

THESE

présentée devant

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD-LYON I

pour l'obtention du

DIPLOME de DOCTORAT

par

Sylvie RECOUS

Dynamique de l'azote en sol cultivé :
organisation microbienne des formes ammoniacale et nitrique,
conséquences sur l'utilisation de l'azote des engrais
par une culture de blé

soutenue le 6 mai 1988

Jury :

Mme G. FAURIE	Présidente
M. P. BOTNER	Rapporteur
M. G. CATROUX	Rapporteur
M. DS. FOWLSON	
M. JC. REMY	
M. D. BALLAND	

- . Président de l'Université M. le Professeur P. ZECH
- . 1er Vice-Président Fédération Santé M. le Professeur L.M. PATRICOT
- . 1er Vice-Président Fédération Sciences M. le Professeur R. UZAN
- . Président du Comité de Coordination des Etudes Médicales M. le Professeur P. ZECH
- . Secrétaire Général M. F. MARIANI

ERATION SANTE

- UFR de Médecine GRANGE-BLANCHE Directeur : Mme le Pr. H. PELLET
- UFR de Médecine ALEXIS-CARREL Directeur : M. le Pr. EVREUX
- UFR de Médecine LYON-NORD Directeur : Mme le Pr. A. PINET
- UFR de Médecine LYON-SUD Directeur : M. le Pr. J. NORMAND
- UFR de PHARMACIE Directeur : M. le Pr. C.A. BIZOLLON
- UFR d'ODONTOLOGIE Directeur : M. le Pr. G. LABE
- INSTITUT de TECHNIQUES DE READAPTATION Directeur : M. le Pr. M. EYSSETTE
- Département de BIOLOGIE HUMAINE Directeur : M. le Pr. P.A. BRYON
- Département d'INNOVATION et de COORDINATION PEDAGOGIQUE Directeur : M. le Pr. G. LLORCA

RATION SCIENCES

- Institut des SCIENCES de la MATIERE Directeur : M. le Pr. E. ELBAZ
- Institut des SCIENCES DE L'INGENIERIE ET DU DEVELOPPEMENT TECHNOLOGIQUES Directeur : M. le Pr. G. FONTAINE
- Institut DE CHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE Directeur : Mme VARAGNAT, Maître de Conf.
- Institut d'ANALYSE DES SYSTEMES BIOLOGIQUES ET SOCIO-ECONOMIQUES Directeur : M. le Pr. J.M. LEGAY
- Institut DES SCIENCES DE LA TERRE, DE L'OCEAN, DE L'ATMOSPHERE, DE L'ESPACE ET DE L'ENVIRONNEMENT Directeur : M. le Pr. S. ELMI
- UFR des ACTIVITES PHYSIQUES ET SPORTIVES Directeur : M. le Pr. CAMY
- I.U.T. A Directeur : M. le Pr. J. GIELLY
- I.U.T. B Directeur : M. le Pr. J. PIVOT
- Département de 1er Cycle pluridisciplinaire Sciences Directeur : M. P. PONCET, Maître de Conf.
- Département de 2ème Cycle
 - Sciences de la Vie et de la Terre Directeur : M. le Pr. J.P. BLANCHET
 - Sciences pour l'Ingénieur Directeur : M. le Pr. P. BETHOUX
 - Sciences de l'Analyse et de la Matière Directeur : M. le Pr. VIALLE J.L.

AVANT - P R O P O S

INRA
STATION DE SCIENCE DU SOL

23. OCT. 1951

Domaine St-Paul s.P. 91
84140 MONTFAVET

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une convention CIFRE* par laquelle ont été associés la COFAZ (Compagnie Française de l'Azote), le laboratoire d'Ecologie Microbienne de Lyon (U.A CNRS 697) et l'équipe AZOTE de la Station d'Agronomie de Laon (INRA, Département d'Agronomie).

Monsieur J.C. RENY, Mme G. FAURIE, Monsieur Ph. ADMONT alors Directeur du Service Agronomique COFAZ, ont été les initiateurs de cette collaboration. Je leur suis très reconnaissante de la confiance qu'ils m'ont témoignée tout au long de ce travail.

Monsieur BALLAND actuel Directeur du Service Agronomique COFAZ, Monsieur DUCHESNE, Directeur commercial et, tout en exigeant des résultats concrets, ont compris la nécessité de poursuivre des recherches plus approfondies. Qu'ils en soient vivement remerciés.

Je remercie Messieurs BOTTNER et CATROUX de participer au Jury de cette thèse dont ils sont les rapporteurs. Je remercie également Monsieur POWLSON, Directeur de Recherche à la Station Expérimentale de ROTHANSTED, d'avoir accepté de juger ce travail.

Je donnerai une place particulière à Geneviève FAURIE et Bruno MARY qui ont encadré ce travail. Ils m'ont aidé à me situer à la frontière de deux disciplines : la microbiologie et l'agronomie. Bruno m'a initiée aux subtilités du marquage isotopique. Nous en avons partagé les joies mais également les soucis.

Je dois beaucoup à Monsieur J. BOIFFIN, Directeur de la Station d'Agronomie de Laon, et à Monsieur R. BARDIN, qui dirige l'Equipe d'Ecologie Microbienne à Lyon. Leur qualité d'écoute et leur exigence scientifique ont été une aide précieuse.

* Convention d'Incitation à la Formation par la Recherche dans l'Entreprise

J'exprime toute mon amitié au groupe Azote de Laon :

- Jean-Marie MACHET a été mon interlocuteur privilégié en ce qui concerne le blé. Son soutien ne m'a jamais fait défaut.

- Christiane PRESNEAU a, grâce à son expérience et sa disponibilité, beaucoup contribué à ma formation en matière d'analyses d'azote.

- Louis THOUANT, dont le savoir-faire dans les expérimentations au champ, a permis de tenir un programme de travail chargé.

- Daniel VAROTEAUX, Eric VENET, Daniel BOITEZ, Yannick GEOFFRIAU, Olivier DELFOSSE, Marie-Noëlle BONHOMME, qui, à des degrés divers, ont tous participé à ce travail.

Je n'oublie pas Valérie PELLETIER et Joëlle HAPILLON qui ont assuré, avec beaucoup de gentillesse, la frappe de ce document.

Ce travail, partagé entre deux lieux géographiques, n'a été possible que grâce à l'amitié et l'aide logistique de quelques "familles" d'accueil : André MARIN-LAFLECHE, Maria FERNANDEZ, Geneviève GAY et Michel COGNET, Olivier et Geneviève GRUNDMANN, Christian et Corinne STEINBERG.

Mes proches ont très largement bénéficié de mes enthousiasmes et de mes désespoirs. C'est à eux que je dédie ce travail.

INTRODUCTION GENERALE

PARTIE I : DYNAMIQUE DE LA TRANSFORMATION D'UN APPORT D'AZOTE DANS LE SOL ET DE SON UTILISATION PAR LA CULTURE

Chapitre I : Méthodes d'appréciation de l'utilisation de ----- l'azote des engrais par la culture.....	11
1 - Rappel de définitions.....	11
2 - Utilisation réelle et apparente de l'engrais.....	13
21 - Coefficient apparent d'utilisation	
22 - Coefficient réel d'utilisation	
23 - Interaction entre N Sol et N Engrais	
Chapitre II : Démarche d'étude et méthodologies.....	19

1 - Démarche d'étude.....	19
2 - Dispositifs expérimentaux.....	20
21 - Essai de Mons en Chaussée, 1985	
22 - Essais 1987	
3 - Méthodes d'échantillonnage au champ.....	27
31 - Parties aériennes	
32 - Sol et racines	
33 - Volatilisation	
34 - Dénitrification	
4 - Méthodes analytiques.....	29
41 - Mesure des matières sèches des parties aériennes et des racines	
42 - N minéral	
43 - Dosage de l'urée	
44 - N organique	
45 - Analyses ¹⁵ N	
5 - Traitement des échantillons pour l'évaluation du compartiment " ¹⁵ N organique".....	39
51 - Introduction	
52 - Protocoles expérimentaux	
53 - Résultats et discussions	
54 - Conclusions	

Chapitre III : Résultats et discussion.....55

- 1 - Devenir des trois formes d'azote en sol de limon :
Mons 1985.....55
 - 11 - Evolution de l'azote minéral
 - 12 - Pertes par voie gazeuse
 - 13 - Utilisation par la culture
 - 14 - Organisation de l'azote
 - 15 - Bilan ^{15}N
- 2 - Etude de la relation entre coefficient d'utilisation par la culture et taux d'organisation dans 3 types de sols.....73
 - 21 - Evolution de l'azote minéral
 - 22 - Bilan ^{15}N et pertes d'azote
 - 23 - Utilisation par la culture
 - 24 - Organisation de l'azote dans le sol

Chapitre IV : Discussion générale.....89

- 1 - Evolution de l'apport d'azote dans le sol.....89
- 2 - Utilisation de l'azote par la plante.....90
- 3 - Organisation de l'azote.....93
- 4 - Relations entre l'organisation dans le sol et l'utilisation par la plante.....99

PARTIE II : ORGANISATION MICROBIENNE DE L'UREE, DE L'AMMONIUM ET DU NITRATE EN CONDITIONS CONTROLEES

Chapitre I : Processus de l'organisation microbienne et facteurs de variation.....103

- 1 - Assimilation de l'azote par les micro-organismes.....105
 - 11 - Assimilation de l'ammonium
 - 12 - Assimilation du nitrate
 - 13 - Utilisation de l'urée
 - 14 - Conclusion
- 2 - Facteurs de variation de l'organisation microbienne.....115
 - 21 - Les facteurs du milieu
 - 22 - Le carbone
 - 23 - L'azote

Chapitre II : Démarche d'étude et méthodologie.....	119

1 - Objectifs.....	119
2 - Incubations de sol nu avec différentes formes d'azote:..	122
21 - Systèmes expérimentaux	
22 - Méthodes analytiques	
23 - Protocoles	
3 - Etude de la croissance des microorganismes du sol en culture pure.....	127
31 - Isolement	
32 - Identification partielle des souches	
33 - Test de croissance sur milieu solide	
34 - Croissance sur milieu liquide	
Chapitre III : Résultats.....	131

1 - Organisation de l'urée, de l'ammonium et du nitrate en conditions contrôlées.....	131
11 - Organisation de différentes formes d'azote dans un sol de limon (Mons)	
12 - Organisation comparée de l'ammonium et du nitrate dans 3 types de sol	
2 - Assimilation de l'ammonium et du nitrate par les micro-organismes.....	149
21 - Test de croissance sur milieux NH_4 et NO_3	
22 - Etude de la croissance des souches en milieu liquide	
Chapitre IV : Discussion.....	161
CONCLUSION GENERALE.....	167
BIBLIOGRAPHIE.....	171
ANNEXES.....	183

INTRODUCTION GENERALE

Les recherches menées ces dernières années ont permis de proposer des solutions raisonnées pour la fertilisation azotée. L'équation du bilan en est la base (Hebert 1975, Rémy et Hebert 1977).

Sur une période bien définie les variations des quantités d'azote minéral contenues dans un certain volume de sol, sont la résultante des gains et des pertes affectant ce compartiment pendant la même période:

$$bY + R_f + P_l + (P_v + P_d) = R_i + M_h + M_r + M_a + (A_p + A_f) + E$$

bY = besoins du peuplement végétal

R_f = azote minéral à la fermeture du bilan (à la récolte)

P_l = pertes par lixiviation

(P_v + P_d) = pertes par voie gazeuse (volatilisation et dénitrification)

R_i = azote minéral à l'ouverture du bilan (par exemple à la sortie de l'hiver)

M_h = minéralisation nette de l'humus du sol

M_r = contribution nette des résidus de récolte

M_a = contribution des amendements organiques

(A_p + A_f) = apports incontrôlés (pluies, fixation non symbiotique)

E = fumure minérale

L'utilisation pratique de ce bilan consiste à calculer l'inconnue "fumure" en donnant à tous les autres termes une valeur mesurée ou estimée. C'est le bilan prévisionnel (Viaux 1980, Rémy et al 1983) :

Besoins pour l'objectif de rendement	Azote fourni par le sol
Azote absorbé par la céréale	Effet du précédent +
+	Apports organiques +
Azote non utilisable par la céréale	Effets retournement prairies +
	Minéralisation humus du sol +
	Reliquat
APPORT TOTAL = BESOINS - AZOTE FOURNI PAR LE SOL	

Tableau 1 : Bilan prévisionnel pour le calcul de la fumure azotée

Le calcul repose sur:

1 - La définition des besoins (bY) en azote de la culture : dans le cas des céréales, cette estimation est le produit du rendement objectif par la quantité d'azote absorbée par quintal de grain produit, quantité que l'on peut considérer relativement constante;

2 - La mesure du reliquat d'azote minéral (R_1) à l'ouverture du bilan qui est estimée sur l'ensemble des horizons accessibles aux racines;

3 - L'estimation de la minéralisation nette en provenance respectivement de la matière organique du sol (M_{rs}) et des résidus de récolte du précédent cultural (M_r). Ces estimations sont basées respectivement :

* sur la prise en compte du taux de minéralisation annuel de la matière organique, de sa composition en azote et de sa teneur dans le sol;

* sur des expérimentations consistant à faire varier la nature des résidus enfouis sur des parcelles non cultivées, et à comparer les quantités d'azote minéral produites à celles mesurées sur des parcelles témoins. Elles se sont traduites par une grille d'estimation de la contribution nette des résidus culturaux (tableau 2) :

Tableau 2 : Contribution des résidus culturaux

ESPECE	Contribution kg N.ha ⁻¹	ESPECE	Contribution kg N.ha ⁻¹
BETT.SUCRIERE	+ 20	LUZERNE	+ 30
BLE	- 20	MAIS FOURRAGE	0
COLZA	+ 20	MAIS GRAIN	- 25
FEVEROLLE	+ 30	ORGE	- 20
HARICOT	+ 20	FOMME DE TERRE	+ 20
LIN	0	FOIS	+ 20
		FRAIRIE	+ 40

4 - L'approximation consistant à admettre que l'ensemble des pertes ($P_v + P_d$) sont compensées par les gains résultant de la fixation biologique et des apports météoriques ($A_p + A_e$). Les pertes par lessivage sont prises en compte en réduisant le reliquat R_1 en fonction du type de sol et de la pluviométrie (P_1).

5 - Une prévision de la quantité minimale d'azote restant dans le sol à la récolte de la céréale (R_r). Ce dernier terme prend en compte de manière globale l'utilisation par la plante de l'azote mis à sa disposition par différentes sources. Dans un premier temps, constatant qu'il restait toujours dans le sol une quantité d'azote minéral non utilisée, on a fixé à ce reliquat une valeur minimale correspondant approximativement à 10kg N par tranche de 30cm d'épaisseur de sol.

Divers travaux ont montré que l'utilisation de l'engrais n'était pas toujours aussi complète que ne le prévoyait l'équation du bilan dans sa forme originelle, en particulier dans les situations où un état structural dégradé entraîne une colonisation défectueuse du profil par le système racinaire (Meynard et al 1981, Viaux 1980). Ce problème a conduit à une adaptation du calcul des doses consistant à affecter la dose calculée par le bilan prévisionnel "idéal" d'un coefficient censé tenir compte de l'interception racinaire ; ceci s'est traduit par la majoration du terme " R_r " de l'équation (Rémy et al 1983).

D'une façon plus générale, l'utilisation de l'azote minéral par la plante ne résulte pas seulement de la plus ou moins grande accessibilité de celui-ci aux racines, mais aussi de la concurrence qui s'établit entre l'absorption et les autres processus intervenant dans le sol (figure 1). Dans les conditions pédo-climatiques de nos régions tempérées, ces processus peuvent se classer en deux catégories :

- ceux qui, comme l'absorption, vont se produire de façon plus ou moins continue dans toutes les situations, avec une intensité différente selon les conditions de milieu: la nitrification, l'organisation, la lixiviation (lessivage);
- ceux qui vont se produire de manière plus aléatoire et ponctuelle quand un certain nombre de conditions seront réunies: la volatilisation, la rétrogradation de l'ammonium (fixation chimique), la dénitrification du nitrate.

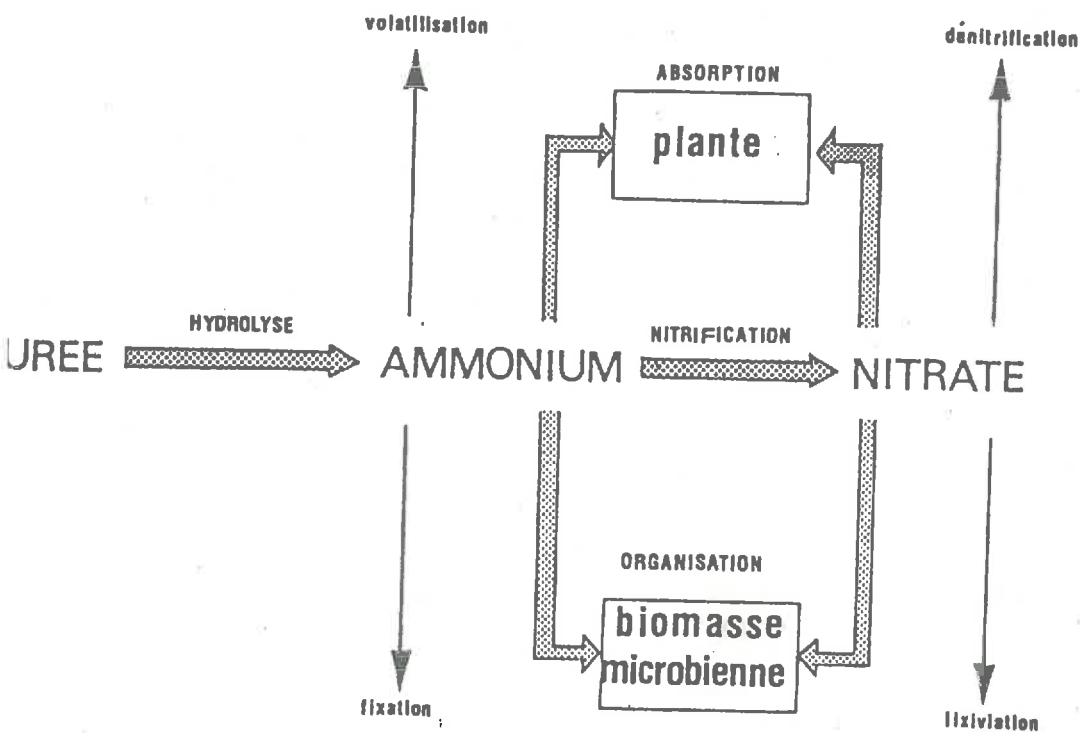


Figure 1 : Schéma simplifié du devenir d'un engrais azoté

On peut donc s'attendre à ce que l'utilisation d'une procédure forcément simplifiée comme c'est le cas pour le bilan prévisionnel, soit parfois mise en défaut.

De fait, le calcul de la fumure par cette méthode s'est révélé satisfaisant dans un certain nombre de situations moyennes où l'estimation des différents termes (minéralisation, reliquat, utilisation de l'engrais) est assez bonne et où les écarts par rapport aux conditions moyennes restent relativement faibles. Mais les limites d'un tel raisonnement apparaissent maintenant plus clairement :

- les recherches menées sur les lois de l'élaboration du rendement d'une culture (en particulier sur les céréales) ont montré que certaines phases cruciales du développement coïncident avec une très forte absorption d'azote, ce qui rend l'offre instantanée du milieu particulièrement déterminante ;

- parallèlement, la plupart des transformations de l'azote dans le sol résultent de l'activité des populations microbiennes. Ces populations microbiennes sont caractérisées par une réponse rapide aux variations du milieu (température, humidité, carbone, azote), en termes de croissance, renouvellement et activité.

Pour faire face aux besoins instantanés, le raisonnement basé sur l'estimation d'un pool d'azote minéral globalement disponible sur une longue période de végétation devient inadéquat.

Progresser vers une fertilisation mieux raisonnée, c'est à dire adaptée de façon plus précise à la dynamique des besoins et des fournitures par le sol, nécessite de prendre en compte les processus qui conditionnent l'utilisation par la plante de l'azote minéral présent dans le sol, et tout particulièrement celui en provenance des engrais: il représente désormais entre la moitié et les deux-tiers des fournitures d'azote minéral à une culture de blé.

C'est dans ce cadre que s'inscrivent les recherches qui sont présentées ici.

Il est dès à présent nécessaire de bien distinguer l'appréciation de l'efficacité d'un apport d'azote et celle de son utilisation par la culture.

* L'efficacité peut être jugée à posteriori sur plusieurs critères : le plus courant est d'apprécier la différence de production de biomasse végétale résultant du traitement "azote" appliqué (doses, formes, dates d'apport, etc...). L'étude des composantes du rendement (pour une céréale : nombre d'épis, nombre de grains par unité de surface, poids de mille grains...) permet, grâce à la connaissance des mécanismes de l'élaboration du rendement, d'identifier la période du cycle végétal pendant laquelle se sont différenciés -au niveau de la plante- les traitements appliqués.

* L'utilisation de l'apport d'azote peut être appréciée par plusieurs critères en cours de végétation ou à la récolte :

- la mesure du compartiment "azote total" ou d'un compartiment spécifique (azote protéique, nitrate,...) et la comparaison avec d'autres traitements (témoins sans azote, doses);

- la mesure de la fraction azotée issue de l'engrais. Ceci est possible grâce au traçage avec l'isotope 15 de l'azote.

L'utilisation de l'azote de l'engrais a fait l'objet de nombreuses études, les plus récentes étant essentiellement basées sur l'emploi du traceur ^{15}N . Ces essais ont montré une utilisation de l'azote à la fois incomplète et très variable (30-80%), notamment en réponse à différentes pratiques de fertilisation.

Ainsi a été étudiée l'influence :

* de la date d'apport de l'azote : les résultats obtenus sur céréales (Olson et Swallow 1984, Rémy 1985, Machet et al 1987) ont montré que plus l'apport était réalisé tard (dans le cycle de la plante) et mieux il était valorisé par la culture. La compétition pour l'azote qui s'exerce entre la plante et les autres processus opérant dans le sol paraît donc tourner de plus en plus en faveur de la plante à mesure que se déroule le cycle cultural.

L'effet de la date d'apport dépend d'une part du stade de la culture auquel est fait l'apport d'azote (ses besoins instantanés, ses capacités "d'interception racinaire"), d'autre part des conditions climatiques qui peuvent favoriser ou non les processus de transformation ou de pertes dans le sol. Enfin, pour une date de mesure donnée, l'effet de la date d'apport est en partie lié au délai qui s'écoule entre ces deux moments, et pendant lequel peuvent se produire les processus.

* de la dose apportée : les résultats obtenus (Campbell et Paul 1978, Olson et al 1979, Rémy 1985, Machet et al 1987) ont montré qu'il n'y avait pas de variation du coefficient réel d'utilisation (cf page 12) dans une gamme d'apport excluant les cas extrêmes. Cela signifie que la plante prélève une proportion identique de différentes doses d'engrais.

* de la forme d'apport :

Les formes chimiques d'azote les plus couramment apportées sont l'ammonium, le nitrate (sous forme de nitrate d'ammonium ou seuls), l'urée, et la solution azotée (combinaison des trois formes) (tableau 3).

	Azote apporté sous la forme (en %)				Consommation Campagne 86-87 (Tonnes N)	Augmentation / 85-86
	Teneur en Azote	Nitrique	Ammo- niacal	Uréique		
Ammonitrates	26-27 % 33,5 %	50	50	0	1108000	+ 6,1 %
Sulfate d'ammoniaque	20,5 %	0	100	0	41000	+ 3,2 %
Nitrate chaux Nitrate soude	15,0 %	100	0	0	3000	+ 28,9 %
Urée	46,0 %	0	0	100	287000	+ 30,0 %
Solution N	36-39 %	25	25	50	503000	+ 4,4 %
Ammoniac anhydre	80,0 %	0	100	0	41000	+ 32,4 %
		Total Engrais Simples			1985000	+ 9,0 %
		Total Engrais Complexes			583000	- 0,7 %
		Total			2568000	

Tableau 3 : Consommation des engrais simples en France
Campagne 86-87 (source FNIE)

Nous avons vu que ces formes apportées au sol se différencient les unes des autres par la succession des transformations qu'elles subissent dans le sol jusqu'à l'étape nitrate, et les pertes qui sont susceptibles d'affecter les divers états de l'azote minéral (Figure 1).

La forme ammoniacale est un carrefour important du cycle interne de l'azote dans le sol; elle est soumise à :

- * une oxydation en nitrite puis nitrate lors des processus de nitrification réalisés par des populations spécifiques de bactéries du sol, les nitrifiants. Ces bactéries chimiolithotrophes assurent leurs besoins énergétiques exclusivement par ces oxydations ;
- * une absorption et assimilation par les micro-organismes hétérotrophes du sol qui peuvent ainsi satisfaire les besoins d'azote nécessaire à leurs activités de biosynthèse : c'est l'organisation microbienne de l'azote minéral qui conduit à l'incorporation d'azote dans les corps microbiens, puis, plus largement, sous forme de matière organique humifiée;
- * une absorption et assimilation par la plante;
- * des "pertes" par voie gazeuse (volatilisation d'ammoniac) et rétrogradation d'ammonium dans les espaces inter-feuillets des argiles.

La forme nitrique issue de la nitrification de l'ammonium, ou apportée par l'engrais est soumise à:

- * une absorption et assimilation par la plante;
- * une assimilation par la microflore hétérotrophe (organisation);
- * des pertes par voie gazeuse (sous forme N_2 par dénitrification) et des pertes par lixiviation.

L'urée : l'urée se distingue par une étape d'hydrolyse qui aboutit à la formation d'azote ammoniacal. Cette hydrolyse doit être catalysée par une enzyme, l'uréase, produite en abondance par les micro-organismes (champignons, bactéries) et les végétaux supérieurs (racines).

La vitesse d'hydrolyse dépend:

- de l'activité uréasique potentielle du sol. Celle-ci paraît rarement limitante (Tabatabai et Bremner 1972, Zantua et Bremner 1975);
- de la température : plus celle-ci est élevée et plus l'hydrolyse est rapide (O'Toole et al 1982, Vlek et Carter 1983, Kumar et Wagenet 1984). Cependant l'uréase reste active aux températures basses (Soubies et al 1955);
- du contact entre l'urée et l'uréase (dépendant de la diffusion de l'urée, du mode d'apport) (Vlek et Carter 1983, Buresh et al 1984).

L'étape d'hydrolyse n'occasionne pas elle-même de pertes: elle transforme quantitativement l'urée en azote ammoniacal. Elle paraît toujours rapide, même en plein champ (Soubies et al 1955, Campbell et al 1984). Cependant :

- le délai qu'elle nécessite peut éventuellement restreindre l'utilisation par la plante dans des circonstances où les besoins de celle-ci sont importants;
- elle provoque une augmentation temporaire du pH du sol qui peut localement être de plusieurs unités (Lyster et al 1980, Rachhpal-Singh et Nye 1984b). L'azote ammoniacal issu de l'hydrolyse est ainsi potentiellement plus sujet aux pertes par volatilisation (Faurie et Bardin 1979, Terman 1979, Lyster et al 1980).

En revanche cette élévation du pH peut favoriser la nitrification, notamment dans des conditions de sols acides (Connolly et al 1980, Faurie 1980).

La forme ammoniacale (et par voie de conséquence l'urée) est donc susceptible d'être davantage détournée de l'utilisation par la plante que le nitrate. Ceci se traduit généralement par des coefficients d'utilisation plus élevés pour le nitrate (Broadbent et Nakashima 1968, Dev et Rennie 1979, Van Lierop et Tran 1980, Lhotellier et Segard 1983, Guiraud et al 1986).

Dans les conditions climatiques du Nord-Est de la France, les pertes par voie gazeuse se sont avérées faibles (Fresneau 1982, Rémy et al, non publié), conduisant à l'hypothèse que l'organisation microbienne pouvait jouer un rôle dont l'ampleur et le déterminisme restait insuffisamment connu.

En effet ce processus est resté d'une manière générale peu pris en compte. Il a été rarement mesuré au champ, en raison de la lourdeur des expérimentations (nécessité d'un marquage ^{15}N élevé, problème de séparation des compartiments dans le sol). Dans le meilleur des cas, un compartiment " ^{15}N restant dans le sol" (N organique + N racines) a été dosé, la plupart du temps uniquement à la récolte (Chabalier et al 1975, Dowdell et Crees 1980, Mahli et Nyborg 1983, Olson et Swallow 1984) et rarement en continu après les apports (Pierre et al 1984, 1985, 1986 ; Rice et Smith 1984, Nannipieri et al 1985).

Le travail mené a consisté à étudier la place de l'organisation microbienne dans la dynamique de l'azote en sol cultivé, et ses conséquences sur l'utilisation de l'azote par la culture.

Ce travail ayant été engagé dans le cadre d'une collaboration avec la COPAZ, le facteur de variation privilégié a été la forme chimique sous laquelle l'azote est apporté. L'efficacité des différentes formes d'azote est en effet un problème d'actualité, étant donné les écarts de coûts et la compétition internationale très forte sur le marché des engrais.

A la suite des travaux déjà réalisés en France sur blé (Fresneau 1982, Lhotellier et Segard 1983) et des écarts d'utilisation observés sur d'autres cultures, il paraissait nécessaire d'examiner dans quelle mesure les variations de l'organisation pouvaient rendre compte des différences d'efficacité, d'ampleur variable, qui avaient été constatées entre formes.

Une première étape réalisée au champ a consisté à examiner s'il était possible de dégager une relation entre l'organisation de l'azote et l'absorption par un peuplement de blé. Les flux d'organisation et d'absorption ont été appréhendés grâce au traceur ^{15}N , sur un pas de temps adapté à leur cinétique.

Une différence entre formes, quelle qu'en soit la nature, va apparaître nécessairement avant que tout l'azote apporté soit sous forme nitrate; l'espacement des mesures a donc été conçu en fonction des vitesses d'hydrolyse et de nitrification attendues : il s'est traduit par des prélèvements très rapprochés après les apports d'azote marqué.

Une deuxième étape visait à séparer l'organisation des autres processus qui, au champ, interviennent simultanément, en recourant à des conditions expérimentales qui permettent :

- d'éliminer l'action de la plante (apport de carbone et azote issus de l'exsudation et de la décomposition des racines);
- de privilégier l'organisation par rapport à la minéralisation, en utilisant un pas de temps court et une source de carbone induisant une forte organisation.

Nous avons donc réalisé des incubations en reprenant les sols des expérimentations de plein champ. Celles-ci ont consisté à comparer l'organisation de différentes formes d'azote (urée, nitrate, ammonium, nitrate d'ammonium) en conditions contrôlées de température, humidité et carbone disponible.

Enfin la mise en évidence de différences systématiques de l'organisation entre ammonium et nitrate nous a conduit à une étude des populations microbiennes du sol impliquées dans l'organisation, seule apte à permettre un choix entre les diverses hypothèses qui pouvaient être émises quant aux mécanismes responsables de ces différences.

PARTIE I :

**DYNAMIQUE DE LA TRANSFORMATION
D'UN APPORT D'AZOTE DANS LE SOL
ET DE SON UTILISATION
PAR LA CULTURE**

CHAPITRE I
METHODES D'APPRECIATION DE L'UTILISATION DE L'AZOTE
DES ENGRAIS PAR LA CULTURE

METHODES D'APPRECIATION DE L'UTILISATION DE L'AZOTE
DES ENGRAIS PAR LA CULTURE

L'utilisation du traçage isotopique avec l'azote 15 a ouvert de nombreuses perspectives pour l'étude des flux d'azote dans le sol. Il a constitué notre outil d'investigation privilégié. Nous ne rappellerons ici que les notions indispensables à la compréhension des résultats en raison des études très complètes qui ont explicité les méthodologies liées au ^{15}N (Mariotti 1982, Guiraud 1984).

1 - Rappel de définitions

L'azote possède six isotopes connus (de masse 12, 13, 14, 15, 16 et 17), dont deux, ceux de masse 14 et 15 sont stables. Les autres, radioactifs, ont une trop courte période pour pouvoir être employés si ce n'est pour des études strictement limitées dans le temps.

L'abondance isotopique est le rapport des atomes de masse 15 par rapport à la totalité des atomes azote

L'abondance naturelle est l'abondance isotopique des composés azotés des systèmes naturels. L'étalon de référence est l'azote atmosphérique dont l'abondance est de 0.366 %

L'excès isotopique est l'unité utilisée dans le cas du traçage artificiel. C'est la différence entre l'abondance isotopique de l'échantillon et l'abondance naturelle du même composé.

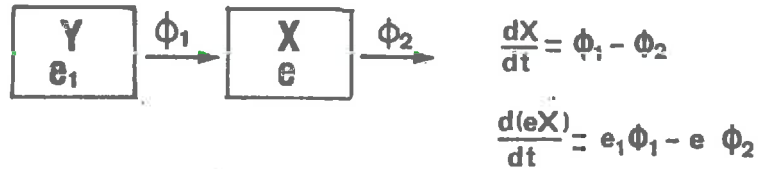
La dilution isotopique : on parle de dilution isotopique lorsqu'un compartiment isolé de taille X et de composition isotopique E (marqué ou non marqué), reçoit un flux azoté Q (respectivement non marqué ou marqué). Ce compartiment possède alors une taille $Q+X$ et un excès isotopique E' . L'équation de conservation de la masse des atomes ^{15}N s'écrit :

$$Q \cdot E = (Q + X) E' \quad \text{d'où on déduit} \quad X = Q \left(\frac{E}{E'} - 1 \right)$$

Cette formule de la dilution isotopique ne s'applique en fait que dans un nombre restreint de cas (dilution "instantanée" d'un apport marqué dans un compartiment minéral du sol, absorption rapide d'azote 15 par la plante...).

Dès qu'un compartiment d'un système étudié est soumis à des flux d'entrée et de sortie, il n'est plus possible d'appliquer cette formule. Il faut alors utiliser une analyse de type compartimentale où la variation d'un compartiment peut s'exprimer

en fonction de la variation des flux sur une période de temps court.



dX étant la variation de N et $d(eX)$ la variation de ^{15}N du compartiment X . On peut déduire de ces deux équations, l'équation de différentielle de "dilution" : $X \frac{d(eX)}{dt} = (e_1 - e) \phi_1$

Le fractionnement isotopique : les études sur l'abondance naturelle en isotope ^{15}N ont montré que l'inégalité des masses entraîne l'existence de différences dans la vitesse des réactions chimiques. Les isotopes sont ainsi "distingués" au cours des processus biochimiques (dénitrification, fixation, assimilation...), ce qui entraîne un "fractionnement isotopique" (Mariotti 1982, Domenach 1987). Ce fractionnement produit des variations faibles mais significatives de l'abondance naturelle.

L'utilisation de composés azotés ayant un marquage artificiel, permet de s'affranchir de ces variations en les rendant négligeables. Cependant dans le cas de faibles marquages (mesures du compartiment organique par exemple) il est nécessaire de prendre également en compte l'abondance isotopique naturelle d'un échantillon "témoin" non marqué.

Calculs

Dans tous les compartiments étudiés, le principe d'étude sera le même : la mesure de la quantité d'azote d'un compartiment (azote total, azote organique, nitrate...) et celle de son excès isotopique. Connaissant précisément les quantités d'azote ^{15}N introduites initialement dans le système (N_0, e_0) il est alors possible :

- 1/ de connaître la quantité d'azote apporté dans le compartiment mesuré
- pour la plante : la part de l'azote apporté contenue dans la plante est obtenue par :

$$\frac{N_p \cdot (E_p - E_r)}{F \cdot E_0} \cdot 100$$

- N_p = N absorbé par la plante
- E_p = excès isotopique de ce compartiment
- E_r = excès isotopique "naturel" du même compartiment
- E_0 = excès isotopique initial de l'azote apporté
- F = N apporté par la fumure

c'est le coefficient réel d'utilisation (C.R.U.)

- pour le sol : On peut calculer la proportion de l'azote apporté, qui se trouve sous l'une ou l'autre des formes minérales ou sous forme organique :

$$\frac{N \cdot (E_p - E_r)}{F \cdot E_o} \times 100$$

Il n'y a pas d'appellation particulière et on exprime ces proportions en terme de pourcentage.

2/ de suivre la dilution de l'isotope dans la plante :

* le rapport des excès $(E_p - E_r) / E_o$ indique la proportion de l'azote absorbé provenant de la source d'azote marquée ;

$\frac{E_p - E_r}{E_o}$
 N_p (-----) est encore appelé Ndff (nitrogen derived from fertilizer)

* le rapport $1 - (E_p - E_r) / E_o$ indique par différence la proportion provenant de la source non marquée.

$\frac{E_p - E_r}{E_o}$
 N_p (1- -----) ou Ndfs (nitrogen derived from soil)

2 - Utilisation réelle et apparente de l'engrais

21 - Coefficient apparent d'utilisation

Les essais comportant des parcelles fertilisées avec une dose X d'azote, et des parcelles "témoins" non fertilisées permettent d'accéder à une estimation de l'utilisation de l'engrais. Le calcul est basé sur l'hypothèse que la fourniture d'azote par le sol est identique sur les parcelles témoins (où elle est la seule source d'azote) et sur les parcelles fertilisées. La différence dans l'azote total absorbé provient alors de l'azote de l'engrais. Un tel calcul est appelé coefficient apparent d'utilisation

$$C.A.U. = \frac{N_f - N_o}{F} \times 100$$

avec N_f = N absorbé par le blé fertilisé
 N_o = N absorbé par le témoin
 F = Dose engrais apportée

Nous verrons toutes les difficultés liées à cette hypothèse.

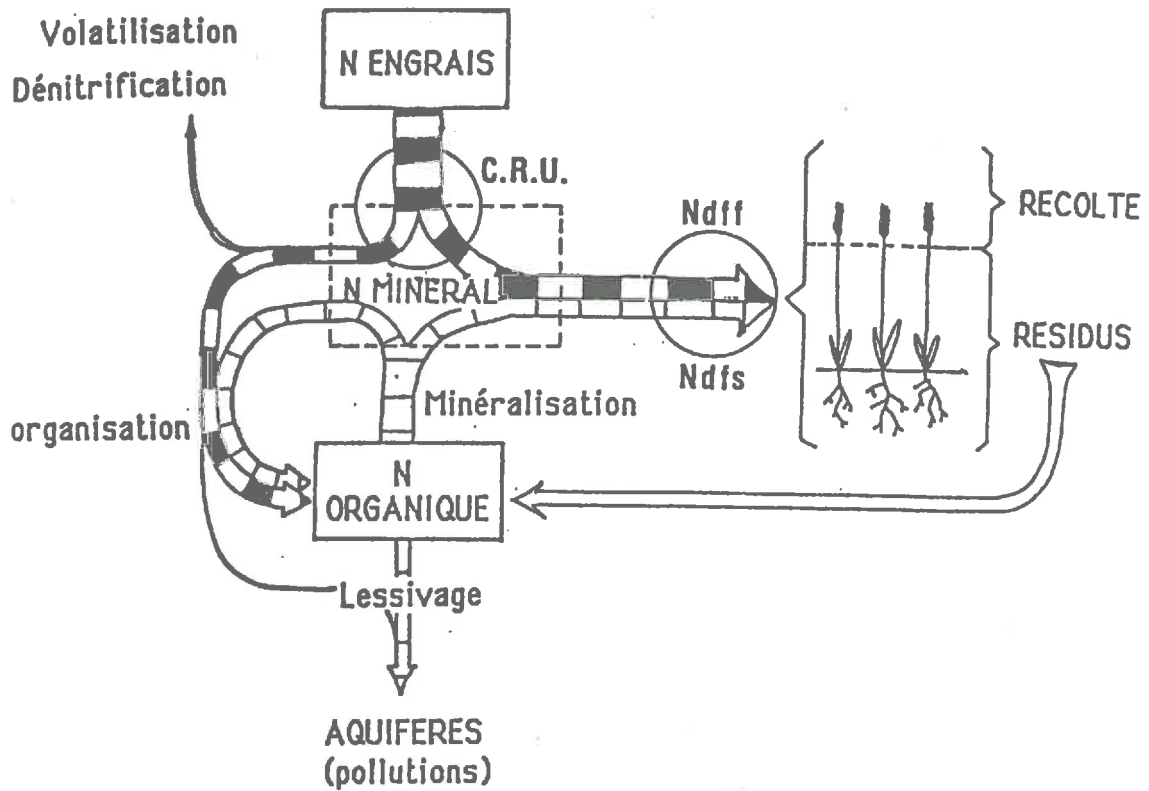


Figure 2 : Schéma simplifié de la nutrition azotée d'une culture lors d'un apport d'azote 15. (d'après Machet et al 1987)

22 - Coefficient réel d'utilisation

Le coefficient réel d'utilisation (formule page 12) très utilisé dans les expérimentations ^{15}N , sert généralement à rendre compte, à la récolte ou en fin d'expérimentation, de la quantité d'azote apporté utilisée par la culture. Dans la plupart des études, il s'agit d'un C.R.U. "parties aériennes", parce que la mesure de la biomasse racinaire s'avère très difficile à réaliser au champ.

L'évaluation des quantités totales d'azote absorbé implique de prendre en compte l'azote présent dans les racines. On peut en tenir compte en appliquant un coefficient multiplicateur aux quantités d'azote présentes dans les parties aériennes. Pour les céréales, un coefficient de 1,3 a été proposé (Viaux 1980). Cela suppose que l'azote des racines correspond à 25% de l'azote total absorbé par la culture. La variabilité des situations du point de vue de l'enracinement et de l'absorption d'azote a montré les limites de l'application d'un tel coefficient (Machet et al 1987).

23 - Interactions entre N sol et N engrais

L'estimation de l'utilisation de l'azote par la plante, soit par différence avec un témoin (C.A.U.) soit par l'azote 15 (C.R.U.) ne fournit pas toujours des résultats similaires. Si parfois C.R.U. et C.A.U. sont équivalents, les C.A.U. sont souvent supérieurs aux C.R.U. (Steele et al 1980, Machet et al 1987) et dépassent dans quelques cas 100 %.

Cela signifie que la différence "N-No" du calcul du C.A.U. est surestimée et qu'il existe une interaction entre la fourniture de l'azote du sol et l'utilisation de l'engrais azoté.

Plusieurs hypothèses ont été émises jusqu'alors. Des phénomènes de "surminéralisation" ("priming-effect" en anglais) affecteraient les parcelles fertilisées, notamment en raison d'une stimulation de la microflore du sol lors d'un apport d'azote. Les débats ont été nombreux sur ce sujet et la surminéralisation en tant que mécanisme biologique n'a pu être prouvée (Jansson 1958, Broadbent 1965, Rennie et Fried 1971, Westerman et Kurtz 1973, Hauck et Bremner 1976).

Jenkinson et ses collaborateurs (Jenkinson et al 1985, Hart et al 1986) ont fait le point sur ce problème. Ils ont remplacé les vocables "surminéralisation" ou "priming effect" (dans un sens restreint) par la notion d'interaction dans le sol entre azote natif et azote apporté, (A.N.I. - Added Nitrogen Interaction), cette interaction pouvant être soit positive (ANI +) soit négative (ANI -).

Deux cas peuvent se présenter:

1- des situations à ANI réel : elles peuvent expliquer les différences CAU-CRU. Différents mécanismes peuvent jouer :

* une minéralisation indépendante de l'apport d'azote, mais une meilleure interception racinaire soit par une plus grande extension des racines (interception de l'azote profond), soit par une plus forte densité racinaire (interception plus complète);

* une affectation différente de l'azote absorbé entre les parties aériennes et les racines: l'azote racinaire représenterait une proportion plus grande de l'azote absorbé lorsque l'azote devient moins limitant ou non limitant de la croissance;

* une minéralisation nette plus grande dans les parcelles fertilisées associée soit à une minéralisation brute plus élevée, soit à une organisation plus faible.

Selon Jenkinson et al (1985) l'importance de ces phénomènes d'ANI réel ne peut être que limitée.

2- des situations à ANI qualifié d'"apparent": il s'agit essentiellement de réactions de "substitution de pool"

Un ANI apparent peut ainsi avoir lieu lorsque l'azote marqué est apporté à un sol contenant une certaine quantité d'azote minéral, alors que le compartiment azote minéral est lui-même affecté par un processus qui opère indépendamment de la quantité d'azote présente. Dans ce cas l'azote apporté va être utilisé au même titre que l'azote natif (non marqué) et partiellement à sa place, ce qui laissera en contre-partie, des quantités équivalentes d'azote natif disponibles.

L'organisation de l'azote minéral est le mécanisme principal impliqué dans ces substitutions de pool. Nous expliciterons le processus par quelques exemples.

1- Les quantités organisées étant constantes pour une quantité de carbone disponible sur une période de temps donné, plus les doses d'azote marqué apporté sont importantes, moins l'azote du sol est organisé. Il peut en résulter une absorption plus importante de N-sol par la plante qui se traduira par un ANI positif.

2 - De la même façon, l'utilisation par la plante ou l'organisation dans le sol d'un apport marqué va varier selon l'importance du pool d'azote minéral initial dans lequel il se diluera. Il en résulte des "C.R.U." variables.

3 - La forme d'apport joue également un rôle dans ces phénomènes de substitution de pool. En effet l'ammonium étant préférentiellement assimilé au nitrate par les micro-organismes hétérotrophes (cf partie II), il sera possible d'observer un ANI négatif lors d'un apport de nitrate marqué (en milieu particulièrement homogène). Dans ce cas en effet l'ammonium "natif" issu de la minéralisation sera réorganisé prioritairement, le pool nitrate marqué restant peu affecté. La minéralisation (effet net) sera faible ou nulle, comparée à celle d'un traitement où l'on aurait apporté de l'ammonium marqué.

Les conditions d'expérimentation vont être déterminantes pour l'apparition ou non d'un effet de substitution. Dans une expérience en pot où le mélange azote sol et azote engrais est relativement homogène, ces interactions se produisent nécessairement. Par contre, en conditions de plein champ, l'azote de l'engrais et l'azote du sol ont généralement des dynamiques assez différentes de sorte que ces phénomènes ne peuvent prendre autant d'importance (Hart et al 1986, Powlson et al 1986).

Comme l'ont souligné Jenkinson et ses collaborateurs, Jansson (1958), Jansson et Persson (1982) en parlant d'"artéfacts de la méthode ^{15}N ", la substitution de pool semble avoir parfois conduit à une interprétation erronée des essais menés avec l'azote 15. Il apparaît délicat d'interpréter séparément les fluctuations des pools ^{14}N et ^{15}N . Cependant l'azote 15 reste indispensable pour séparer les différents processus intervenant dans le sol et dans la plante, et préciser leur déterminisme.

CHAPITRE II
DEMARCHE D'ETUDE ET METHODOLOGIES

DEMARCHE D'ETUDE ET METHODOLOGIES

1 - DEMARCHE D'ETUDE

Sur le premier essai réalisé sur un sol de limon profond de la Somme, les facteurs de variation étudiés ont été la forme d'azote (^{15}N -urée, $^{15}\text{NH}_4\text{NO}_3$, $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$) et la date d'apport. Nous avons suivi les transformations de l'azote après un premier apport marqué réalisé au tallage du blé et un second apport réalisé au début de la montaison. Les prélèvements rapprochés ont permis de suivre la dynamique des différents processus (hydrolyse, nitrification, organisation, absorption par la plante).

