vidal W., Tosca J.C. et Berge P., 1985. Transferts d'azote minéral dans les sols froids : essai de traçage isotopique *in situ*. Soil Biology and Biochemistry, 17 : 683-689.

Mariotti A., Muller J.C., Guillemot J. et Marne E., 1980. Variations de la composition isotopique naturelle de l'azote minéral de sols carbonatés, suivies en incubation et au champ. Science du Sol, 2 : 141-159.

Mariotti A., Germon J.C., Hubert P., Kaiser P., Letolle R., Tardieux A. et Tardieux P., 1981. Experimental determination of nitrogen kinetic isotope fractionation. Some principles ; illustration for the denitrification and nitrification processes. Plant and Soil, 62 : 413-430.

Mariotti A., 1982. Apports de la géochimie isotopique à la connaissance du cycle de l'azote. Thèse de Doctorat d'Etat, Université P.M. Curie, 465 p.

Mary B. et Recous S., 1994. Measurement of nitrogen mineralisation and immobilisation fluxes in soil as a mean of predicting net mineralisation. European Journal of Agronomy, accepté pour publication.

Myrold D.D. et Tiedje J.M., 1986. Simultaneous estimation of several nitrogen cycle rates using ^{15}N : theory and applications. Soil Biology and Biochemistry, 18 : 559-568.

Nishio T., Kanamori T. et Fujimoto T., 1985. Nitrogen transformations in an aerobic soil as determined by a $^{15}NH_4^+$ dilution technique. Soil Biology and Biochemistry, 17 : 149-154.

Nishio T. et Fujimoto T., 1989. Mineralization of soil organic nitrogen in upland fields as determined by a $^{15}NH_4^+$ dilution technique, and absorption of nitrogen by maize. Soil Biology and Biochemistry, 21 : 931-942.

Recous S., Machet J.M. et Mary B., 1992. The partitioning of fertilizer-N between soil and crop : comparison of ammonium and nitrate applications. Plant and Soil, 144 : 101-111.

Schimel J.P., Jackson L.E. et Firestone M.K., 1989. Spatial and temporal effects on plant-microbial competition for inorganic nitrogen in a California annual grassland. Soil Biology and Biochemistry, 21 : 1059-1066.

Tietema A. et Wessel W.W., 1992. Gross nitrogen transformations in the organic layer of acid forest ecosystems subjected to increased atmospheric nitrogen input. Soil Biology and Biochemistry, 24 : 943-950.

Wessel W.W. et Tietema A., 1992. Calculating gross N transformation rates of ^{15}N pool dilution experiments with acid forest litter : analytical and numerical approaches. Soil Biology and Biochemistry, 24 : 931-942.

VOLUME 40

Scientific Editor
R.J. Summerfield, *The University of Reading, Department of Agriculture, P.O. Box 236, Reading RG6 2AT, Berkshire, UK*

Scientific Advisory Board
J. Hamblin, *Research Director, Export Grains Centre Ltd., WA, Australia*
H.-J. Jacobsen, *Universität Hannover, Hannover, Germany*

Aims and Scope
The book series is intended for readers ranging from advanced students to senior research scientists and corporate directors interested in acquiring in-depth, state-of-the-art knowledge about research findings and techniques related to all aspects of agricultural biotechnology. Although the previous volumes in the series dealt with plant science and biotechnology, the aim is now to also include volumes dealing with animals science, food science and microbiology. While the subject matter will relate more particularly to agricultural applications, timely topics in basic science and biotechnology will also be explored. Some volumes will report progress in rapidly advancing disciplines through proceedings of symposia and workshops while others will detail fundamental information of an enduring nature that will be referenced repeatedly.

The titles published in this series are listed at the end of this volume.