Nous avons tenté de faire un bilan complet du devenir de l'azote: dans ce but, nous avons pris en compte aussi complètement que nos méthodes le permettent, la plante entière (parties aériennes et racines), le sol (N organique et N minéral), les pertes par voie gazeuse (volatilisation et dénitrification).

La vitesse et l'intensité des processus d'organisation observés dès les premiers jours qui suivent les apports d'une part, les différences qui apparaissent précocément à ce niveau entre ammonium et nitrate d'autre part, nous ont amené:

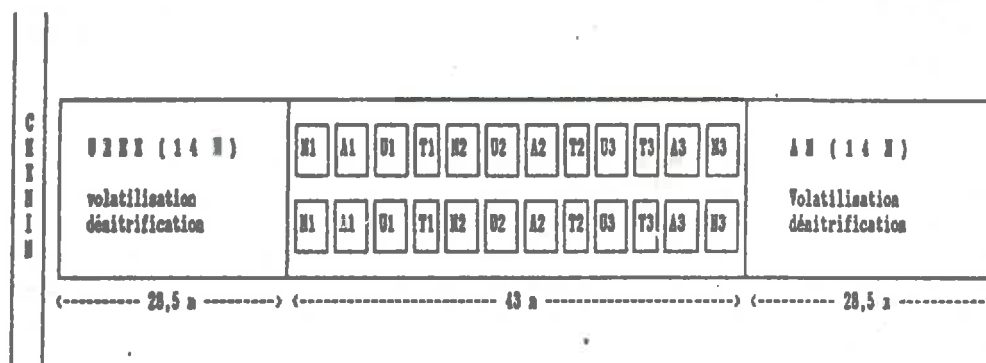
- à rechercher l'origine de la différence d'organisation entre ammonium et nitrate. Ceci sera l'objet de la deuxième partie de ce document;
- à étendre les observations à des situations pédo-climatiques contrastées, de façon à valider la relation observée entre l'organisation et l'absorption.

Nous avons donc mis en place dans un second temps trois essais, les facteurs de variation étant la forme d'apport (^{15}N -urée, $^{15}\text{NH}_4\text{NO}_3$, $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$) et la situation pédo-climatique: trois sols (argile-sableuse, sol calcaire, limon hydromorphe) dont nous attendons des comportements différents, en particulier au niveau des vitesses de minéralisation et de nitrification et des potentialités de pertes gazeuses.

Le suivi des trois essais parallèlement, a nécessité un protocole simplifié, cependant suffisant pour apprécier la variabilité des relations entre l'organisation et l'absorption: l'utilisation par la plante entière et l'organisation microbienne ont été mesurées à trois dates au cours de la période de nitrification puis à la floraison et à la récolte du blé.

	MONS (80) sol brun lessivé (Picardie)	LIVRY LOUVERCY (51) rendzine (Champagne)	ETREPILLY (02) sol lessivé dégradé hydrom. (Brie)	BOURGUIGNON (02) sol brun humide (Chaunois)
SOL				
Argile %	16.9	8.8	15.4	25.4
Limon fin %	18.7	1.3	21.1	8.0
Limon grossier %	51.0	4.9	53.2	11.7
Sable fin %	4.6	0.8	2.4	39.3
Sable grossier %	2.1	0.2	2.4	6.5
Carbone org. %	1.2	2.4	1.0	1.5
Azote %	1.2	2.1	0.7	1.5
Calcaire %	1.0	74.9	0.3	4.5
pH H ₂ O	7.8	7.9	7.9	7.9
CULTURE				
Variété	Pernel	Thésé	Fidel	Mission
Date de semis	15/10/84	25/11/86	4/12/86	27/11/86
Ecartement semis	12 cm	17 cm	12 cm	12 cm
Précédent	Colza d'hiver	Betterave verts enfouis	Betterave verts enfouis	Betterave verts enfouis
AZOTE				
1er apport	*50 kg 06/03	*80 kg 11/03	*80 kg 13/03	*80 kg 12/03
2eme apport	*110 kg 17/04	105 kg 13/04	105 kg 15/04	105 kg 14/04

Tableau 4 : Caractéristiques pédologiques et culturelles des essais
* : apport marqué



Parcelles A : ¹⁵AN
 Parcelles N : A ¹⁵N
 Parcelles U : ¹⁵Urée

Figure 3 · Plan de l'essai de MONS (1985)

2 - DISPOSITIFS EXPERIMENTAUX

21. Essai de Mons-en-Chaussée - 1985

L'essai a été mené à la station expérimentale INRA de Mons-en-Chaussée, dans la Somme (80) sur un limon profond dont les caractéristiques physiques et chimiques sont indiquées tableau 4. Le blé d'hiver (*Triticum aestivum* c.v. Pernel) a été semé le 15 Octobre 1984. Le précédent cultural était un colza d'hiver.

Les traitements étudiés ont été la forme d'azote apportée et la date d'application :

* 3 formes :

- ^{15}N -urée ($^{15}\text{NH}_2$)₂CO : parcelles *U
- $^{15}\text{NH}_4\text{NO}_3$: parcelles *AN
- $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$: parcelles A*N

* 2 dates d'application :

- premier apport au tallage du blé (stade 3 sur l'échelle de Feekes)
- second apport au début montaison (stade 5 sur l'échelle de Feekes).

La dose totale d'azote apporté était constante : 160 kg N.ha⁻¹. Elle a été calculé en utilisant la méthode du bilan prévisionnel. Un traitement témoin sans azote a été inclus.

Les parcelles, de taille 3,5 m x 3,5 m, ont été disposées de manière aléatoire, avec 3 répétitions par forme, formant 3 blocs (Fig. 3). Chaque parcelle a été divisée en 8 placettes de 0,3 m² qui représentent la surface élémentaire sur laquelle ont été effectués les prélèvements de plante et de sol pour chaque date de mesure. Une neuvième placette de 1 m², au centre de la parcelle, (Fig. 4), a été utilisée pour des analyses de plantes à la récolte, et réservée pour des analyses de sol et de plante sur la culture suivante (betterave à sucre).

Des zones "tampons" ont été prévues entre placettes ainsi qu'entre les placettes et le bord de la parcelle marquée. Ces zones tampons ont des tailles variables selon, en particulier, le délai qui s'écoule entre le prélèvement fait sur une placette et celui fait sur la placette voisine. Chabalier et al (1975) ont montré que des bordures de 30 à 50 cm conduisent à des erreurs relatives respectives de 1 à 5 % sur les mesures d'excès isotopiques à la récolte.

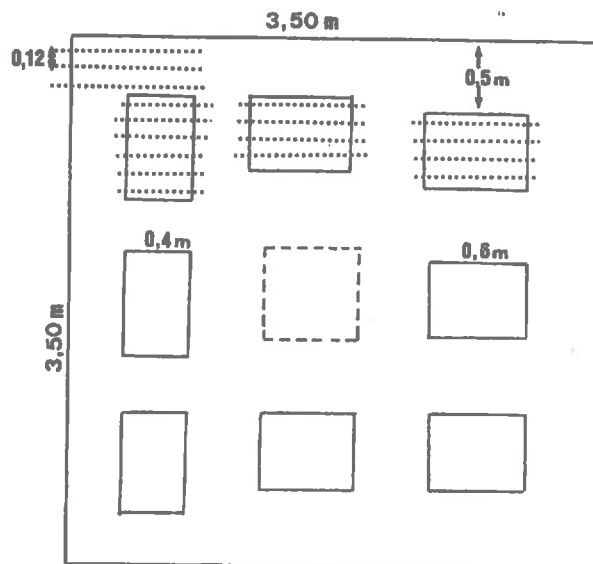


Figure 4 : Plan d'une parcelle 15N avec ses 9 placettes de prélèvement

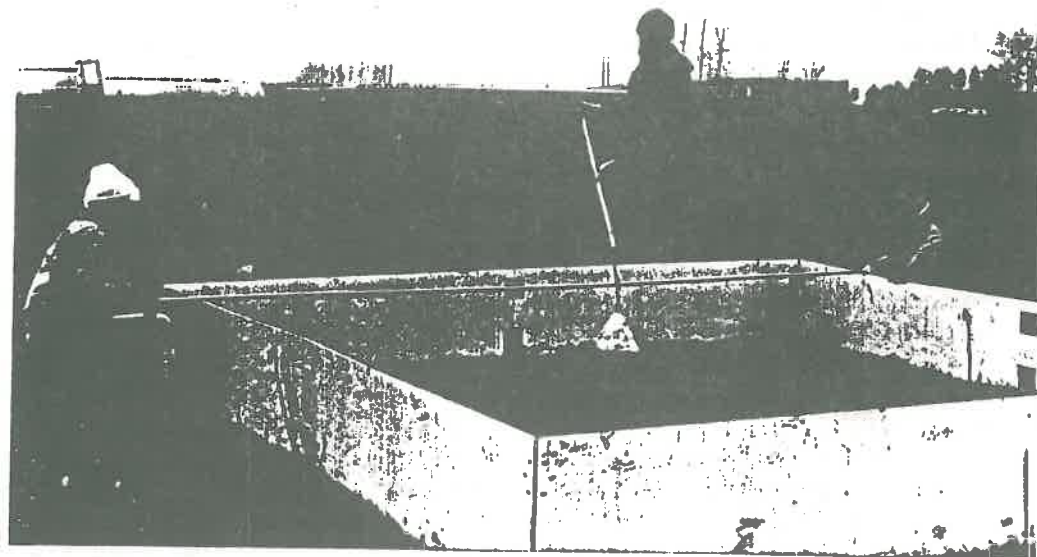


Photo 1 : Epandage de l'azote marqué

Neuf parcelles (parcelles I) ont reçu 50 kg N.ha⁻¹ sous forme ¹⁵N-urée (excès isotopique de l'ammonium 3,63 %), ¹⁵NH₄NO₃ (excès isotopique de l'ammonium 8,54 %), NH₄¹⁵NO₃ (excès isotopique du nitrate 11,58 %), le 6 mars (jour 0) et 110 kg N.ha⁻¹ (sous la même forme, non marquée) le 17 avril (jour 42). Les 9 autres parcelles (parcelles II) ont reçu 50 kg N.ha⁻¹ (non marqué) et 110 kg N.ha⁻¹ sous forme ¹⁵N-urée (excès isotopique de l'ammonium : 1,61 %), ¹⁵NH₄NO₃ (excès isotopique de l'ammonium : 3,71 %), NH₄¹⁵NO₃ (excès isotopique du nitrate : 3,63 %) aux mêmes dates.

Les parcelles I et II ont été choisies contiguës pour un même traitement, de façon à permettre l'extrapolation (I + II) (Figure 3).

Deux parcelles latérales (8,5 m x 56 m) ont reçu de l'azote non marqué sous forme solide, soit de l'urée, soit du nitrate d'ammonium. Elles ont été mises en place pour réaliser les mesures de volatilisation et de dénitrification.

Epannage de l'azote

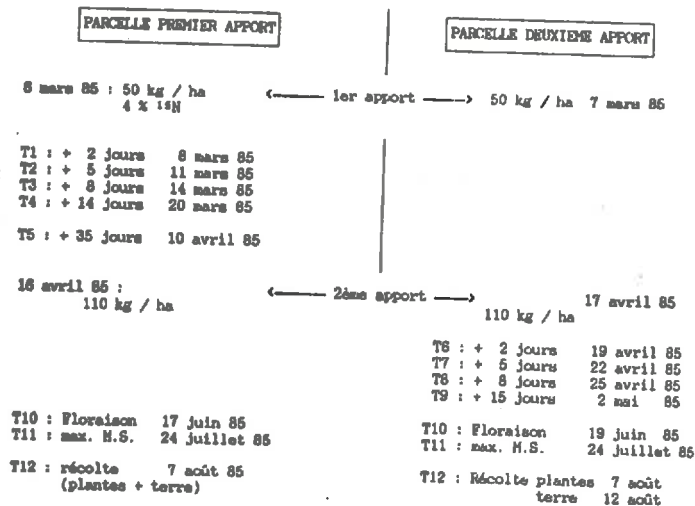
L'azote marqué et non marqué, a été apporté sous forme liquide, en utilisant un pulvérisateur manuel équipé d'une buse fongicide. L'application a été réalisée avec de nombreux croisements de façon à obtenir une pulvérisation la plus homogène possible. Chaque parcelle a ainsi reçu 8 litres de solution d'azote, puis 2 l d'eau afin de "laver" le mieux possible le feuillage (soit 0,7 mm eau).

Calendrier de prélèvements

Les placettes ont été échantillonnées aux jours 2, 5, 8, 14, 35, 103 (floraison), 140 (remplissage du grain) et 154 (maturité) après le premier apport marqué sur les parcelles I ; aux jours 44, 47, 50, 57, 103, 140, 154 (respectivement 2, 5, 8, 15, 61, 98, 112 jours après le second apport marqué) sur les parcelles II.

CALENDRIER DES PRELEVEMENTS

TO
Profil azote minéral
Abondance naturelle ¹⁵N M.O.



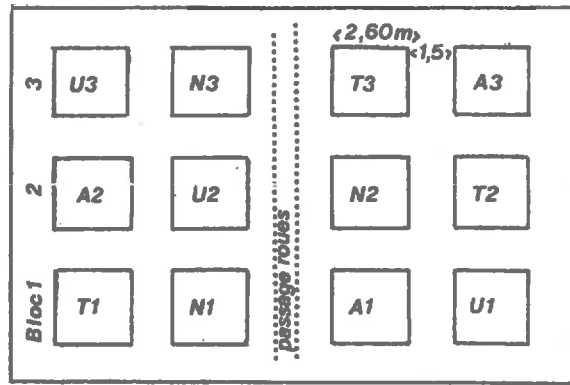


Figure 5 : Plan d'un essai (Bourguignon, Etrépilly, LIVRY 1987)

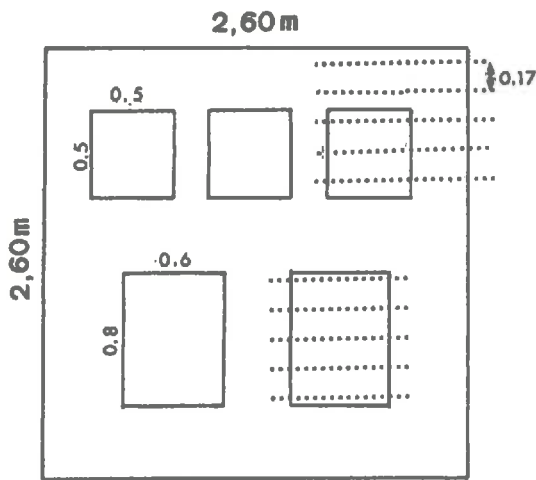
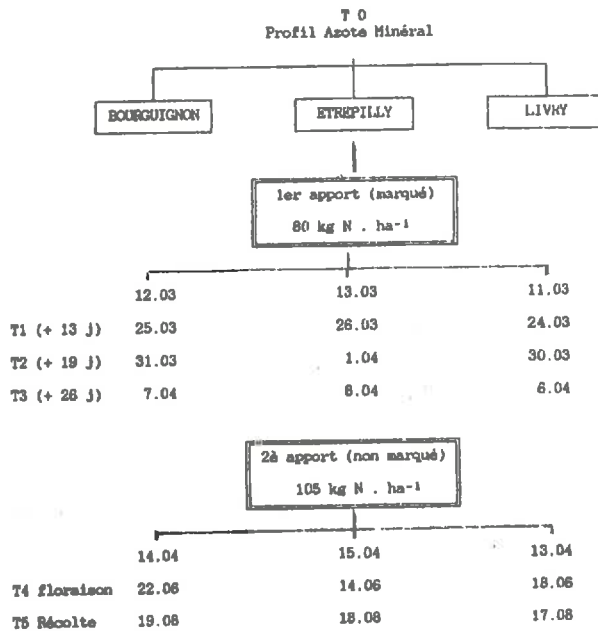


Figure 6 : Plan d'une parcelle ¹⁵N avec 5 placettes de prélèvement

CALENDRIER DES PRELEVEMENTS



22. Essais 1987

Sur cette deuxième série d'essais un protocole sensiblement identique, mais simplifié, a été appliqué simultanément sur 3 sites : Livry Louvercy (Marne), Etrepilly (Aisne) et Bourguignon/Coucy (Aisne), dont les caractéristiques pédologiques et culturales sont indiquées tableau 4.

Le facteur étudié a été la forme de l'apport de l'azote : trois formes marquées ont été apportées lors d'un premier apport au tallage du blé :

- ($^{15}\text{NH}_2$) $_2\text{CO}$ (urée) : parcelles *U
- $^{15}\text{NH}_4\text{NO}_3$: parcelles *AN
- $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$: parcelles A*N

Un traitement "témoin" sans azote est également suivi (T).

Les parcelles, d'une taille de 2,6 m x 2,6 m ont été disposées de manière aléatoire, avec 3 répétitions par traitement, formant 3 blocs (Figure 5). Sur chacune des parcelles on a délimité 5 placettes de prélèvement de 0,3 m² à 0,5 m² chacune. Les zones "tampons" entre les placettes, et entre placettes et bordure de la parcelle sont également variables, de 0,2 m à 0,5 m (Figure 6).

Les doses d'azote apportées ont été les mêmes dans les 3 essais : le premier apport marqué a été de 80 kg N.ha⁻¹ sous forme ^{15}N -urée (excès isotopique de l'ammonium : 2,56 %), $^{15}\text{NH}_4\text{NO}_3$ (excès isotopique de l'ammonium : 5,30 %) ou $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$ (excès isotopique du nitrate : 5,86 %), début mars (jour 0). Le second apport a été de 105 kg N.ha⁻¹, sous la forme U ou AN non marquée, à la mi-Avril.

Epannage de l'azote

L'application a été réalisée un peu différemment de celle de l'essai 85 de façon à éviter au maximum les absorptions foliaires constatées alors. 5 épannages successifs ont été effectués entre les lignes du blé (sous le couvert végétal). Pour cela, chaque parcelle a reçu 4 litres de solution azotée puis 2 litres d'eau (environ 1 mm eau).

Calendrier des prélèvements

Les placettes ont été échantillonnées à 13, 19 et 26 jours après l'apport d'azote marqué, puis à la floraison et à la maturité du blé.

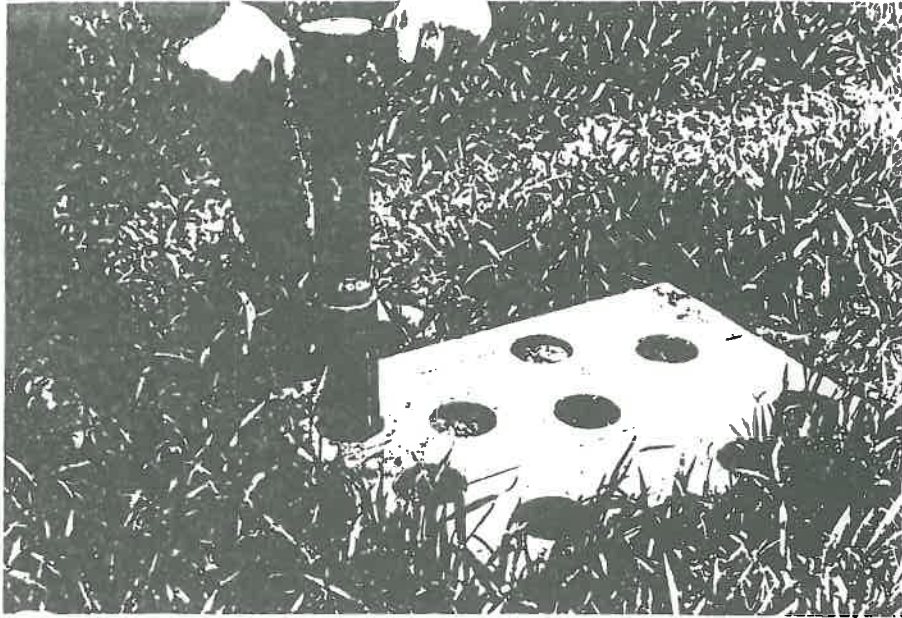


Photo 2 : Positionnement des prélèvements avec la plaque perforée

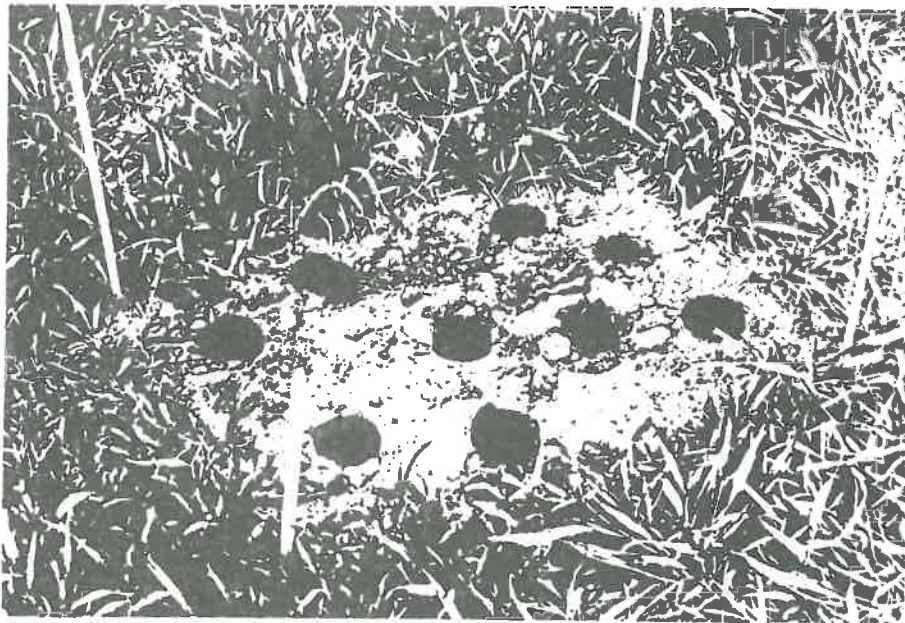


Photo 3 : Placette à la fin du prélèvement

3 - METHODES D'ECHANTILLONNAGE AU CHAMP

31. Parties aériennes

Dans chaque placette de prélèvement, la totalité des parties aériennes a été récoltées. Elles ont été coupées avec précaution juste au-dessus du plateau de tallage, sans perturber la surface du sol. Elles ont été lavées pour éliminer les traces de terre et d'engrais pouvant rester sur les feuilles.

32. Sol et racines

Sur la même placette, 9 carottes de sol ont été prélevées ensuite : les échantillons ont été constitués en mélangeant les carottes obtenues de chaque horizon.

Trois types de sondes ont été utilisées : une sonde de 60 mm de diamètre pour les horizons 0-10 et 10-30 cm, une sonde de 40 mm de diamètre pour la couche 30-60 cm et une sonde de 25 mm pour les horizons plus profonds. Ces horizons (60-90 cm et 90-120 cm) n'ont été prélevés qu'à la floraison et à la récolte. Les horizons 10-30 cm et 30-60 cm ont été prélevés ou non en fonction des précipitations intervenues depuis l'épandage.

Dans le souci d'obtenir un échantillonnage représentatif du sol et du système racinaire, les 9 carottes ont été prélevées comme suit : 2 carottes ont été prélevées sur le rang, 3 au milieu de l'interang et 4 tangentiellement aux rangs. L'utilisation d'une plaque de contreplaqué percée de 9 trous a permis d'une part de "standardiser" le prélèvement pour toutes les placettes et, d'autre part, de limiter la perturbation de la surface du sol en facilitant le prélèvement et le maniement des sondes.

Les échantillons ont été rapidement ramenés au laboratoire ou placés dans des glacières et pesés avant le sous-échantillonnage. En utilisant le poids réel de chaque échantillon et les valeurs de densité apparente mesurée par sonde gammamétrique, la profondeur exacte de chaque échantillon a pu être recalculée et les corrections nécessaires réalisées.

Dans les essais menés en 87, les techniques au champ ont été identiques. Seuls les horizons 0-10 cm et 10-30 cm ont été prélevés aux 3 premières dates. A la floraison et à la maturité du blé, l'horizon 30-60 cm a été également prélevé.

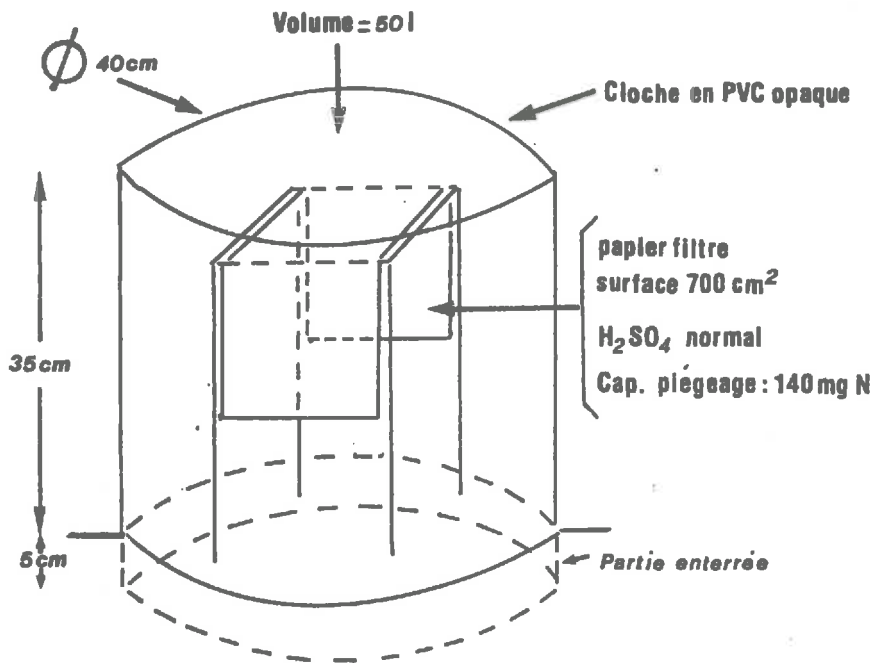


Figure 7 : Système de piégeage de l'ammoniac
(d'après FRESNEAU 1982)

33. Volatilisation

Les mesures de volatilisation ont été réalisées par une méthode de confinement, adaptée et testée par Fresneau (1982). Des cylindres opaques en PVC (hauteur 40 cm, diamètre 40 cm) sont enfoncés de 5 cm dans le sol et fermés à l'extrémité supérieure. L'ammoniac dégagé par le sol sous le cylindre est piégé sur un papier filtre saturé en H_2SO_4 (1N) installé à 30 cm de la surface du sol sur un support (Figure 7).

Toutes les 24 heures, le papier filtre est récupéré et remplacé, la cloche étant déplacée. Les mesures ont été réalisées avec 3 répétitions, dès l'apport et pendant 2 semaines.

L'ammoniac piégé est extrait par agitation dans 200 ml d'acide sulfurique (1N), puis dosé par colorimétrie.

34. Dénitrification

Des mesures de dénitrification ont été réalisées avec l'aide de JC Germon et Y Couton (INRA Dijon), en utilisant la méthode d'inhibition à l'acétylène.

Des cylindres de PVC (diamètre 50 cm) sont enfoncés dans le sol (3 cm en dessous, 12 cm au-dessus de la surface). Autour de chaque cylindre, 4 aiguilles d'acier sont introduites verticalement dans le sol, jusqu'à 30 cm de profondeur. L'atmosphère du sol est saturée par l'acétylène à un débit de 15 ml/min/aiguille pendant 24 heures, ce qui amène à une concentration en acétylène supérieure à 0.5 % dans la couche supérieure du sol (GERMON et al 1983). Dès que l'injection d'acétylène est arrêtée, les cylindres sont fermés, des prélèvements de gaz sont effectués au temps 0, 20 et 40 minutes. Les mesures ont été réalisées une fois par semaine de Mai à Octobre, avec 5 répétitions.

Le N_2O accumulé dans les cylindres a été dosé en chromatographie par capture d'électrons. Les flux de dénitrification ont été calculés selon la méthode de Germon et al (1985).

4 - METHODES ANALYTIQUES

41. Mesure des matières sèches des parties aériennes et des racines

La matière sèche et l'azote absorbé des parties aériennes ont été déterminés à 12 stades du cycle végétatif. A maturité les plantes ont été séparées en (paille + balles) et grain. Le rendement en grains est exprimé à 15 % d'humidité.

La matière sèche et l'azote des racines ont été évalués à certaines des dates de prélèvements dans l'horizon 0-10 cm ou 0-10 cm et 10-30 cm, et sur tout le profil (0-120 cm) à la floraison. A cette fin, les échantillons de sol ont été tout d'abord sous-échantillonnés pour réaliser les mesures d'azote minéral et d'azote

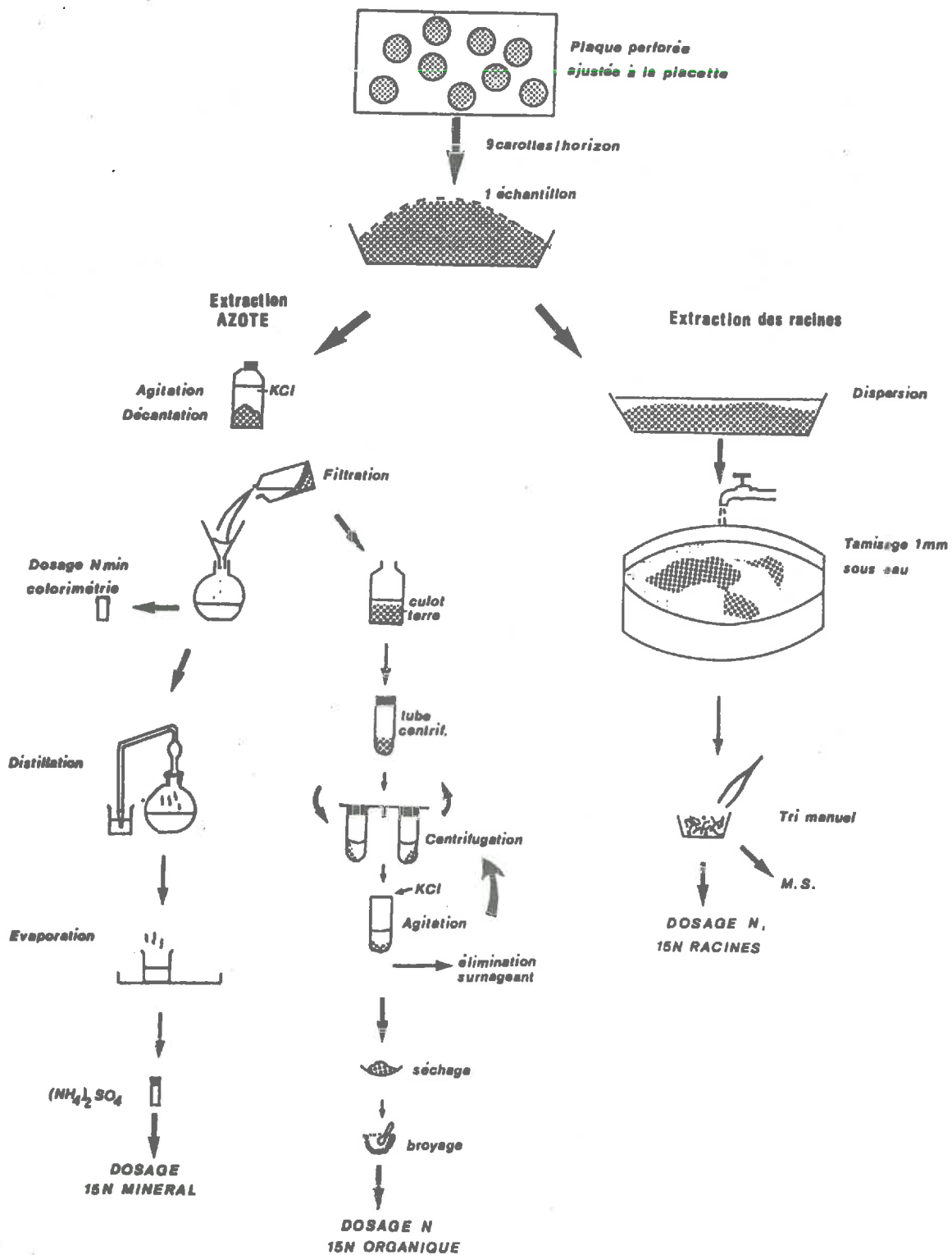


Figure 8 : Les différentes étapes de traitement d'un échantillon de terre pour le dosage de l'azote minéral, l'azote organique, l'extraction des racines et les mesures isotopiques

organique. Le sol restant (environ 4, 8 et 4 kg de sol frais pour les horizons 0-10 cm, 10-30 cm et 30-60 cm respectivement) a été utilisé pour l'extraction des racines.

Celles-ci ont été séparées après dispersion du sol pendant 12 heures dans le métaphosphate de sodium (50 g.l^{-1}), suivi d'un tamisage sous eau sur un tamis de maille 1 mm. Les racines sont ensuite abondamment lavées et séparées manuellement des autres débris végétaux et minéraux à l'aide d'une pince fine. Les parties aériennes et les racines sont séchées à 80°C , finement broyées en poudre.

42. N minéral

L'azote minéral a été extrait par le chlorure de potassium : 150 g de sol dans 300 ml KCl (1M), agitation pendant 1/2 heure et décantation. Chaque analyse comporte 2 répétitions. Le dosage a été réalisé par colorimétrie en flux segmenté avec un analyseur automatique Technicon, par réduction des nitrates en nitrites par l'hydrazine et dosage des nitrites par la réaction de Griess Ilosvay (Henriksen et Selmer-Olsen 1970) et la méthode à l'indophénol pour l'ammonium (Verdow 1977).

43. Dosage de l'urée

Alors que la majorité des auteurs suivent l'hydrolyse de l'urée par apparition de l'ammonium dans le sol, nous avons dosé ce composé de manière spécifique. Deux techniques étaient à notre disposition :

- la détermination de l'azote uréique par la méthode de l'uréase, adaptée par Fresneau (1982). Cette méthode consiste successivement à faire une hydrolyse de l'urée et distiller l'ammonium produit. Elle est lourde à utiliser (temps d'incubation, bain-marie) mais réellement adaptée si l'on veut déterminer l'excès isotopique de l'urée.
- la détermination de l'urée par la méthode colorimétrique au diacétylmonoxime de Mulvaney et Bremner (1979). La méthode est basée sur le principe de l'étude de Fearon (1939) : l'urée chauffée avec du diacétylmonoxime et du thiosemicarbazide en conditions acides forme un composé de couleur rouge foncé.

Douglas et Bremner (1970), Mulvaney et Bremner (1979) ont mis au point cette méthode pour les extraits de terre, en particulier avec l'utilisation de l'acétate phenylmercurique comme inhibiteur de l'hydrolyse dès l'extraction.

Le dosage de l'urée ne justifie généralement pas l'utilisation d'une chaîne colorimétrique automatisée, en raison du nombre relativement limité d'échantillons dans une même série, comparé au nombre de dosages d'azote ammoniacal et nitrique.

Cependant la méthode manuelle préconisée met en oeuvre de grandes quantités de réactifs nocifs qui sont très instables, ce qui

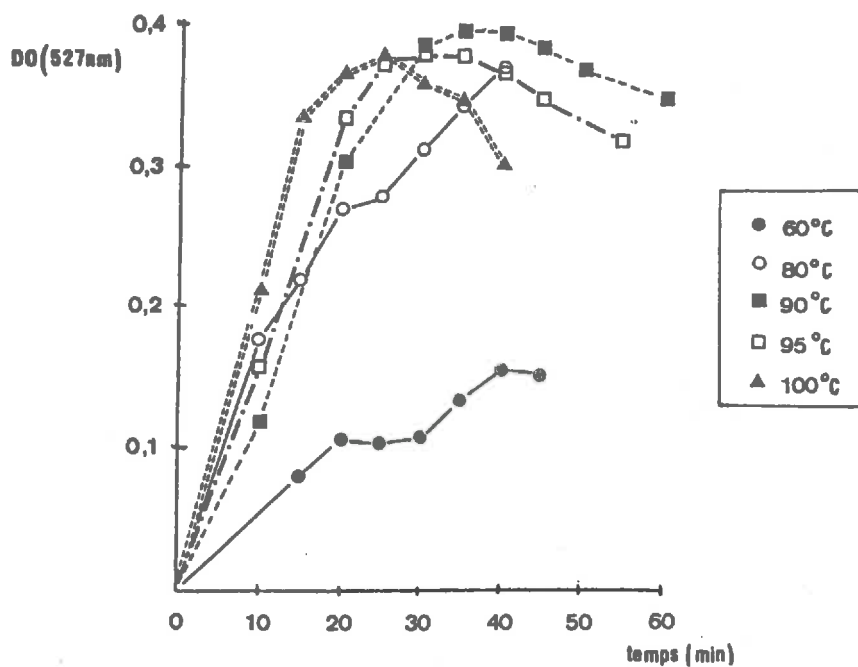


Figure 9 : Dosage colorimétrique de l'urée : évolution de la coloration de la solution en fonction de la durée et de la température d'incubation au bain-marie

la rend lourde, peu rapide et imprécise.

Afin de rendre cette technique plus facile d'emploi, nous l'avons améliorée de la façon suivante :

1 - réduction des volumes de réactifs utilisés grâce à l'emploi de pipettes de précision (volume final 2,5 ml au lieu de 50 ml). Cette réduction des volumes permet de travailler de manière plus rapide, et de traiter un plus grand nombre d'échantillons. L'emploi de petits tubes de verre facilite également les manipulations au bain-marie, le passage en refroidissement, dont la rapidité et la standardisation sont des éléments essentiels dans la révélation de la coloration.

2 - définition de la température et de la durée optimale d'incubation. Le meilleur développement de la coloration est obtenu pour une durée d'incubation de 35 mn à 90°C (Figure 9).

La procédure de dosage est explicitée en annexe p.186.

44. N organique

Nous avons d'abord cherché, dans les échantillons de sol, à séparer le ^{15}N associé aux racines fines du ^{15}N organique du sol sensu stricto (microbien ou humifié). Cependant les défauts de bilan d'azote 15 observés (cf page 70), nous ont amené à nous interroger sur la possibilité de pertes d'azote 15 au cours de cette séparation. Nous avons alors comparé deux techniques :

* une technique consistant à éliminer les résidus organiques libres supérieurs à 0,1 mm par tamisage et du ^{15}N minéral par des extractions successives. Le dosage du ^{15}N a ensuite été réalisé de deux façons :

- soit par minéralisation Kjeldahl et analyse isotopique du $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ formé au spectromètre de masse (technique conventionnelle) ;
- soit par un dosage couplé N et ^{15}N à l'analyseur d'azote connecté au spectromètre de masse (Marshall et Whiteway 1985) ;

* une technique de mesure globale du compartiment organique sans élimination des racines fines et résidus et sans élimination totale de l'azote minéral, le dosage étant fait par le couplage analyseur + spectromètre.

Le détail de ces protocoles et l'expérience méthodologique qui s'y rapporte font l'objet d'un développement plus important (paragraphe 52).

Toutes les valeurs d'azote ^{15}N organique présentées dans les résultats ont été obtenus sur des échantillons de terre dont l'azote minéral a été totalement extrait.

A cette fin, le culot de terre après l'extraction KCl est centrifugé (1/4 h à 3000 tours min^{-1}), puis subit 2 nouvelles extractions successives au KCl (20 g terre humide pour 80 g KCl 1M). L'échantillon est ensuite séché (60°C) et broyé très finement en vue de son passage à l'analyseur d'azote.

45. Analyses ^{15}N

^{15}N minéral

$^{15}\text{NH}_4$ et $^{15}\text{NO}_3$ sont séparés par distillations successives de l'extrait KCl avec la magnésie calcinée, puis après réduction des nitrates en ammonium par l'alliage Dewarda. L'ammoniac est piégé dans H_2SO_4 (0,1N), l'évaporation menée en milieu acide (Bremner 1965a). La procédure technique a été décrite par Fresneau (1982).

^{15}N total

1 - attaque Kjeldahl

L'azote total est dosé après réduction du nitrate par le fer, minéralisation par attaque Kjeldahl et distillation, titration et évaporation en milieu acide (Bremner 1965a).

2 - combustion type "Dumas"

Cette combustion "sèche" est réalisée à l'aide d'un auto-analyseur d'azote (Carlo Erba, ANA 1500). L'échantillon (végétaux, sols, liquides adsorbés sur un matériau inerte) est pesé, placé dans une nacelle d'étain et déposé dans un distributeur automatique. Chaque échantillon est automatiquement introduit dans un four d'oxydation (Cr_2O_3 à 1000°C) où, en présence d'oxygène, a lieu une combustion violente ou "combustion flash" pendant laquelle la température s'élève à 1800°-2000°C. Il en résulte une oxydation complète et la formation de CO_2 , H_2O , N_2 et N_xO_y . Les produits de combustion sont entraînés par le flux d'hélium. Le passage sur un four de réduction contenant du cuivre à 680°C permet d'éliminer l'excès d' O_2 et de convertir les oxydes d'azote en N_2 .

Le CO_2 et H_2O sont retenus dans des pièges chimiques (ascarite et tamis moléculaire ou perchlorate de magnésium) et/ou piégés à l'azote liquide. Le flux passe ensuite à travers une colonne chromatographique puis dans un catharomètre qui fournit un signal électrique proportionnel à la concentration en azote.

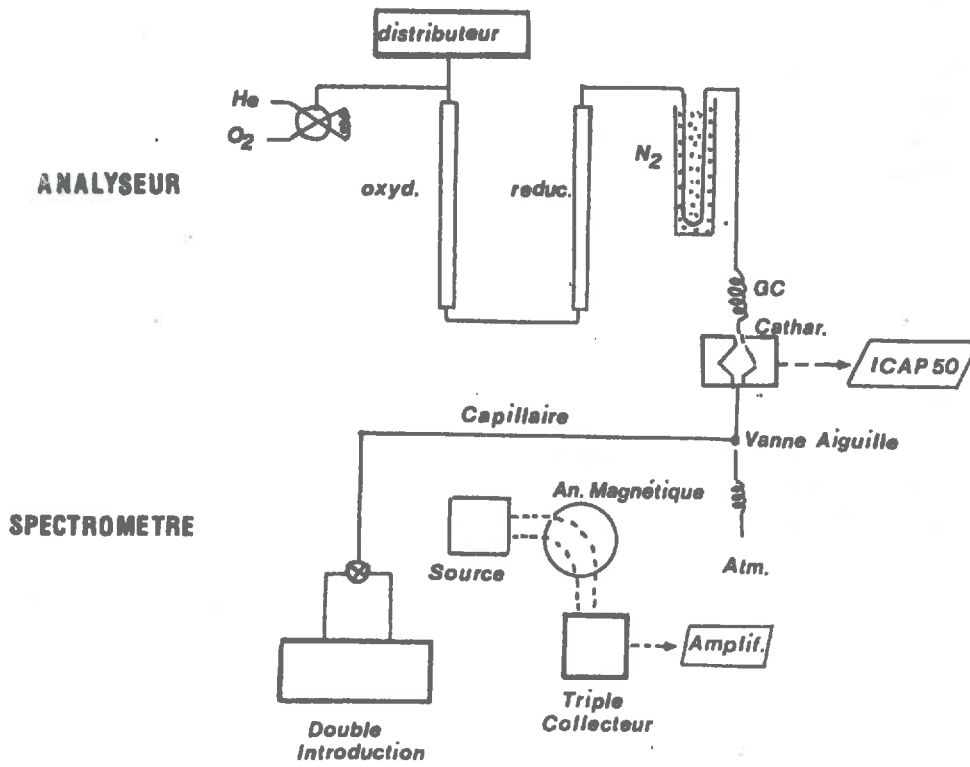


Figure 10 : Liaison Analyseur d'azote - Spectromètre de masse

Mesures isotopiques

Analyse Rittenberg

La transformation du sulfate d'ammonium (échantillon issu de la minéralisation Kjeldahl ou de la distillation de l'azote minéral), en azote gazeux se fait en traitant l'échantillon par une solution d'hypobromite de lithium en milieu totalement exempt d'air, selon la technique décrite par Rittenberg (1948).

La composition isotopique de l'azote moléculaire est ensuite déterminée avec un spectromètre de masse VG SIRA 9 à double introduction et triple collection, par comparaison avec un gaz de référence étalonné par rapport à l'air.

Analyse par couplage Analyseur N - spectromètre de masse

Une aliquote de l'ordre de 0.1 % du flux de gaz sortant de l'analyseur est envoyée (via une vanne aiguille et un capillaire en inox) vers le spectromètre de masse. Un flux continu d'hélium arrive donc au spectromètre de masse, avec une pression partielle en azote qui varie continuellement au cours du temps (suivant le pic d'éluion de la colonne chromatographique).

Contrairement à la méthode classique dans laquelle on mesure à l'équilibre les courants 29 ($^{14}\text{N}^{15}\text{N}$) et 28 ($^{14}\text{N}^{14}\text{N}$), on mesure ici un rapport de charges (courant x temps) en intégrant les pics 28 et 29. Le cycle total d'un échantillon est de 210 secondes dont 155 secondes d'intégration du pic.

Ce type d'analyse dynamique ne permet pas de se référer en parallèle au gaz de référence. Il est alors nécessaire de prendre en compte :

- l'azote provenant de l'échantillonneur automatique : pour cela on réalise des "blancs" avec des nacelles vides ;
- l'azote provenant de l'hélium vecteur, qui constitue le "bruit de fond", traduit par une ligne de base. Celle-ci est mesurée au début et à la fin de chaque analyse.

On calibre ensuite les abondances, en analysant des échantillons d'abondances isotopiques connues et différentes : généralement de l'atropine (Ab = 0,3612 %) et du sulfate d'ammonium (Ab = 0,5663 %). On corrige la dérive d'abondance de 2 façons :

- par la mesure en dynamique d'une référence (généralement de l'atropine), tous les 5 échantillons ;
- par la mesure en statique d'un gaz de référence en présence du flux d'hélium, entre 2 échantillons.

Les quantités analysées varient entre 50 et 500 $\mu\text{g N/échantillon}$. La masse de l'échantillon utilisé, déterminée par une microbalance à 0,01 mg, est choisie en fonction de la teneur supposée en N : 3 à 10 mg pour les plantes et 20 à 50 mg pour les sols.

La précision nominale du spectromètre de masse est de plus ou moins 0,0003 % c'est à dire 1 % environ d'erreur sur l'abondance.

	Excès isotopiques %				
	N-NH ₄	N-NO ₃	N organique	N racines	N p.aériennes
2 j.	1.4917	1.2192	0.0063	0.1759	0.5427
15 j.	1.3181	1.4607	0.0256	0.3725	0.5358
Flor.	0.1851	0.2170	0.0257	0.3617	0.6407

Tableau 5 : Exemple d'évolution des excès isotopiques des compartiments N minéral, N plante et N organique, au cours du temps après un apport de ¹⁵N-urée (1,61 %). Moyenne de 3 répétitions .

5 - TRAITEMENT DES ECHANTILLONS POUR L'EVALUATION DU COMPARTIMENT "¹⁵N ORGANIQUE"

51 . Introduction

Le dosage du compartiment organique peut être abordé de plusieurs manières selon la signification qu'on lui attribue. Dans notre cas, il s'agit de quantifier pour une période de temps donnée, l'azote qui sera "immobilisé" dans le compartiment organique et les variations de ce compartiment résultant du cycle de minéralisation-organisation (ceci étant rendu possible grâce au traçage isotopique). Dans le cadre d'un "bilan" (du devenir de l'azote apporté à une culture), notre préoccupation est aussi de ne pas éliminer de manière totale une fraction, d'autant que les limites des compartiments dosés ne sont pas toujours facilement définissables.

Si le contenu en azote minéral d'un sol n'affecte pas de façon sensible - avec les moyens méthodologiques dont nous disposons - la teneur en N de ce sol, il n'en va pas de même quand on utilise le traceur ¹⁵N. Dans ce cas, le marquage du compartiment N minéral est infiniment plus important que celui de l'azote organique, et il importe alors d'estimer parfaitement chacun des 2 compartiments.

Dans l'étude des transformations de l'azote après un apport marqué, l'évolution des pools d'azote minéral et organique dans le sol et dans la plante, et de leur marquage respectif (tableau 5), a pour conséquence que la nature des échantillons à traiter est très variable au cours du temps. Les méthodes doivent s'y adapter.

Comment accéder de manière précise à un pool organique faiblement marqué en présence d'azote minéral en quantités importantes et fortement marqué ? Quelle est l'effet de la présence des racines dont le marquage est très supérieur à celui de la matière organique que l'on cherche à doser ?

Nous pouvons estimer ce compartiment marqué par :

- le dosage du ¹⁵N total sur un échantillon de terre, après extraction de l'azote minéral. L'échantillon contient alors les fractions ¹⁵N organique, ¹⁵N minéral résiduel et éventuellement ¹⁵N racines. Par un calcul de différence, on peut accéder à la valeur "¹⁵N organique".

- le dosage du compartiment ¹⁵N organique, après élimination complète de l'azote minéral de l'échantillon. La méthode employée diffère sensiblement selon les auteurs (dilutions successives dont le nombre est variable avec KCl et/ou H₂O...).

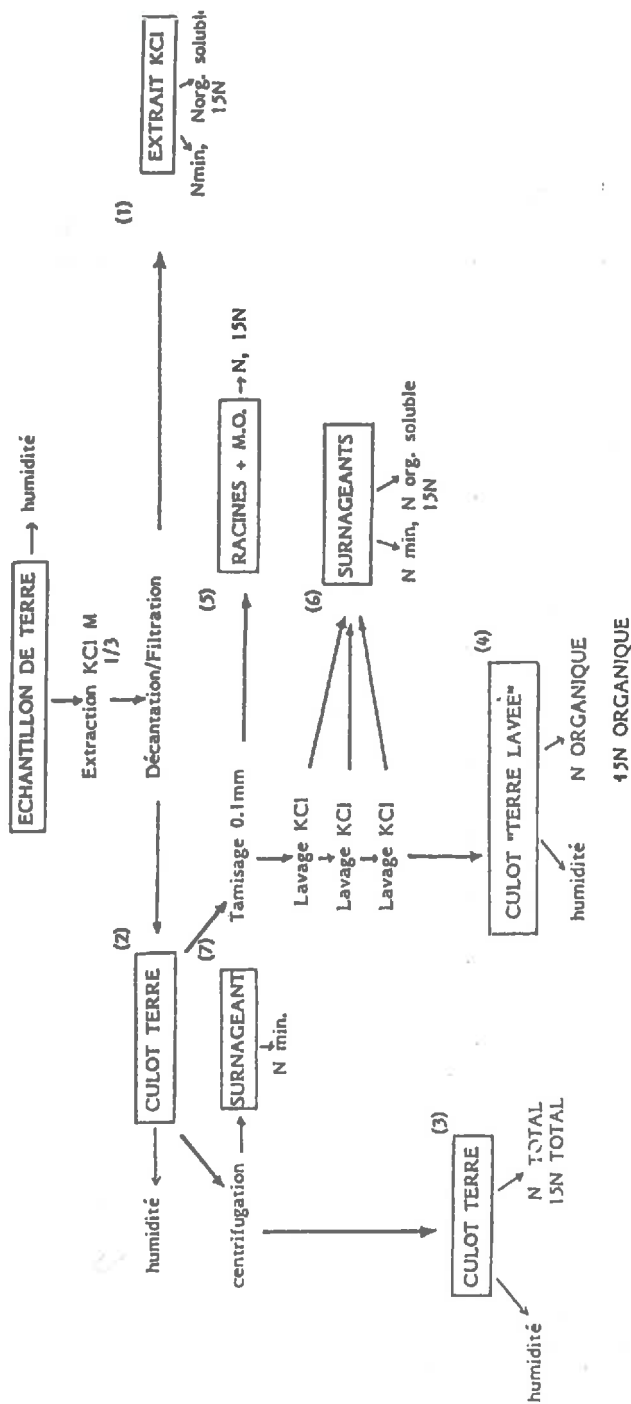


Figure 10 : Mise au point d'un protocole de traitement de l'échantillon de sol : identification des compartiments azote minéral, azote organique, azote organique soluble et azote racines

Les objectifs de l'expérience présentée ici, étaient de répondre à ces questions et d'estimer les difficultés liées :

* à l'élimination de l'azote minéral : importance des pertes de composés organiques solubles dans le KCl, effet des extractions successives;

* à la présence ou non de racines et leur élimination par tamisage,

et de définir les limites du dosage par le ^{15}N total, notamment dans le cas d'échantillons à contenu en ^{15}N minéral élevé. Nous avons pu également comparer les résultats obtenus par la minéralisation Kjeldahl et par la combustion Dumas et la variabilité induite par le mode de préparation des échantillons.

52. Protocoles expérimentaux

521 - Fractionnement ^{15}N minéral/ ^{15}N organique

Les échantillons de terre, précédemment congelés, proviennent de l'essai réalisé à Mons, sur limon profond (analyse de terre page 20). Deux échantillons correspondent au prélèvement se situant 14 jours après le deuxième apport réalisé sous forme de nitrate d'ammonium marqué soit sur l'ammonium (A1), soit sur le nitrate (N1). Ils contiennent des teneurs élevées en azote minéral. Les deux autres échantillons (A2 et N2) proviennent du prélèvement réalisé à la floraison du blé, et ils ne contiennent plus que des traces d'azote minéral.

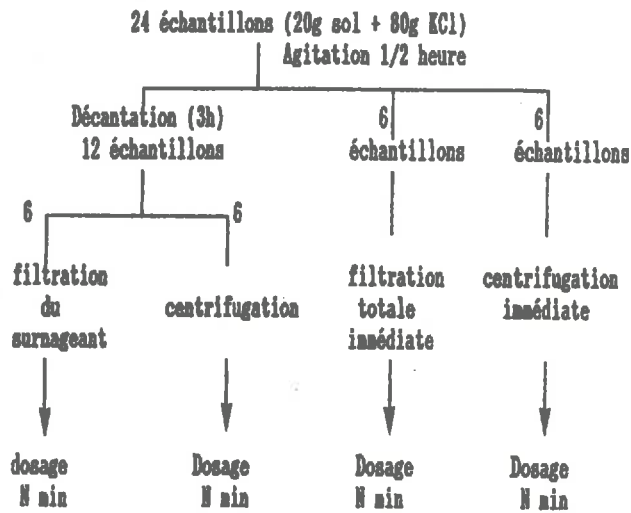
Le protocole de l'expérimentation est schématisé figure 11. Toutes les mesures comportent 3 répétitions. Chaque compartiment dosé est identifié par un numéro figurant sur le schéma.

L'extraction KCl (1M) est réalisée dans un rapport 1/3, agitation pendant 1/2 h, décantation 3 heures et filtration. C'est la procédure classique que nous utilisons pour tous les échantillons de terre des expérimentations de terrain.

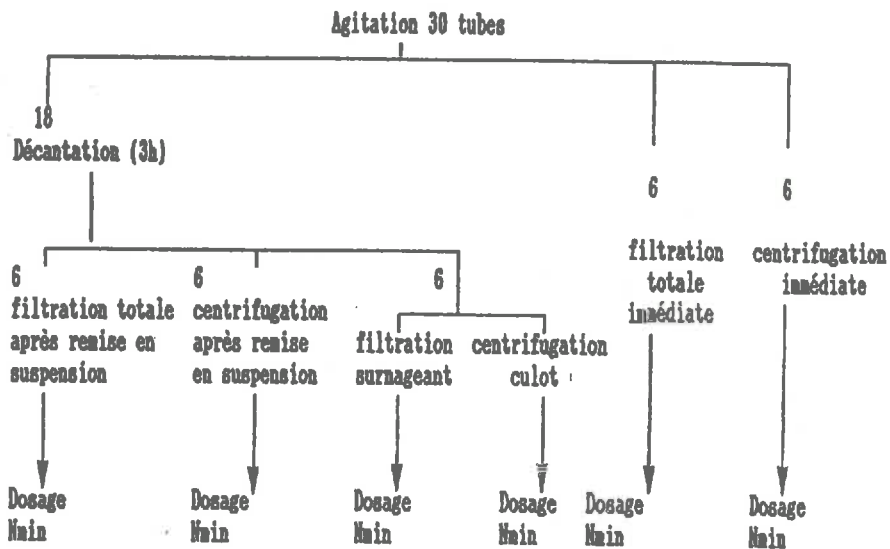
* L'extrait KCl (1) : N minéral est dosé par colorimétrie d'une part, par distillation et titration suivie d'un dosage isotopique du sulfate d'ammonium d'autre part ; l'azote organique soluble est également dosé (cf ci-dessous).

* Le culot de terre (2) est repris et va subir deux traitements parallèles :

- un dosage de ^{15}N total (3) : l'échantillon est centrifugé (3000 tours.min⁻¹ pendant 1/4 h) de façon à éliminer l'excès de solution (et d'azote minéral), puis



a



b

Schéma 12 : Protocole de comparaison de l'effet de la décantation d'un échantillon de sol après extraction KCl, et de l'effet de la séparation sol/extrait par centrifugation ou filtration

dosé soit par minéralisation Kjeldahl, soit par combustion sèche (Dumas) sur un échantillon humide et sur un échantillon séché (60°C) et broyé.

- un dosage de ^{15}N organique (4) : l'échantillon est tamisé à 0,1 mm sous un volume connu de KCl. Le résidu organique recueilli sur le tamis (5) est séparé des fractions minérales par lévigation, puis il est séché et broyé en vue du dosage. La terre "tamisée" (4) subit 3 extractions successives dans un volume connu de KCl (1M) (agitation 1/4 h, centrifugation 3000 tours. min^{-1}). Les surnageants (6) sont additionnés et conservés.

La terre "lavée" (4) est dosée pour N et ^{15}N soit par minéralisation soit par combustion Dumas (échantillons secs ou humides). Les surnageants (6) sont dosés pour ^{15}N minéral et ^{15}N organique soluble.

L'azote organique soluble de l'extrait KCl(1) et des surnageants (6) est dosé après élimination de l'azote minéral par distillation, en reprenant les culots de distillation et en leur faisant subir une évaporation en milieu acide, une minéralisation Kjeldahl et une distillation.

Tous les dosages ^{15}N (sulfate d'ammonium et échantillons de terre) sont réalisés à l'analyseur d'azote couplé au spectromètre de masse.

Les calculs des quantités d'azote minéral, azote organique soluble et azote ^{15}N extraits lors des trois extractions appliquées au culot de terre, sont effectués en tenant compte du KCl résiduel contenu dans ce culot de terre. D'autre part, la teneur en azote des échantillons de terre est corrigée du poids de KCl contenu dans l'échantillon sec.

522 - Comparaison de méthodes d'extraction de l'azote minéral

Les effets du mode de séparation de l'extrait KCl et de la terre, et ceux du temps de décantation sur les concentrations en N-NH_4 et N-NO_3 d'un échantillon de terre ont été étudiés.

1 - extraction sur sol frais : L'azote minéral de 20 g de sol frais a été extrait dans 80 g de KCl (1M), directement dans un tube de centrifugation. L'agitation est de 1/2 heure. Les 24 répétitions ont ensuite été réparties en 4 traitements selon le schéma 12 a.

2 - Extraction sur sol décongelé : L'azote minéral de 20 g de sol décongelé a été extrait dans 80 g de KCl (1M) dans un tube de centrifugation avec une agitation d'une demi-heure. Les 30 répétitions sont réparties en 5 traitements selon le schéma 12 b.

Echantillon	Extrait KCl mg.l ⁻¹		Solution CULOT mg.l ⁻¹	
	N-NH4	N-NO3	N-NH4	N-NO3
A.1	1.60	18.00	3.80	17.30
N.1	0.45	8.20	2.50	8.60
A.2	1.00	0.40	2.70	0.20
N.2	0.80	0.60	2.75	0.40

Tableau 6 : Concentrations en N-NH4 et N-NO3 obtenues dans l'extrait KCl (1), et dans la solution du culot de terre (2) après centrifugation . Moyenne de 3 répétitions

53. Résultats et discussion

531 - Comparaison des méthodes analytiques

Les échantillons ont subi soit une minéralisation Kjeldahl (Kj) soit une combustion à l'analyseur (ana). Ils ont été, soit analysés humides, soit analysés après séchage et broyage. Ils ont été tamisés et débarrassés de l'azote minéral ou non. Les résultats concernant la teneur en azote et les excès isotopiques des échantillons suivant le mode de traitement, sont donnés annexe p.188.

Mesure du ^{15}N minéral :

L'azote ^{15}N minéral représente, par exemple, 14 jours après l'apport d'azote, 50 % de l'azote ^{15}N total du culot "sol + KCl" avant centrifugation et 30 % après. On doit donc obtenir une mesure très précise de la valeur " ^{15}N min" qui sera retranchée de la mesure " ^{15}N total". Cette valeur dépend elle-même de la précision des mesures d'humidité et de teneur en azote de l'extrait KCl.

L'échantillon de terre récupéré après extraction KCl, est à une humidité de 100 % (% TS) environ. L'homogénéité de l'échantillonnage est donc difficile à obtenir (phase liquide-phase solide). C'est pourquoi l'humidité est réduite par une centrifugation (3000 tours min^{-1} pendant 15 minutes) après laquelle, la "pâte" obtenue est à une humidité de 38 % environ.

L'extrait recueilli après centrifugation (7) a été dosé pour N-NH_4 et N-NO_3 . Les résultats obtenus (tableau 6) montrent que les concentrations en azote minéral ne sont pas identiques à celles de l'extrait KCl (1) : en effet les teneurs en azote ammoniacal sont 2 à 5 fois plus élevées que celles des extraits KCl correspondants ; par contre les concentrations en N-NO_3 sont sensiblement identiques.

Ce résultat nous a conduit à vérifier, par deux essais complémentaires, l'effet du mode de traitement de l'extrait KCl : d'une part l'effet de la décantation, réalisée quelques heures à température ambiante, d'autre part le mode de séparation de la terre et du KCl : filtration ou centrifugation.

Ces 2 expériences ont permis d'éclaircir quelques points :

* Dans le premier essai (tableau 7) nous avons mesuré les concentrations en azote minéral obtenues par 4 traitements de l'extrait sol + KCl après agitation. Nous observons des différences significatives pour l'azote ammoniacal et non significatives pour l'azote nitrique:

	N-NH ₄ mg.l ⁻¹		N-NO ₃ mg.l ⁻¹	
(a) Filtration immédiate	0.31	(0.007)	1.30	(0.08)
(b) Décantation filtration	0.34	(0.002)	1.33	(0.06)
(c) Centrifugation immédiate	0.28	(0.03)	1.34	(0.08)
(d) Décantation centrifugation	0.43	(0.02)	1.31	(0.02)

Tableau 7: Concentrations en N-NH₄ et N-NO₃ obtenues dans l'extrait KCl :

a : filtration totale et immédiate de l'échantillon

b : filtration du surnageant après décantation (3h)

c : centrifugation immédiate

d : décantation (3h), remise en suspension de l'échantillon et centrifugation

Moyenne de 6 répétitions, écarts-types entre parenthèses

traitement	N-NH ₄ mg.l ⁻¹		N-NO ₃ mg.l ⁻¹	
a FILT IMM	0.32	(0.02)	1.04	(0.02)
b CENT IMM	0.35	(0.05)	1.09	(0.01)
c DEC-FILT	0.39	(0.03)	1.11	(0.01)
d DEC-CENT	0.28	(0.07)	1.09	(0.02)
e SURNAGEANT DEC-filtré	0.23	(0.02)	1.12	(0.02)
f CULOT DEC-cent	0.70	(0.07)	1.44	(0.06)

Tableau 8 : Concentrations en N-NH₄ et N-NO₃ obtenues dans l'extrait KCl

a : filtration immédiate de la totalité de l'échantillon

b : centrifugation immédiate de la totalité de l'échantillon

c : décantation (3h), remise en suspension et filtration totale

d : décantation (3h), remise en suspension et centrifugation

e : décantation, filtration du surnageant

f : centrifugation du culot après e)

Moyenne de 6 répétitions, écarts-types entre parenthèses

la différence de concentration en N-NH₄ pour une filtration immédiate de l'échantillon total (a) et pour une filtration du surnageant après 3 h de décantation (b) est significative (au seuil de 5 %). La différence entre le traitement (d) (centrifugation après décantation) et les traitements a, b et c est significative (au seuil de 0,1 %). Il semble donc probable que cette évolution des concentrations en N ammoniacal ne soit pas due au mode de séparation (filtration/centrifugation) mais plutôt au temps de décantation.

* Dans le second essai (tableau 8) le traitement induit toujours une différence significative (au seuil de 10 %) entre les concentrations en azote ammoniacal pour les différents traitements. Nous constatons par ailleurs une très grande différence de concentration pour l'ammonium et le nitrate entre le KCl surnageant filtré (e) et la solution restant au contact du culot de terre centrifugé (f) (significatif au seuil 0,1 %).

Ces tests préliminaires réalisés sur des échantillons à faible contenu en azote, et sur un sol arbitrairement choisi, nous amènent à penser que :

1 - le mode mécanique de séparation (filtration ou centrifugation) a peu d'effet sur la fraction N minéral dosée.

2 - La filtration, suivie de la récupération du culot de terre en vue d'un dosage ¹⁵N organique, nécessite une décantation (de plusieurs heures à température ambiante généralement). C'est la méthode employée en routine sur les échantillons de terre ramenés du champ. Nous avons observé, sur un échantillon de terre fraîchement échantillonné au champ, une augmentation du contenu en azote ammoniacal des échantillons ayant incubé plusieurs heures, par rapport aux mêmes échantillons traités immédiatement. Cela n'a pas été observé sur un échantillon décongelé.

3 - la concentration en azote est plus élevée dans la phase adsorbée résiduelle (correspondant à la fraction de solution KCl qu'on ne récupère pas par filtration classique après décantation) que dans la phase libre (surnageant filtré).

	1ere Extraction		Extr. successives	
	N mg.kg ⁻¹	E.i. %	N mg.kg ⁻¹	E.i. %
A.1	3.7	0.1580	4.5	0.0486
N.1	4.4	0.1495	7.0	0.0594
A.2	3.4	0.1045	12.6	0.0292
N.2	5.1	0.0583	11.2	0.0137

Tableau 9 : Quantité d'azote sous forme organique soluble et excès isotopiques (E.i) dosé dans le KCl après la première extraction et dans les extraits KCl additionnés résultant des trois extractions successives (dans ce dernier cas on tient compte de l'azote présent au départ dans le culot de terre + KCl).
Moyenne de trois répétitions

	N minéral (1)			N minéral (6)			N minéral ré-extrait		
	NH4 N mg.kg ⁻¹	NO3 N mg.kg ⁻¹	E.i. %	NH4 N mg.kg ⁻¹	NO3 N mg.kg ⁻¹	E.i. %	NH4 N mg.kg ⁻¹	NO3 N mg.kg ⁻¹	E.i. %
A.1	5.8	65.7	1.246	8.3	18.0	0.737	4.3	0	-
N.1	1.5	28.1	1.392	4.4	13.4	0.617	2.1	5.3	-
A.2	3.5	1.4	0.149	6.1	0.9	0.094	4.0	0	-
N.2	2.6	2.0	0.078	4.8	1.7	0.034	2.5	0	-

Tableau 10 - Quantités d'azote minéral et excès isotopiques dosés après la première extraction (extrait KCl - 1 -), après les trois extractions successives (KCl "lavages" - 6 -);
- Azote minéral ré-extrait, obtenu par calcul en tenant compte de l'azote minéral initialement présent dans le culot terre + KCl.
Moyenne de trois répétitions

532 - Pertes au cours de la séparation N minéral-N organique

Azote organique soluble

L'azote organique soluble contenu dans les extraits KCl des 4 échantillons représente 3 à 5 mg N.kg⁻¹ terre sèche, soit 0,3-0,5 % de l'azote total. Les solutions KCl obtenues par les extractions successives contiennent des quantités plus élevées, notamment pour les échantillons de terre prélevés au moment de la floraison du blé (A.2 et N.2). Tableau 9

L'excès isotopique de cette fraction soluble présente dans le KCl, est très supérieur, pour chaque échantillon, à celui de l'azote organique (non soluble) correspondant (4). L'excès isotopique de l'azote organique soluble "ré-extrait" (excès isotopique calculé) est par contre du même ordre de grandeur.

Etant donné les quantités mises en jeu, cet azote organique soluble ne représente que 0,1 à 0,5 % de l'apport initial de ¹⁵N.

Effet des extractions successives

Les quantités d'azote ammoniacal extraites lors des lavages successifs sont élevées et parfois supérieures à celles obtenues lors de la première extraction KCl (tableau 10). Par contre, excepté pour un échantillon, il n'y a pas d'azote nitrique ré-extrait.

Il n'a pas été possible de calculer la contribution de l'apport ¹⁵N à l'azote minéral ré-extrait (6) parce que nous n'avons pas une mesure précise de l'azote 15 minéral présent dans le culot KCl (la mesure de l'excès isotopique de l'azote minéral récupéré en (7) n'a pas été réalisée).

Fraction éliminée par tamisage

La fraction récupérée sur le tamis de 0,1 mm est importante (tableau 11), et équivalente, en moyenne, à 1,5 tonne de matière sèche par hectare.

	Matière Sèche g.kg ⁻¹	Azote mg.kg ⁻¹	Excès isotopique %	% apport de ¹⁵ N
A.1	0.96	33.5	0.0997	1.4
N.1	1.01	33.4	0.0634	1.3
A.2	1.18	34.1	0.0584	2.3
N.2	1.10	32.8	0.0549	1.6

Tableau 11 Fraction organique récupérée sur le tamis de maille 0,1 mm (exprimée par kg terre sèche tamisée; les trois répétitions d'un même échantillon sont additionnées)

^{15}N $\mu\text{g.kg}^{-1}$	A.1	N.1	A.2	N.2
<i>Sans fractionnement</i>				
N total (3)	330.2	158.6	415.1	147.2
N minéral (7) *	117.0	48.1	0.6	0.7
N org. soluble (7)*	3.2	3.0	1.3	1.0
Total	450.4	209.7	417.0	148.9
<i>Avec fractionnement</i>				
N organique (4)	232.7	76.0	356.2	111.1
N racines + M.O. (5)	20.0	18.0	33.4	21.2
N minéral (8)	194.0	110.4	6.6	2.7
N org. soluble (8)	3.9	5.9	6.6	2.2
Total	450.6	210.4	402.8	137.2

Tableau 12 : Bilan des quantités d'azote ^{15}N mesurées

- *sans fractionnement* (*) : il est nécessaire de faire une hypothèse sur les quantités d'azote ^{15}N présent dans le KCl du culot de terre (concentration équivalente au maximum à celle de l'extrait KCl)
 - *avec fractionnement* N organique/ N minéral
- Moyenne de trois répétitions par échantillon;
Les numéros entre parenthèses renvoient à la numérotation des fractions, protocole schéma 11 .

	N Organique CALCULÉ (N total - N minéral)		N organique DOSE (élimination N minéral)	
	$\mu\text{g } ^{15}\text{N.kg}^{-1}$	% apport ^{15}N	$\mu\text{g } ^{15}\text{N.kg}^{-1}$	% apport ^{15}N
A.1	229.4	16.5	232.7	16.6
N.1	111.8	8.8	76.0	6.0
A.2	414.4	29.6	356.2	25.5
N.2	146.8	10.7	111.1	8.0

Tableau 13 : Comparaison des quantités d'azote organisé obtenues par calcul ou par dosage après élimination de l'azote minéral. Moyenne de trois répétitions

En terme d'azote 15, elle représente 1 à 2 % de l'apport . Le marquage de cette fraction est environ inférieur d'un facteur 10 à celui qui a pu être mesuré, aux mêmes dates, sur les racines extraites par tri manuel. La matière organique récupérée sur le tamis correspond alors probablement à un mélange de racines fines et de matière organique non marquée.

533 - Bilan ^{15}N et mode d'évaluation de l'azote organique

Le bilan ^{15}N effectué en additionnant les fractions (5) + (6) + (4) d'une part et (7) + (3) d'autre part a été réalisé (tableau 12). Une hypothèse doit être faite sur les quantités d'azote 15 sous forme minérale et organique soluble présentes dans le culot de terre + KCl (7) ; elles sont au plus égales (en concentration) à $N \times e_i$ de l'extrait KCl(1).

Nous constatons que, lorsque l'on additionne de part et d'autre toutes les fractions mesurées, les quantités d'azote 15 retrouvées sont très proches par les deux méthodes, avec une différence relative de 4 à 7 % au maximum (erreur absolue 1% de l'apport).

Nous obtenons donc une mesure assez précise des fractions multiples issues du mode de traitement de l'échantillon.

Si l'on compare les 2 modes d'estimation de l'azote organisé (tableau 13), on constate que l'écart est de 2,5 à 4 % de l'apport sur 3 échantillons. Une partie de ces écarts paraît donc expliquée par les pertes (tamisage, extractions successives). L'autre partie peut avoir pour origine une erreur sur le calcul ($N_{\text{total}} - N_{\text{minéral}}$), en raison des problèmes de mesure précise du terme $N_{\text{minéral}}$ que nous avons évoqué.

54. Conclusion

Le dosage de N et ^{15}N total à l'analyseur d'azote couplé au spectromètre de masse constitue un progrès considérable : gain de temps, élimination de la plupart des contaminations entre échantillons. Nous avons pu constater qu'il était possible, lorsque les contraintes de l'expérience le demandaient, d'analyser des échantillons humides si ceux-ci étaient relativement homogènes (annexe p.188).

En routine, le dosage d'azote minéral est fait après une extraction unique, dite "à l'équilibre". Celle-ci permet le recouvrement d'une quantité d'azote minéral obtenu de manière standardisée, et à laquelle est attribuée une signification "agronomique".

Cependant l'élimination de la totalité de l'azote minéral pour le dosage du ^{15}N organique met en oeuvre des extractions successives à priori sans conservation du KCl au delà de la première extraction.

Nous avons constaté que les quantités d'azote ammoniacal et d'azote organique soluble récupérées lors des extractions successives étaient au moins équivalentes à celles obtenues lors de la première extraction. Par contre les excès isotopiques, beaucoup plus faibles, ont montré qu'une grande partie de cet azote ré-extrait ne provenait pas de l'apport marqué. Les extractions successives sans dosage au delà de la première extraction éliminent donc une quantité d'azote qui n'est comptabilisé ni dans l'azote minéral, ni dans l'azote total de l'échantillon de terre, constituant donc une source de pertes non négligeable (même si elle paraît faible en terme d'azote 15).

Chabalier et al (1975) ont discuté l'intérêt de la technique des extractions successives, même si celle-ci est lourde à mettre en oeuvre en routine. Kenney et Nelson (1982) restent relativement "discrets" sur les conséquences du fractionnement et sur la coïncidence entre les résultats d'une extraction à l'équilibre et ceux d'extractions successives, les différences éventuelles étant attribuées à l'azote ammoniacal fixé.

Nomnik et Vahtras (1982) expliquent ces différences par une succession d'équilibres entre compartiments (NH_4 soluble \rightleftharpoons NH_4 échangeable \rightleftharpoons NH_4 fixé). Les dilutions successives modifient alors ces équilibres et provoquent une libération progressive d'ammonium. La différence de concentration en azote ammoniacal du KCl surnageant (après extraction et décantation) et du KCl obtenu après centrifugation du culot de terre paraît confirmer une telle hypothèse.

L'évolution des concentrations en azote ammoniacal peut cependant également résulter du temps de décantation de l'échantillon (plusieurs heures à température ambiante). Cette évolution a été observée par Viaux et Lesire (1981). Il pourrait s'agir de la minéralisation de composés organiques très labiles.

L'élimination des racines fines par tamisage, délicate et fastidieuse, est à l'origine de pertes élevées de matière organique et d'azote. Il nous a semblé préférable de supprimer ce tamisage, en sachant qu'on accède alors à un compartiment non homogène " ^{15}N organique + ^{15}N racines fines". Sur les échantillons de terre traités par les deux méthodes, pour l'essai 85, nous avons obtenu un écart moyen de 5.3 %. En supprimant le tamisage lors des essais 87, la présence de racines abondantes et fortement marquées est sans doute à l'origine de quelques valeurs totalement aberrantes d'excès

CHAPITRE III
RESULTATS ET DISCUSSION

RESULTATS ET DISCUSSION

1. DEVENIR DE TROIS FORMES D'AZOTE EN SOL DE LIMON ; MONS 1985

11 - Evolution de l'azote minéral

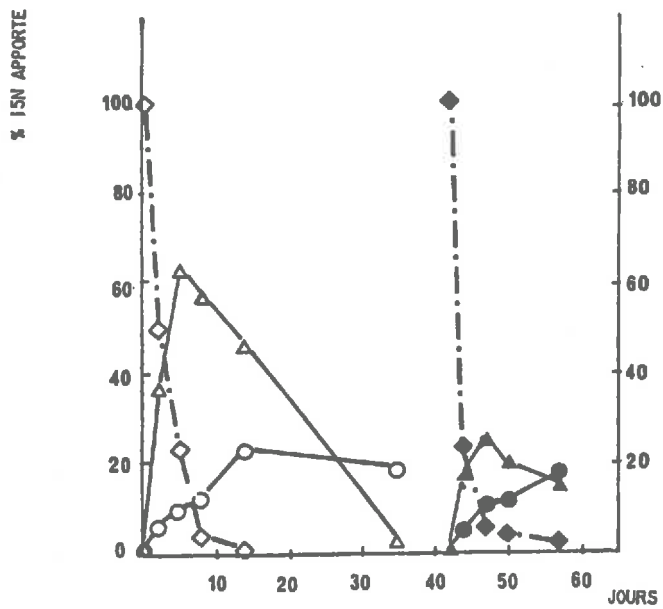
Après le premier apport d'azote (Fig. 13), l'hydrolyse de l'urée se produit très rapidement malgré des températures froides (température moyenne du sol à -5 cm = 3,3°C). Huit jours après l'apport, il ne reste que 2 kg N.ha⁻¹ présent sous cette forme dans le sol. L'hydrolyse obéit à une cinétique d'ordre 1, dont la demi-vie est de 1,9 jour.

La nitrification a également démarré, comme le montre l'apparition de ¹⁵NO₃ sur les parcelles "U et "AN. On constate après hydrolyse de l'urée que le rythme de disparition de l'ammonium est quasiment identique sur les parcelles "U et "AN. L'azote apporté sous forme NH₄ n'a pas été nitrifié plus rapidement que l'azote apporté sous forme urée, en dépit du temps nécessaire à l'hydrolyse ; c'est donc le processus de nitrification qui a constitué l'étape limitante de la formation de nitrate.

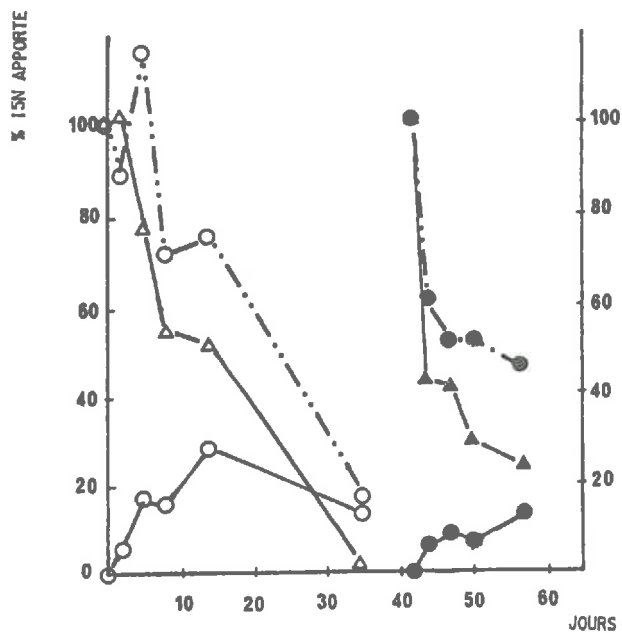
Au jour 35, la nitrification de l'azote 15 apporté est pratiquement terminée puisqu'il n'y a plus de ¹⁵N-NH₄. 16 à 20 % du ¹⁵N reste sous forme nitrate, ce qui correspond à 7-8 kg N par hectare pour les traitements urée et ammonitrate. Sur les parcelles A*N, le nitrate marqué se situe exclusivement dans les horizons 10-30 cm. La distribution observée dans le profil (Tableau 14) résulte des vitesses de nitrification et de transfert du nitrate.

Deux jours après le second apport (jour 44), 41 à 62 % de l'azote 15 est retrouvé sous forme minérale. Ce recouvrement faible résulte, comme nous le verrons, d'une utilisation rapide par la plante, très probablement par une absorption foliaire provoquée par le mode d'épandage.

En l'absence de pluies, seul l'horizon 0-10 cm a été prélevé pendant les deux premières semaines. L'hydrolyse, la nitrification et les processus d'absorption et d'organisation ont été plus rapides qu'après le premier apport, en raison de conditions climatiques plus favorables aux processus physiologiques et microbiens. Il en résulte un pic d'ammonium dans le traitement urée plus faible (20 % du ¹⁵N apporté) que celui obtenu après le premier apport (60 %).



a



b

Figure 13 : MONS - Evolution de l'azote 15 minéral dans l'horizon 0-60 cm (exprimée en % apport)
 ◇—◇ urée, Δ—Δ ammonium, ○—○ nitrate (nitrifié), ○—...—○ nitrate (apporté).
 a : parcelles urée
 b : parcelles nitrate d'ammonium

Quatorze jours après le second apport (jour 57) des quantités importantes d'azote sont encore présentes sous forme minérale dans le sol et un point de mesure supplémentaire aurait été souhaitable. L'extrapolation jusqu'à la floraison est donc hasardeuse. On peut penser que la disparition de cet azote minéral a été rapide (épuisement en 15 jours environ) compte tenu de la forte intensité d'absorption à cette période de développement du blé, et de la relativement faible réserve du sol en azote minéral.

Nous observons ainsi que le devenir de l'azote minéral a été déterminé très tôt. A la floraison et à la récolte, il ne subsiste que des traces d'azote 15 dans le profil. Nous n'observons pas de disparition soudaine de l'azote minéral comme cela a été mentionné par Neeteson et al (1986). A Mons, après les apports d'engrais, l'azote minéral "disparu" est retrouvé dans les autres compartiments.

L'hydrolyse de l'urée a été rapide et ceci est parfaitement en accord avec la plupart des études faites sur ce sujet (cf biblio). Elle n'apparaît donc pas comme une étape limitante de la disponibilité de l'azote par la culture, dans la mesure notamment où la nitrification a des exigences de températures plus élevées.

Après le second apport l'absorption rapide par la culture a introduit un biais au niveau des cinétiques de transformation de l'azote dans le sol et il est difficile de les décrire.

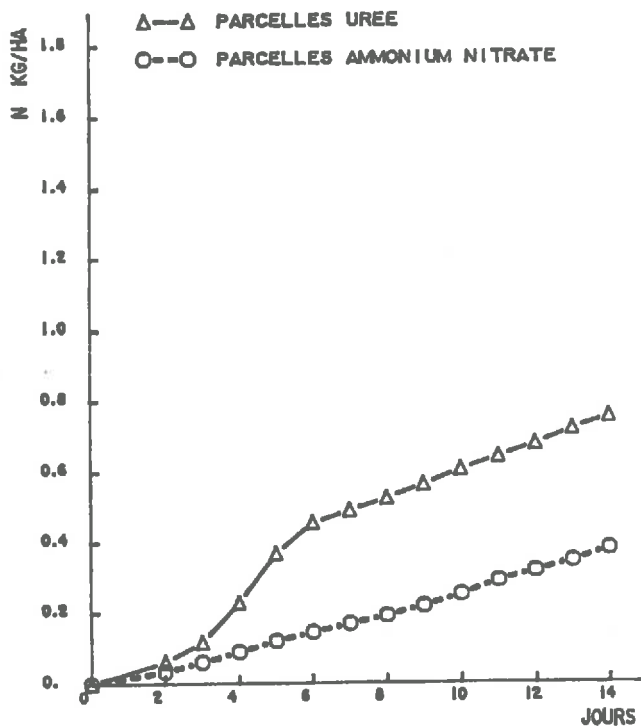
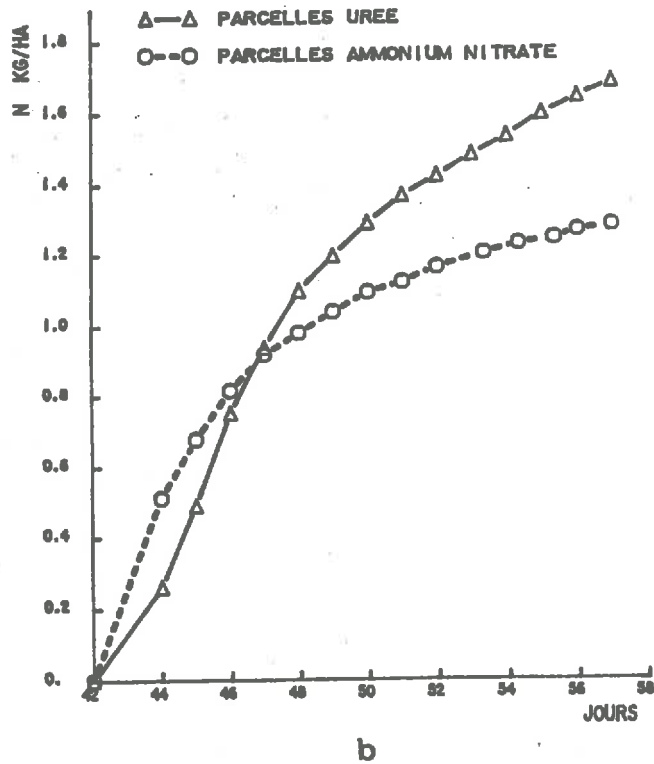
12 - Pertes par voie gazeuse

Volatilisation

Les pertes cumulées de NH_3 dans les deux premières semaines qui suivent l'apport sont représentées à la figure 14. La vitesse de volatilisation sur les parcelles U est maximale pendant les 4 à 6 premiers jours après le premier apport et pendant les trois premiers jours après le second apport. Dans le cas de l'ammonitrate, la volatilisation est maximale dès l'apport.

* Pour le premier apport elles représentent après 14 jours 1,5 % et 0,7 % pour les traitements "U et "AN respectivement. Après le second apport elles représentent 1,5 et 1,2 % de l'azote apporté. L'allure des courbes de volatilisation et la présence d'ammonium dans le sol indiquent que les pertes de NH_3 ont continué au delà de cette période de mesure. Le rythme de volatilisation de NH_3 était à peu près constant après 6 jours : respectivement 37 g et 30 g $\text{N}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{jour}^{-1}$ sur les parcelles urée et sur les parcelles nitrate d'ammonium. Si l'on fait l'extrapolation jusqu'au jour 35, date à laquelle il n'y a plus de $^{15}\text{N}\text{-NH}_4$ dans le sol, on peut estimer que 1,6 et 1,2 % supplémentaire de N apporté ont été perdus sous forme NH_3 pendant cette période.

* Pour le second apport, le rythme de perte décroît en continu. Par extrapolation nous avons calculé que les pertes au delà du jour 57 pouvaient, au plus, correspondre à 0,8 % de l'apport d'azote.



a

Figure 14 : Volatilisation d'ammoniac après le 1er apport d'azote (a) et le second apport d'azote sur les parcelles ayant reçu de l'urée et du nitrate d'ammonium.
Mons (1985)

Les pertes auraient donc concernées $3,1 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ pour le traitement Urée et $4,1 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ pour le traitement Ammonitrate. Ces faibles valeurs sont en accord avec les essais menés tant au laboratoire qu'au champ, sur sols limoneux et calcaires et dans des conditions expérimentales identiques (Fresneau 1982, résultats INRA Laon non publiés).

Cependant nous avons conscience des inconvénients associés aux mesures en milieu confiné. Cette technique de cloche fermée peut, en particulier, sous-estimer les pertes d'ammoniac en réduisant les turbulences d'air à la surface du sol (Nelson 1982, Bouwmeester et al 1985). D'autre part l'azote a été apporté sous forme solide sur les parcelles qui ont servi à la mesure de volatilisation, alors que l'azote a été épandu sous forme liquide sur les parcelles ^{15}N sur lesquelles le bilan est établi. Il est possible que nous ayons sous-estimé les pertes intervenues sur les parcelles ^{15}N en raison de cette différence de forme physique (Buresh et al 1984).

Dénitrification

Des pertes significatives de N_2O , ont été détectées à 5 périodes sur les 20 dates de mesure. Le flux maximal été observé en Mai, 2 jours après une pluie de 33 mm. L'extrapolation des mesures faites entre le tallage et la récolte a permis d'estimer les pertes à $0,5 \text{ kg}$ et $1,4 \text{ kg N ha}^{-1}$ pour les traitements U et AN (Germon et Couton, communication personnelle). Ces pertes semblent négligeables et ne correspondent pas au défaut de bilan enregistré (cf page 70).

La dénitrification a été décrite comme un phénomène qui se produit ponctuellement et spatialement très variable (Christensen et Tiedge 1987, Parkin 1987). Il est certain que dans cet essai, les mesures peuvent difficilement rendre compte d'un "bilan", la période de mesure recouvrant au total $0,3 \%$ de la période d'intégration. Bien avant la remise en cause des méthodes employées, c'est le temps que nous avons consacré à cette mesure qui est sans doute insuffisante pour rendre compte d'une estimation quantitative des pertes.

13 - Utilisation par la culture

131. Production de matière sèche et rendement en grain

La production totale de matière sèche et les composantes du rendement n'ont pas été significativement affectés par la nature de l'azote apporté ni au cours du temps, ni à la récolte (tableau 15). Le coefficient de variation moyen sur l'ensemble des mesures de matière sèche est de $8,8 \%$. Pour la suite des calculs nous avons utilisé, à chaque date, la moyenne des matières sèches obtenues sur les 9 puis 18 parcelles.

Traitement	Matière sèche totale t.ha ⁻¹	N absorbé total kg.ha ⁻¹	Rendement grain		N absorbé grain kg.ha ⁻¹
			85 % DM	t.ha ⁻¹	
Témoin	13.0 (0.5)	95.9 (6.3)	6.6	(0.5)	67.6 (5.3)
U	19.0 (0.5)	176.1 (3.8)	10.4	(0.5)	128.4 (4.2)
A N	18.9 (0.5)	179.3 (11.0)	10.4	(0.4)	129.8 (8.4)

Tableau 15: Rendements et absorption d'azote par la plante entière (tiges + racines) et par le grain, pour le traitement témoin (ON) et les traitements fertilisés 160 kg N.ha⁻¹). Les écarts types sont indiqués entre parenthèses.

Stade	Matière sèche kg.ha ⁻¹	N absorbé kg.ha ⁻¹	N racines % N total absorbé	CRU 1er apport %	CRU 2e apport %
Tallage (jour 14)	320 ^a	4.6	18.0	ND	ND
Floraison (jour 103)	1200	12.0	7.4	2.6 ^b	1.1 ^b
Maturité (jour 154)	950 ^a	10.0	6.0	1.4 ^b	1.3 ^b

Tableau 16 : Matière sèche et azote absorbé par les racines à trois stades (moyenne de tous les traitements)
^a : la matière sèche est calculée sur 0-120 cm par extrapolation du profil obtenu à la floraison
^b : les CRU racines correspondent aux racines de l'horizon 0-30 cm, sur lesquelles seulement ont été réalisées les mesures isotopiques.

A la récolte, des rendements élevés de paille + grain ont été obtenus (18 t.ha⁻¹). Le rendement grain a atteint 10,4 t ha⁻¹ sur les parcelles fertilisées (160 kg N.ha⁻¹) et 6,6 t.ha⁻¹ sur les parcelles témoins.

La matière sèche racinaire dans la couche 0-30 cm a augmenté jusqu'à la floraison. En raison des quantités relativement réduites de terre à partir desquelles se font les estimations, la variabilité des mesures de masses racinaires est forte; le coefficient de variation moyen est de 31 %. Nous n'avons pas détecté de différences en fonction de la forme d'engrais. Un profil racinaire complet a été réalisé à la floraison. Il montre que plus de 50 % des racines (en terme de poids sec) se situait dans 0-10 cm et 20 % dans 10-30 cm. Il n'y a pas de différence entre parcelles fertilisées et parcelles non fertilisées.

Si nous considérons que les racines fines passant à travers le tamis de 1 mm ont une masse négligeable, la matière sèche racinaire atteint 1200 kg.ha⁻¹ à la floraison, ce qui représente 10 % de la matière sèche totale à cette date (Tableau 16).

On peut néanmoins se poser à postériori certaines questions concernant ce poids total de racines passant à travers le tamis de 1 mm - estimé proche de 1 % de la matière sèche totale "racines", d'après Barraclough et Leigh (1984) - sachant que, par ailleurs, nous avons récupéré sur un tamis de 100 µm, un mélange de racines fines et matière organique dont le poids est équivalent à 1500 kg.ha⁻¹ (cf page 49). Il subsiste donc une limite mal définie du compartiment "racines" à chaque étape d'échantillonnage.

132. Teneur en azote et azote total absorbé

Si la teneur moyenne des plantes (parties aériennes) se situe dans les normes habituelles au tallage (5 %), elle est par contre particulièrement faible en fin de culture. La chute brutale de la teneur en azote a lieu juste après le second apport. Les parcelles fertilisées avec l'urée ont une teneur en azote inférieure de 7 % à celle des traitement AN. Cette différence n'est cependant plus significative à partir du jour 57.

A la récolte le contenu en azote des parties aériennes est en moyenne de 85,9 kg.ha⁻¹ pour les parcelles témoins et de 167,5 kg.ha⁻¹ pour les parcelles fertilisées. Les différences entre parcelles U et parcelles AN ne sont pas significativement différentes, ni pour l'azote total absorbé, ni pour l'azote absorbé par le grain. L'absorption nette (parties aériennes + racines) est équivalente à 18 kg N.t⁻¹ grain produit, ce qui est très en dessous des normes habituelles pour le blé d'hiver qui sont de 30 kg N.t⁻¹ grain (Remy et Viaux 1982).

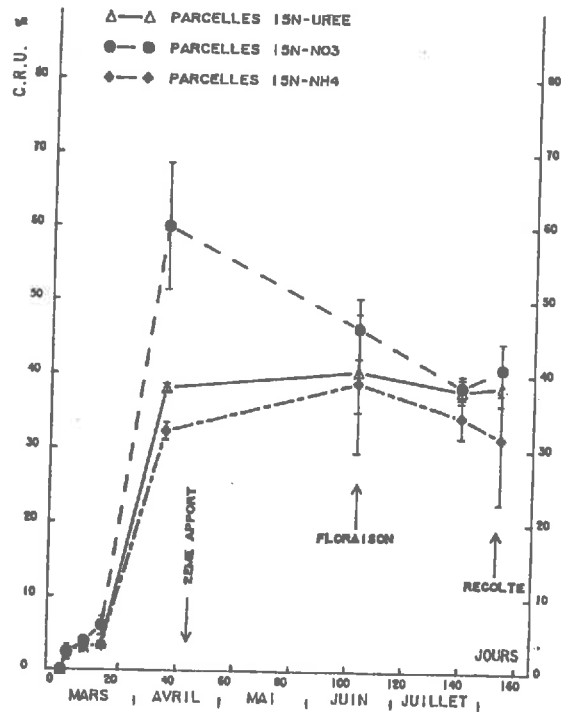


Figure 15 : Coefficients réels d'utilisation (parties aériennes) du 1er apport marqué. Mons (1985)
50 kg N.ha⁻¹ sous forme ¹⁵N-urée, ¹⁵NH₄NO₃ et NH₄¹⁵NO₃

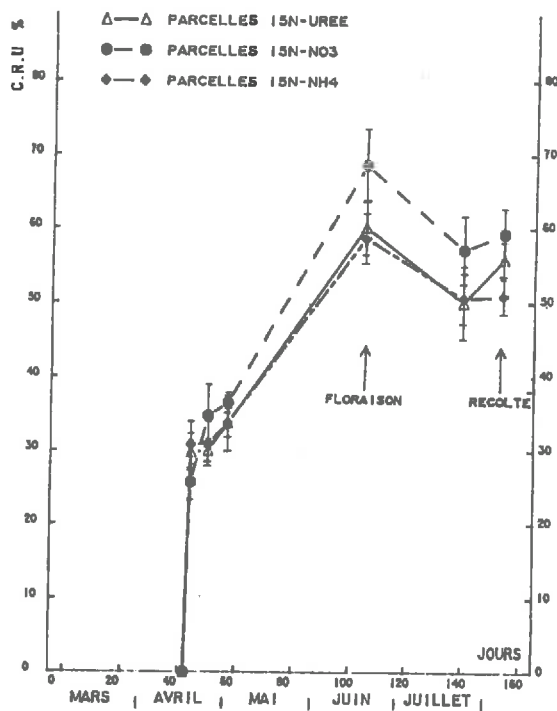


Figure 16 : Coefficients réels d'utilisation (parties aériennes) du 2ème apport marqué. Mons (1985)
110 kg N.ha⁻¹ sous forme ¹⁵N-urée, ¹⁵NH₄NO₃ et NH₄¹⁵NO₃

L'absorption nette d'azote a été nulle entre floraison et maturité, alors que la matière sèche totale est passée de 13,6 à 18,0 t.ha⁻¹.

Les quantités d'azote dans les racines sont équivalentes à 18 % de l'azote total au tallage, 7 % à la floraison et 6 % à maturité (Tableau 16).

133. Cinétique d'utilisation de l'azote, par le peuplement végétal

L'utilisation de l'azote de l'engrais par la plante est caractérisée par le coefficient réel d'utilisation (C.R.U.). Nous considérons ici séparément les CRU "parties aériennes" et les CRU "racines".

Après le premier apport (fig. 15) : L'absorption de l'azote de l'engrais reste très faible pendant les 14 premiers jours, puisqu'environ 5% de l'azote (2,5 kg N.ha⁻¹) est absorbé. Au jour 14, il existe cependant un écart significatif de CRU entre les traitements ¹⁵NO₃ et ¹⁵NH₄. L'absorption est fortement stimulée à la fin du tallage, la température moyenne passant de 3°C à 8°C. Au jour 35, les C.R.U. sont de 60 % pour A*N, 38 % pour *U et 32 % pour *AN. A cette date, nous l'avons vu, tout l'azote minéral marqué est sous forme nitrate et dans les mêmes proportions pour les trois traitements (15 %). Le maximum d'utilisation a donc très probablement été atteint après le jour 35. Nous avons calculé, en extrapolant les rythmes d'absorption et d'organisation mesurés entre les jours 14 et 35, que le pool ¹⁵N minéral aurait été totalement utilisé au jour 42, les valeurs maximales atteintes par les C.R.U. étant alors de 74 %, 53.5 % et 45 % pour les parcelles A*N, *U et *AN respectivement. Cette estimation est maximale puisqu'elle néglige les pertes qui ont pu intervenir pendant cette période.

On observe ensuite une chute significative du CRU sur les parcelles A*N équivalente à 12 % du ¹⁵N apporté et qui correspond, comme nous le verrons, à une augmentation importante de l'azote 15 dans la matière organique du sol.

On observe également une décroissance des CRU entre floraison et récolte dans 7 des 9 parcelles, en moyenne de 5,2 % (écart-type = 5 %).

Après le deuxième apport (fig. 16) on observe une absorption très importante puisque 25,6 % du ¹⁵NO₃, 29 % du ¹⁵N-urée et 31 % du ¹⁵NH₄ ont été retrouvés dans les parties aériennes. Il est très improbable que de telles quantités aient pu être absorbées par les voies racinaires. Cela représente une vitesse d'absorption de 16 kg N.ha⁻¹.jour⁻¹. Il s'agit très probablement d'absorption foliaire.

Traitement	Jours	Absorption N engrais		Absorption N sol	Absorption N total		
		1er apport	2ème apport				
kg N.ha ⁻¹							
UREE	2	1.3	-	16.4	17.7		
	5	1.4	-	18.4	19.8		
	8	1.5	-	19.9	21.4		
	14	1.7	-	19.5	21.2		
	35	19.0	-	30.7	49.7		
	44	26.8 ^a	32.8	33.3 ^a	92.9		
	47	26.8 ^a	32.1	35.6 ^a	94.5		
	50	26.8 ^a	33.0	44.2 ^a	104.0		
	57	26.8 ^a	37.0	44.1 ^a	107.9		
	103	20.2	66.2	72.0	158.4		
	140	18.9	55.0	71.7	145.6		
154	19.2	61.4	84.1	164.7			
AMMONIUM NITRATE	2	*NO3 0.6	*NH4 0.6	-	-	15.7	16.9
	5	0.9	0.7	-	-	18.5	20.0
	8	1.0	0.8	-	-	20.1	21.9
	14	1.5	0.8	-	-	18.6	20.8
	35	14.9	8.0	-	-	27.7	50.6
	44	18.5 ^a	11.3 ^a	14.1	16.9	29.9 ^a	82.8
	47	18.5 ^a	11.3 ^a	17.5	15.4	38.5 ^a	101.2
	50	18.5 ^a	11.3 ^a	18.8	17.0	45.2 ^a	110.8
	57	18.5 ^a	11.3 ^a	20.0	18.5	42.3 ^a	110.6
	103	11.5	9.7	37.7	32.2	76.9	168.0
	140	9.5	8.5	31.4	27.8	80.8	158.0
154	10.2	7.8	32.5	27.9	90.4	168.8	

Tableau 17 : Absorption d'azote de l'engrais et du sol par le blé (parties aériennes)

a : l'utilisation du 1er apport de l'azote du sol sur la période 35-103 jours a été calculée, en considérant que le C.R.U. atteint sa valeur maximale au jour 42, et que la décroissance commence au-delà du jour 57.

Des nécroses de la feuille terminale ont d'ailleurs été notées 2 jours après l'épandage sur les parcelles AN et 5 jours après sur les parcelles U.

Pendant les 13 jours suivants, la culture a prélevé respectivement 11 % (A*N), 4 % (*U) et 2 % (*AN) du ^{15}N apporté. A nouveau on observe une utilisation préférentielle du nitrate. Les C.R.U. maximum ont été enregistrés à la floraison et ont atteint 68 % pour A*N, 60 % pour *U et 59 % pour *AN. Pour les mêmes raisons que précédemment, les valeurs maximales, égales ou supérieures à celles mesurées à la floraison, ont été atteintes bien avant cette date, lorsque le pool ^{15}N minéral a été totalement utilisé.

Les C.R.U. ont diminué de façon significative entre floraison et maturité : la diminution moyenne d'azote 15 dans les parties aériennes a été de 6,9 % (écart-type 3,3 %) du ^{15}N apporté. Cette perte de ^{15}N ne correspond pas à une translocation vers les racines puisque les quantités ^{15}N dans les racines ont elles-mêmes diminué.

Les allocations d'azote vers le système racinaire sont restées faibles (tableau 16) et n'ont mobilisé qu'une petite partie de l'engrais à la floraison et à la récolte : entre 1 et 3 % du ^{15}N apporté.

134. Contribution du sol et de l'engrais

Les cinétiques d'absorption par la culture de l'azote provenant du sol et de l'engrais sont données au tableau 17. Dans les jours qui suivent les 2 apports, l'utilisation de l'azote de l'engrais reste faible - exception faite de l'absorption foliaire du 2ème apport. Ces périodes sont suivies d'une période d'absorption plus active pendant laquelle azote de l'engrais et azote du sol sont utilisés en quantités comparables.

La contribution du sol a été estimée pendant la période 35-103 j. sur la base de deux hypothèses qui sont : d'une part que le C.R.U. maximum (précédemment calculé) a été atteint à 42 jours, et d'autre part qu'il n'y a pas eu de décroissance du C.R.U. avant 103 j. La quantité d'azote sur laquelle porte l'incertitude est de 6 kg N.ha⁻¹.

Entre la floraison et la récolte, l'absorption nette d'azote est nulle : dans le même temps, il se produit une perte d'azote provenant de l'engrais de 10,2 (\pm 3,9) kg N par hectare (5,7 % de 50 kg N + 6,9 % de 110 kg N.ha⁻¹).

Si l'on considère que le marquage des tissus végétaux est homogène et que l'on peut appliquer la théorie du traçage isotopique, on peut calculer que la perte d'azote totale a été au minimum de 20,5 kg N.ha⁻¹ (10,2 kg N de l'engrais et 10,2 du sol). Cela indique qu'il y a eu une absorption brute d'azote pendant cette période de remplissage du grain au moins égale à 20 kg N.ha⁻¹ (bilan net nul).

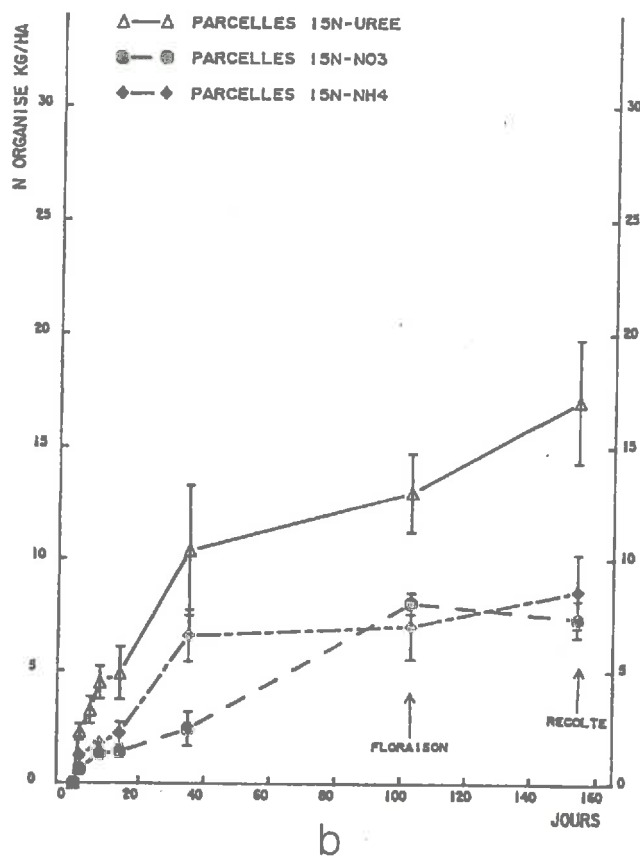
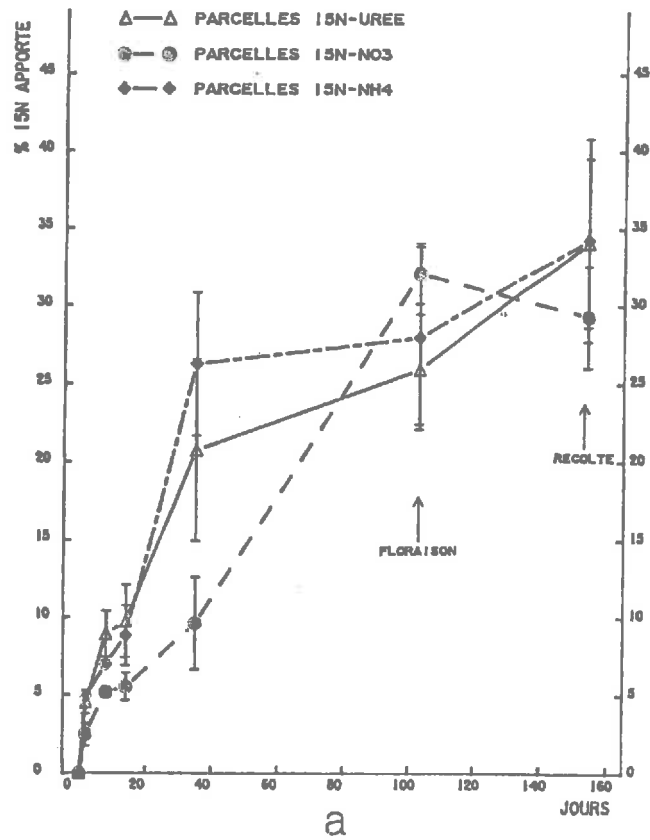


Figure 17 : MONS - Organisation de l'azote du premier apport
 a : exprimée en % apport
 b : exprimée en kg N ha⁻¹

L'azote prélevé par la culture, provenant du sol, est équivalent pour les parcelles fertilisées et non fertilisées, ce qui aboutit à une bonne concordance entre utilisation réelle et utilisation apparente (C.R.U. global pour les 2 apports = 48 % ; C.A.U. = 51 %).

14 - Organisation de l'azote

Premier apport

L'organisation de l'azote de l'engrais commence immédiatement après le premier apport dans l'horizon 0-10 cm (fig. 17). Elle est alors supérieure sur les parcelles *U et *AN et cette différence persiste plus tard. Entre les jours 2 et 35, l'organisation s'accroît de façon approximativement linéaire à un taux de 0,6, 0,75 et 0,25 % (de l'apport) par jour sur les parcelles *U, *AN, et A*N, respectivement.

Dans l'horizon 10-30 cm des traces de ^{15}N apparaissent après le jour 5 mais ne deviennent conséquentes qu'à partir du jour 14. A 35 jours, les quantités ^{15}N retrouvées dans les horizons 0-10 cm et 10-30 cm sont respectivement de 17,3 % et 2,8 % pour les parcelles *U, 20,2 % et 5,0 % pour les parcelles *AN, 5,9 % et 3,5 % de l'azote 15 apporté pour les parcelles A*N. Il n'y a pas de différences significatives d'organisation dans l'horizon 10-30. Par contre, l'organisation totale de l'azote marqué est nettement inférieure pour le traitement $^{15}\text{NO}_3$, en particulier dans l'horizon de surface.

A la floraison, nous observons une augmentation importante du ^{15}N organique (augmentation absolue de 19 %) sur les parcelles A*N, qui amène ce traitement au niveau des deux autres. Cette immobilisation supplémentaire se situe dans l'horizon 0-10 cm, et ne peut être due à l'assimilation microbienne d'azote 15 minéral résiduel: en effet au jour 35, il ne restait plus que 1 % du ^{15}N minéral dans cet horizon. Il peut s'agir alors de l'exsudation dans le sol de composés marqués préalablement assimilés par la plante. Cette augmentation du ^{15}N dans le compartiment organique (5,4 kg N. ha⁻¹) correspond à une décroissance de l'azote 15 contenu dans les parties aériennes de la plante pour le traitement A*N, comme cela a déjà été mentionné (figure 15).

Après la floraison, l'organisation cumulée du ^{15}N apporté n'est plus significativement différente suivant le traitement considéré. Elle atteint à la floraison 27,8 % ($\pm 3,0$ %) et à la récolte 31,6 % ($\pm 2,7$ %), soit 13,9 et 15,8 kg N.ha⁻¹.

L'essentiel (83%) de cet azote organique se situe dans l'horizon 0-10 cm, 17% dans l'horizon 10-30 cm tandis que l'azote 15 organique n'est pas détecté dans les horizons inférieurs.

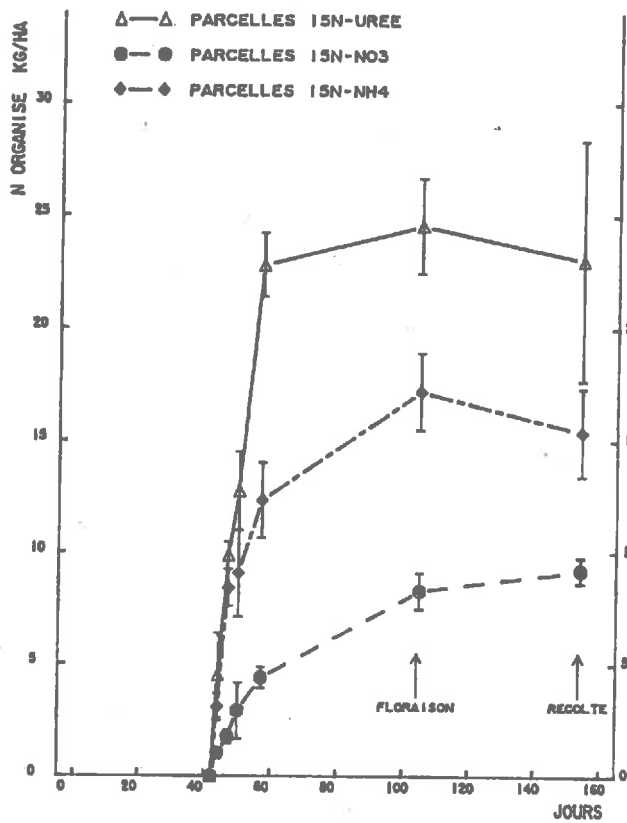
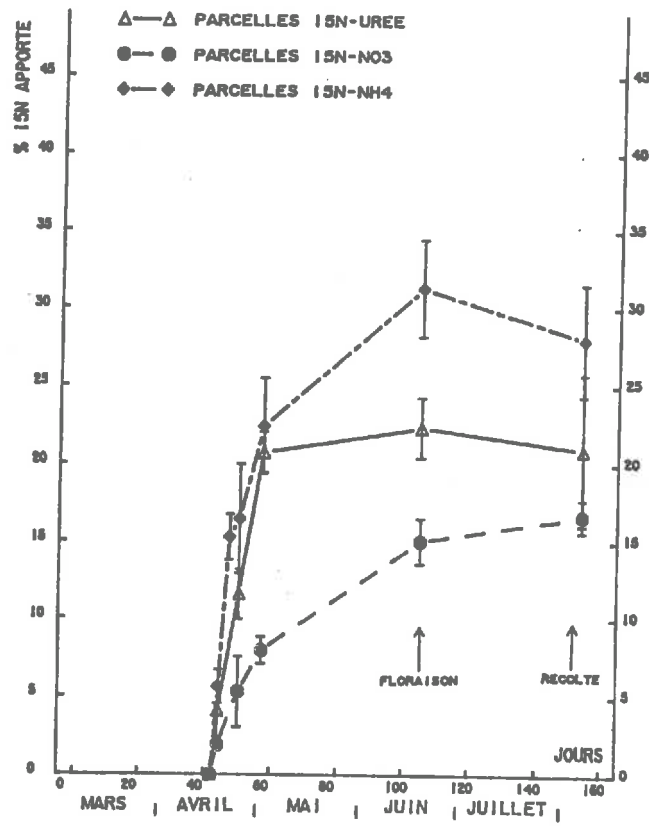


Figure 18 : MONS - Organisation de l'azote du second apport
 a : exprimée en % apport
 b : exprimée en kg N ha⁻¹

Second apport

L'organisation de l'azote après le second apport est très rapide (fig. 18). Les quantités de N¹⁵ organisées pendant la période 42-50 jours sont différentes suivant la forme d'apport et se classent ainsi : *AN>*U>A*N. Cependant les vitesses d'organisation sont égales dans les traitements urée et nitrate d'ammonium, équivalentes 1,5 kg N.ha⁻¹.jour⁻¹ (Fig. 26).

Après le jour 50, le comportement diverge entre les deux traitements U et AN. La vitesse d'organisation reste élevée sur les parcelles U (1,4 kg N.ha⁻¹.jour⁻¹), tandis qu'elle devient faible sur les parcelles AN (0,65 kg N.ha⁻¹.jour⁻¹ dont 0,45 pour *AN et 0,20 pour A*N). A cette date (50 j) des quantités importantes d'azote 15 minéral sont encore présentes dans le sol pour les 3 types de traitement dont 14 % et 23 % sous forme ammoniacale pour *U et *AN respectivement. C'est pourquoi il est surprenant de ne pas observer d'augmentation des quantités ¹⁵N organisées durant la période 57-103 jours pour l'apport d'urée, tandis qu'une augmentation de 8,4 kg N.ha⁻¹ est mesurée pour le traitement ammonitrate (4,7 sur *AN + 3,7 sur A*N).

A la floraison et à la récolte, les quantités d'azote 15 organisées ne sont pas significativement différentes. Elles ne sont également pas dépendantes du traitement U ou AN, et correspondent en moyenne à 23,4 kg N.ha⁻¹, provenant de l'engrais.

Elles sont par contre très discriminantes de la forme initiale d'apport et montrent que l'azote apporté sous forme urée ou sous forme ammoniacale a été beaucoup plus organisé que l'azote apporté sous forme nitrate.

Deux aspects des cinétiques restent difficile à expliquer :

* Sur les parcelles ayant reçu le premier apport marqué (I), une augmentation importante de l'azote 15 organique a été observée pour A*N entre 35 et 103 jours, associée à une perte de composés marqués de la plante dans le sol. Cependant, un tel phénomène n'est pas observé pour *AN et *U. On peut penser que de tels composés ont été effectivement perdus par la plante, mais sous une forme non marquée (donc non détectée). Dans ce cas cela signifierait qu'il y a eu, très tôt, pendant l'utilisation de N engrais par la plante, une allocation qui a conduit à incorporer le nitrate (alors marqué sur les parcelles A*N et non marqué sur les parcelles *AN et *U) dans un pool azoté, concerné plus tard par la translocation et l'exsudation.

* D'autre part, la différence de comportement entre les parcelles *U et *AN après le second apport est étonnante. Le taux plus rapide d'organisation de l'azote sur les parcelles *U, notamment pendant la période 50-57 jours pourrait être interprétée comme le résultat d'une diffusion plus importante de l'azote dans le sol (diffusion de l'urée, puis hydrolyse), ce qui aurait augmenté la

Parcelles	Jours	% apport ¹⁵ N					Total	
		Volat. N	N sol		C.R.U.			
			minéral	organique	tiges	racines		
¹⁵ N-urée	2 a	0.2	91.3	4.5	2.6	ND	98.7 (12.8)	
	5 b	0.5	93.9	6.4	2.9	ND	103.7 (10.7)	
	8 c	0.8	71.2	8.9	3.0	ND	84.0 (6.9)	
	1er apport	14 e	1.5	68.2	9.7	3.5	ND	83.0 (14.7)
		35 e	1.5	20.2	20.7	38.1	ND	80.6 (13.6)
		103 d	1.5	0.7	25.9	40.4	2.2	70.8 (8.8)
154 d	1.5	1.2	34.0	38.5	1.3	76.6 (7.5)		
NH ₄ ¹⁵ NO ₃	2 a	-	89.2	2.4	2.3	ND	94.1 (7.4)	
	5 b	-	116.4	2.3	3.6	ND	122.3 (13.2)	
	8 c	-	73.7	5.2	3.8	ND	82.8 (11.2)	
	1er apport	14 e	-	77.2	5.5	6.0	ND	88.7 (9.9)
		35 e	-	18.0	9.6	59.9	ND	87.6 (13.0)
		103 d	-	0.9	32.1	46.2	3.0	82.2 (5.8)
154 d	-	1.0	29.3	40.9	1.5	72.7 (6.4)		
¹⁵ NH ₄ NO ₃	2 a	0.1	107.5	4.9	2.4	ND	115.0 (10.5)	
	5 b	0.2	94.5	4.6	2.9	ND	102.2 (11.4)	
	8 c	0.4	70.3	7.0	3.2	ND	81.0 (4.1)	
	1er apport	14 e	0.7	79.2	8.8	3.3	ND	92.0 (15.0)
		35 e	0.7	15.1	26.2	32.3	ND	74.4 (6.2)
		103 d	0.7	0.7	27.9	38.8	2.5	70.7 (15.0)
154 d	0.7	0.8	34.2	29.6	1.3	66.9 (13.7)		
¹⁵ N-urée	44 a	0.2	44.0	4.0	29.8	ND	83.3 (8.0)	
	47 a	0.5	39.4	9.0	29.3	ND	82.0 (2.1)	
	50 a	0.8	33.8	11.5	30.0	ND	82.2 (6.0)	
	2ème apport	57 e	1.5	33.6	20.7	33.8	ND	89.7 (10.8)
		103 d	1.5	1.5	22.3	60.3	1.4	87.1 (4.2)
		154 d	1.5	0.8	21.5	56.0	1.1	80.4 (4.2)
NH ₄ ¹⁵ NO ₃	44 a	-	61.7	1.8	25.6	ND	91.2 (1.8)	
	47 a	-	53.0	3.1	31.8	ND	88.8 (9.9)	
	50 a	-	53.0	5.3	34.6	ND	95.6 (4.3)	
	2ème apport	57 e	-	47.1	8.0	36.4	ND	91.1 (15.6)
		103 d	-	1.0	15.0	68.4	1.1	85.6 (5.6)
		154 d	-	0.6	16.7	59.1	1.2	78.6 (4.2)
¹⁵ NH ₄ NO ₃	44 a	0.1	49.3	5.6	31.0	ND	88.9 (6.0)	
	47 a	0.4	50.4	15.2	28.2	ND	96.4 (6.6)	
	50 a	0.6	36.2	16.4	31.1	ND	87.1 (2.1)	
	2ème apport	57 e	1.0	36.8	22.4	34.0	ND	94.3 (11.0)
		103 d	1.0	0.7	31.2	59.0	1.0	93.2 (2.5)
		154 d	1.0	0.8	28.0	51.2	1.6	82.7 (2.4)

Tableau 18 : Bilan du ¹⁵N retrouvé dans le sol et dans la plante.

a,b,c,d, indiquent respectivement que les horizons 0-10 cm, 10-30 cm, 0-60 cm, 0-120 cm ont été prélevés.

e : le total inclus également l'azote ¹⁵ retrouvé dans l'eau de lavage des feuilles.

ND : non déterminé ; écarts-types entre parenthèses

"Capacité" d'organisation. Cela n'explique cependant pas pourquoi il n'y a pas d'augmentation de l'organisation entre le jour 57 et la floraison, alors qu'il est improbable que le carbone assimilable ait été complètement utilisé et non renouvelé dans cette période de croissance active de la culture.

15 - Bilan ^{15}N

En dépit du soin apporté lors de l'épandage de l'azote et à chaque étape du traitement, une variabilité importante subsiste. La moyenne des coefficients de variation est de 16 % pour les valeurs d'azote 15 minéral, 19 % pour les valeurs ^{15}N organique et 11 % pour la plante.

Le bilan ^{15}N (% de recouvrement de l'azote 15 apporté) est présenté Tableau 18. Nous constatons une diminution progressive des quantités d'azote 15 retrouvées. En effet durant les 5 jours qui suivent le premier apport le recouvrement atteint 102 % puis 80 % entre les jours 8 et 35. Il manque enfin environ 27 % du ^{15}N apporté (13 kg N.ha⁻¹) à la floraison pour ce premier apport.

Après le second apport, une partie de l'azote est immédiatement non retrouvée dans la plante et le sol (0-10 cm). Des transferts d'azote en dessous de 10 cm ne peuvent être exclus bien qu'il n'ait pas plu entre l'apport et le jour 50. Le bilan est à peu près constant jusqu'à la floraison et il manque, en moyenne, 14 % de l'apport d'azote (15 kg N.ha⁻¹).

La diminution des quantités retrouvées entre floraison et récolte, tend à confirmer le fait que des pertes gazeuses d'azote des parties aériennes du blé se soient produites pendant la période de remplissage du grain.

Un certain nombre "d'erreurs" expérimentales peuvent avoir contribué au déficit ^{15}N : sous estimation du C.R.U. "racines" (1 % maximum), pertes d'azote organique soluble (1 %), et sous estimation des pertes par volatilisation (1,5 % et 1 % pour le premier et le second apport). L'ensemble de ces compartiments pourraient rendre compte de 5 % environ de ce déficit.

Néanmoins ces valeurs sont proches de celles obtenues par d'autres auteurs. Olson et Swallow (1984) obtiennent 80 à 85 % de recouvrement sur une série de 5 essais ^{15}N successifs. Une moyenne de 81% a été obtenue sur douze essais menés sur blé d'hiver (Powlson 1988).

Traitement	Jours	N minéral 0-10 cm kg.ha ⁻¹	N minéral 10-30 cm kg.ha ⁻¹
Témoin	13	4.2	9.7
	19	5.2	8.7
	26	4.0	7.2
	103	2.1	4.0
	160	2.8	9.9
Urée	13	67.8	15.6
	19	64.2	13.1
	26	52.9	10.8
	103	2.8	4.1
	160	3.2	6.7
Ammonium nitrate	13	39.3	37.4
	19	39.4	32.2
	26	34.5	25.0
	103	3.8	5.4
	160	2.8	7.1

Traitement	Jours	N minéral 0-10 cm kg.ha ⁻¹	N minéral 10-30 cm kg.ha ⁻¹
Témoin	13	2.6	7.9
	19	3.8	6.4
	26	2.7	26.6
	103	1.6	4.4
	158	7.0	11.8
Urée	13	67.2	22.6
	19	51.8	16.7
	26	62.2	45.8
	103	2.6	3.6
	158	7.5	16.7
Ammonium nitrate	13	19.0	27.0
	19	33.4	22.3
	26	36.4	71.7
	103	2.0	3.6
	158	6.7	15.2

BOURGUIGNON

KTRKPIILY

Traitement	Jours	N minéral 0-10 cm kg.ha ⁻¹	N-minéral 10-30 cm kg.ha ⁻¹
Témoin	13	11.6	20.3
	19	8.5	20.5
	26	15.1	4.5
	99	1.8	4.5
	159	8.0	19.7
Urée	13	58.5	24.4
	19	49.0	30.8
	26	50.5	12.3
	99	3.0	4.6
	159	9.8	23.4
Ammonium nitrate	13	47.7	52.7
	19	26.0	58.9
	26	23.6	19.3
	99	3.7	5.9
	159	10.7	27.6

LIVRY

Tableau 19 Evolution des quantités d'azote minéral
(horizons 0-10 et 10-30cm)

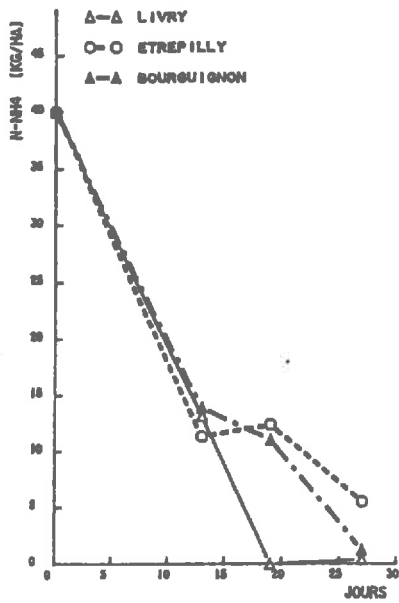
2. ETUDE DE LA RELATION ENTRE COEFFICIENT D'UTILISATION PAR LA CULTURE ET TAUX D'ORGANISATION DANS 3 TYPES DE SOLS

21. Evolution de l'azote minéral

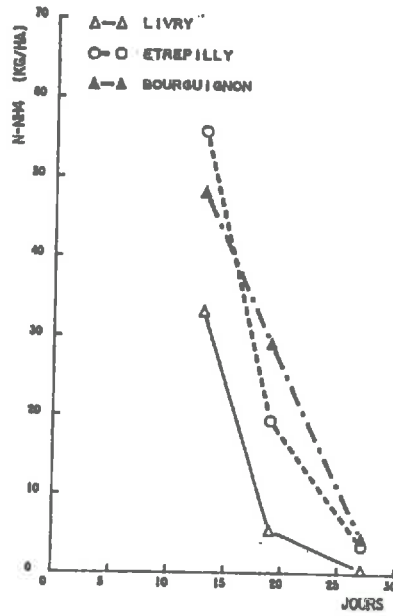
L'évolution des quantités d'azote minéral dans les horizons 0-10 et 10-30 cm des traitements témoin, urée et nitrate d'ammonium est donnée au tableau 19. Il s'agit des quantités totales d'azote (N14 + N 15), l'azote 15 minéral n'ayant pas été mesuré. Pendant la période 0-26 jours, les quantités absorbées par la culture sont faibles et il n'y a pas de différence significative d'absorption entre parcelles témoins et fertilisées. On peut considérer, en première approximation, que les différences d'azote minéral entre traitements fertilisés et témoin correspondent effectivement à l'azote provenant de l'engrais.

On observe d'abord que l'on retrouve, dès la première date de prélèvement, de fortes quantités d'azote nitrique dans le deuxième horizon pour le traitement ammonitrate. A 13 jours, les quantités respectives sont de 32, 19 et 28 kg N.ha⁻¹ sur les sites de Livry, Etrépilly et Bourguignon. Cet azote provient de l'entraînement du ¹⁵NO₃ apporté suite à la pluviométrie importante enregistrée pendant cette période (35 à 50 mm). Il est probable qu'une quantité supplémentaire de nitrates a migré en-dessous de 30 cm.

Les quantités d'azote minéral provenant de l'engrais dans l'horizon 0-30 cm diminuent régulièrement entre les jours 13 et 26 à Livry et Bourguignon. A Etrépilly, par contre, on constate une disparition très forte de l'azote minéral à 13 jours dans le traitement AN : on ne retrouve alors que 36 kg sur les 80 kg N.ha⁻¹ apportés. Deux semaines plus tard, on retrouve apparemment l'azote apporté, puisque la différence avec le témoin est de 79 kg N.ha⁻¹. L'urée se comporte de façon similaire puisque les quantités apparentes d'azote retrouvées sont respectivement égales à 79, 58 et 79 kg N.ha⁻¹ à 13, 19 et 26 jours. La disparition observée à 19 jours est cependant plus faible. Nous n'avons pas d'explication satisfaisante de ce phénomène qui avait été déjà remarqué par Neeteson et al (1986).



a



b

Figure 19 : Evolution des quantités d'ammonium dans les 27 jours suivant le premier apport d'azote, à Livry, Etrépilly et Bourguignon.

a - Apport de nitrate d'ammonium (40 kg N-NH₄)

b - Apport d'urée (80 kg N-urée)

L'hydrolyse de l'urée était terminée pour les trois essais au jour 13. En comparant les cinétiques de disparition de l'ammonium de l'horizon de surface dans les traitements urée et nitrate d'ammonium (fig.19), on constate, à partir du jour 13, que l'ammonium disparaît plus vite dans le cas de l'apport d'urée. D'autre part, les quantités d'azote retrouvé dans le sol et la plante, provenant de l'urée, sont approximativement constantes entre 13 et 27 jours (excepté à Etrépilly au jour 19). Dans ce cas il est possible d'attribuer la disparition de l'ammonium du sol au seul processus de nitrification. On peut alors calculer les vitesses de nitrification suivantes :

- Livry : 4,7 kg N.ha⁻¹.j⁻¹
- Etrépilly : 3,7 kg N.ha⁻¹.j⁻¹
- Bourguignon : 3,2 kg N.ha⁻¹.j⁻¹

Le classement des sols en fonction de leur vitesse de nitrification est différent de celui observé au laboratoire dans des conditions plus favorables de température et d'aération (cf. Partie II). L'amplitude des variations est également moins grande in situ. Le choix des sols n'a donc pas permis d'obtenir une variabilité importante des temps de résidence de l'ammonium dans le sol, comme nous l'espérions. En tenant compte de ces vitesses calculées et parce qu'il n'y a pas eu de changements climatiques importants, on peut penser que la nitrification s'est achevée aux environs du jour 20 dans le sol de craie, du jour 28 dans le sol argilo-sableux, et vers 30-35 jours dans le sol hydromorphe.

		Urée			Nitrate d'ammonium		
		Na*	Nm**	Na + No	Na*	Nm**	Na + No
		+ No*		+ Nm	+ No*		+ Nm
LIVRY sol calcaire	13j	4.0	51.0	55.0	3.0	68.5	71.5
	19j	6.4	50.8	57.2	5.3	53.9	59.2
	26j	13.6	43.2	56.8	14.2	23.3	37.5
ETREPILLY limon hydr.	13j	7.8	79.3	87.1	5.5	35.5	41.0
	19j	9.3	58.3	67.6	6.8	45.5	52.3
	26j	16.5	78.7	95.2	12.7	78.8	91.5
BOURGUIGNON argile sableuse	13j	8.8	69.5	78.3	5.6	62.8	68.4
	19j	13.5	63.4	76.9	9.9	57.7	67.6
	26j	23.2	52.5	75.7	23.3	48.3	71.6

Tableau 20: Evolution des bilans d'azote pendant la période de nitrification (N kg.ha⁻¹)

Na : Quantités N de l'engrais prélevées par la culture (parties aériennes + racines)

No : Quantités N de l'engrais organisées dans le sol (horizon 0-30 cm)

Nm : Quantités N minéral du sol provenant de l'engrais (horizon 0-30 cm)

* : déterminé avec N15

** : calculé par différence avec le témoin

	Jours	CBU Tiges	Plantes Racines ^a	N organisé ^b	Total
ORKE	13	3.0	ND	5.8	8.8 (1.8)
	19	6.7	ND	7.8	13.5 (4.4)
	28	11.8	2.0	9.4	23.2 (4.6)
	103	36.4	10.6	19.3	66.4 (10.3)
	160	37.8	9.0	24.3	71.3 (10.7)
NE ₄ ¹⁵ NO ₃	13	3.2	ND	0	3.2 (0.8)
	19	7.9	ND	0.7	8.6 (2.0)
	28	17.9	1.5	6.8	26.3 (6.4)
	103	45.5	12.6	17.5	75.1 (7.7)
	160	49.6	12.6	27.0	89.2 (15.3)
1 ⁵ NE ₄ NO ₃	13	1.9	ND	6.1	8.0 (0.9)
	19	3.4	ND	7.8	11.2 (1.6)
	28	7.5	0.8	12.0	20.4 (2.6)
	103	35.6	7.2	17.3	60.2 (8.0)
	160	37.4	8.9	20.7	67.1 (10.3)

BOURQUIGNON

	Jours	CBU Tiges	Plantes Racines ^a	N organisé ^b	Total
ORKE	13	1.0	ND	6.8	7.8 (2.1)
	19	2.2	ND	7.1	9.3 (1.2)
	27	5.3	1.5	9.7	16.5 (0.8)
	103	39.8	12.2	18.8	70.8 (6.0)
	158	37.3	8.4	25.5	71.3 (6.0)
NE ₄ ¹⁵ NO ₃	13	1.2	ND	0	1.2 (0.2)
	19	2.1	ND	0.4	2.5 (0.2)
	27	4.0	1.8	1.8	7.6 (2.5)
	103	34.5	12.8	16.2	63.5 (7.2)
	158	34.5	9.7	16.2	60.6 (13.8)
1 ⁵ NE ₄ NO ₃	13	1.2	ND	8.5	9.8 (1.5)
	19	2.4	ND	8.8	11.2 (0.6)
	27	4.2	2.6	11.0	17.8 (1.6)
	103	33.5	10.4	18.1	62.1 (3.6)
	158	33.4	10.5	19.1	63.7 (10.3)

ETREPILLY

	Jours	CBU Tiges	Plantes Racines ^a	N organisé ^b	Total
ORKE	13	1.0	ND	3.1	4.0 (0.5)
	19	2.0	ND	4.5	6.4 (1.1)
	26	5.1	0.5	8.0	13.6 (2.9)
	99	28.4	12.5	17.2	58.2 (2.8)
	159	32.3	7.4	27.4	67.1 (5.0)
NE ₄ ¹⁵ NO ₃	13	1.3	ND	0	1.3 (0.3)
	19	2.9	ND	0.2	3.0 (0.5)
	28	8.0	0.8	6.0	14.8 (6.0)
	99	56.7	19.9	24.5	101.2 (3.9)
	159	53.7	12.3	33.5	99.5 (3.5)
1 ⁵ NE ₄ NO ₃	13	0.9	ND	3.8	4.7 (0.7)
	19	2.8	ND	4.7	7.6 (0.3)
	28	5.9	1.3	6.5	13.7 (1.6)
	99	22.7	8.7	15.8	47.3 (3.8)
	159	23.2	5.3	21.1	49.6 (5.5)

LIVRY

Tableau 21 : LIVRY - Bilan de l'azote 15 utilisé par la plante et organisé dans la matière organique du sol. (exprimé en % de l'apport ¹⁵N)
a : racines extraites sur l'horizon 0-30 cm
b : azote organisé mesuré sur 0-60 cm

22. Bilan ^{15}N et pertes d'azote

Les bilans ^{15}N réalisés à la floraison et à la récolte (tableau 21) mettent en évidence des pertes très significatives d'azote des engrais. Il pourrait s'agir d'azote nitrique entraîné profondément, non dosé, et non absorbé par la plante. Des pertes significatives par lessivage ne peuvent être exclues. Cependant, le tableau 20 montre que le déficit réel de N engrais se manifeste très tôt, à 13 jours, notamment à Livry. Or, dans ce sol de craie, le bilan ^{15}N de la forme $^{15}\text{NO}_3$, la plus sujette au lessivage, boucle à 100 %. Les déficits importants observés pour les apports d'urée et d'ammonium (respectivement 33 et 50 % du ^{15}N apporté à la récolte, soit 26 et 20 kg N.ha⁻¹), ne peuvent s'expliquer que par des pertes gazeuses, en particulier la volatilisation d'ammoniac à partir du sol.

Dans le cas de l'urée, les pertes se sont produites presque exclusivement pendant les deux premières semaines qui ont suivi l'apport, puisque le déficit était déjà de 25 kg N.ha⁻¹ au jour 13 (tableau 20). Les pertes provenant de l'ammonium du nitrate d'ammonium se sont produites dans les trois premières semaines : 9 kg au jour 13, 21 kg N.ha⁻¹ au jour 19.

A Etrépilly, les pertes ont affecté toutes les formes d'azote : le déficit N15 est de 29 % pour l'urée, 36 et 39 % pour les formes ammoniacale et nitrique (soit 23 et 30 kg N.ha⁻¹ pour les traitements urée et nitrate d'ammonium). Le fait que le bilan apparent d'azote à 26 jours soit de 100 % (et même davantage) nous incite à penser que le déficit est attribuable à des pertes par dénitrification qui se sont produites après le jour 26, pendant la montaison du blé. Le potentiel de dénitrification est évidemment plus grand dans ce type de limon ayant une forte sensibilité à l'hydromorphie, celle-ci s'étant exprimée pendant cette période pluvieuse. Les deuxième et troisième décades d'avril (jours 26 - 47) ont été plus chaudes que les moyennes décennales (température moyenne = 12,4°C), et donc a priori favorables à la dénitrification.

A Bourguignon, les pertes apparentes (tableau 20) d'azote à 26 jours sont approximativement égales à 9 kg N.ha⁻¹ pour le traitement ammonitrate et 4 kg N.ha⁻¹ pour le traitement urée. Il s'agit très vraisemblablement de volatilisation d'ammoniac.

A la récolte, le déficit N15 montre que les pertes cumulées sont de 18 kg.ha⁻¹ pour le nitrate d'ammonium (13 pour *A et 4 pour *N) et 23 kg N.ha⁻¹, pour l'urée. Les pertes ayant eu lieu entre 26 jours (fin de la période de nitrification) et la récolte seraient respectivement de 19 et 9 kg N.ha⁻¹ pour AN et U, très probablement par dénitrification.

	Mat.sèche totale t.ha ⁻¹		Rendement grain t.ha ⁻¹		N absorbé total kg.ha ⁻¹	
	U	AN	U	AN	U	AN
LIVRY	13.1	13.3	8.0	8.0	142	159
ETREPILLY	12.4	12.6	5.6	5.5	93	94
BOURGUIGNON	16.2	15.9	6.9	7.1	179	168

Tableau 22: Production de matière sèche, rendement en grain et N absorbé à la maturité du blé dans les 3 situations étudiées. Aucune des différences entre les traitements urée (U) et nitrate d'ammonium (AN) n'est significative au seuil 5%, sauf pour la quantité d'azote absorbée à Livry.

	CRU % apport			
	¹⁵ N-Urée	¹⁵ NO ₃	¹⁵ NH ₄	¹⁵ NH ₄ ¹⁵ NO ₃ *
LIVRY	40.9 (1.2)	76.6 (4.2)	31.4 (1.0)	54.0
ETREPILLY	52.0 (6.7)	47.3 (7.7)	43.9 (3.2)	45.6
BOURGUIGNON	47.0 (4.0)	58.1 (6.1)	42.8 (3.2)	50.5

Tableau 23: Coefficients réels d'utilisation des différents engrais mesurés dans la plante entière (parties aériennes + racines), à la floraison du blé (moyenne des trois blocs). Livry (51): sol calcaire ; Etrépilly (02): limon hydromorphe; Bourguignon (02): argile sableuse
(*) CRU calculé (moyenne de ¹⁵NO₃ et ¹⁵NH₄)
Ecart-types entre parenthèses

23. Utilisation par la culture

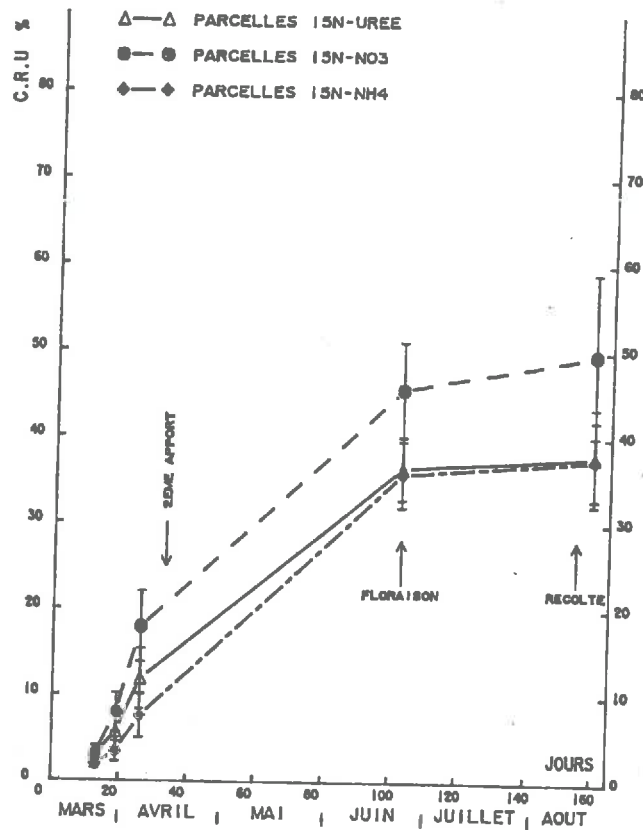
La comparaison des apports d'urée et de nitrate d'ammonium ne fait apparaître aucune différence significative dans les courbes de croissance, la matière sèche totale à la récolte et les composantes du rendement (tableau 22), pour les 3 situations (cf annexe p.183).

De même, on n'observe pas de différence significative dans les quantités totales d'azote absorbées à Etrépilly et Bourguignon. A Livry, l'absorption d'azote démarre plus rapidement dans le traitement nitrate d'ammonium ; la différence se maintient jusqu'à la récolte ; l'écart est alors de 17 kg N.ha⁻¹ (tableau 22).

L'azote mobilisé dans le système racinaire s'est avéré représenter une part importante du prélèvement total d'azote (annexe p. 185). A la floraison, cet azote représente en moyenne 65, 53 et 54 kg N.ha⁻¹ dans les sols de Livry, Etrépilly et Bourguignon (horizon 0-30 cm). Ces valeurs sont beaucoup plus élevées que celles observées sur l'essai de Mons où l'azote racinaire ne représentait que 12 kg N.ha⁻¹.

Les coefficients d'utilisation des différentes formes d'azote à la floraison sont données au tableau 23. On constate le classement suivant : NH₄ ≤ Urée < NO₃, sauf à Etrépilly où le coefficient d'utilisation de la forme nitrique est intermédiaire entre celui de l'ammonium et de l'urée. L'utilisation du ¹⁵NO₃ est très nettement supérieure en sol de craie ; c'est un résultat en accord avec des observations antérieures mettant en comparaison urée, sulfate d'ammonium et nitrate de calcium (Lhotellier et Ségard, 1983). Les écarts entre urée et ammonitrate sont plus faibles. A Livry, le coefficient d'utilisation du nitrate d'ammonium est supérieur de 13% à celui de l'urée ; ce qui explique une différence de 10,5 Kg N.ha⁻¹ dans l'absorption totale de l'azote.

a
BOURGUIGNON



b
ETREPILLY

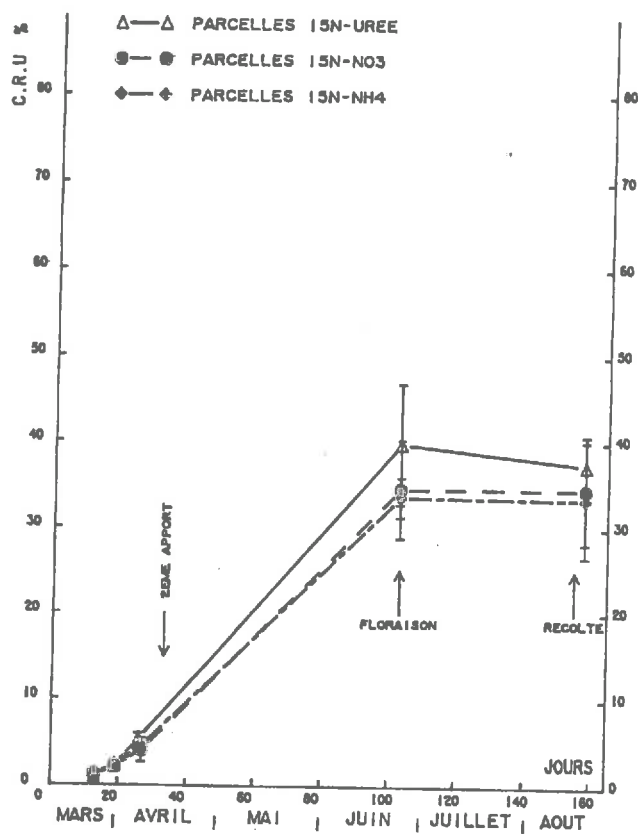
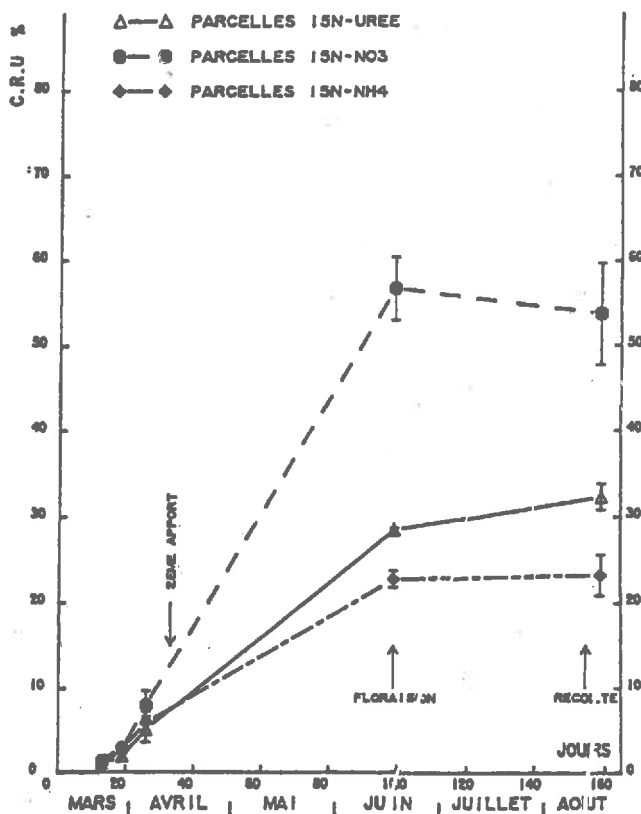


Figure 20 : Coefficients réels d'utilisation (parties aériennes) du 1er apport marqué (80 kg N.ha⁻¹ sous forme ¹⁵N-urée, ¹⁵NH₄NO₃, NH₄¹⁵NO₃)

Les cinétiques d'utilisation (Figure 20) montrent que le CRU des parties aériennes a atteint un maximum à la floraison, ou probablement avant dans les essais de Livry et Etrépilly. A Bourguignon, le CRU augmente légèrement entre floraison et récolte. Il peut s'agir soit du prélèvement d'azote minéral marqué résiduel, soit d'une absorption faisant suite à une reminéralisation de ^{15}N . A Livry, le coefficient d'utilisation de la plante entière décroît en moyenne de 10 % sur les 3 traitements entre floraison et maturité. Cela résulte d'une diminution très importante de la masse et de la quantité d'azote racinaires (annexe p. 185).

Il est également remarquable de constater que les différences d'utilisation des différentes formes d'azote se manifestent très rapidement, alors que les besoins de la culture sont très restreints, la disponibilité en azote minéral semblant non limitante. L'utilisation plus rapide du $^{15}\text{NO}_3$ apparaît nettement au jour 26 à Livry et surtout à Bourguignon. La différence est plus grande à Bourguignon qu'à Livry, probablement parce que les vitesses d'absorption sont plus élevées, le peuplement végétal étant plus avancé.



C
LIVRY

24. Organisation de l'azote dans le sol

L'organisation de l'azote de l'engrais a été déterminée dans les horizons 0-10 et 10-30 cm à toutes les dates de mesures (Figures 21, 22, 23). L'horizon 30-60 cm, échantillonné à la floraison et à la récolte, ne contenait pas d'azote 15 organique détectable.

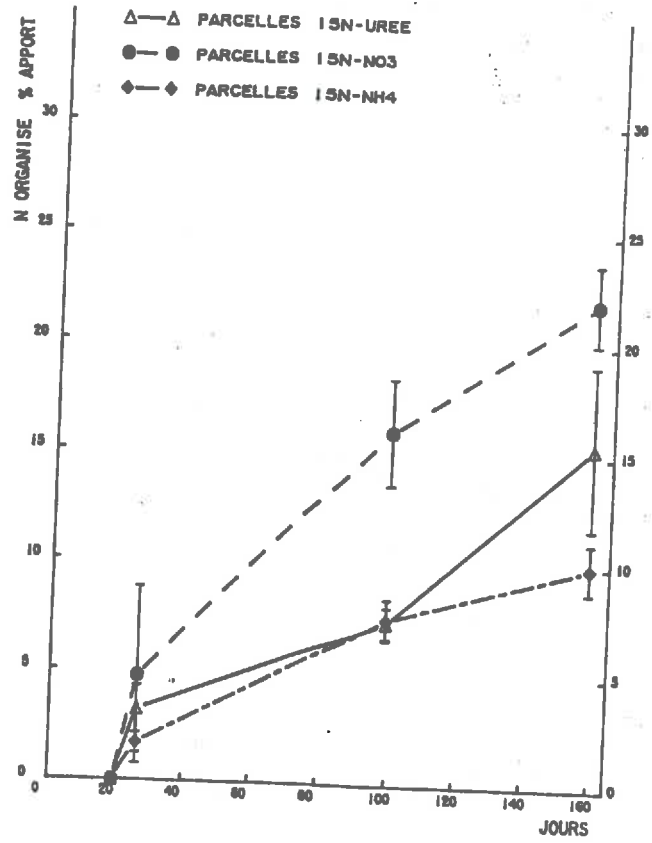
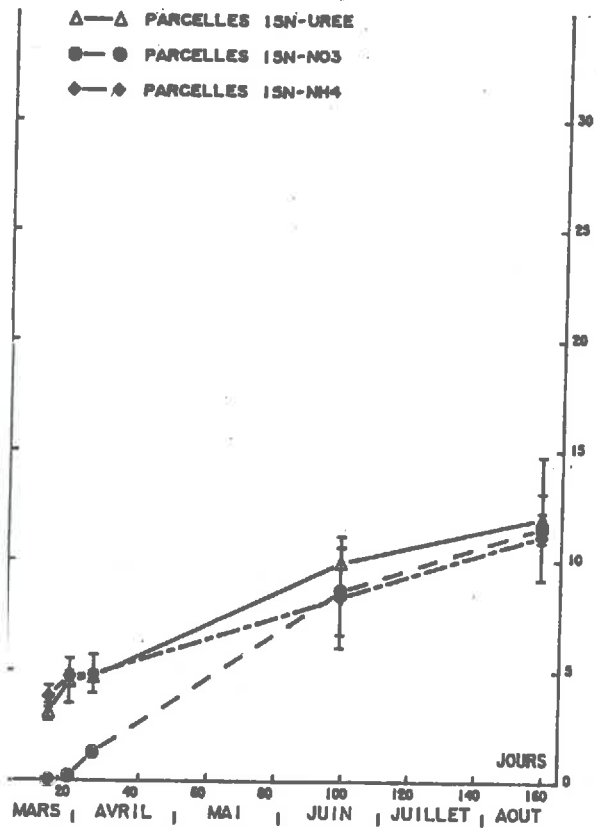
Horizon 0-10 cm -----

Les cinétiques d'organisation des formes nitrique et ammoniacale (celle-ci incluant l'urée après hydrolyse) sont très contrastées. Dans tous les essais, on constate une organisation beaucoup plus rapide de la forme ammoniacale. L'organisation mesurée initialement peut inclure en partie un phénomène de fixation d'azote ammoniacal sur les argiles. Les mesures faites au laboratoire sur ces mêmes sols ont montré que la rétrogradation était nulle dans le sol de craie et inférieure à 1 mg N.kg^{-1} sol (donc inférieure à 1.5 % de l'apport) pour les sols d'Etrépilly et de Bourguignon.

L'organisation biologique de l'ammonium, pendant la période de nitrification, est très supérieure à celle du nitrate. Au jour 26, les quantités de ^{15}N organisé provenant de l'ammonium de l'urée sont 3 à 4 fois plus importantes que les quantités provenant du $^{15}\text{NO}_3$.

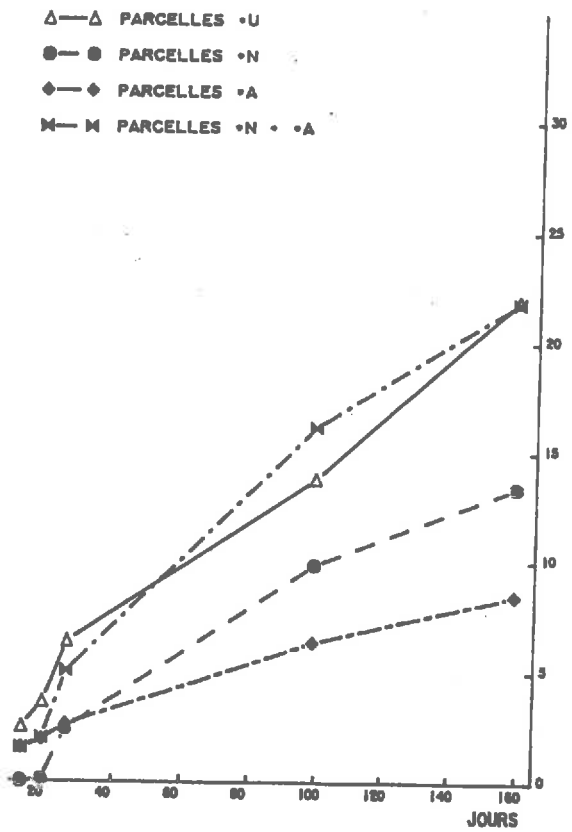
Du jour 26 à la floraison, la tendance s'inverse : la vitesse d'organisation devient plus forte dans les parcelles A*N. Il est probable que cela résulte des pertes qui ont davantage affecté l'azote provenant du $^{15}\text{NH}_4$ (A*N) et du ^{15}N -urée : les quantités d'azote 15 résiduel (celui-ci étant sous forme $^{15}\text{NO}_3$) dans ces traitements sont alors plus faibles et plus diluées que dans le traitement A*N.

A la floraison, les différences entre formes sont réduites à Etrépilly et Bourguignon, ou même comblées dans le sol de Livry. Entre floraison et maturité, l'organisation nette augmente dans les 3 situations. Il est peu probable que cette organisation se soit faite aux dépens d'azote minéral marqué résiduel puisqu'on retrouve très peu d'azote minéral à la floraison. Elle doit correspondre à un début de décomposition des racines marquées. On en déduit que la reminéralisation de l'azote organisé précédemment, si elle se produit, ne peut être que de faible amplitude.



a - horizon 0-10 cm
(exprimée en % apport)

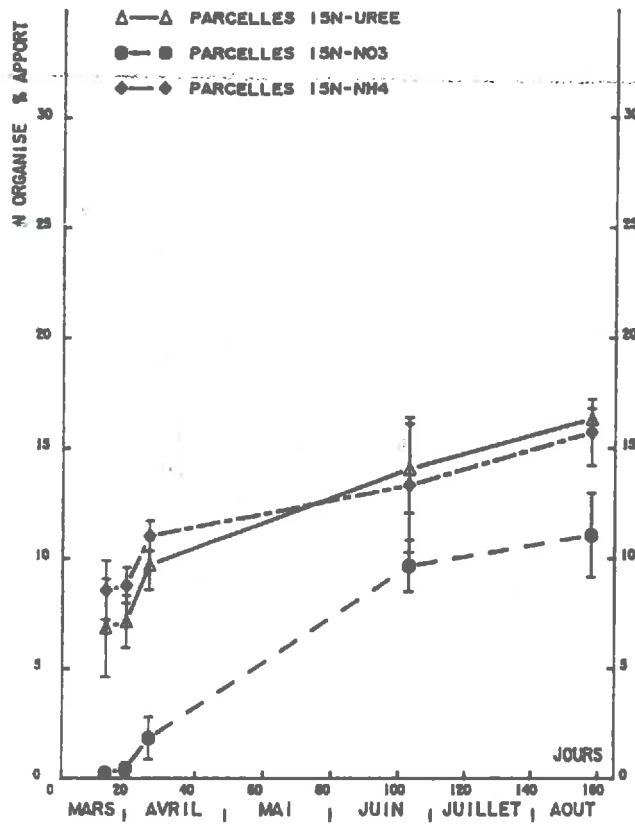
b - horizon 10-30 cm
(exprimée en % apport)



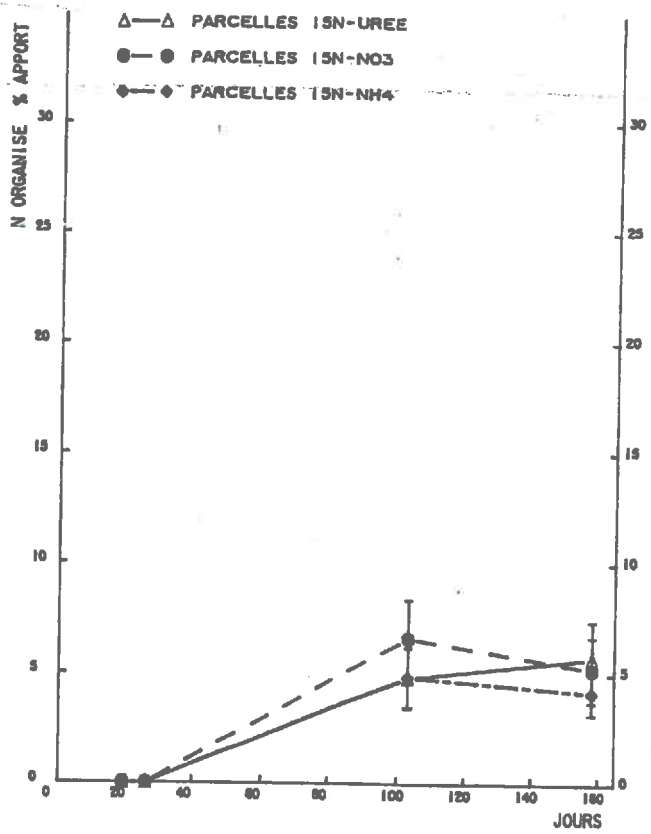
- horizon 0-30 cm
(exprimée en kg N.ha⁻¹)

Figure 21

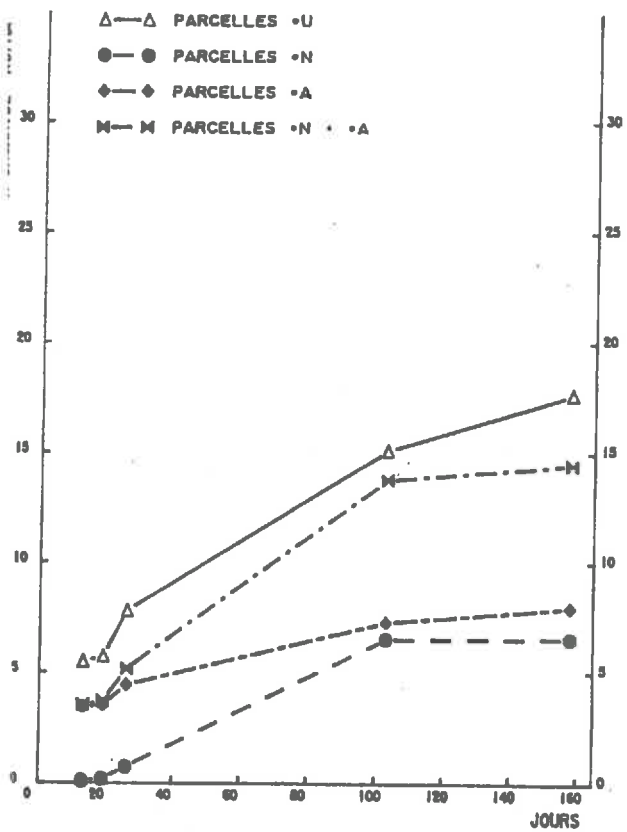
LIVRY - Organisation de l'azote du
1er apport marqué pour les parcelles
15N-urée, 15NH₄NO₃, NH₄15NO₃



a - horizon 0-10 cm
(exprimée en % apport)



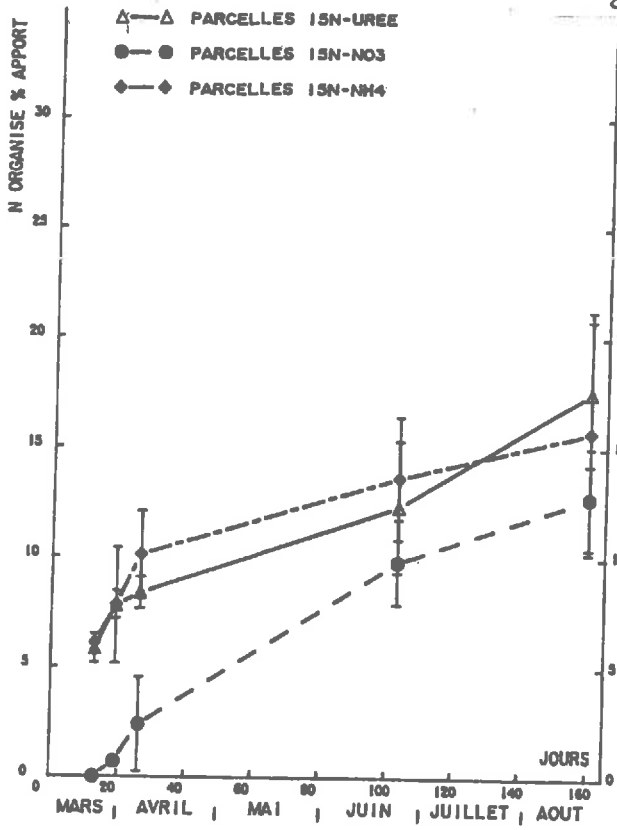
b - horizon 10-30 cm
(exprimée en % apport)



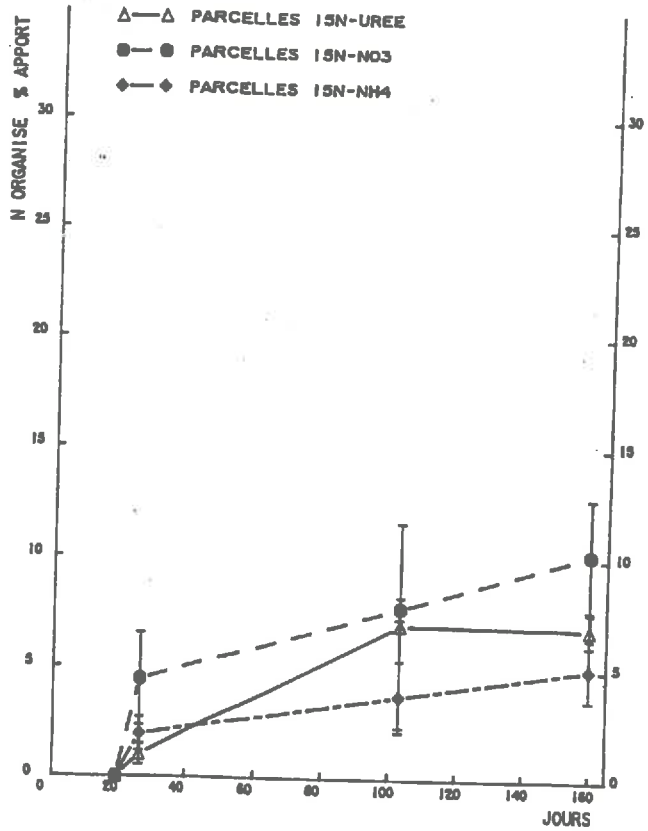
c - horizon 0-30 cm
(exprimée en kg N.ha⁻¹)

Figure 22

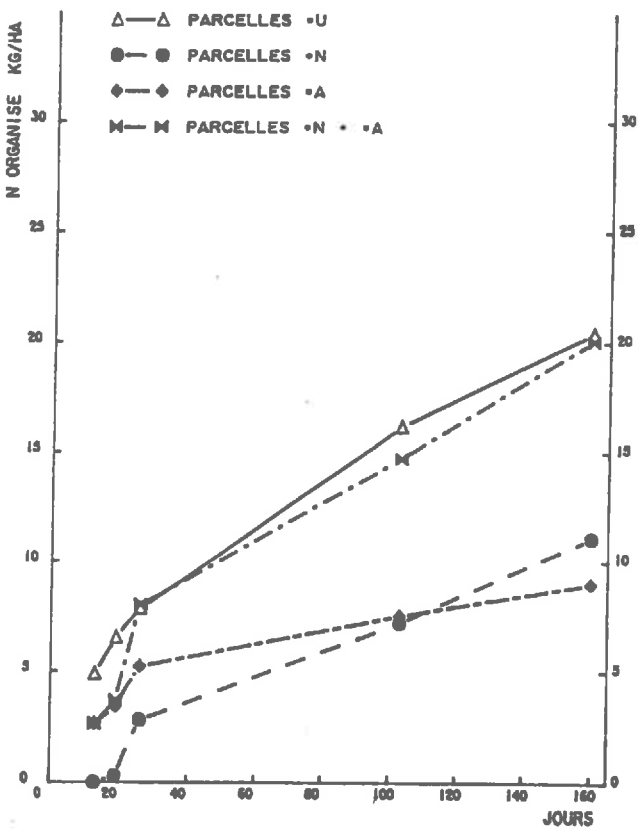
ETREPILLY - Organisation de l'azote du 1^{er} apport marqué pour les parcelles ^{15}N -urée, $^{15}\text{NH}_4\text{NO}_3$, $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$



a - horizon 0-10 cm
(exprimée en % apport)



b - horizon 10-30 cm
(exprimée en % apport)



c - horizon 0-30 cm
(exprimée en kg N.ha⁻¹)

Figure 23

BOURGUIGNON - Organisation de l'azote du 1er apport marqué pour les parcelles 15N-urée, 15NH4NO3, NH415NO3

Horizon 10-30 cm

Dans tous les essais, l'organisation apparaît plus importante pour le traitement $^{15}\text{NO}_3$. C'est un résultat logique puisque l'azote 15 a migré plus rapidement et sans doute plus intensément dans ce traitement. Bien que du $^{15}\text{NO}_3$ ait été présent dans cet horizon au jour 13, on n'observe d'organisation significative qu'à partir du jour 26.

Les quantités organisées à la floraison sont très variables selon les sols et les formes d'azote. Elles correspondent sans doute à des quantités d'azote très variables présentes dans cet horizon (en fonction des pertes et des transferts) ; cette hypothèse demanderait à être vérifiée par des dosages isotopiques de l'azote minéral.

Après la floraison, on constate une forte augmentation de l'organisation à Livry. Cette augmentation s'explique probablement par la décomposition du système racinaire qui est en cours et qui est attestée par la nette diminution de la masse des racines (annexe p. 185).

Lorsque l'on compare les quantités organisées pour les différents traitements (figures 21, 22, 23), on constate qu'il y a peu d'écart entre les parcelles U et les parcelles AN. A la floraison les quantités d'azote organisé aux dépens du premier apport se situent entre 15 et 22 kg N.ha⁻¹ pour les deux traitements et sur les trois essais.

CHAPITRE IV

DISCUSSION GENERALE

DISCUSSION GENERALE

1 - EVOLUTION DE L'APPORT D'AZOTE DANS LE SOL

Nous avons constaté dans les 4 situations une transformation très rapide de l'azote minéral apporté, après les premiers ou le second apports.

- l'hydrolyse de l'urée s'est réalisée à Mons en quelques jours. Dans les 3 essais menés en 87, il n'y avait plus d'azote sous forme uréique 13 jours après l'apport. Cette hydrolyse est donc rapide, même à des températures se situant autour de 2-3°C. Ceci est en accord avec les observations faites en conditions de plein champ ou au laboratoire (Connoly et al 1980, Vlek et Carter 1983, O'Toole et Morgan 1988). Cette capacité que possède l'uréase de fonctionner à des températures avoisinant 0°C est sans doute liée à sa position essentiellement extra-cellulaire dans le sol (Paulson et Kurtz 1969, Zantua et Bremner 1976, Burns 1982). L'activité de l'enzyme est alors, pour partie, indépendante des mécanismes de régulation caractéristiques des cellules microbiennes.

L'apport d'azote sous forme d'urée conduit alors à la présence d'azote ammoniacal en quantités plus importantes - même très temporairement - que dans le traitement nitrate d'ammonium.

- La nitrification ne peut être appréciée directement car la disparition de l'ammonium résulte de plusieurs processus. Nous observons, par l'apparition de nitrate marqué, qu'elle s'est produite à Mons aussi rapidement sur les parcelles "U que sur les parcelles "AN. Sur les essais 87, la nitrification a pu être mieux suivie (prélèvement par la plante et organisation faibles entre 0 et 26 jours), et nous avons constaté que les vitesses de nitrification étaient de l'ordre de 3 à 5 kg N.ha⁻¹.j⁻¹, pour des températures moyennes de 6 à 9°C. Ce rythme d'approvisionnement est suffisant pour assurer les besoins de la culture à cette période de son développement, par une nutrition purement nitrique.

- De fortes pertes gazeuses ont été indirectement mises en évidence, et correspondent très probablement à la volatilisation sur le sol de craie à Livry (20 à 26 kg N.ha⁻¹), à la dénitrification sur le limon hydromorphe à Etrépilly (23 à 28 kg N.ha⁻¹) et aux deux processus à Bourguignon (18 à 23 kg N.ha⁻¹). En 1987, il s'est produit une séquence climatique favorable à la dénitrification : période 0-26 jours à forte pluviométrie, suivie d'une période chaude (nettement au-dessus de la moyenne). La forte proportion de ¹⁵N₂O dans l'horizon 10-30 cm a pu également favoriser le phénomène (moindre aération par rapport à la couche de surface).

2 - UTILISATION DE L'AZOTE PAR LA PLANTE

Cinétique d'utilisation

On observe une grande variabilité dans les coefficients réels d'utilisation mesurés dans 4 situations avec un apport effectué au tallage et pour une situation avec apport à la montaison : 25 à 65 % du ^{15}N apporté est retrouvé dans les parties aériennes du blé.

Le suivi, sur un pas de temps court, a permis de saisir à Mons la cinétique d'utilisation : nous avons constaté une utilisation rapide des deux apports d'azote, le premier apport étant totalement utilisé au moment du second apport. Une utilisation rapide a également été décrite par plusieurs auteurs dont Nielsen et Jensen (1986) sur une orge de printemps et Nannipieri et al (1985) sur une association céréale - légumineuse.

Le CRU atteint généralement une valeur maximale (dépendante de toutes les autres dérivations possibles de l'azote) bien avant la récolte, et même parfois la floraison. Nous avons pu mettre en évidence des pertes quantitatives d'azote 15 préalablement assimilé par la plante (figure 15). Ceci a été également observé par Chaballier et al (1975), Boniface et al (1979), Smith et al (1983).

Nous n'avons pas noté de pertes substantielles par voie mécanique (chute de feuilles) et l'azote 15 "perdu" par les parties aériennes n'a pas été retrouvé dans les racines. Les deux explications qui nous semblent plausibles sont les suivantes :

1. L'existence de translocations d'azote vers les racines, suivies au non d'une exsudation dans le sol.

A Mons, sur les parcelles A*N, la diminution des CRU observée entre le jour 35 et la floraison est concomitante d'une augmentation du ^{15}N dans le compartiment organique du sol. On constate les mêmes phénomènes sur les parcelles A*N de l'essai de Livry, entre floraison et récolte.

Ces phénomènes d'exsudation n'ont pas été fréquemment décrits in situ, soit en raison de méthodes inadéquates (pertes de composés solubles marqués, imprécision de la localisation des prélèvements), soit parce que les processus de décomposition associés au renouvellement ou à la sénescence du système racinaire peuvent masquer par leur importance les phénomènes d'exsudation. On peut supposer qu'il s'agit d'un phénomène physiologique normal, dont il importe alors de connaître les facteurs de variation.

2. L'existence de pertes d'azote par volatilisation par le couvert végétal en fin de végétation.

Des pertes gazeuses d'ammoniac et/ou d'amines, liées à un début de sénescence, ont été décrites par Hooker et al (1980), Wetselaar et Parquhar (1980), Parquhar et al (1983).

La décroissance significative des CRU du deuxième apport observée à Mons entre la floraison et la récolte, et la diminution du bilan ^{15}N réalisé sur la plante et le sol, nous ont amenés à envisager de telles pertes. Celles-ci correspondraient à 8 kg d'azote du deuxième apport, et à 20 kg $\text{N}\cdot\text{ha}^{-1}$ si l'on considère la totalité du pool azote (N premier apport + N deuxième apport + N sol absorbé).

Toujours sur blé, une décroissance du CRU d'un second apport a également été observée dans un essai suivi sur des pas de temps courts (Mary et al 1988). La chute du CRU s'est produite environ 2 semaines après la floraison. Très récemment, Harper et al (1987) sont arrivés à la conclusion (par un bilan d'azote) que des pertes d'azote de l'ordre de 7 kg $\text{N}\cdot\text{ha}^{-1}$ étaient intervenues entre floraison et récolte sur une culture de blé. Ce sont, à notre connaissance, les premières données obtenues au champ. Il est nécessaire de préciser le déterminisme et les facteurs de variation de ce phénomène. La mesure directe de ces flux gazeux in situ pose cependant de gros problèmes méthodologiques.

Prise en compte de la plante entière

La détermination des masses et des quantités d'azote mobilisé dans le système racinaire demeure une opération laborieuse et difficile : extraction des racines à partir de masses de terre considérables, séparation rigoureuse de la terre, des racines et des résidus végétaux, pertes d'azote au cours du traitement.

Les méthodes employées ici nous paraissent donner une estimation non biaisée des masses racinaires, avec une variabilité acceptable (coefficient de variation moyen = 30 %).

Nous avons constaté que la masse de racines était très variable : 1,2 $\text{t}\cdot\text{ha}^{-1}$ à Mons, 3 à 5 $\text{t}\cdot\text{ha}^{-1}$ sur les essais menés en 1987. Le premier cas de figure est légèrement inférieur à ce qu'ont pu mesurer Barraclough et Leigh (1984) dans un sol comparable. Les fortes valeurs obtenues en 1987 sont, elles, assez proches des mesures réalisées par D. Pierre et ses collaborateurs (1983, 1984, 1985) dans le sud de la France.

A la floraison du blé, l'azote racinaire représente 29, 26 et 23 % de l'azote de la plante entière, dans les essais de Livry, Etrépilly et Bourguignon. Nous avons pu observer que l'essentiel des racines se trouvait dans les 30 premiers centimètres du sol, et que la sénescence du système racinaire était perceptible, avec nos méthodes, entre floraison et récolte.

Dans les essais 87, les CRU racines représentent alors une part non négligeable de l'utilisation de l'engrais : 10 à 12 %, et jusqu'à 20 % à Livry pour la forme A*N. L'estimation de la masse racinaire et de son excès isotopique, tous deux très variables, est donc une étape obligatoire pour évaluer correctement l'utilisation réelle de l'azote.

CRU et formes d'apport

La meilleure utilisation du nitrate comparée à celle de l'ammonium ou de l'urée a souvent été observée sur blé et sur d'autres cultures en pots ou au champ (Broadbent et Nakashima 1968, Dev et Rennie 1979, Van Lierop et Tran 1980, Lhotellier et Ségard 1983, Guiraud et al 1986, Powlson et al 1986). Ceci est confirmé ici pour 4 des 5 apports d'azote marqué.

Les cinétiques d'utilisation du ^{15}N font apparaître une différenciation précoce entre les formes, même si la différence n'est pas significative en chaque point de la courbe. Ceci pourrait suggérer une "préférence" des plantes pour l'absorption des nitrates. Cependant, les racines disposent de quantités limitées d'ions ammonium et nitrique dans la rhizosphère alors que celles-ci paraissent, au dosage, non limitantes: d'une part, nous avons constaté une localisation différente des formes pendant les premières semaines qui suivent l'apport; d'autre part, il est probable qu'une organisation plus intense se produise à proximité des racines, affectant davantage le pool ammonium.

- L'utilisation précoce du nitrate résulterait alors d'une localisation plus favorable du nitrate marqué apporté, par rapport à l'ammonium ou au nitrate produit après un délai, même court, par la nitrification et l'hydrolyse de l'urée.
- L'écart entre utilisation du nitrate apporté et utilisation de l'azote apporté sous forme urée ou ammonium, s'affirmerait ensuite selon l'importance des mécanismes (organisation, volatilisation) qui affectent spécifiquement les formes U et A, limitant en fin de compte leur utilisation par la plante.

Ceci a été observé après le premier apport marqué à Mons (1985) et à Livry Louvercy (1987).

L'écart d'utilisation entre formes est variable. Il est très important en sol de craie, et ce résultat n'apparaît pas exceptionnel (Lhotellier et Ségard, 1983). Sur les autres essais, l'écart entre U et A d'une part, N d'autre part, varie de 0 à 16 %. Il convient de ne pas masquer par une moyenne les différences importantes qui peuvent caractériser des situations pédo-climatiques diverses.

Les cinétiques de prélèvement de ^{15}N ont indiqué que les CRU récolte, habituellement seuls pris en compte, peuvent sous-estimer l'utilisation qui a été faite de l'engrais. De même, la quantité d'azote accumulé dans la culture peut sous-estimer les quantités réelles d'azote absorbé. Ainsi, le concept de coefficient réel d'utilisation, obtenu grâce à l'emploi du traceur ^{15}N , nous apparaît moins facile à prendre en compte et à interpréter qu'au début de ces expérimentations. L'azote 15 reste cependant un indicateur idéal des transferts et des flux d'azote (Guiraud 1984).

3 - ORGANISATION DE L'AZOTE

Nos efforts méthodologiques ont porté sur l'isolement et la caractérisation du compartiment organique, très global au demeurant, dans lequel nous suivons la part de l'azote de l'engrais organisée. Nous accédons à ce compartiment de façon satisfaisante, même en présence de grandes quantités d'azote minéral ayant un excès isotopique élevé. Il reste toujours difficile de distinguer les racines "vivantes" devant être prises en compte dans une valeur de CRU, et les racines sénescentes considérées comme faisant déjà partie du compartiment matière organique du sol.

Il est également difficile de prendre en compte la variabilité spatiale de l'organisation dans le sol, et de distinguer le fonctionnement des zones rhizosphérique et non rhizosphérique, les connaissances acquises sur les populations microbiennes et les phénomènes de rhizodéposition suggérant une relative indépendance de fonctionnement de ces deux zones. Cela est difficilement réalisable dans notre type d'expérimentations.

Sur l'essai de Mons, ont cependant été effectuées des mesures globales de ^{15}N contenu dans la biomasse microbienne, par la méthode de fumigation au chloroforme (Jenkinson et al 1976), parallèlement aux mesures de ^{15}N organique total. Les résultats (Mary et al, non publié) confirment le caractère essentiellement microbien de l'organisation, et la relativement faible vitesse de libération de l'azote assimilé par les micro-organismes.

L'organisation du ^{15}N résulte de l'action de plusieurs processus simultanés ou successifs :

- l'organisation de la forme ammoniacale (NH_4 apporté ou provenant de l'hydrolyse de l'urée) observée sur les parcelles *U et *AN ;
- l'organisation du nitrate apporté (A*N) ou du nitrate produit par la nitrification de l'ammonium (*U et *AN) ;

- le recyclage microbien ou l'humification de composés azotés marqués issus de la plante par exsudation, desquamation et sénescence des racines ;

C'est pourquoi, si les fluctuations du compartiment organique marqué rendent compte de l'organisation de l'azote apporté initialement sous forme urée, ammonium ou nitrate, il ne faut pas interpréter les données comme les taux respectifs d'assimilation de l'ammonium et du nitrate par les micro-organismes.

Les cinétiques d'organisation du ^{15}N apporté montrent que l'organisation augmente jusqu'à la récolte. On peut distinguer le comportement de deux horizons :

- dans l'horizon 0-10 cm, une discrimination entre les traitements apparaît très précocément. A Mons, Bourguignon et Livry (figure 24), l'organisation exprimée en % de l'apport de ^{15}N est identique pour les traitements *U et *AN. Les quantités d'azote organisé sont donc supérieures pour *U. La diffusion de l'urée avant hydrolyse a probablement donné naissance à un profil de $^{15}\text{NH}_4$ beaucoup plus homogène que celui provenant du $^{15}\text{NH}_4\text{-NO}_3$, augmentant ainsi la probabilité d'organisation.

L'organisation de la forme $^{15}\text{NO}_3\text{-NH}_4$ est beaucoup plus lente. Dans les essais 87, elle ne devient mesurable qu'à partir du jour 26. Tous les essais indiquent que la vitesse d'organisation reste nettement plus faible pour le nitrate, tant que la nitrification n'est pas terminée (figure 24).

Par contre, à la floraison, on constate dans la plupart des situations un "rattrapage" des quantités organisées sur les parcelles $^{15}\text{NO}_3$, les amenant à des valeurs proches de celles obtenues pour *U et *AN. Dans le cas du premier apport à Mons, nous avons pu montrer qu'au moins une partie de cette augmentation ne résultait pas de l'organisation d'azote 15 minéral, mais de l'exsudation par la plante de composés azotés marqués.

- dans l'horizon 10-30 cm, l'organisation de l'azote 15 apparaît avec un certain délai. Elle est plus rapide et plus importante pour le traitement $^{15}\text{NO}_3$ ce qui correspond à la migration plus précoce du nitrate marqué.

A Mons, l'organisation dans l'horizon 10-30 cm n'a représenté que quelques % de l'apport, étant donné le faible déplacement de l'azote 15 minéral. A Livry, on observe au contraire une plus forte organisation dans l'horizon 10-30 cm que dans 0-10 cm à la floraison, suite à une descente rapide du nitrate dans le profil.

- en dessous de 30 cm, il n'y a pas eu d'organisation détectable de ^{15}N pour aucun des essais, bien que du $^{15}\text{NO}_3$ ait parfois migré au-delà de 30 cm. Ce résultat, en accord avec l'ensemble des résultats ^{15}N disponibles dans la bibliographie (Olson et Swallow 1984, Rice et Smith 1984, Nannipieri et al 1985, Powlson et al 1986), montre que l'essentiel du carbone assimilable disponible (en particulier par rhizodéposition) est localisé dans la couche supérieure du sol.

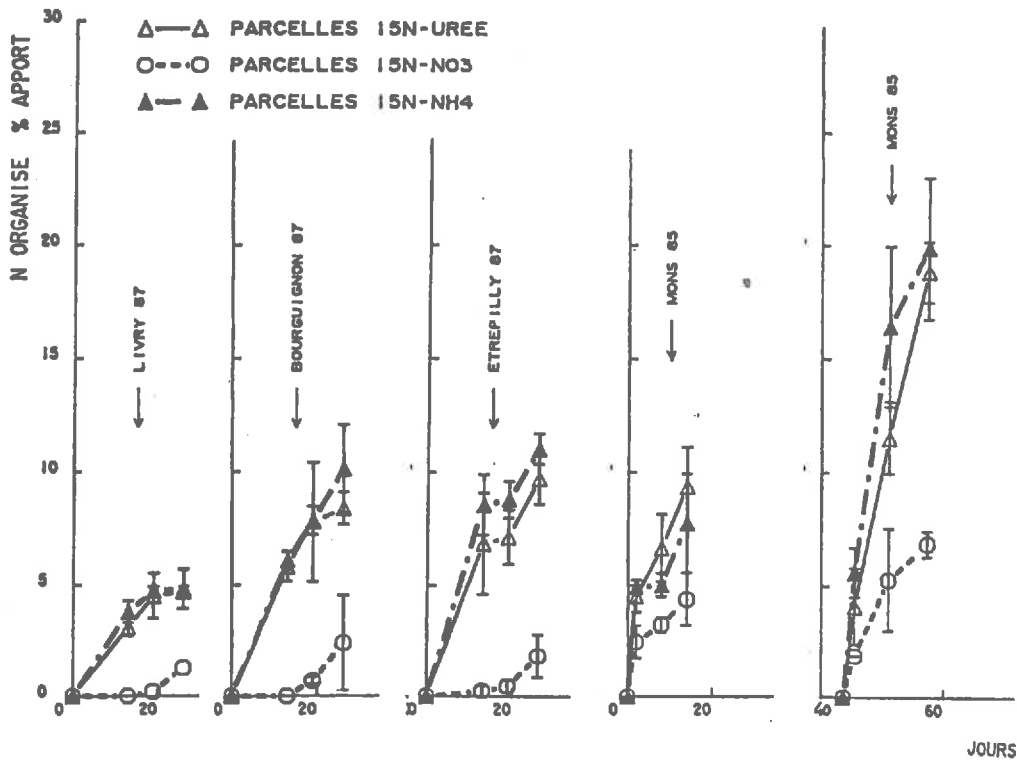


Figure 24 : Cinétiques d'organisation du N^{15} provenant de différentes formes azotées, dans les semaines qui suivent l'apport

Malgré les différences de localisation, les quantités totales d'azote organisé dans les traitements urée et nitrate d'ammonium ne sont pas significativement différentes sur la quasi totalité des mesures (figures 21, 22, 23). C'est un résultat intéressant car il permet d'envisager d'utiliser l'azote 15 en véritable traceur de l'azote minéral du sol, pour calculer les quantités totales organisées (provenant du sol et de l'engrais).

Il est également remarquable de constater qu'il n'y a pas de gros écarts dans les cinétiques d'organisation de l'azote du premier apport dans les 4 situations considérées (figure 25). Les divergences les plus notables ont lieu après floraison et correspondent très probablement à des processus de décomposition racinaire plus ou moins avancée (très intense à Livry). Les quantités organisées aux dépens du premier apport sont identiques à la floraison, égales à $15 \text{ kg N}\cdot\text{ha}^{-1}$. La constance de ce résultat est assez surprenante, notamment si l'on considère l'essai de Mons où la densité racinaire était très inférieure et la dose d'azote apporté plus faible que dans les autres essais.

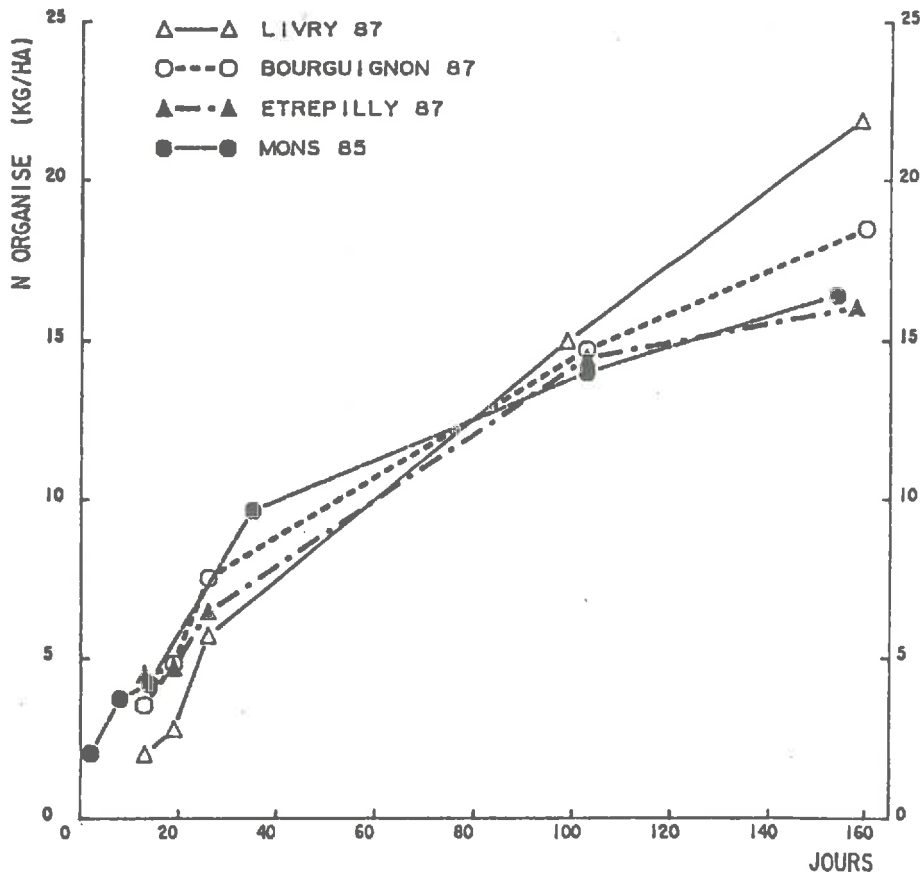


Figure 25 : Cinétiques d'organisation comparées de l'azote du premier apport dans les quatre situations étudiées. (Moyennes des traitements urée et nitrate d'ammonium)

Les quantités organisées après le second apport à Mons ont été plus fortes qu'après le premier apport, puisqu'elles atteignent 25 kg N.ha⁻¹ à la floraison. On constate surtout que l'organisation s'est produite très rapidement (figure 26) et à une vitesse constante de 1,5 kg N.ha⁻¹.jour⁻¹ dans les 15 jours qui ont suivi le deuxième apport (à comparer avec une vitesse de 0,25 Kg N.ha⁻¹. jour⁻¹ au premier apport). Cette organisation intense peut être attribuée soit à la présence de carbone résiduel non assimilé par les micro-organismes, peut être en raison d'une insuffisance d'azote minéral (l'horizon de surface ne contenait pratiquement plus d'azote minéral au moment du second apport), soit à une très forte rhizodéposition en début de montaison.

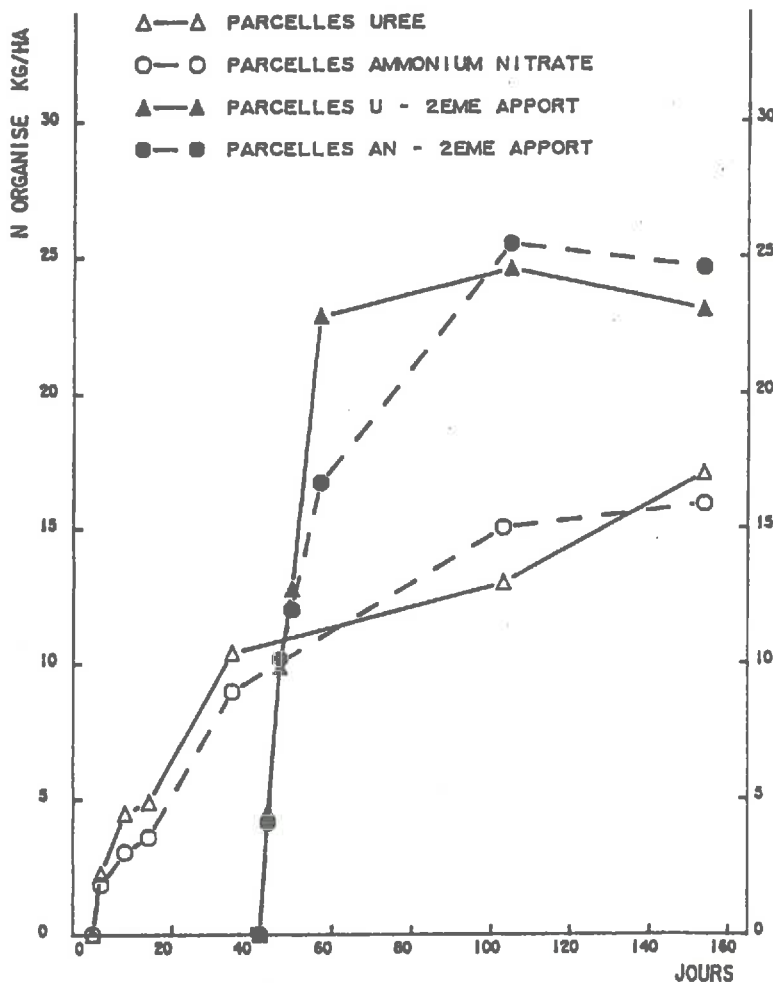


Figure 26 : Cinétiques d'organisation de l'azote apporté au tallage et au début de la montaison sur l'essai de MONS.

Symboles vides : 1er apport marqué
Symboles pleins : 2ème apport marqué

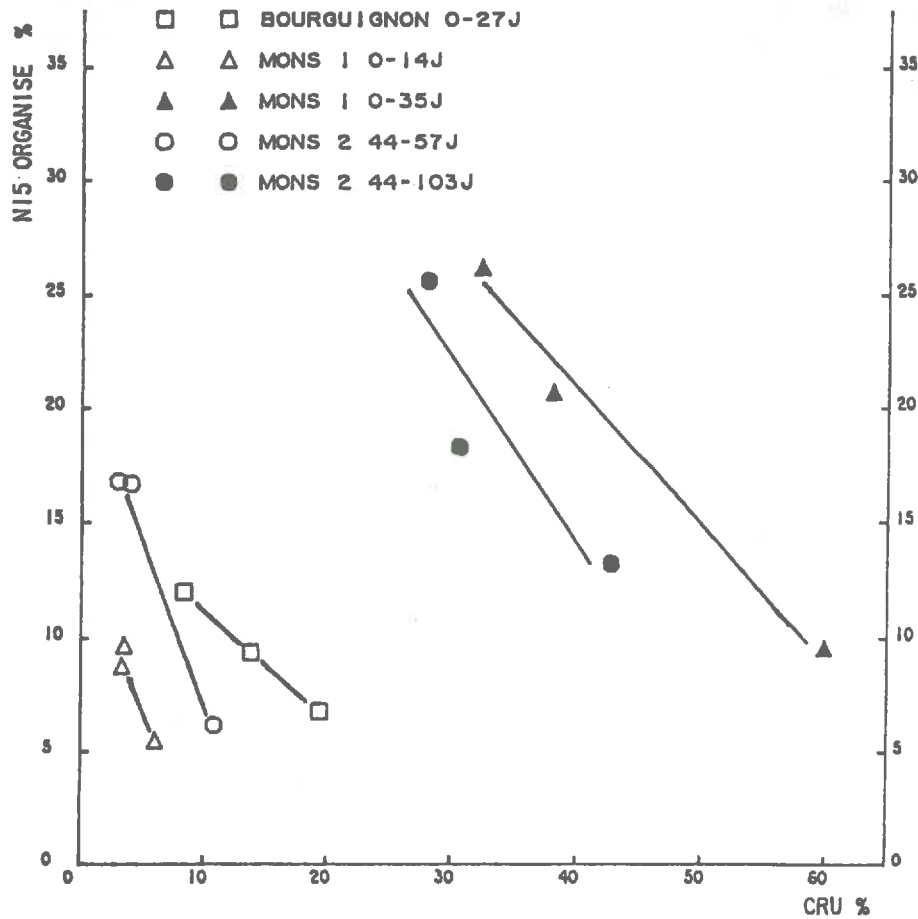


Figure 27 : Relations observées entre le N¹⁵ absorbé par la culture et le N¹⁵ organisé dans le sol, dans 3 situations à différentes périodes

Les symboles identiques correspondent aux traitements A,U et N.

Les symboles blancs correspondent à la période de nitrification.

Les symboles noirs correspondent au CRU maximum (après nitrification).

4 - RELATIONS ENTRE L'ORGANISATION DANS LE SOL ET L'UTILISATION PAR LA PLANTE

L'hypothèse avait été émise que l'organisation de l'azote pouvait être un facteur explicatif important des variations d'utilisation de l'engrais par la plante, mesurées par le CRU. Cette hypothèse s'appuyait sur 3 séries de constatations :

1. La faible intensité des pertes par volatilisation d'ammoniac après apport d'engrais uréique ou ammoniacal, même en sol à pH élevé, constatée au laboratoire ou au champ (Fresneau 1982 ; Rémy et al, non publié).
2. La forte variabilité des CRU obtenue parfois avec différentes formes d'azote .
3. La susceptibilité plus grande de la forme ammoniacale à l'organisation microbienne et la possibilité de rétrogradation de l'ion NH_4^+ .

Cette hypothèse ne s'est pas vérifiée dans toutes les situations. Nous pouvons distinguer deux cas :

1. Les situations où il n'y a pas eu de pertes très différenciées en fonction des formes d'azote, en particulier de pertes par volatilisation d'ammoniac du sol ou de pertes d'azote par la plante: on constate alors une forte corrélation négative entre le ^{15}N organisé dans le sol et le coefficient réel d'utilisation, qui se manifeste même précocément (figure 27). Cela a été notamment le cas de l'essai réalisé à Mons en 85, pour le premier et le second apports.

2. Les situations où d'importantes pertes se sont produites : ces pertes ont eu pour conséquence soit d'effacer la variabilité entre formes d'azote, aussi bien du CRU que du ^{15}N organisé (essai d'Etrépilly et de Bourguignon), soit même d'inverser la tendance et de rendre positive la corrélation ^{15}N organisé / CRU (cas de Livry). Dans ce sol de craie, les pertes ont affecté les formes très différemment : 33 % pour l'urée, 0 % pour le nitrate, 50 % pour l'ammonium. Il n'est alors pas surprenant d'observer à la fois un fort coefficient d'utilisation et une assez forte organisation dans le traitement $^{15}\text{NO}_3$ dont le bilan ^{15}N boucle à 100 % .

Dans les essais réalisés à Mons, les défauts de bilan ^{15}N ont été peu différents selon les formes d'azote, ce qui indique des similitudes dans la nature et les périodes d'occurrence des pertes. De plus, les périodes de nitrification ont été relativement longues, et surtout ont correspondu à une absorption par le végétal nettement plus forte que dans les essais 87.

Ainsi, l'absorption d'azote observée à Mons pendant la période 0-35 jours a été de $33 \text{ kg N}\cdot\text{ha}^{-1}$, contre 9, 4 et $14 \text{ kg N}\cdot\text{ha}^{-1}$ dans les essais de Livry, Etrépilly et Bourguignon sur l'intervalle 0-26 jours. Il en a résulté une grande amplitude de variation des CRU et du ^{15}N organisé dans les deux essais 85. En 87, la période de croissance active, et donc d'absorption d'azote plus intense, s'est produite après que la nitrification ait eu lieu, ce qui a contribué à gommer les différences entre formes.

Ceci indique que les vitesses de nitrification dans le sol et l'absorption par le peuplement végétal répondent différemment aux facteurs du milieu. Ce découplage peut conduire à une variabilité des CRU.

La relation ^{15}N organisé / CRU semble se manifester peu de temps après l'apport (figure 27). C'est ce que l'on observe à Mons, aux premier et deuxième apports, ainsi qu'à Bourguignon (essai 87 présentant la plus forte croissance du peuplement). Cette relation peut s'expliquer de deux façons :

- par une absorption préférentielle du nitrate par la plante, en présence des deux sources : nitrate et ammonium. Cette hypothèse nous semble contradictoire avec les résultats obtenus en physiologie végétale, montrant que le blé possède de fortes capacités d'absorption de l'ammonium (Mc Duff et Hopper 1985, Lewis et al 1985);

- par une disponibilité en azote limitée dans la rhizosphère, même lorsque les quantités totales sont importantes. Il s'agirait alors d'une véritable compétition entre la microflore rhizosphérique et la racine. L'azote ammoniacal disponible étant la forme presque exclusivement utilisée par les micro-organismes (cf. Partie II), il resterait davantage de nitrate et moins d'ammonium à la disposition de la racine.

PARTIE II :

**ORGANISATION MICROBIENNE DE
L'UREE, DE L'AMMONIUM ET
DU NITRATE
EN CONDITIONS CONTROLEES**

CHAPITRE I

PROCESSUS DE L'ORGANISATION MICROBIENNE ET FACTEURS DE VARIATION

<p style="text-align: center;">PROCESSUS DE L'ORGANISATION MICROBIENNE ET FACTEURS DE VARIATION</p>

L'organisation de l'azote minéral (ou la réorganisation d'azote minéralisé) résulte des processus de maintenance et de croissance des micro-organismes du sol. Elle correspond à l'absorption et l'assimilation d'ammonium, de nitrate, de nitrite (éventuellement) par les micro-organismes hétérotrophes, qui conduit à la synthèse de composés organiques azotés.

Avec la minéralisation (correspondant au processus d'ammonification), l'organisation est une étape essentielle du cycle de l'azote (schéma 29). Les deux processus travaillent en sens inverse, construisant ou détruisant la matière organique. Ils sont réalisés par un grand nombre de micro-organismes, très diversifiés, et vont donc avoir lieu dans des conditions écologiques variées. Leur activité constitue le cycle de minéralisation-organisation (organisation brute et minéralisation brute), la différence entre ces deux processus étant un effet net : minéralisation nette ou organisation nette. C'est de ce résultat que va dépendre la disponibilité en azote minéral dans un sol.

L'effet net (production ou disparition de l'azote minéral) ne renseigne pas - comme tout autre mesure de la taille d'un compartiment - sur l'intensité des processus dont il est la résultante. On peut estimer indirectement l'activité microbienne par une activité respiratoire globale (production de CO₂, consommation d'O₂) ou par des activités enzymatiques. L'utilisation de l'azote 15 permet d'accéder sur un pas de temps court, à l'organisation et à la minéralisation brutes.

Les phénomènes de minéralisation provoquent par une rupture des liaisons C — H et C≡N une libération d'énergie tandis que l'édification des composés organiques en nécessite.

En conditions naturelles, le fonctionnement spontané des systèmes va dans le sens d'une minéralisation brute supérieure à l'organisation brute, ce qui aboutit à une production nette d'azote.

En sols cultivés, les équilibres vont être modifiés par l'injection dans le sol de quantités importantes d'azote minéral (apport d'engrais) et de carbone et d'azote issus des restitutions organiques - (résidus de récolte, rhizodéposition). Le rythme des transformations dans le sol et l'interaction constante entre les pools N et C auront des conséquences sur l'azote minéral disponible en cours de végétation.

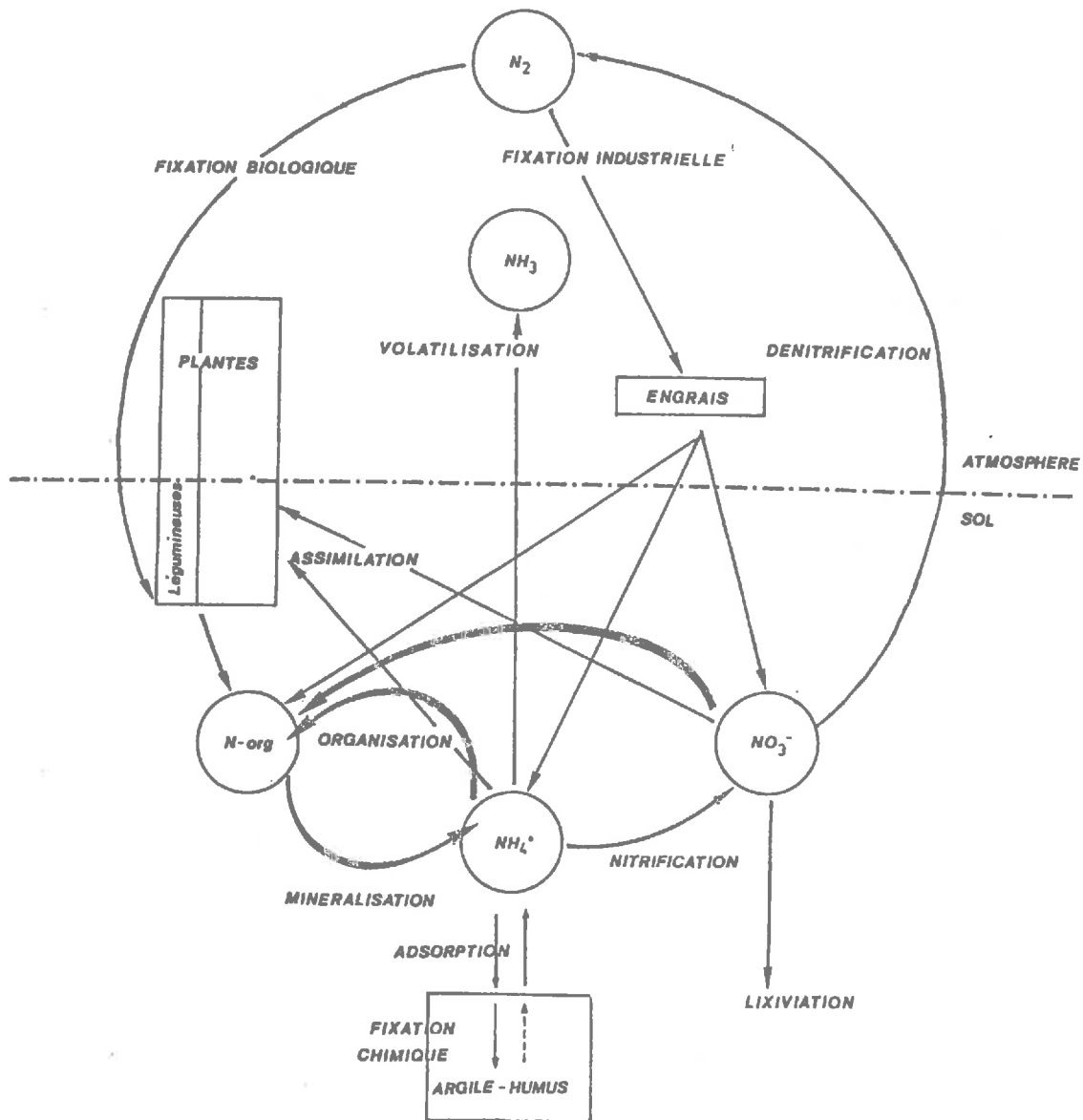


Figure 29 : Cycle de l'azote (d'après FAURIE, 1980)

1 - ASSIMILATION DE L'AZOTE PAR LES MICRO-ORGANISMES

Les micro-organismes récupèrent de l'azote aux dépens d'un nombre varié de composés (protéines, acides aminés, peptides, azote minéral) et leurs capacités d'adaptation au substrat disponible sont grandes (enzymes extracellulaires, systèmes d'absorption) (Payne 1980). Nous nous limiterons ici à la présentation des systèmes impliqués dans l'assimilation de l'ammonium et du nitrate, et la régulation de la fonction d'assimilation en fonction de la disponibilité des sources.

Les formes peuvent être métabolisées dans des réactions énergétiques sans qu'il y ait incorporation d'azote dans la biomasse microbienne : ce sont, par exemple, l'oxydation de l'ammonium lors de la nitrification (réaction exergonique), la réduction dissimilative du nitrate lors de la dénitrification biologique. Les réactions dans lesquelles l'azote est incorporé dans la biomasse sont les réactions assimilatives. Ce sont celles-ci qui aboutissent à l'organisation de l'azote.

Quelle que soit la forme originelle de prélèvement de l'azote, le produit final avant assimilation en acides aminés, protéines et acides nucléiques est l'ammonium.

L'ammonium se situe donc à un carrefour du métabolisme de l'azote :

- produit de la fixation de N_2
- produit de la réduction assimilative des nitrates
- produit directement absorbé
- produit intracellulaire résultant de la désamination d'acides aminés, de l'hydrolyse de l'urée etc...

11. Assimilation de l'ammonium

111 - Absorption de l'ammonium

Très peu d'études ont été faites sur le mécanisme d'entrée de l'ammonium, essentiellement parce qu'il n'y avait pas de méthodes isotopiques adaptées. Des études assez anciennes (Morton et Mac Millan 1953, Mac Millan 1954, Nicholas 1965) semblaient démontrer, pour les hyphes fongiques, une entrée passive par diffusion. Ensuite il a été montré que les bactéries et les champignons étaient capables de retenir l'ammonium de manière intracellulaire à des concentrations supérieures à celles du milieu de culture. L'emploi d'un composé analogue de l'ammonium, le ^{14}C -méthylammonium (CH_3NH_2) absorbé par la cellule mais non assimilé, a permis d'étudier le mécanisme. Un système d'absorption a ainsi été mis en évidence : c'est une perméase, énergie-dépendante (Pateman et al 1974).

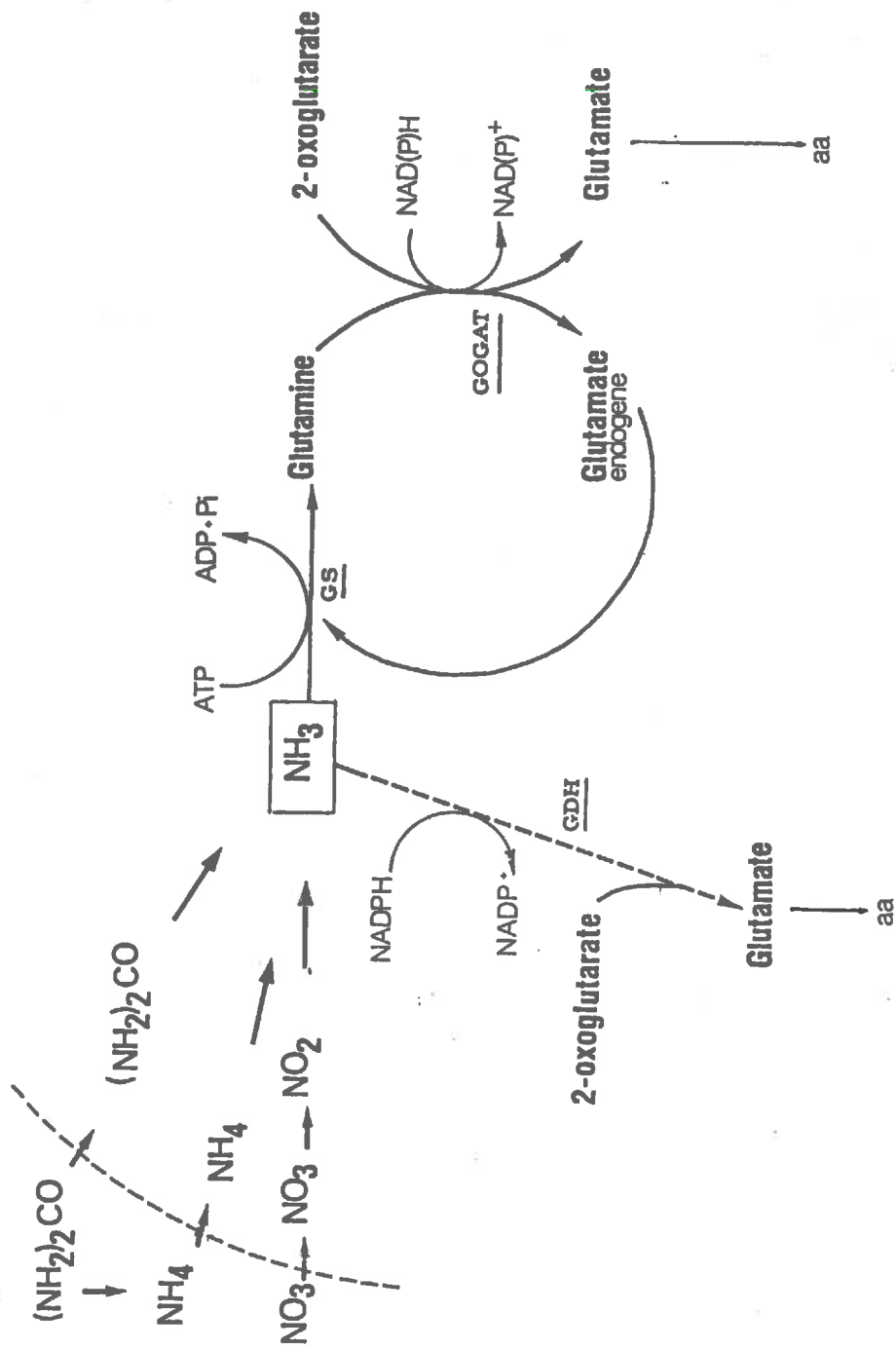


Figure 30 : Assimilation de l'ammonium par la voie GDH et la voie GS/GOGAT

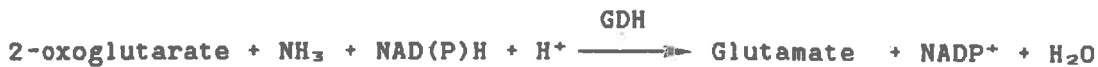
En conditions de substrat limitant, elle peut permettre de concentrer l'ammonium dans les cellules (Segal et al 1970, Pateman et al 1974, Roon et al 1975). La concentration intracellulaire en ammonium régule ce système de prélèvement par répression et dérépression de la synthèse du composé protéique (Brown 1980).

112 - Assimilation de l'ammonium

Il existe deux systèmes enzymatiques impliqués dans l'assimilation de l'ammonium. La première voie est connue depuis longtemps. Elle avait été mise en évidence chez les champignons. C'est la réaction catalysée par l'enzyme Glutamate Dehydrogénase (GDH). La seconde voie a été mise en évidence chez les bactéries dans les années 1970, et progressivement chez tous les micro-organismes étudiés. C'est la réaction catalysée par le système Glutamine Synthetase (GS)-Glutamate Synthase (GOGAT) (schéma 30)

Le système GDH

La première voie est catalysée par la Glutamate déhydrogénase qui convertit un composé intermédiaire, le 2-oxoglutarate en Glutamate, l'ammonium étant le donneur d'azote et NADPH ou NADH étant le donneur d'électrons :



C'est une réaction réversible. La constante d'affinité de l'enzyme (Km) est généralement élevée indiquant une faible affinité de l'enzyme avec son substrat (NH₄). Ce système ne constitue pas un mécanisme efficient pour utiliser l'ammonium à de faibles concentrations.

Le système GDH ne semble pas avoir un rôle uniquement d'assimilation. Par son caractère réversible, il pourrait prendre un rôle catabolique de désamination, afin de prévenir l'accumulation excessive de glutamate dans des conditions où la transamination s'arrête. La plupart des micro-organismes posséderaient ce système, l'enzyme pouvant passer de son rôle anabolique à son rôle catabolique en fonction des concentrations en azote et en carbone (Dalton 1979).

L'absence d'un réel stockage intracellulaire de l'ammonium dans la plupart des cas, a conduit à penser que l'ammonium intracellulaire ne pouvait pas avoir un rôle régulateur prépondérant: le flux d'entrée de l'ammonium dans la cellule serait alors le signal de la répression ou de la dérèpression des systèmes enzymatiques, leur activité étant contrôlée par les produits du métabolisme (glutamine, glutamate) plutôt que par l'ammonium lui-même (Sims et al 1968, Brown et al 1974, Dalton 1979).

Lorsque le milieu extérieur contient de fortes quantités d'ammonium, la synthèse de GS et GOGAT est réprimée tandis que la synthèse de GDH est dérèprimée (Brown 1980). Pour des concentrations limitées en ammonium, le système inverse opère.

Les moyens mis en jeu pour effectuer ce contrôle sont de 3 types: contrôle de la synthèse de l'enzyme (activation par des cations divalents, inhibition en retour par les produits du métabolisme de la glutamine), contrôle de son activité (notamment modification covalente par adénylylation) (Brown et al 1974).

En fait il existe une grande diversité des moyens selon les groupes de micro-organismes. Certains Clostridium ne synthétisent pas de GDH et la synthèse de GS/GOGAT est constitutive. D'autres comme les Streptococcus ne synthétisent pas GOGAT; la croissance à de faibles concentrations en azote provoque la production très importante de GDH (in Brown 1980). C'est le système le plus généralement mis en évidence pour les champignons et les levures chez lesquels la GS ne semble pas jouer un rôle central dans l'assimilation de l'ammonium. Dans ce cas, on observe soit une accumulation intracellulaire d'ammonium (Roon et al 1975a) soit une production de quantités très importantes d'enzyme GDH.

Entre ces cas extrêmes, la plupart des bactéries modulent la synthèse de GS, GOGAT et GDH et leurs activités respectives pour s'adapter à la disponibilité de l'azote dans le milieu de croissance.

La séparation est généralement faite entre bactéries et champignons: le système GS/GOGAT serait prédominant chez les bactéries, alors que ce serait l'enzyme GDH chez les champignons. Cette distinction pourrait être fautive, et ne résulter que d'un manque de connaissances (Brown 1980).

12. Assimilation du nitrate

121 - Absorption du nitrate

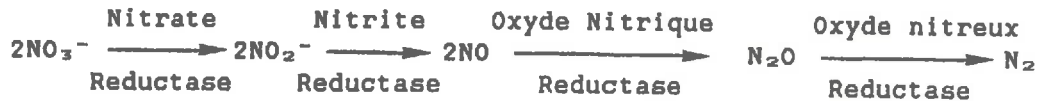
Le processus d'absorption du nitrate est très mal connu. Il semble bien qu'il soit effectué par un transporteur actif, une perméase, ATP-dépendante. Le transporteur est sensible à des inhibiteurs spécifiques, saturable à des concentrations élevées en nitrate et sujet à régulation métabolique (Brownlee et Arst 1983). L'incapacité à détecter du nitrate de manière intracellulaire en

présence d'une nitrate réductase active d'une part, l'indépendance entre valeur de la constante de Michaelis-Menten et activité de la nitrate réductase d'autre part, semblent montrer que ce transport actif est l'étape limitante de l'assimilation du nitrate (Betlach et al 1981).

122 - Réduction du nitrate

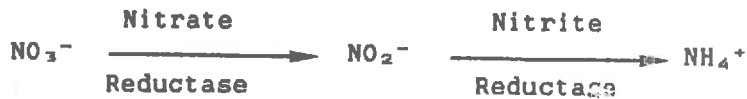
La réduction des nitrates peut être faite par deux mécanismes distincts (Pichinoty 1964), mais un seul aboutit à l'incorporation d'azote dans la cellule.

* Le métabolisme dissimilatif des nitrates est réalisé par des bactéries anaérobies ou anaérobies facultatives pour lesquelles le nitrate sert d'accepteur final d'électrons dans la chaîne respiratoire. Cette fonction est assurée par la nitrate réductase dissimilative (nitrate réductase A) qui réduit NO_3^- en NO_2^- , puis par la nitrite réductase dissimilative qui réduit le NO_2^- :



Réactions de la réduction dissimilative du nitrate

* L'autre voie est assurée par la nitrate réductase (nitrate réductase B) et la nitrite réductase assimilatives, conduisant à la formation de NH_4^+ . Il n'y a pas d'assimilation du nitrate sans oxygène et sans source d'énergie.



Réactions de la réduction assimilative du nitrate

Les études portant sur la nitrate réductase assimilative restent peu nombreuses pour des raisons d'ordre méthodologique : la première raison est la labilité de l'enzyme, la seconde est que la plupart des bactéries qui assimilent le nitrate contiennent simultanément une nitrate réductase dissimilative par laquelle le nitrate est également rapidement converti en nitrite. L'utilisation de mutants $\text{NR}_{(A)}^-$ permet de s'affranchir de ce problème (Koreishi et Hino 1984, Revilla et al 1986).

Peu d'éléments apparaissent clairement pour distinguer chez les micro-organismes les deux types de nitrate réductase:

- * la localisation, la nitrate réductase A (NR_A) étant membranaire et la nitrate réductase B (NR_B) étant dans la fraction soluble cytoplasmique (Dalton 1979, Koreishi et Hino 1984)
- * une sensibilité différente au chlorate, la nitrate réductase dissimilative étant inhibée par le chlorate et la NR assimilative ne l'étant pas. Le chlorate est utilisé pour isoler les bactéries ne contenant pas de NR_A.

Les différences entre les nitrite-réductases assimilative et dissimilative ne sont pas établies.

La nitrate-réductase B est NADPH-dépendante. C'est une enzyme généralement inductible par son substrat, la durée de la phase de latence, correspondant à sa synthèse, étant très variable selon les espèces (Ali et Hipkin 1986). La nitrite-réductase serait NADH-dépendante chez les bactéries mais le donneur d'électrons n'est pas clairement défini.

123 - Régulation de l'assimilation du nitrate

Excepté quelques études ponctuelles (Morton et McMillan 1953, Nicholas 1965), les travaux sur les relations entre l'assimilation de l'ammonium et celle du nitrate sont récents (depuis 1980).

Il a été montré, sur quelques micro-organismes, que lors d'une croissance sur milieu contenant ammonium et nitrate, l'utilisation du nitrate est partiellement ou totalement supprimée tant que l'ammonium est disponible (Ohmori et al 1977, Betlach et al 1981, Ali et Hipkin 1985, Revilla et al 1986). Ali et Hipkin (1986) ont constaté que cette inhibition de l'assimilation du nitrate était cependant variable. Chez Candida nitratophila par exemple, l'assimilation est de 75 % pour NH₄ et de 25 % pour NO₃ (par rapport à un milieu contenant une unique source d'azote), ce qui aboutit à une croissance identique à celle obtenue sur un milieu uniquement ammoniacal.

L'hypothèse d'une répression de l'activité de la nitrate réductase par l'ammonium a été émise (Cove 1966, Cove et Pateman 1969, Dunn-Coleman et Pateman 1977). Celle-ci s'exercerait par un blocage de la synthèse de la nitrate réductase accompagnée d'une dégradation rapide de la protéine déjà formée.

Un consensus se dégage maintenant sur une inhibition de l'absorption du nitrate : en effet Ohmori et al (1977) avaient mis en évidence chez la cyanophycée Anabaena cylindrica une inhibition très rapide de l'assimilation du nitrate (5 min) alors que la

nitrate réductase était potentiellement active. Depuis il a été découvert que le système d'absorption du nitrate était indépendant du système d'assimilation (Dalton 1979, Betlach et al 1981). Cette inhibition de l'absorption du nitrate se jouerait au niveau d'une compétition pour l'ATP entre l'assimilation de l'ammonium et le transport des nitrates (Ohmori et al 1977, Betlach et al 1981, Ali et Hipkin 1986).

124 - Rendement de croissance

L'assimilation du nitrate représente une perte d'énergie substantielle pour la cellule comparée à l'utilisation de l'ammonium: 8 équivalents-réducteurs sont utilisés pour la réduction du nitrate (2 NAD(P)H pour $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$ et 6 NADH pour $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NH}_4^+$). Chez les végétaux supérieurs l'approvisionnement en électrons est assuré respectivement par le NADH et la ferredoxine réduite, ce qui équivaut du point de vue énergétique à 15 ATP (tableau 24, Salsac et al 1987). Chez les bactéries le coût de la réduction du nitrate serait donc supérieur à 15 ATP alors que l'assimilation de l'ammonium par la voie GS-GOGAT nécessite 5 ATP.

REDUCTION NITRATE		ASSIMILATION AMMONIUM
$\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow$	NH_4^+	$\rightarrow \text{Glutamine} \rightarrow 2 \text{ Glutamate}$
	NH_4^+ endogène	
1) Nitrate réductase $\text{NO}_3^- + 2e^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{OH}_2$ Donneur d'électrons : NADH		
2) Nitrite réductase $\text{NO}_2^- + 6e^- + 6\text{H}^+ \rightarrow \text{NH}_4^+ + \text{OH}_2 + 2\text{OH}^-$ Donneur d'électrons : Ferredoxine réduite		
3) Glutamine Synthetase $\text{NH}_4^+ + \text{Glutamate} + \text{ATP} \rightarrow \text{Glutamine} + \text{ADP}$		
4) Glutamate Synthase $\text{Glutamine} + 2e^- + 2\text{H}^+ \rightarrow 2 \text{ glutamate}$ Donneur d'électrons : Ferredoxine réduite		
COUT ENERGETIQUE		
1 NADH = 3 ATP		
2 ferredoxine réduite = 1 NADPH = 4 ATP		
REDUCTION du NITRATE = 15 ATP		
ASSIMILATION DE L'AMMONIUM = 5 ATP		

Coût énergétique de la réduction du nitrate et de l'assimilation de l'ammonium chez les végétaux (Salsac et al 1987)

Sur cette base, le rendement de croissance (N assimilé/ C disponible) obtenu avec une source azotée nitrique devrait logiquement être inférieur à celui obtenu avec de l'ammonium.

Morton et Mac Millan (1953) avaient constaté une assimilation plus lente du nitrate sur Scropulariopsis brevicaulis, mais un rendement final identique entre les deux sources d'azote. Brown et al (1974) ont observé une différence de rendement sur une culture de Pseudomonas.

Bruinenberg (1986) a réalisé des études en chemostat avec mesures de radiorespirométrie (^{14}C -glucose); il met en évidence pour Candida utilis, un rendement supérieur de croissance (^{14}C -biomasse) sur ammonium et un dégagement plus important de $^{14}\text{CO}_2$ sur milieu nitrique, correspondant à un fonctionnement différent des voies biochimiques pour assurer l'approvisionnement de la cellule en NADPH nécessaire à la réduction.

13 - Utilisation de l'urée

Il y a relativement peu d'informations sur le transport de l'urée et sur son utilisation éventuelle par les cellules microbiennes (Payne 1980). Pateman et al (1982) ont étudié celui-ci chez Aspergillus nidulans. Il semble que le transport soit actif, ATP-dépendant, fonction de la concentration et saturable (soit une réponse de type Michaelis-Menten). Le transport est inhibé en présence de glutamine (Sumrada et al 1976, Friedrich et Magasanik 1977). L'urée ne constitue pas une source d'énergie pour la cellule et le transport est bloqué lorsque le carbone est limitant.

L'uréase est une enzyme constitutive, c'est à dire sécrétée sans induction par l'urée, localisée probablement dans le cytoplasme. L'uréase bactérienne a des propriétés physiques et immunologiques différentes de celle de l'enzyme végétale. La production d'uréase est régulée par la glutamine.

La capacité à produire de l'uréase est une fonction très répandue chez les micro-organismes : sur une microflore totale, sélectionnée sur gélose nutritive, 80 % des micro-organismes testés sont producteurs d'uréase (Paulson et Kurtz 1969, Mulvaney et Bremner 1978). Celle-ci est sécrétée de manière extra-cellulaire ou résulte de la lyse des cellules microbiennes ou végétales. Elle peut rester active un certain temps dans la phase aqueuse du sol. Elle est ensuite soit dégradée par les protéases, soit associée à des colloïdes humiques. Dans ce dernier cas elle possède une longue demi-vie et devient résistante à la dénaturation (Zantua et Bremner 1976, Mulvaney et Bremner 1981, O'Toole et Morgan 1984, Boyd et Mortland 1985).

Parce que la production d'uréase ne résulte pas d'une induction en présence d'urée mais d'un co-métabolisme très répandu chez les micro-organismes du sol (Burns 1982), l'activité uréasique d'un sol

est un bon indicateur des fluctuations de la biomasse microbienne de ce sol et elle est souvent utilisée comme tel (Ladd et Paul 1973, Pancholy et Rice 1973, Nannipieri et al 1978, Nannipieri et al 1983).

14. Conclusion

Le facteur essentiel qui détermine le niveau des populations est la disponibilité en substances nutritives. En cas de substrat limité, il s'agit pour un micro-organisme de récupérer ce substrat plus efficacement que les autres.

Nous avons vu que les micro-organismes peuvent :

- induire ou déréprimer la synthèse de mécanismes de prélèvement à forte affinité avec le substrat limitant. Cette affinité va déterminer la compétition avec d'autres micro-organismes ;
- moduler l'utilisation d'un substrat non limitant pour prévenir l'accumulation de métabolites intermédiaires ;

L'assimilation de l'ammonium avec deux systèmes enzymatiques, à faible (GDH) et forte affinité (GS-GOGAT) est un exemple de cette adaptation des organismes. Pour le micro-organisme l'intérêt de conserver les deux voies est clair : pour les organismes croissants en azote ammoniacal non limitant, la voie GDH est énergétiquement moins coûteuse, alors que la voie GS-GOGAT représente un avantage compétitif indéniable en cas de substrat limitant (Tempest et Nijssel 1978).

La cellule s'est donnée un ensemble de systèmes de régulation pour être compétitive : elle adapte l'absorption d'ammonium à ses capacités de protéosynthèse. La recherche d'un moindre coût énergétique d'assimilation est à l'origine du contrôle relativement strict de l'assimilation d'autres formes azotées quand l'ammonium est disponible; l'absence de stockage important d'ammonium ou de nitrate dans la cellule microbienne amène à penser que la régulation s'effectue en amont de l'assimilation, au niveau des mécanismes d'absorption. Très peu de choses sont encore connues à ce sujet, quel que soit la forme d'azote impliquée.

Si théoriquement, l'assimilation plus lente ou moins efficace du nitrate s'explique, elle n'est pas clairement démontrée dans les études physiologiques (excepté le temps de latence nécessaire à l'induction de la nitrate-réductase). Il faut en effet des méthodes très fines pour mettre en évidence un fonctionnement différent des voies biochimiques qui se traduirait par un rendement azote assimilé/C consommé différent (Bruinenberg et al 1986).

2 - FACTEURS DE VARIATION DE L'ORGANISATION MICROBIENNE

Les principaux facteurs qui vont affecter l'organisation dans le sol sont la nature et la quantité de carbone disponible, la quantité et la forme d'azote minéral, les conditions du milieu.

21. Les facteurs du milieu

Il y a peu d'études systématiques des facteurs du milieu sur l'organisation.

La température : on constate que la température d'incubation a une influence sur la vitesse d'organisation mais pas sur les quantités finales organisées (Kai et al 1972, Kubat et al 1981). Par contre, la température a une influence sur la vitesse de reminéralisation. (Mary 1987). Les activités de synthèse sont favorisées aux basses températures et les activités cataboliques aux températures élevées (Jansson 1958). Il n'y a pas d'études systématiques de l'effet des températures basses (0-10°C).

L'humidité : La relation entre humidité du sol et organisation n'a pas été réellement testée. Il paraît certain que les alternances d'humectation et dessiccation ont un effet sur la microflore du sol. Jansson (1958) ne note pas d'effet réel sur l'organisation et (sur la minéralisation) en dehors des situations extrêmes.

Le type de sol : le type de sol peut être caractérisé d'un point de vue microbien par plusieurs variables : respiration des échantillons de sol, biomasse C ou N par la méthode de fumigation au chloroforme (Jenkinson et Powlson 1976), minéralisation de l'azote, minéralisation du carbone et réorganisation d'azote après apport de C (Chaussod et al 1986). Il apparaît que la respiration spécifique (respiration ramenée à l'unité C-biomasse) diminue d'un facteur 2 à 3 lorsque l'on passe des sols légers aux sols lourds. Les sols légers hébergeraient donc une biomasse plus faible mais proportionnellement plus active que celle des sols argileux. L'argile agirait en augmentant la capacité de protection de la matière organique humifiée et des micro-organismes du sol (Ladd et al 1981, van Veen et al 1985, Chaussod et al 1986).

22. Le carbone

L'effet net du cycle de minéralisation - organisation va dépendre de l'énergie disponible pour les micro-organismes hétérotrophes. La nature et la quantité de carbone disponible déterminent de manière très stricte les quantités d'azote organisées (Jansson et Persson 1982, Mary 1987). L'apport de matière

organique décomposable est donc une condition préalable à cette organisation.

Il a été montré que les composés à contenu élevé en cellulose étaient dégradés rapidement alors que la lignine se caractérise par une grande résistance à la biodégradation (Singh et Singh 1987). En conséquence le rapport C/N ne permet pas de caractériser la biodégradabilité d'un résidu.

L'effet de la nature du composé est apprécié de deux façons :

- Le rythme de l'organisation : dans le cas de substrats non azotés comme le glucose ou la cellulose, l'intensité de l'organisation est étroitement corrélée à la quantité de carbone dégradé (mesurée par le CO₂ dégagé par exemple). Le glucose est le composé qui permet l'organisation la plus rapide (maximum de 3 jours quel que soit la quantité apportée) alors que l'organisation maximale au cours de la décomposition de la cellulose nécessite 3-6 semaines.

Dans le cas de résidus contenant à la fois du carbone et de l'azote sous forme de molécules complexes, les différences entre résidus sont notables. Elles peuvent être expliquées par la proportion et la vitesse de décomposition de fractions solubles, hémicelluloses, cellulose et lignine des tissus végétaux (Mary 1987).

- Le rendement de l'organisation : il est nécessaire de considérer séparément les constituants homogènes sans azote, des résidus carbonés contenant N et C.

Les expériences menées en laboratoire ont montré que le glucose induisait une moindre organisation que la cellulose ; l'organisation maximale était respectivement de 61 et 71 mg N par g de C apporté (Ahmad et al 1969).

Il semble que les différents substrats ne sont pas utilisés par les mêmes populations bactériennes, les bactéries utilisant plutôt le glucose et les champignons plutôt la cellulose. La répartition de l'azote et du carbone assimilables peut également jouer sur la compétition entre populations bactériennes et fongiques (Adu et Oades 1978). Dans ce cas, la vitesse de reminéralisation de l'azote peut en être affectée, les populations bactériennes ayant un turnover plus rapide (Klemedtsson et al 1987).

Dans le cas de résidus contenant de l'azote, l'organisation nette de l'azote minéral ne dépend que de manière très grossière du rapport C/N du résidu.

Le début de la décomposition provoque notamment, pour le développement de la microflore hétérotrophe, un prélèvement d'azote minéral du milieu, l'azote du résidu n'étant disponible qu'avec un certain décalage. Un manque d'azote dans le milieu peut alors freiner la décomposition des résidus en ralentissant la croissance de la microflore dégradative.

On sait aussi que l'accessibilité du résidu (contact sol-résidu, taille du résidu...) joue un rôle important dans la dynamique des processus d'organisation. C'est un facteur encore très mal quantifié.

L'intensité de la minéralisation nette de l'azote du résidu dépend également de l'importance du pool d'azote minéral présent lors de la décomposition du résidu. On peut avoir des phénomènes de "substitution" entre l'azote minéral du sol et l'azote provenant du résidu végétal (Mary 1987).

23. L'azote

L'effet des formes d'azote sur l'organisation est souvent mentionné dans la littérature, en se basant en réalité, sur un nombre très restreint d'études réalisées en conditions contrôlées.

Jansson et al (1955) constatent, par un bilan ^{14}N sur un type de sol en incubation au laboratoire, une organisation très faible du nitrate en présence d'ammonium, alors qu'elle est équivalente quand les deux formes sont séparées. Ces différences entre formes ne sont pas retrouvées sur d'autres types de sol testés (en particulier en sol acide) (Jansson 1958).

Ahmad et al (1972) obtiennent pour quatre sols, une organisation un peu plus importante avec l'ammonium comparé à celle obtenue avec du nitrate. Ils concluent donc que, à quantités égales d'azote apporté, les quantités de carbone nécessaires pour assimiler le nitrate sont plus importantes.

Fresneau (1982), Wickramasinghe et al (1985), constatent que le nitrate est peu organisé en absence d'apport de carbone; les quantités organisées pour l'urée et le sulfate d'ammonium sont équivalentes et supérieures à celles du traitement nitrate.

Les causes de cette organisation préférentielle de l'ammonium ne sont pas discutées : les auteurs s'interrogent sur la capacité des populations microbiennes à assimiler le nitrate (Azam et al 1986, Bjarnason 1987).

Il peut y avoir d'autre part une confusion d'effets entre la capacité potentielle des micro-organismes à assimiler telle ou telle forme, et les effets indirects des formes d'azote sur la sélection des populations. Par exemple, les modifications du pH du sol rhizosphérique, résultant d'une nutrition ammoniacale ou nitrique de la plante, peuvent être très importantes (Marschner et Römheld 1983, Marschner et al 1986).

Enfin une différence de "rendement" de l'organisation entre ammonium et nitrate, sa quantification et les conséquences sur la dynamique de l'azote au cours d'une expérimentation, ne sont pas clairement établis.

CHAPITRE II
DEMARCHE D'ETUDE ET METHODOLOGIES

DEMARCHE D'ETUDE ET METHODOLOGIES EMPLOYEES

1 - OBJECTIFS

Les résultats obtenus au champ nous ont permis de confirmer l'hypothèse de l'importance de l'organisation microbienne, celle-ci permettant une meilleure compréhension des variations de l'utilisation de l'engrais par la plante et expliquant partiellement les différences d'utilisation des formes uréique, ammoniacale et nitrique.

Nous avons en effet observé des cinétiques différentes d'organisation propres à chaque forme avec une différence très marquée entre l'ammonium et le nitrate, à la fois au niveau du rythme et de l'intensité de l'organisation, et ceci dans les étapes précoces où ammonium et nitrate sont en quantités importantes. Cependant dans un système complexe comme le sol cultivé, plusieurs processus opèrent simultanément.

Pour caractériser l'organisation respective des formes ammoniacale et nitrique, en mesurer la variabilité et le caractère généralisable il était nécessaire de séparer l'organisation des autres processus.

Une première étape a donc été de mener des incubations de sol en conditions contrôlées.

Les sols des 4 essais au champ ont été repris dans des incubations, en conditions contrôlées de température et d'humidité, et en absence de plante. Le choix d'un pas de temps court (mesures journalières sur 6 à 8 jours) et d'une température relativement basse (10°C) a permis de négliger les processus de reminéralisation. Nous avons pu, grâce au ^{15}N , suivre l'organisation brute des formes sulfate d'ammonium, nitrate de potassium, urée, nitrate d'ammonium (marqué sur l'une ou l'autre des formes). Le glucose a été choisi comme substrat carboné "modèle", en raison de sa capacité d'utilisation par un grand nombre de micro-organismes.

La mise en évidence de différences systématiques de l'organisation entre ammonium et nitrate nous a conduit à une étude microbiologique.

Les études bibliographiques nous ont permis de dégager quelques points nets concernant l'assimilation de l'azote par les micro-organismes :

- le "carrefour" de l'assimilation que représente l'ammonium quelque soit le substrat azoté à l'origine ;
- l'économie que constitue l'assimilation de l'ammonium par rapport à celle du nitrate et de l'urée par exemple ;
- les moyens que se donne la cellule pour gérer son métabolisme assimilatif.

Ces connaissances reposent sur quelques micro-organismes bien étudiés au laboratoire (bactéries E. Coli, Klebsiella, Rhizobium, Azobacter; Champignon : Aspergillus ; algues Chlorella....). Peu d'études ont dégagé les lois communes à ces organismes et les conséquences au niveau de l'écologie des micro-organismes dans les milieux naturels (Tempest et Neijssel 1978, Dalton 1979).

En effet il n'est pas clairement démontré, à notre échelle de travail (le sol et les populations microbiennes) si ce sont des micro-organismes différents qui assimilent ammonium et nitrate (micro-organismes dont les proportions seraient variables) ou si individuellement chaque micro-organisme du sol régule ses fonctions d'assimilation.

Nous nous proposons, par les études conduites, de vérifier si le fonctionnement physiologique mis en évidence au niveau de quelques organismes (cf bibliographie) peut être généralisé à l'ensemble des micro-organismes du sol.

Nous avons le choix entre deux stratégies :

- étudier un micro-organisme "représentatif" de l'organisation du sol, avec les problèmes de choix que cela suppose (quels critères ?). Le risque encouru était une spécialisation des recherches sur un micro-organisme, proche du type d'expérimentations déjà décrites.

- tester un grand nombre de micro-organismes isolés du sol. Cela suppose une moins bonne connaissance de chaque organisme cultivé, avec les problèmes méthodologiques qui en découlent.

Pour nous éloigner le moins possible de nos préoccupations et des réponses que nous avons à obtenir, cette dernière stratégie a été choisie. Cependant seules les bactéries ont été conservées après isolement, l'étude simultanée des champignons n'étant pas réalisable d'un point de vue matériel.

2 - INCUBATIONS DE SOL NU AVEC DIFFERENTES FORMES D'AZOTE

Ces expériences ont consisté à incuber les quatre sols, correspondant aux quatre essais de plein champ, avec différentes formes d'azote : urée, sulfate d'ammonium, nitrate de potassium, nitrate d'ammonium, marqués avec l'azote 15.

La température est contrôlée (20°C ou 10°C) ainsi que l'humidité (qui correspond à pP 2.7 soit - 50 KPa). Les facteurs de variation sont la forme d'apport de l'azote et la présence ou non d'un substrat carboné additionnel, le glucose, et le type de sol.

21. Systèmes expérimentaux

211 - Préparation des sols

Les expériences sont réalisées avec des sols prélevés au champ plusieurs semaines avant l'expérience, tamisés à l'état frais à 2 mm puis conservés à 4°C. Ils sont ensuite pré-incubés une semaine à la température de l'expérience. L'humidité est ajustée relativement près de l'humidité choisie pour l'expérience afin de créer le moins de perturbations possibles.

212 - Système d'incubation sans piégeage du CO₂

Les incubations sont menées en flacon "plasma" de 200 ml contenant l'équivalent de 16,6 g de terre sèche. Le maintien de l'humidité est assuré par la fermeture du flacon avec un feuillet plastique autorisant les échanges gazeux. L'humidité est vérifiée en début et en fin d'expérimentation par pesée. Il n'y a pas de variations d'humidité sur le pas de temps considéré (figure 30).

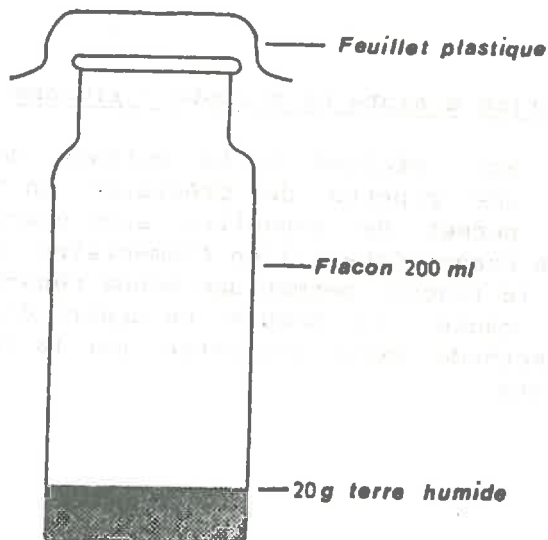


Figure 30 :

Système d'incubation de sol

213 - Système d'incubation avec piégeage du CO₂

Les échantillons de terre sont répartis dans des béciers de 100ml, eux-mêmes disposés dans des bocaux de 500ml (type Familia Wiss). On place également dans chaque bocal un bécier de 50 ml contenant 10 ml de soude NaOH (0,25 N) qui va piéger le CO₂ dégagé, et un flacon contenant de l'eau qui assure le maintien de l'humidité de l'air. Les bocaux sont hermétiquement fermés (figure 31). Ils sont aérés tous les jours et la soude est changée. Sur une série de bocaux, la soude est soigneusement pesée en vue du dosage du CO₂ dégagé.

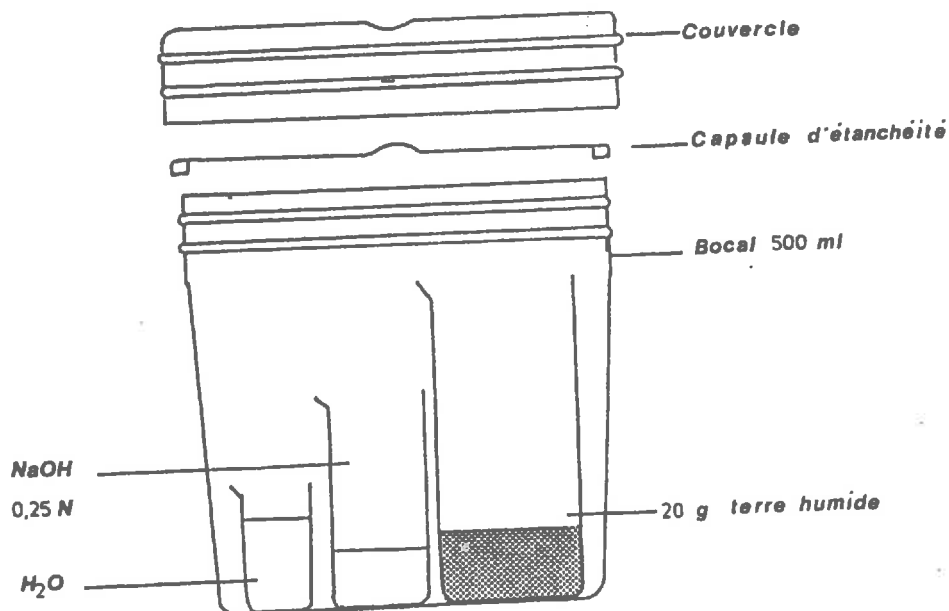


Figure 31 : Incubation de sol avec piégeage du CO₂

214 - Apport de la solution d'azote ou d'azote + glucose

L'apport de solution est réalisé à la surface de chaque échantillon de terre avec une pipette de précision en "goutte à goutte". Ce mode d'apport permet de connaître avec exactitude la quantité d'azote apportée à chaque échantillon élémentaire. La faible épaisseur de la terre dans le flacon, permet une bonne répartition de l'azote. En tout état de cause, il simule un apport d'azote. La standardisation de cette méthode sera confortée par la très bonne reproductibilité des résultats.

22. Méthodes analytiques

221 - Extraction de l'azote minéral

L'extraction de l'azote minéral se fait par le KCl (1M), directement dans le flacon plasma ou après transfert de l'échantillon et rinçage dans le cas du système avec bécher. L'apport de KCl est réalisé avant la décongélation totale de l'échantillon.

L'extraction directe dans le flacon plasma a beaucoup d'avantages. Elle permet un traitement très rapide et sans aucune perte possible d'azote ou de terre. Elle nécessite un transvasement dans le tube de centrifugation.

L'incubation en bécher nécessite un transfert avant extraction, dans le tube de centrifugation, en prenant soin alors de rincer le bécher soigneusement avec le KCl.

L'extraction est réalisée dans un rapport 20 g sol pour 80 g de KCl. L'agitation est de 30 minutes et la centrifugation s'effectue à 3000 tours/minute pendant 15 minutes. Le surnageant est récupéré. Une seconde extraction a lieu (80 g de KCl, agitation pendant 1/4 heure, centrifugation) et le second extrait est ajouté au premier. Une troisième extraction est réalisée dans les mêmes conditions, et l'extrait obtenu est éliminé.

222 - Dosage de l'azote minéral

L'azote contenu dans les extraits KCl est dosé par colorimétrie :

- pour l'urée : selon la méthode colorimétrique de Mulvaney et Bremner (1979) modifiée (annexe p.186) ;
- pour l'ammonium : par la méthode à l'indophénol (Verdow 1977) ;
- pour le nitrate : après réduction en nitrite par le cadmium et dosage du nitrite par le réactif de Griess Ilosvay (Henriksen et Selmer-Olsen 1970).

223 - Dosage de l'azote organique

Les culots de terre, débarrassés de traces d'azote minéral sont séchés à 60°C pendant 24 heures et broyés finement au mortier en vue du dosage à l'analyseur d'azote. Le dosage se fait par une combustion sèche de type Dumas. La procédure a été décrite, partie I page 37.

224 - Mesures isotopiques

Les analyses isotopiques ont été réalisées au temps 0 et à la fin de l'incubation sur l'azote minéral après distillation (Bremner 1965a). Les analyses ^{15}N organique ont été réalisées à tous les prélèvements, simultanément aux analyses d'azote grâce au couplage du spectromètre de masse avec l'analyseur d'azote (page 36).

225 - Minéralisation du Glucose

Nous n'avons pas fait de mesure directe de la disparition du glucose; nous nous sommes référés à la littérature dans ce domaine. Il est apparu en particulier illusoire de suivre la consommation de glucose par un dosage de celui-ci dans le milieu. VanVeen et al (1985), Coody et al (1986) ont montré que le glucose disparaissait en quelques heures (90% en 12h) alors que le dégagement de CO_2 avait à peine commencé. Ils ont émis l'hypothèse soit qu'il se formait rapidement un dimère du glucose (peut-être le maltose), soit que le glucose était absorbé par les micro-organismes avant d'être métabolisé. La mesure de la minéralisation du glucose (par dégagement de CO_2) reste alors une mesure indirecte mais sensible de son assimilation.

Le CO_2 dégagé par la respiration et piégé dans NaOH (0,25N). A chaque mesure la soude est récupérée et les carbonates sont précipités par BaCl_2 . La soude résiduelle est titrée en retour par HCl 0,25N par autotitrateur jusqu'à pH 8,62 (Mary 1979). Le bocal est aéré 10 minutes avant l'introduction d'un nouveau bécher contenant de la soude.

23. Protocoles

231 - Nitrification et organisation de l'azote apporté à un limon (sol de Mons)

L'incubation est réalisée à 20°C . Les échantillons (contenant 19,2 g de terre à une humidité de 15,5 %) sont ajustés à une humidité de 20% (TS) par l'apport de 750 μl d'une solution contenant soit :

- * du sulfate d'ammonium (Excès isotopique 4.701 %)
- * du nitrate d'ammonium (Excès isotopique 4.562 %)

de façon à apporter l'équivalent de 100 mg N.kg⁻¹ sol sec.

Les mesures sont faites immédiatement (t_0), après 6 heures (t_1), puis 24 heures, 2j, 3j, 4j, 6j, 8j, et 15j (t_8) avec 3 répétitions par traitement et par prélèvement. Les échantillons sont immédiatement congelés et conservés à -18°C jusqu'à l'analyse.

232 - Cinétique de nitrification et d'organisation de l'azote avec apport de carbone (sol de limon - Mons)

L'incubation est réalisée à 10°C . Les échantillons contenant 19 g de terre à une humidité de 14,5 % reçoivent 900 μl de solution de façon à ajuster l'humidité à 20% (TS) et à apporter simultanément le carbone (500 mg.kg^{-1} de C-glucose) et l'azote. Pour cela, la solution de glucose est préparée puis scindée en cinq parts afin de recevoir les cinq traitements azotés. Les apports d'azote sont réalisés à raison de :

- (1) - 50 mg N.kg^{-1} sol de $(^{15}\text{NH}_2)_2\text{CO}$ (*U : excès isotopique 29.47 %)
- (2) - 50 mg N.kg^{-1} sol de $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (*AS : excès isotopique 29.84%)
- (3) - 50 mg N.kg^{-1} sol de $(^{15}\text{KNO}_3)$ (*KN : excès isotopique 28.71 %)
- (4) - 100 mg N.kg^{-1} sol de $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$ (A*N : excès isotopique 30.15 %)
- (5) - 100 mg N.kg sol de $^{15}\text{NH}_4\text{NO}_3$ (*AN : excès isotopique 31.41%)

Les prélèvements sont réalisés à 12 heures puis 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 8 jours. Pour chaque traitement, 2 flacons sont sacrifiés à chaque mesure. Des traitements témoins (sans glucose et sans azote) sont prévus. Les échantillons sont immédiatement congelés et conservés à -18°C jusqu'à l'analyse.

233 - Cinétique de nitrification et d'organisation de l'azote apporté sur trois sols

Les sols : il s'agit des 3 sols (provenant de la couche superficielles (0-10 cm) des expérimentations de terrain de 1987 (tableau 4, page 20).

- 1 sol calcaire limoneux (Livry Louvercy, Marne)
- 1 limon de type hydromorphe (Etrepilly, Aisne)
- 1 argile sableuse (Bourguignon, Aisne)

Pour chaque sol, les échantillons de terre humide (correspondant à 16,6 g de terre sèche) reçoivent une solution contenant soit du glucose (500 mg C.kg^{-1} terre) et de l'azote (50 mg N.kg^{-1} terre), soit de l'azote seul (50 mg N.kg^{-1}).

Les formes d'azote apportées sont :

- le sulfate d'ammonium ¹⁵AS (excès isotopique 5.16 ‰)
- le nitrate de potassium ¹⁵KN (excès isotopique 47.42 ‰)

Un traitement témoin (T) sans azote et sans glucose est également prévu. Il en résulte 5 traitements différents pour chaque sol (T, AS, KN, G-AS et G-KN).

L'humidité est ajustée à pF 2,7 soit respectivement une humidité de 21,4 ‰ pour le sol de Bourguignon, 18,8 ‰ pour le sol d'Etrepilly et 25,8 ‰ pour le sol de Livry. La température d'incubation est de 10°C.

Le nombre d'échantillons mis à incuber est de 168 : 30 sont congelés après 2 mn de contact entre le sol et la solution (temps 0) ; 30 d'entre eux sont utilisés pour le dosage du CO₂ dégagé. Tous les bocalux reçoivent néanmoins un bécher contenant de la soude.

Les mesures sont réalisées à 0h, 12h, 24h, 2j., 4j. et 6j. pour les traitements ayant reçu du glucose; à 0h, 2j. et 6j. pour les échantillons ayant reçu seulement de l'azote et pour les témoins. A chaque date de prélèvement, les échantillons sont congelés dans l'azote liquide et conservés à -18°C jusqu'au moment de l'analyse .

3 - ETUDE DE LA CROISSANCE DES MICRO-ORGANISMES DU SOL EN CULTURE PURE

31. Isolement

A partir de sol fraîchement prélevé (limon de Mons-en-Chaussée), des suspensions-dilutions sont réalisées et ensemencées sur milieu solide : gélose nutritive (23 g.l^{-1}) et gélose à l'extrait de terre (Pochon et Tardieux, 1962). Les colonies apparues sont isolées par repiquages successifs et conservées sur tube de gélose inclinée à 4°C .

32. Identification partielle des souches

Les micro-organismes isolés ont été caractérisés par leur coloration de Gram, leur mobilité, leur type respiratoire (tube Gélose VF Institut Pasteur) et leur morphologie.

Un certain nombre de bactéries ont été testées par leurs fonctions enzymatiques grâce au système d'identification "galeries API", pour entérobactéries (API 20E) et non entérobactéries (API 20NE). Les champignons isolés n'ont pas été conservés ni identifiés.

33. Test de croissance sur milieu solide

Les colonies isolées sur gélose nutritive ont été repiquées sur un milieu solide en boîte de Pétri, contenant soit de l'azote ammoniacal, soit du nitrate. La composition du milieu est la suivante:

KH_2PO_4 : $1,2 \text{ g.l}^{-1}$

Na_2HPO_4 : $2,0 \text{ g.l}^{-1}$

NaH_2PO_4 : $2,0 \text{ g.l}^{-1}$

MgSO_4 : $0,2 \text{ g.l}^{-1}$

CaCl_2 : $0,01 \text{ g.l}^{-1}$

solution d'oligo-éléments : 2 mg.l^{-1} (composition, annexe p.187)

Glucose : $10,0 \text{ g.l}^{-1}$ (4 g.l^{-1} de Carbone)

Azote : $0,17 \text{ g.l}^{-1}$

soit $0,8 \text{ g.l}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
 $0,6 \text{ g.l}^{-1}$ de KNO_3

Agar : 15 g.l^{-1}

Les boîtes ensemencées sont mises en incubation à 28°C ; les lectures sont faites à 2, 5 et 8 jours. La croissance est notée en fonction de la rapidité et de l'importance des colonies (0, +, ++, +++).

34. Croissance sur milieu liquide

341 - Composition du milieu de culture

KH_2PO_4 : 1,2 g.l ⁻¹	}	SOLUTION A
Na_2HPO_4 : 2,0 g.l ⁻¹		
NaH_2PO_4 : 2,0 g.l ⁻¹		
MgSO_4 : 0,2 g.l ⁻¹	}	SOLUTION B
CaCl_2 : 0,01 g.l ⁻¹		
Glucose : 4 g.l ⁻¹ ou 2 g.l ⁻¹		
(soit 1,6 et 0,8 g C.l ⁻¹)		

solution de vitamines *	1 ml.l ⁻¹	}	SOLUTION C
solution d'oligo-éléments*	1 ml.l ⁻¹		
solution de citrate ferrique*	1 ml.l ⁻¹		
biotine	10 mg.l ⁻¹		
acide panthothénique	10 mg.l ⁻¹		
azote : 0,042 g.l ⁻¹ sous forme de	(NH_4) ₂ SO_4 KNO_3 NH_4NO_3		

* Composition des solutions en annexe.

Les solutions sont autoclavées séparément à 115°C pendant 20 minutes. Elles sont ensuite mélangées stérilement et réparties en erlenmeyers (150 ml) ou en tubes de verre.

342 - Culture des micro-organismes

* Test de croissance

Les colonies isolées sont repiquées en milieu liquide. La croissance est notée positive si un trouble apparaît dans le tube.

* Suivi de la croissance

Les micro-organismes sont cultivés sur milieu contenant du nitrate d'ammonium, avec plusieurs repiquages successifs. Au temps 0 de l'incubation, les erlenmeyers contenant 50 ml de milieu de culture sont inoculés avec 0,5 ml de la pré-culture. La croissance est réalisée dans un milieu contenant comme unique source d'azote soit du sulfate d'ammonium, soit du nitrate de potassium, soit du nitrate d'ammonium. L'incubation est conduite à l'obscurité, à 28°C, avec une agitation permanente des cultures permettant d'assurer une bonne oxygénation.

Les prélèvements sont effectués stérilement, à raison de 3 ml de culture. L'aliquote prélevée subit immédiatement une mesure de turbidité par densité optique au spectrophotomètre (longueur d'onde 580 nm) et une mesure de pH.

L'échantillon est ensuite centrifugé (1200 tours/minute pendant 3 minutes). Le surnageant est soit dosé immédiatement soit congelé et conservé à - 18°C en vue de dosages ultérieurs.

En fin d'expérimentation l'absence de contamination est vérifiée par étalement sur gélose nutritive.

343 - Dosages

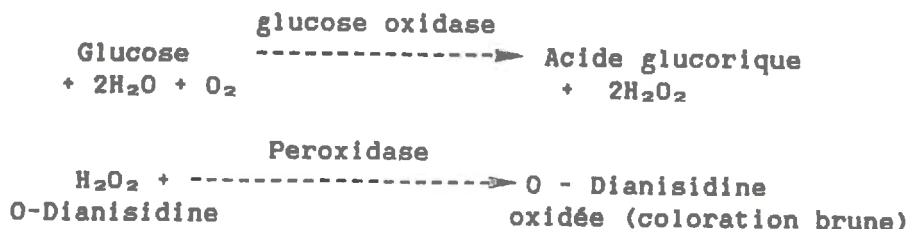
La disparition de l'ammonium, du nitrate et du glucose est suivie soit par dosages colorimétriques, soit en chromatographie ionique (mesures effectuées par le service central d'Analyses de CNRS de Solaize 69390 Vernaison).

En colorimétrie :

- l'ammonium : est dosé par méthode manuelle à l'indophénol (Dorich et Nelson 1983) ou automatisée en flux segmenté (Verdow 1977)

- le nitrate : est dosé après réduction du nitrate en nitrite par le cadmium et dosage du nitrite par la réaction de Griess Ilosvay (Henriksen et Selmer Olsen 1977)

- le glucose : est dosé par une méthode enzymatique à la Glucose oxydase (Raabo et Terkildsen 1960)



L'intensité de la coloration brune est mesurée au spectrophotomètre à 450nm.

La procédure est standardisée selon la méthode proposée par SIGMA (Sigma diagnostics, procédure n° 510).

CHAPITRE III

RESULTATS

RESULTATS

1 - ORGANISATION DE L'UREE, DE L'AMMONIUM ET DU NITRATE EN CONDITIONS CONTROLEES

11. Organisation de différentes formes d'azote dans un sol de limon (Mons)

111 - Expérience préliminaire : organisation en sol nu

Nitrification de l'azote ammoniacal : on constate que la nitrification est complète en 8 jours. Elle est quasiment linéaire entre l'apport et le jour 6 avec une vitesse de $15 \text{ mg N.kg}^{-1}.\text{jour}^{-1}$ (figure 32).

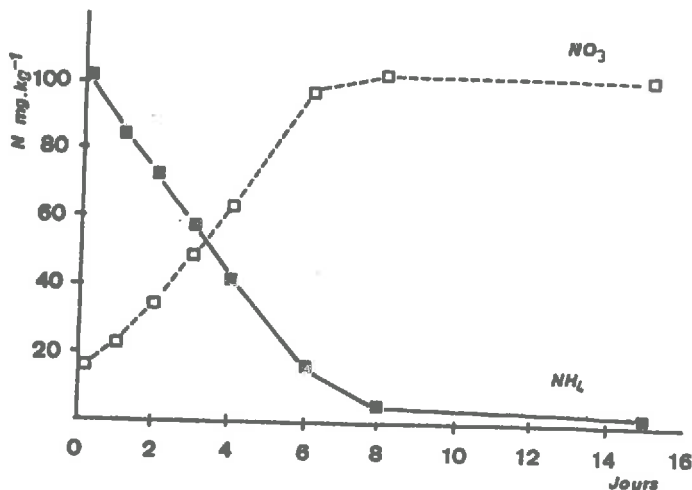


Figure 32 : Nitrification de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ apporté en sol de limon 100 mg.kg^{-1} terre, 20°C

Organisation de l'azote : Le marquage de la "matière organique" du sol obtenu au temps 0 est nul dans le cas du nitrate, et équivalent à $1,2 \text{ mg N.kg}^{-1}$ d'azote pour l'apport d'ammonium. Cela indique que l'élimination de l'azote minéral libre échangeable est pratiquement totale, et que ces $1,2 \text{ mg.kg}^{-1}$ N correspondent probablement à la fixation de l'ammonium sur les feuillets argileux (rétrogradation).

L'organisation sensu stricto démarre après 6 heures d'incubation. Elle atteint un maximum vers 6 jours, lorsque la nitrification est quasi complète. L'organisation est très différente selon la forme d'azote : 0,5 et 3,8 mg N.kg⁻¹ sol pour le ¹⁵NO₃ et le ¹⁵NH₄ respectivement. On n'observe aucune évolution du ¹⁵N organique au delà de 6 jours, quelle que soit la forme d'azote.

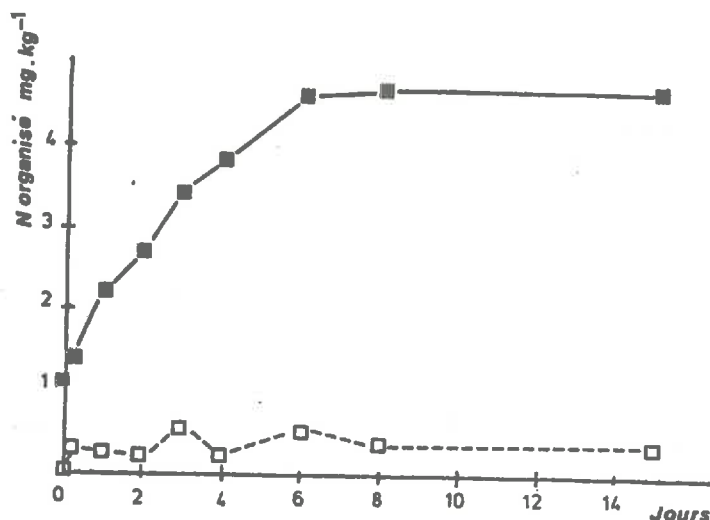


Figure 33 : Organisation de (¹⁵NH₄)₂SO₄ et K¹⁵NO₃ 100 mg N.kg⁻¹, sol de limon, 20°C

112 - Organisation en présence de carbone (glucose)

1121 - En présence d'une seule forme d'azote : traitements *U, *AS et *KN

Les cinétiques d'organisation sont présentées à la figure 34, et au tableau 24.

Nous constatons un bref temps de latence, suivi d'une organisation très rapide dont l'intensité est maximale entre le jour 1 et le jour 2. Pour tous les traitements, 72 - 73 % de l'azote est organisé entre 12 h et 3 jours.

Des quantités similaires d'azote "organisé" sont mesurées à 12 h pour les traitements *U et *AS : 1 à 1,3 ppm d'azote. Il est très probable qu'il s'agisse d'une rétrogradation d'azote ammoniacal, puisque nous avons obtenu la même quantité "organisée" au temps 0 dans l'expérience précédente.

L'hydrolyse de l'urée n'a pas eu d'effet sur les quantités organisées, par contre l'organisation et la nitrification sont un peu plus rapides que pour la forme ammoniacale. L'organisation pour le traitement KN démarre nettement plus lentement mais se poursuit rapidement au cours du troisième jour. En fin d'incubation (à 8 jours), les quantités organisées aux dépens des trois formes sont pratiquement similaires et atteignent en moyenne 28,5 mg N.kg⁻¹ sol.

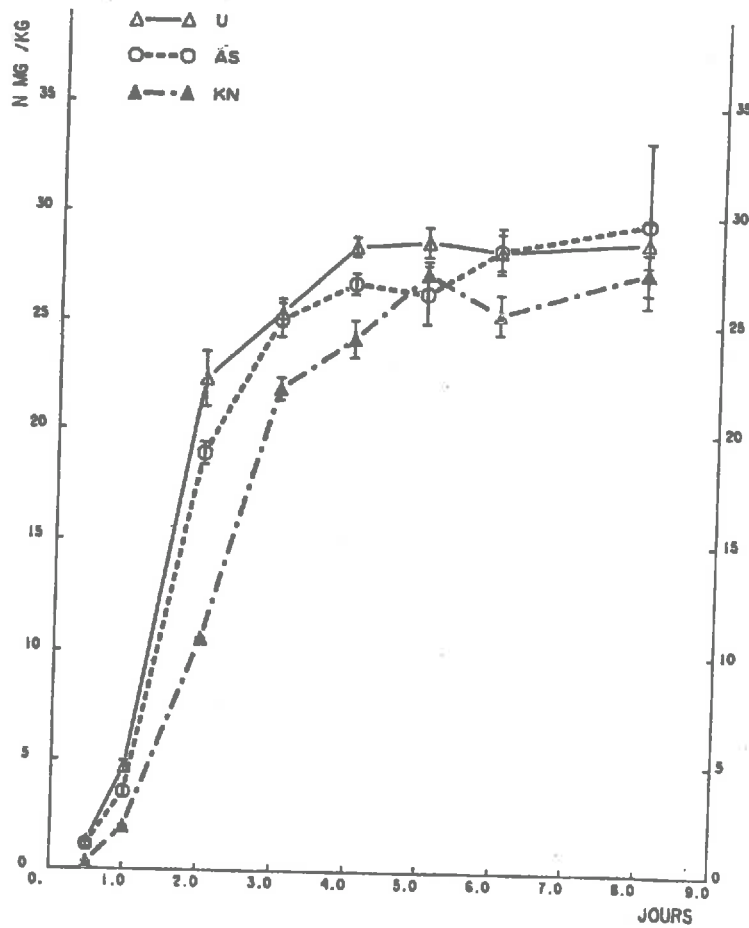


Figure 34: Organisation de l'azote après un apport de $(^{15}\text{NH}_2)_2\text{CO}$ (U), $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (AS), K^{15}NO_3 (KN) 50 mg N.kg^{-1} et 500 mg C.kg^{-1} terre, limon MONS, 10°C .

Temps	U	AS	KN	*AN	A*N	*A+*N
0-12 h	1.2	1.0	0.3	1.3	0.1	1.4
12-24 h	3.5	2.4	1.6	2.6	0.3	2.9
1-2j	17.6	15.4	8.6	14.2	1.5	15.6
2-3j	3.0	6.2	11.4	4.9	0.6	5.5
3-4j	3.1	1.7	2.3	1.7	0.5	2.2
4-5j	0.2	-0.4	3.0	2.1	0.2	2.3
5-6j	-0.4	2.0	-1.8	0.3	-0.2	0.3
6-8j	+0.5	1.3	2.0	-0.1	0.3	0.2
Q. maximale cumulée	28.7	29.5	27.3	27.0	3.3	30.3

Tableau 24: Quantités d'azote organisé (mg N.kg^{-1} terre) pour les traitements U, AS, KN (50 mg N.kg^{-1}), A*N et *AN (100 mg N.kg^{-1}), sur sol limoneux (Mons). Incubation à 10°C avec 500 mg C.kg^{-1} terre

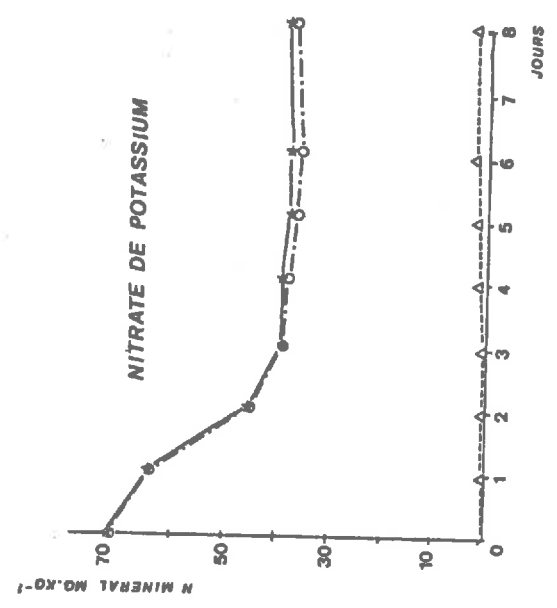
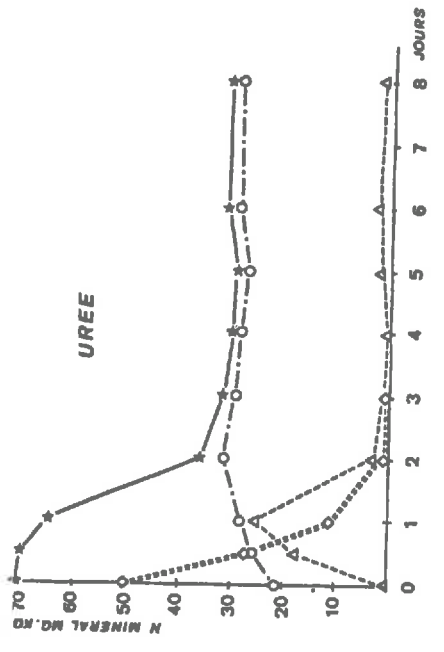
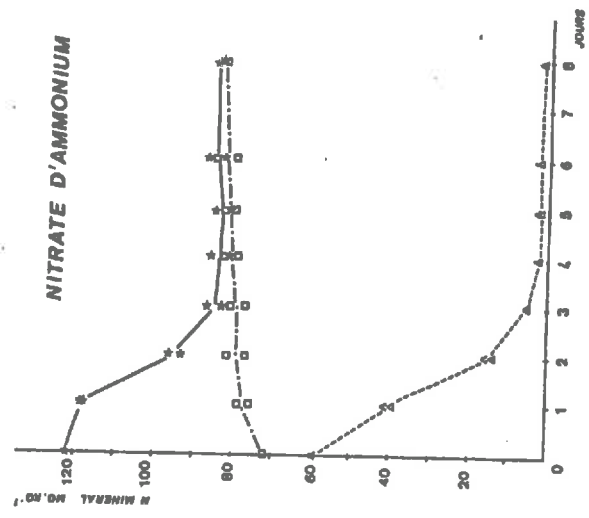
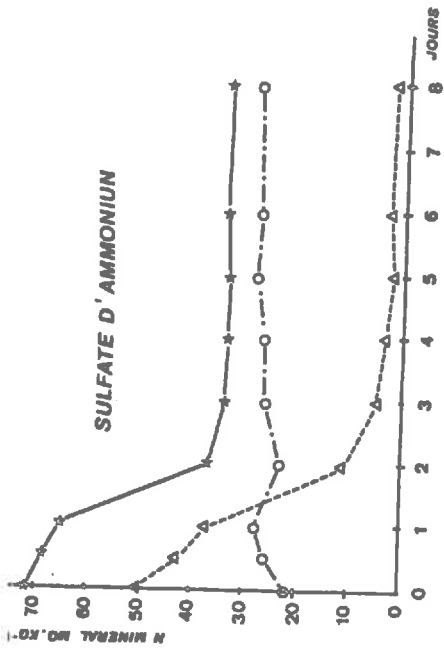


Figure 35 : Evolution de l'azote minéral après un apport de
 - 50 mg N.kg⁻¹ sous forme urée, sulfate d'ammonium, nitrate de potassium
 - 100 mg N.kg⁻¹ de nitrate d'ammonium en présence de 500 mg C-glucose kg⁻¹ terre
 Incubation à 10°C en sol de limon (Mons)
 ◇=◇ urée, △=△ NH₄, ○=○ NO₃, *-* Nmin total

A cette date, la diminution d'azote minéral est respectivement de 39 mg N.kg⁻¹ (U), 39,4 mg N.kg⁻¹ (AS) et 28,0 mg N.kg⁻¹ (KN). Nous constatons (tableau 25) que le bilan ¹⁴N n'est pas totalement expliqué par les quantités d'azote organisées pour les traitements U et AS. Pour ces traitements, il subsiste une différence de l'ordre de 10 mg N.kg⁻¹ d'azote (20 % de l'apport d'azote), qui correspond très probablement à des pertes gazeuses.

L'étude, date par date, des variations du pool N minéral montrent que ces pertes ont eu lieu pratiquement exclusivement entre le jour 1 et le jour 2, le recouvrement de l'azote minéral (natif + apporté) étant complet à la date t = 12 heures.

En utilisant les mesures d'azote minéral (¹⁴N) il est possible d'estimer les répartitions suivantes de l'azote apporté au jour 2 :

* Pour le traitement U : 6 % sous forme NH₄, 22,5 % nitrifiés, 46,4 % organisés, 21,4 % perdus par volatilisation (total 96,3 %).

* Pour le traitement AS : 22,1 % sous forme NH₄, 11,4 % nitrifiés (NO₃), 39,2 % organisés, 20,8 % perdus par volatilisation (total 93,5 %).

mg N.kg ⁻¹ terre	U	AS	KN	*AN	A*N	*A+*N
Δ N (1) organique	28.7	29.5	27.3	27.0	3.3	30.3
Δ N (2) minéral	-39.0	-39.4	-28.9	-32.3	-32.8	-32.6
Bilan (1)+(2)	-10.3	-9.9	-1.6	-	-	-2.3

Tableau 25: Bilan effectué à la fin de l'incubation sur les compartiments N organique (mesuré avec ¹⁵N) et N minéral (mesuré avec ¹⁴N) pour les traitements U, AS, KN (50 mg N et 500 mg C.kg⁻¹), *AN et A*N (100 mg N et 500 mg C.kg⁻¹ terre) .

1122 - En présence de 2 formes d'azote : traitements ^{15}AN et A^{15}N

Dans le cas du traitement nitrate d'ammonium, les micro-organismes ont le choix entre les deux formes d'azote, le nitrate étant en quantités supérieures (22 mg N.kg⁻¹ de nitrate natif en plus de l'apport). Nous constatons alors une très faible organisation du nitrate (3 mg.kg⁻¹) qui intervient entre les jours 1 et 2, et une organisation de l'ammonium très proche de celle observée pour le traitement AS, à la fois au niveau du rythme et des quantités finales organisées. Les quantités organisées à la fin de l'incubation pour ^{15}AN + A^{15}N sont de 30 mg N.kg⁻¹, et non significativement différentes de celle des traitements U, AS et KN.

La diminution de l'azote minéral est presque totalement expliquée par les quantités d'azote organisées (^{15}AN + A^{15}N), puisque le défaut de bilan n'est que de - 2,5 mg N.kg⁻¹ sol.

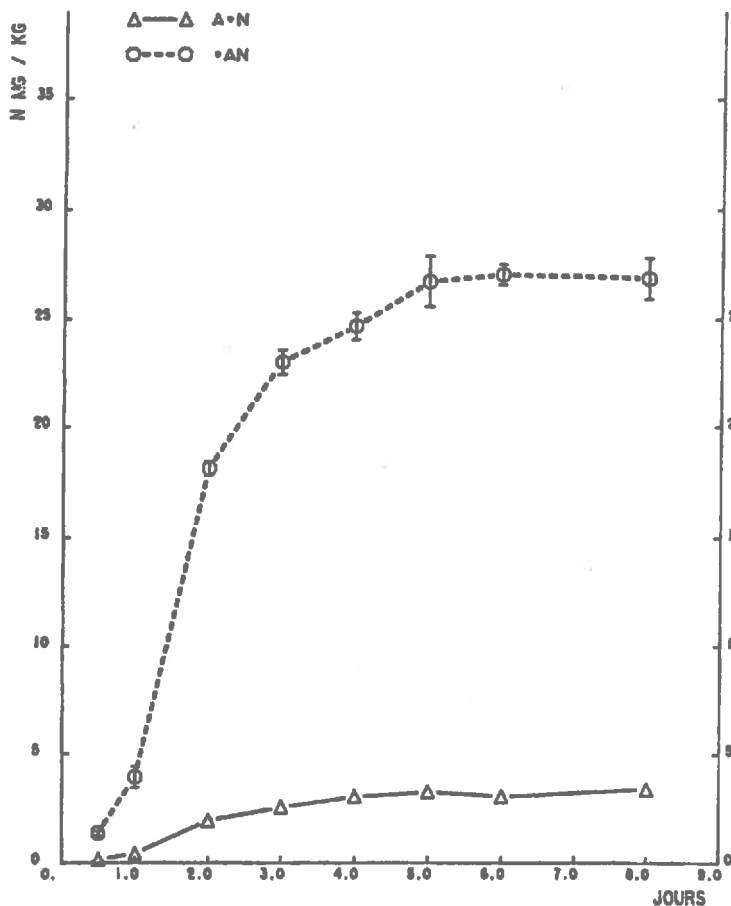


Figure 36 : Organisation de l'azote provenant de la forme ammoniacale ou nitrique dans un traitement NH_4NO_3 . Incubation à 10°C avec 500 mg C.kg⁻¹ de glucose et 100 mg N.kg⁻¹ terre sèche.

A^{15}N : apport de $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$; ^{15}AN : apport de $^{15}\text{NH}_4\text{NO}_3$.

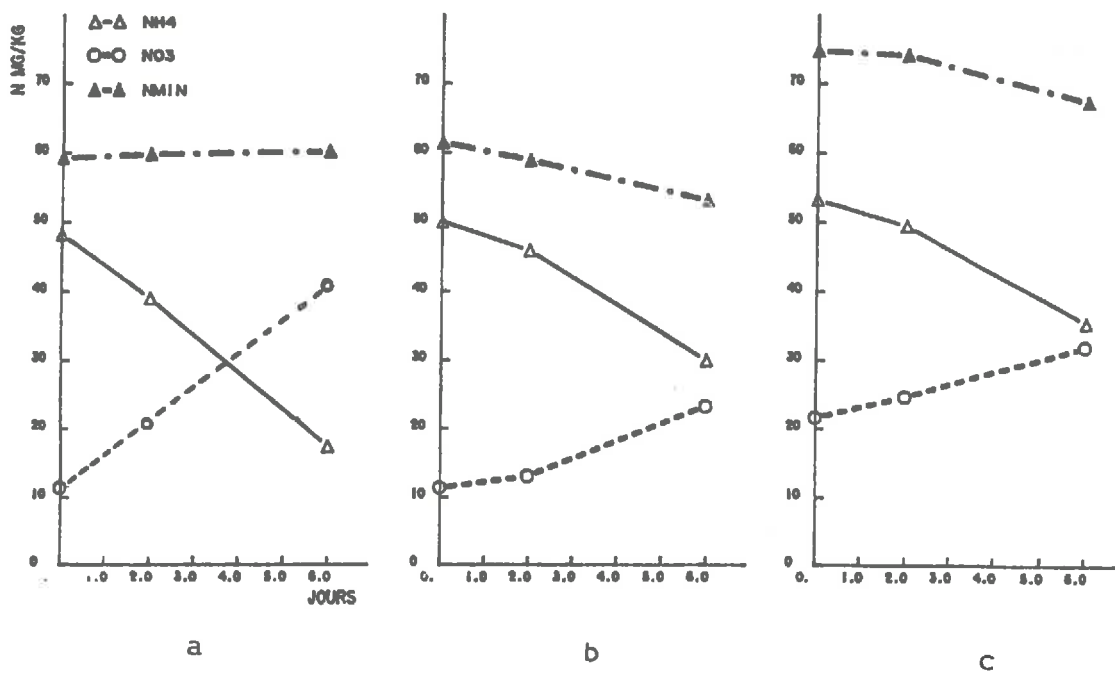


Figure 37 : Nitrification de l'ammonium apporté sous forme $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (50 mg N.kg^{-1} terre). Incubation à 10°C .
 a - sol de Bourguignon
 b - sol d'Etrépilly
 c - sol de Livry

12. Organisation comparée de l'ammonium et du nitrate dans 3 types de sols :

121 - Incubation en sol nu (traitements AS et KN)

1211 - Evolution de l'azote minéral

On observe une évolution différente dans les trois sols (Figure 37). La nitrification est évaluée par les quantités de nitrate apparues au cours du temps, étant donné que les quantités d'azote ammoniacal "disparues" ne sont pas intégralement retrouvées sous forme nitrate :

* Bourguignon (argile sableuse) : après 6 jours d'incubation à 10°C, 33 mg N.kg⁻¹ d'azote ont été nitrifiés (66 % de l'apport) avec une vitesse constante égale à 5,2 mg N.kg⁻¹ jour⁻¹

* Etrepilly (limon hydromorphe) : 20 mg N.kg⁻¹ d'azote ammoniacal manquent au jour 6 et 11,8 mg N.kg⁻¹ se retrouvent sous forme nitrate (23,6 % de l'apport). Les vitesses respectives pour les deux périodes de mesure sont de 0,8 mg N.kg⁻¹ (0-2 j) et 2,5 mg N.kg⁻¹ (2-6 j), soit en moyenne 2,0 mg N.kg⁻¹.jour⁻¹

* Livry (craie) : 17,7 mg N.kg⁻¹ d'azote ammoniacal manquent au jour 6 et 10,4 mg N.kg⁻¹ sont retrouvés sous forme nitrate (19,6 % de l'apport). La vitesse de nitrification sensiblement constante, est égale à 1,7 mg N.kg⁻¹.jour⁻¹

Les vitesses de nitrification sont donc bien différenciées. Bourguignon est un sol qui nitrifie rapidement et dès l'apport d'azote. Les deux autres nitrifient lentement avec un démarrage qui paraît plus lent sur le limon hydromorphe.

En comparaison, le sol de Mons, précédemment étudié, s'est caractérisé par une vitesse de nitrification également élevée : environ 6 mg N.kg⁻¹ sol.jour⁻¹ à 10°C et 15 mg N.kg⁻¹ sol.jour⁻¹ à 20°C.

Il n'y a pas de pertes pour le sol de Bourguignon. Pour les sols d'Etrepilly et de Livry, les quantités d'azote ammoniacal ne sont pas compensées par l'azote nitrique apparu (Figure 37). L'azote minéral non retrouvé représente 8,2 mg N.kg⁻¹ à Etrepilly et 10,3 mg N.kg⁻¹ à Livry.

Dans le cas du traitement KN, le bilan ¹⁴N indique qu'il n'y a pas eu de pertes gazeuses, quelque soit le sol.

1212 - Organisation de l'azote

On constate une fixation immédiate d'azote ammoniacal pour les sols de Bourguignon (argile sableuse) et Etrepilly (limon), équivalente à $0,8 \text{ mg N.kg}^{-1}$ d'azote (2 % de l'apport). Les échantillons ayant reçu le traitement KN pour les trois sols ne montrent aucun marquage de la matière organique au temps 0 (Figure 38).

L'organisation pour les traitements AS est limitée : elle concerne $2,5$ à 3 mg N.kg^{-1} d'azote (5 % de l'apport environ). Sur le sol de craie cette organisation paraît moindre : cependant, si on soustrait les quantités d'azote fixées à $t = 0$, les quantités organisées sont très proches pour les 3 sols : $1,8 \text{ mg N.kg}^{-1}$ (Bourguignon), 2 mg N.kg^{-1} (Etrepilly) et $1,5 \text{ mg N.kg}^{-1}$ (Livry) soit 3 à 4 % de l'apport environ.

On n'observe pas d'organisation notable du $^{15}\text{NO}_3$: des traces de ^{15}N organique sont décelées à Bourguignon et Etrepilly ($0,1$ à $0,2 \text{ mg N.kg}^{-1}$) alors que le sol de craie de Livry ne présente aucun marquage.

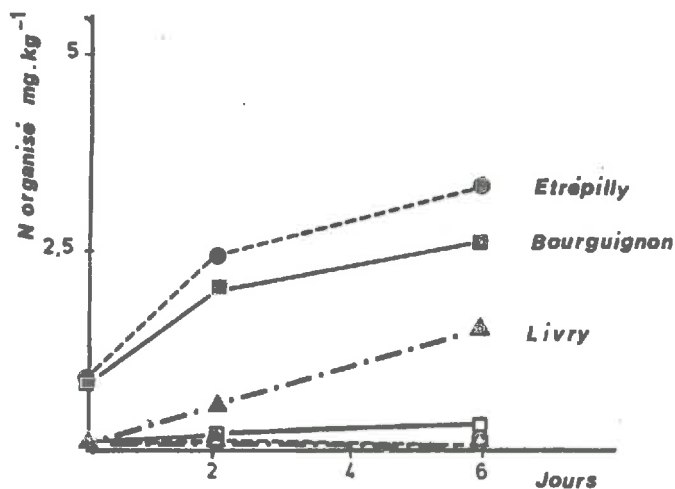


Figure 38: Organisation des formes ammoniacale et nitrique dans les trois sols étudiés. Incubation sans C exogène, à 10°C .
Symboles pleins : apport de 50 mg N.kg^{-1} de $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
Symboles vides : apport de 50 mg N.kg^{-1} de K^{15}NO_3

1213. Mesure du dégagement de CO₂

La mesure de l'activité microbienne a été suivie par le dégagement de CO₂ (Figure 39). Le sol de craie (Livry) est celui qui dégage le plus de CO₂ (témoin et traitements azote seul) ce qui correspond à la minéralisation plus importante constatée. Le sol d'Etrépilly est celui qui "respire" le moins. La forme d'azote ajoutée n'a pas d'influence significative sur la respiration globale, quelque soit le sol. On observe simplement une tendance : l'apport d'ammonium pourrait légèrement stimuler la respiration.

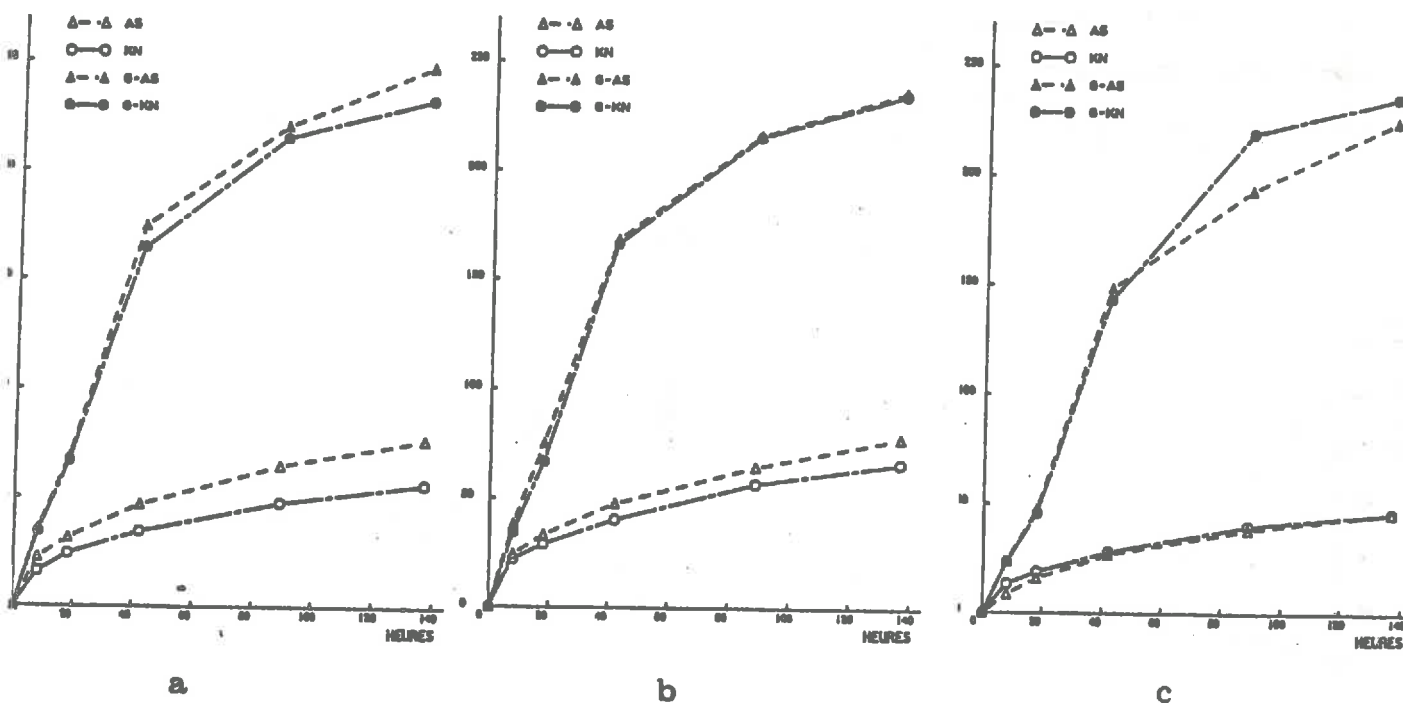
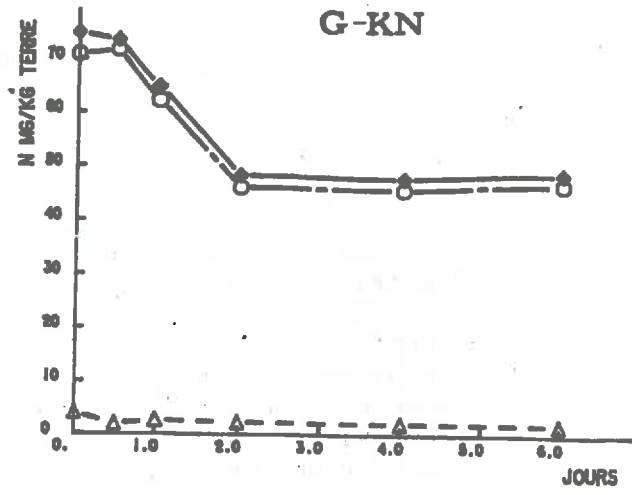
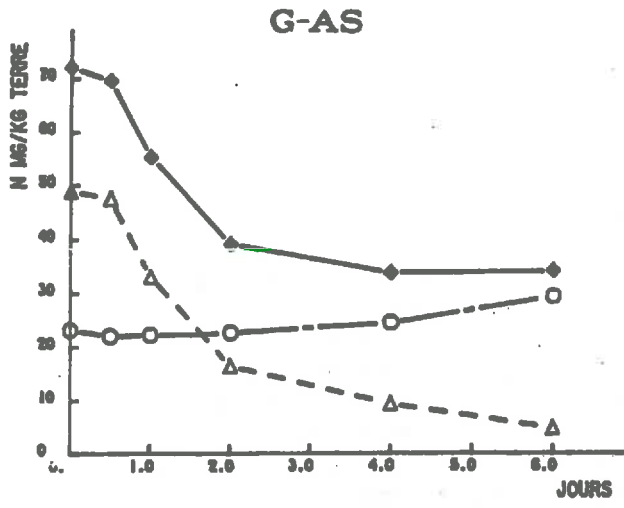
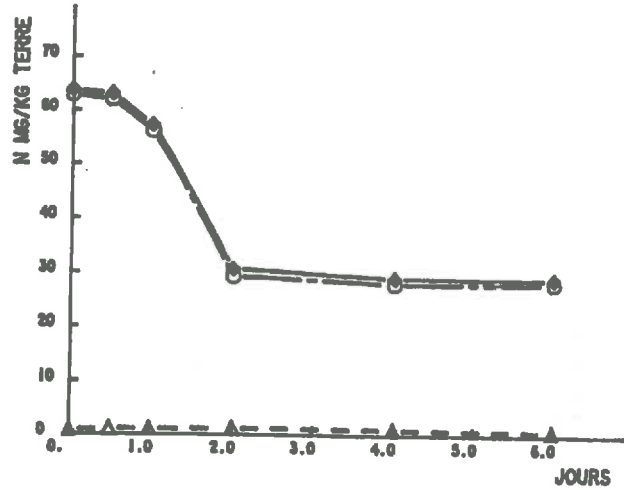
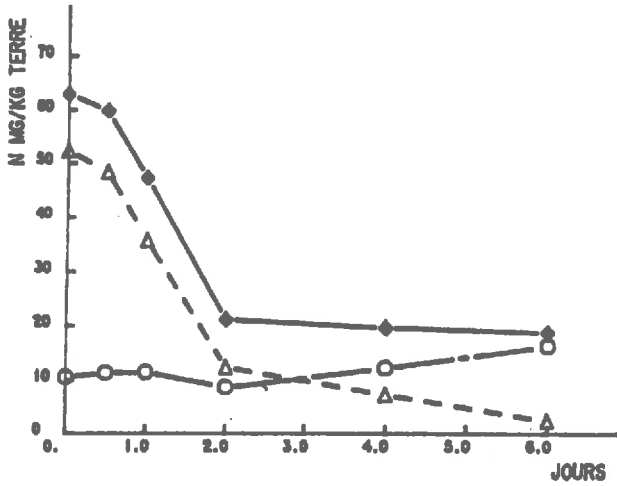


Figure 39 : Quantités cumulées de C-CO₂ dégagé au cours de l'incubation menée à 10°C.

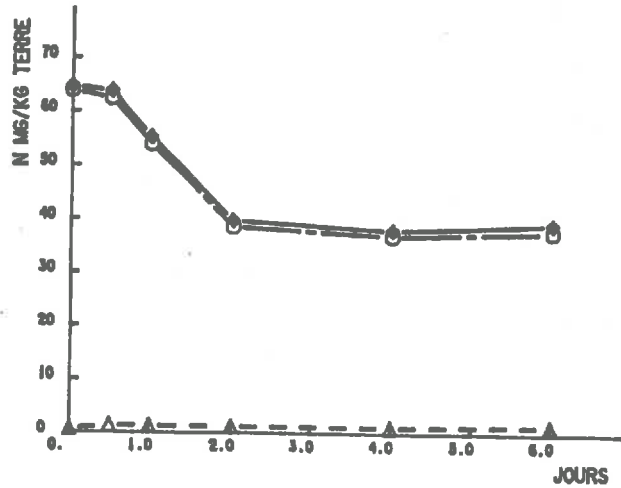
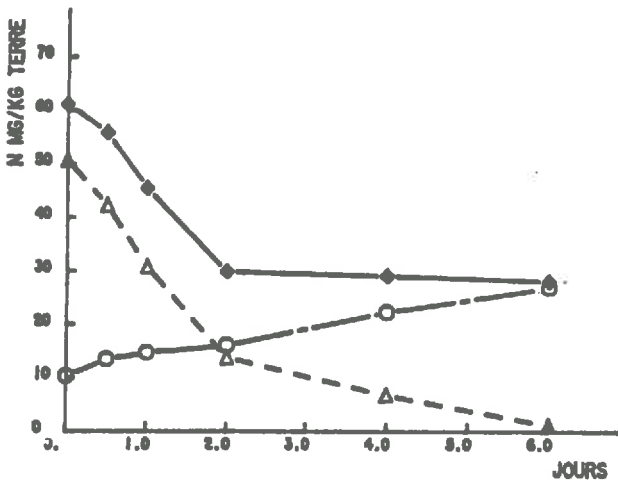
- 500 mg C.kg⁻¹ terre sèche et 50 mg N.kg⁻¹ sous forme ammoniacale ou nitrique (G-AS et G-KN)
- 50 mg N.kg⁻¹ sous forme ammoniacale ou nitrique (AS et KN)
- a : sol de Bourguignon (argile sableuse)
- b : sol de Livry (sol calcaire)
- c : sol d' Etrépilly (limon hydromorphe).



Livry Louvercy



Etrepilly



Bourguignon

Figure 40 : Evolution de l'azote minéral pour les traitements G-AS et G-KN dans les 3 sols. Incubation à 10°C avec 50 mg N.kg⁻¹ et 500 mg C.kg⁻¹ terre.

NH₄ Δ---Δ
 NO₃ ○---○
 Nmin total ◆---◆

122 - Incubations avec glucose (traitements G-AS et G-KN)1221. Evolution de l'azote minéral

L'évolution des formes minérales pour les traitements G-AS est présentée figure 40. Nous constatons une diminution rapide des quantités d'azote sous forme ammoniacale. A la fin de l'expérimentation, les quantités de NH_4 sont équivalentes au témoin pour l'argile sableuse (Bourguignon), à $1,2 \text{ mg N.kg}^{-1}$ de NH_4 pour le limon (Etrépilly) et à 3 mg N.kg^{-1} pour le sol de craie (Livry).

Les excès isotopiques du pool nitrate au jour 6 (seul actuellement disponible) permettent d'accéder aux quantités nitrifiées à partir de l'apport d'azote : 29 % de l'azote apporté sous forme ammoniacale a été nitrifié pour le sol de Bourguignon, 13,7 % pour le sol d'Etrépilly et 11 % pour le sol de Livry. Ces quantités nitrifiées permettent un classement des sols vis à vis de la nitrification, identique à celui effectué sur les échantillons qui n'ont pas reçu de glucose (et pour lesquels l'organisation a été très faible).

Le bilan d'azote minéral pour le traitement G.AS(14N) indique qu'à la fin de l'expérimentation, il manque $33,0 \text{ mg N.kg}^{-1}$ pour le sol de Bourguignon, $44,2 \text{ mg N.kg}^{-1}$ pour celui d'Etrépilly et 38 mg N.kg^{-1} pour celui de Livry (Tableau 26).

TRAITEMENT mg N. Kg^{-1}	AS	KN	G.AS	G.KN
Bourguignon				
Δ N organique(1)	1.8	0.1	25.4	21.7
Δ N minéral (2)	0.9	-1.3	-33.0	-25.4
Bilan (1)+(2)	+2.7	-1.2	- 7.6	- 3.7
Etrépilly				
Δ N organique(1)	2.5	0.0	23.3	20.9
Δ N minéral (2)	-8.3	0.4	-44.2	-34.9
Bilan (1)+(2)	-5.8	+0.4	-20.9	-14.0
Livry				
Δ N organique(1)	1.5	0.0	24.4	17.3
Δ N minéral (2)	-7.3	3.0	-38.0	-26.0
Bilan (1)+(2)	-5.8	+3.0	-13.6	- 8.7

Tableau 26 : Bilan effectué à la fin de l'incubation, sur les compartiments N minéral (mesuré avec 14N) et N organique (mesuré avec 15N), pour les traitements ayant reçu 50 mg N.kg^{-1} sous forme de sulfate d'ammonium ou de nitrate de potassium avec 500 mg.kg^{-1} de C-glucose (G-AS et G-KN) ou sans glucose (AS et KN).

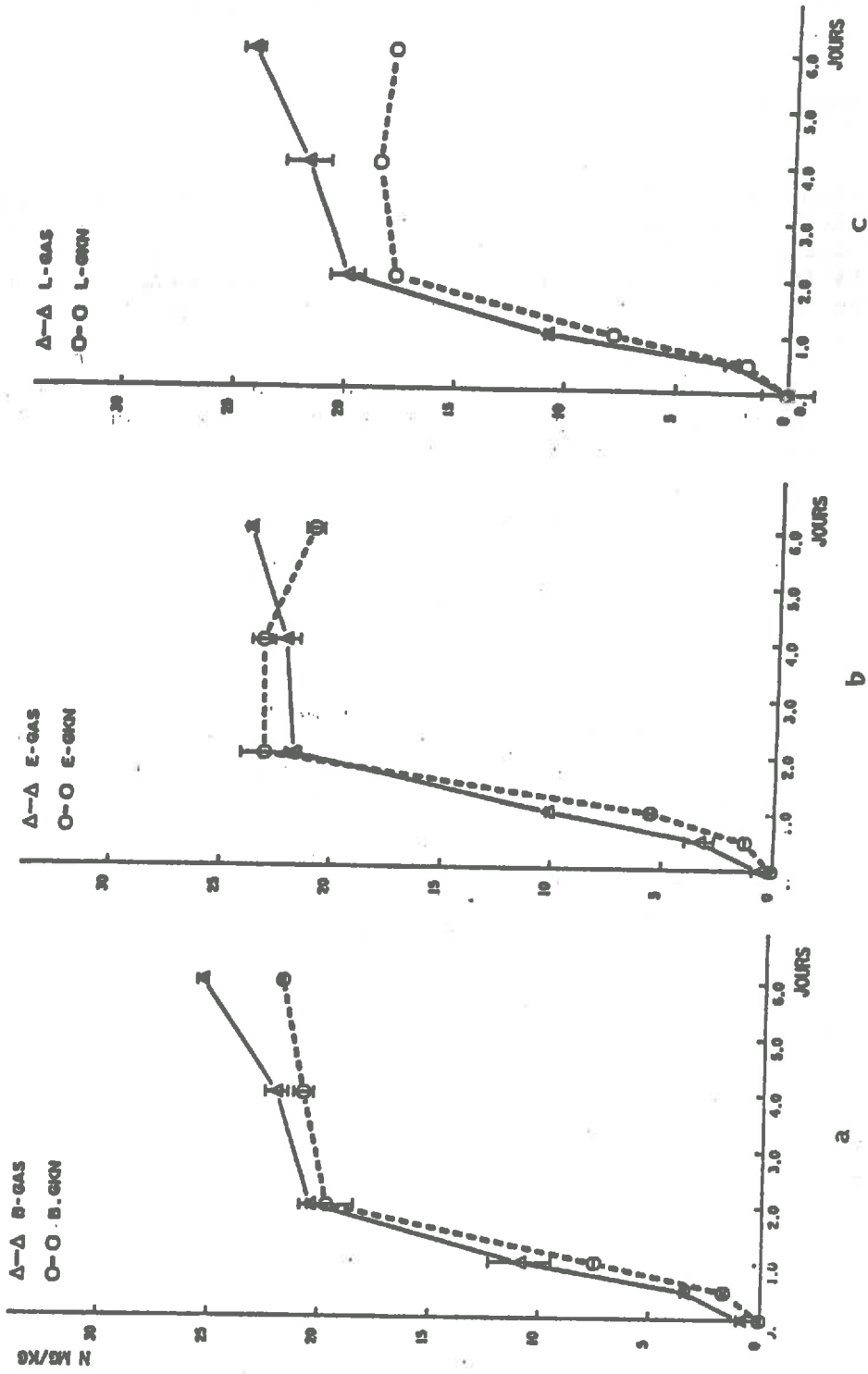


Figure 41 : Organisation de l'azote apporté (50 ppm) sous forme sulfate d'ammonium (GAS) ou nitrate de potassium (GKN) avec 500 ppm de c-glucose. Incubation à 10°C
 a - sol de Bourguignon
 b - sol d'Etrépillly
 c - sol de Livry

1222. Organisation de l'azote

La dynamique de l'organisation de l'azote est représentée à la figure 41 et au tableau 27.

Les quantités d'azote ammoniacal fixées au temps $t = 0$ sont équivalentes à 0,6 et 0,9 mg N.kg⁻¹ pour les sols de Bourguignon et Etrépilly. L'essentiel de l'organisation se situe entre 12 h et 2 j d'incubation. L'organisation dans les traitements G-KN démarre plus lentement mais l'organisation est pratiquement achevée au jour 2. A cette date, si on soustrait pour les traitements G-AS les quantités d'azote probablement fixé par rétrogradation, on constate que les quantités d'azote organisé ne sont pas significativement différentes entre les traitements G-AS et G-KN pour chaque sol, excepté pour la craie (Livry) où le traitement G-KN reste inférieur.

Temps	BOURGUIGNON		ETREPILLY		LIVRY	
	G-AS	G-KN	G-AS	G-KN	G-AS	G-KN
t=0	0.9	0	0.6	0	0	0
0-0,5j	2.5	1.6	2.7	1.2	2.3	1.6
0,5-1j	7.4	5.8	6.8	4.2	8.3	5.6
1-2 j	9.5	12.1	11.6	17.6	9.1	9.8
2-4 j	1.6	1.1	0.4	0.1	1.8	0.8
4-6 j	3.4	1.0	1.7	-2.2	2.6	-0.5
--- Q.maximale cumulée	25.3	21.6	23.8	23.1	24.1	17.8

Tableau 27: Quantités d'azote organisé (mg N.kg⁻¹ TS) au cours d'une incubation à 10°C, en présence de glucose (500 mg C.kg⁻¹ terre sèche)

G-AS = apport de 50 mg N.kg⁻¹ de sulfate d'ammonium

G-KN = apport de 50 mg N.kg⁻¹ de nitrate de potassium

A la fin de l'incubation (jour 6), les quantités organisées sont équivalentes pour les trois sols (22 à 24 mg N.kg⁻¹ d'azote) excepté le traitement nitrate sur le sol de craie. Si l'on soustrait l'organisation obtenue pour les mêmes traitements sans glucose (organisation que l'on peut attribuer au carbone natif des sols), on obtient alors respectivement.

- pour le traitement G-AS :
 - * 22,8 mg N.kg⁻¹ pour le sol de Bourguignon
 - * 20,6 mg N.kg⁻¹ pour le sol d'Etrepilly
 - * 22,8 mg N.kg⁻¹ pour le sol de Livry

- pour le traitement G-KN :
 - * 21,6 mg N.kg⁻¹ pour le sol de Bourguignon
 - * 23,0 mg N.kg⁻¹ pour le sol d'Etrepilly
 - * 18,0 mg N.kg⁻¹ pour le sol de Livry

Nous constatons donc que pour deux des trois sols les quantités d'azote organisé pour 500 mg N.kg⁻¹ de carbone apporté ne sont pas significativement différentes entre le traitement sulfate d'ammonium et le traitement nitrate de potassium.

1223. Pertes d'azote

Les quantités d'azote "disparu" de la forme minérale ne sont pas expliquées en totalité par les quantités organisées (Tableau 27). On constate qu'il manque 7,6 mg N.kg⁻¹ (G-AS) et 3,7 mg N.kg⁻¹ (G-KN) pour le sol de Bourguignon; 20,9 mg N.kg⁻¹ (G-AS) et 14 mg N.kg⁻¹ (G-KN) pour le sol d'Etrepilly; 13,6 mg N.kg⁻¹ (G-AS) et 8,5 mg N.kg⁻¹ (G-KN) pour le sol de Livry.

L'absence de défauts de bilan constatés pour les traitements KN, sans glucose, laissent penser que la dénitrification pourraient être responsable des pertes dans les traitements G-KN pour les trois sols. En supposant que le glucose n'a pas d'effet particulier sur les pertes par volatilisation, on peut également attribuer la différence dans les bilans entre le traitement G-AS et le traitement AS aux pertes par dénitrification, Dans ce cas on obtiendrait :

	G-AS		G-KN
	Volat. mg N.kg ⁻¹	Dénit. mg N.kg ⁻¹	Dénitrification mg N.kg ⁻¹
Bourguignon	0.0	7.6	3.7
Etrepilly	5.8	15.1	14.0
Livry	5.8	7.8	8.5

Tableau 28 : Estimation des pertes par volatilisation et dénitrification pour les traitements N + glucose

Lorsque l'on compare les cinétiques d'azote minéral et d'organisation, on constate que les pertes ont essentiellement eu lieu entre 12 h et 2 jours.

1224. Mesure du CO₂ dégagé

Nous constatons une grande similitude au niveau des quantités de CO₂ dégagé pour les traitements ayant reçu du glucose (Figure 39).

Si on soustrait les quantités de CO₂ dégagées par les traitements correspondants sans glucose, il est possible de calculer la proportion de carbone dégagé, issu de la minéralisation du glucose (en négligeant un éventuel "priming effect" c'est-à-dire une activation de la minéralisation du carbone endogène du sol). On obtient des valeurs proches pour les trois sols: 34,7 % pour le sol de Bourguignon, 37 % pour le sol d'Etrepilly et 32,7 % pour le sol de Livry.

Un léger décalage dans le dégagement du CO₂ est perceptible avec le traitement nitrate (correspondant à la vitesse plus lente d'organisation), mais on ne constate pas d'effet de la forme d'azote sur la quantité totale cumulée de CO₂ dégagé.

2 - ASSIMILATION DE L'AMMONIUM ET DU NITRATE PAR LES MICRO-ORGANISMES

21. Test de croissance sur milieux NH_4 et NO_3

211 - Milieu solide

Les colonies isolées sur gélose nutritive (37 colonies indéterminées) ont été repiquées sur milieu solide. Nous avons observé la croissance de ces colonies avec un critère absolument qualitatif (bonne ou mauvaise croissance). La croissance des colonies a été importante, moyenne ou faible, mais sans distinction pour chaque colonie, entre les deux milieux (ammoniacal ou nitrique). Deux colonies n'ont poussé ni sur l'un ni sur l'autre des milieux.

212 - Milieu liquide

Les colonies isolées sur gélose à l'extrait de terre ont été repiquées sur milieu liquide. La croissance est notée positive en cas d'apparition d'un trouble dans le tube. Les 54 colonies testées se sont développées sur le milieu contenant de l'azote ammoniacal; 47 colonies se sont développées sur le milieu nitrate dont 31 aussi rapidement que pour le milieu NH_4 , les 16 autres après un certain délai.

Ces tests appliqués à des colonies microbiennes sélectionnées uniquement par le mode d'isolement, permettent de situer globalement les capacités à assimiler l'ammonium et le nitrate. Cependant une absence de croissance ne permet pas de conclure à une incapacité à assimiler l'une ou l'autre des formes, étant donné les conditions très standardisées appliquées indifféremment à tous les micro-organismes.

Souches	Gram	T. respi- ratoire	mobilité	oxidase	catalase	Morphologie
Ex1	+	aérobie	-	-	+	Bacilles trapus
Ex8	-	aérobie	+	+	-	Petits Bacilles
Ex10	-	aérobie	-	-	-	Bacilles
Ex23	+	aérobie	-	-	+	Bac. chaines
Ex50	-	aérobie	-	-	+	Pseudomonas ?

Tableau 29 : Identification partielle de quelques souches cultivées

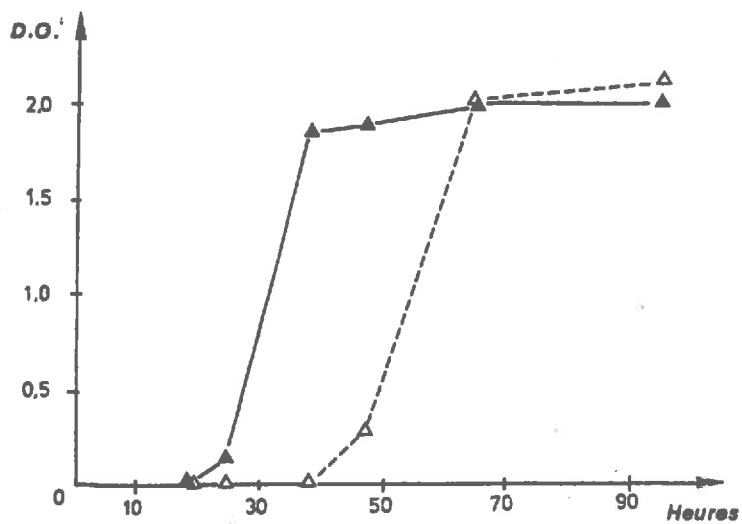


Figure 42 : Souche Ex23 : Culture sur milieu $(NH_4)_2SO_4$ ▲—▲
et sur milieu KNO_3 △---△

22. Etude de la croissance des souches cultivées en milieu liquide

221 - Identification partielle des colonies isolées

Cette identification n'a pu être complète pour plusieurs raisons:

- Les colonies récemment isolées du sol ne sont pas stabilisées du point de vue de leur caractéristiques physiologiques; certains caractères disparaissent au cours des repiquages successifs: c'est un effet de "sub-culture" (Fernandez, communication personnelle).

- Les galeries "API" qui permettent l'identification des souches par leur réponse à un ensemble de réactions enzymatiques, sont mises au point sur des souches bactériennes de référence communément rencontrées en biologie humaine ou animale. Leur utilisation ne s'est pas révélée adaptée aux souches du sol (temps d'incubation plus long, souches non répertoriées).

L'identification partielle des colonies isolées a néanmoins permis :

- de sélectionner les bactéries en fonction de leur type respiratoire. Seules les bactéries aérobies strictes seront conservées afin d'écartier celles pouvant utiliser la voie dissimilative de réduction du nitrate;

- de classer les bactéries en différents groupes morphologiques et physiologiques : bactéries Gram + et Gram -, entérobactéries et non entérobactéries ...

A partir de cette pré-identification, nous avons conservé 15 souches qui ont été cultivées en milieu liquide.

222 - Croissance comparée sur milieu NH_4 et NO_3^- : mesures par densité optique

Les souches cultivées sur milieu contenant du sulfate d'ammonium ont montré, après transfert sur milieu nitrate, une phase de latence caractéristique de l'induction de la nitrate-réductase (Figure 42). Pour cette raison, la croissance comparée sur ammonium et nitrate a toujours été réalisée après une pré-culture sur nitrate d'ammonium.

Sur les 15 souches testées, trois types de réponses se dégagent:

- une croissance identique sur les 2 milieux azotés : c'est le cas de 7 souches testées. Un exemple est présenté à la figure 42.

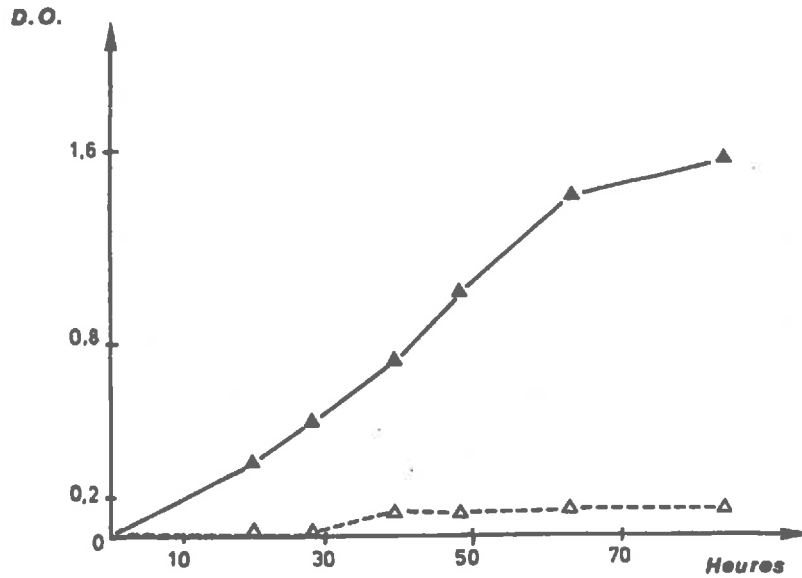


Figure 43 : Souche Ex8 - Suivi de la croissance sur milieu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ▲—▲ et KNO_3 △----△ , par mesure de densité optique (D.O.) à 580nm .

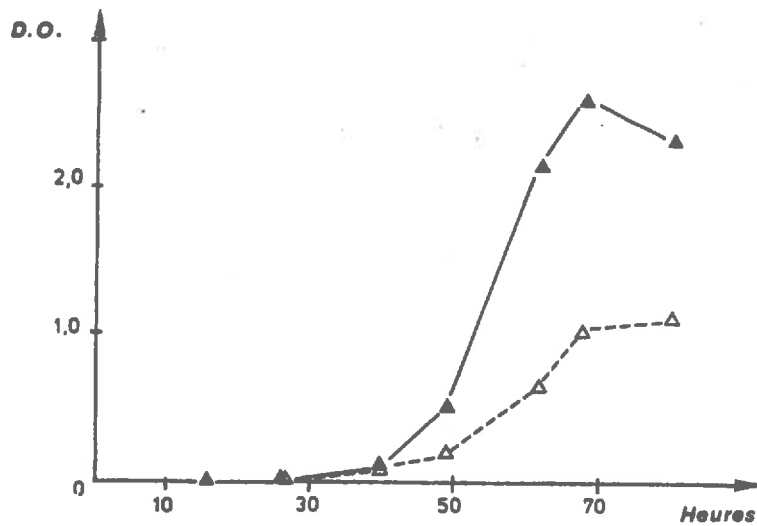


Figure 44 : Souche Ex52 - Suivi de la croissance sur milieu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ▲—▲ et KNO_3 △----△ , par mesure de la densité optique (D.O.) à 580nm.

- une croissance plus lente et plus faible sur milieu nitrique. C'est le cas de 3 souches testées (exemple figure 44).

- pas de croissance sur le nitrate : c'est le cas de 2 souches testées (exemple figure 43).

Enfin la croissance de 3 souches n'a pu être suivie par densité optique, en raison d'une floculation des colonies dans le milieu de culture.

Nous retrouvons par ces suivis de croissance, les différentes réponses observées sur les simples "tests" de croissance. Cependant le nombre très restreint de souches testées ne nous autorise à aucun calcul.

La principale difficulté rencontrée a été la variation du pH du milieu de culture initialement à 6,45. Le pH final des milieux se situait entre pH 4 et pH 7 selon les souches, avec pour certaines cultures un pH très différent après quelques heures entre milieu ammoniacal et milieu nitrique.

La chute de pH, intervenue la plupart du temps spécifiquement pour le milieu ammoniacal, a considérablement freiné ou stoppé la croissance sur ce milieu. Ces problèmes de maintien du pH sont toujours mentionnés dans les études de croissance en "batch" (milieu non renouvelé). Une véritable étude de la croissance ne paraît possible qu'en chemostat (culture en conditions stationnaires).

233 - Cinétiques d'utilisation de l'ammonium et du nitrate

L'utilisation de l'ammonium et du nitrate ne peut être réellement appréciée que par le dosage de ces ions dans le milieu de culture. La croissance, observée sur un milieu où azote ammoniacal et nitrique sont les seules sources d'azote pour le micro-organisme, indique que la disparition de l'azote correspond bien à une assimilation par la bactérie.

Nous avons suivi la croissance de trois bactéries (EX1, EX10 et EX50) sélectionnées parmi les 15 souches précédemment cultivées, pour leur capacité à croître de manière identique sur milieu ammoniacal et nitrique.

Enfin, une "microflore" du sol a été cultivée par ensemencement des milieux par une aliquote de suspension de sol.

2331. Cultures pures

Nous constatons pour les souches EX1 et EX10 des réponses proches : l'utilisation du nitrate débute quand l'ammonium est totalement utilisé (Figure 45). La consommation de glucose et l'augmentation de la densité optique de la culture se poursuivent au delà de l'utilisation de l'azote.

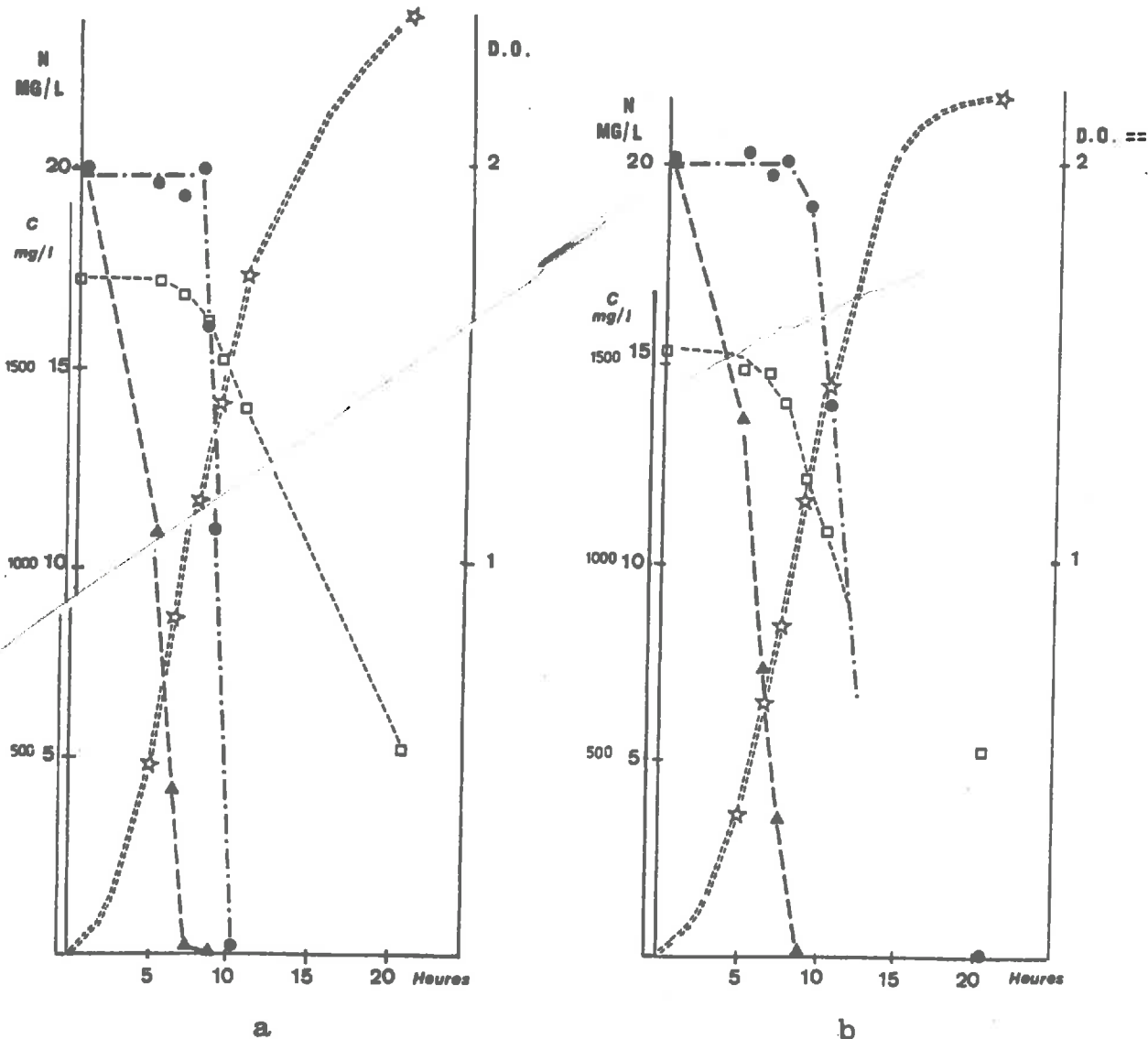


Figure 45 : Cultures pures sur milieu NH_4NO_3 : Croissance suivie par densité optique ☆-----☆, par disparition du glucose □-----□, de l'ammonium ▲-----▲, et du nitrate ●-----●.
 a: souche EX1
 b: souche EX10

Pour la souche EX50 le suivi a été plus fin et réalisé simultanément sur milieu NH_4 , NO_3 et NH_4NO_3 contenant soit 2 soit 4 g.l⁻¹ de glucose.

On constate que l'utilisation du nitrate commence plus tardivement que celle de l'ammonium, la vitesse d'utilisation de l'azote étant ensuite pratiquement identique dans les deux cas (Figure 46).

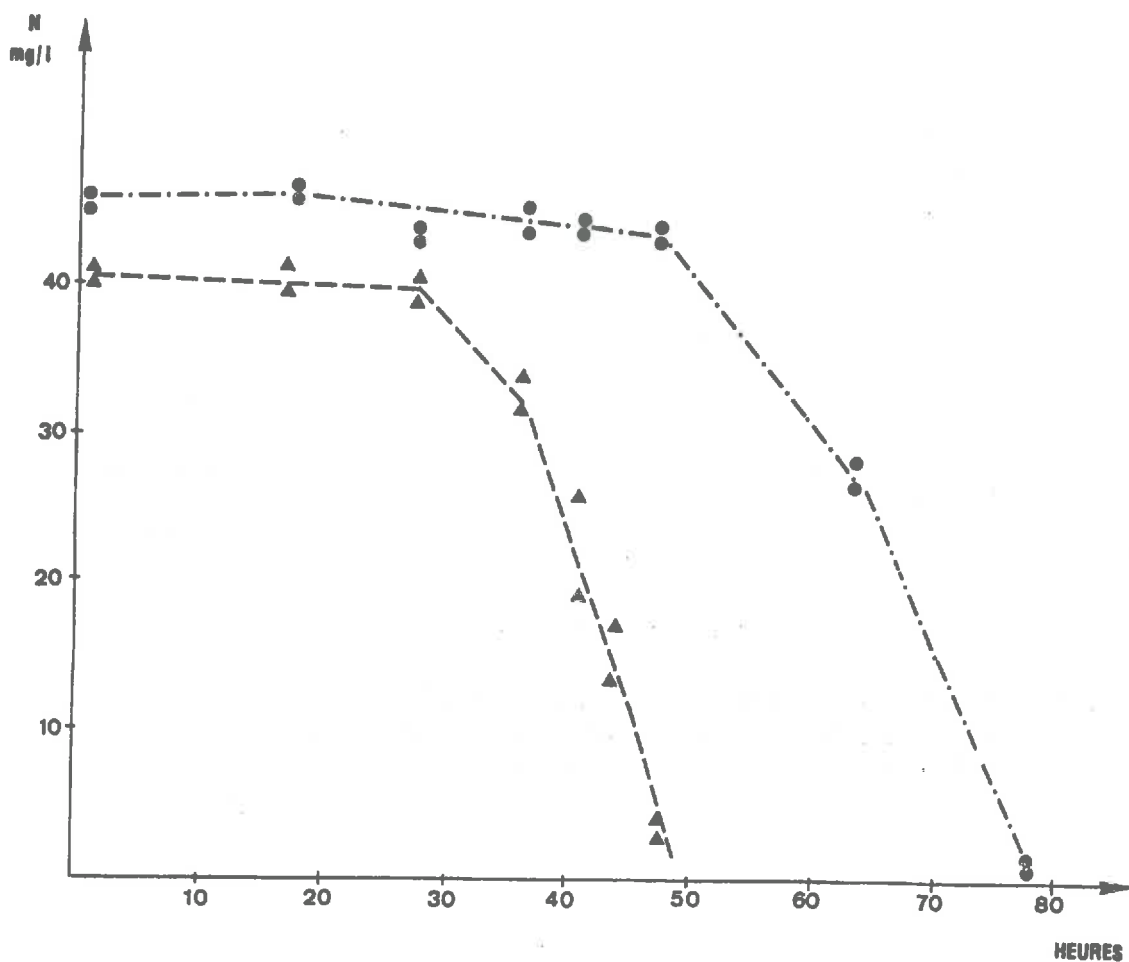


Figure 46 : Souche Ex50 cultivée sur milieu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (4g.l⁻¹ glucose) et milieu KNO_3 : suivi de la disparition de l'ammonium ▲- -▲ ou du nitrate ●-.-●

Dans le milieu contenant du nitrate d'ammonium, nous observons très nettement que l'utilisation du nitrate débute quand celle de l'ammonium est terminée (Figure 47).

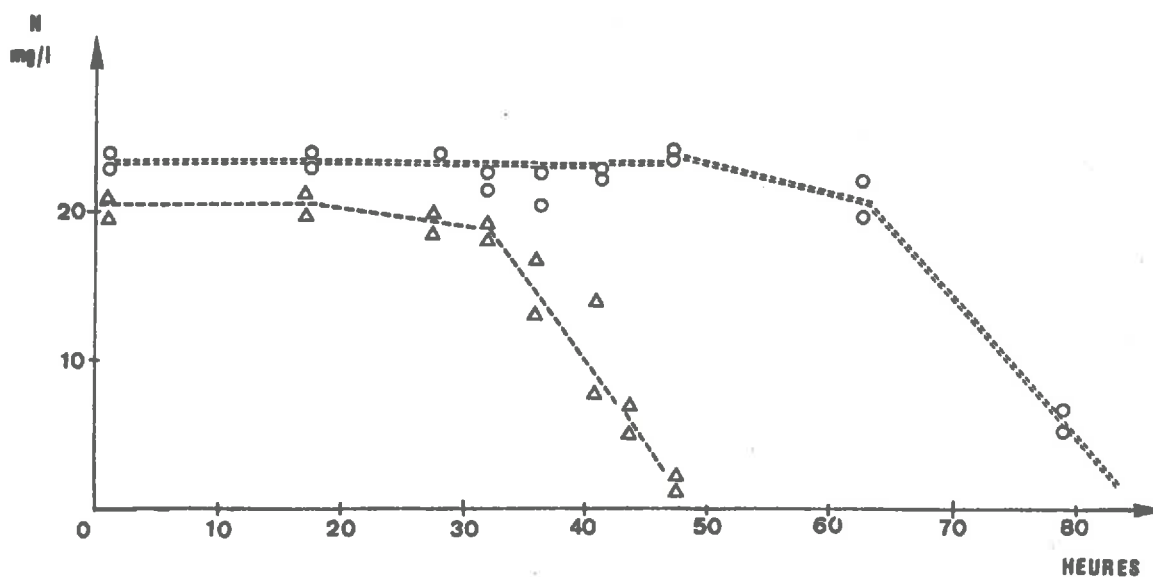


Figure 47 : Souche Ex50 cultivée sur milieu NH_4NO_3 : suivi de la disparition de l'ammonium Δ et du nitrate \circ du milieu de culture.

2332. Culture d'une "population mixte"

* Sur milieux KNO_3 et $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: la croissance démarre plus rapidement sur le milieu contenant de l'ammonium. L'utilisation du nitrate atteint ensuite une vitesse pratiquement identique.

* Sur milieu NH_4NO_3 : l'utilisation du nitrate commence quand l'ammonium a pratiquement totalement disparu du milieu de culture.

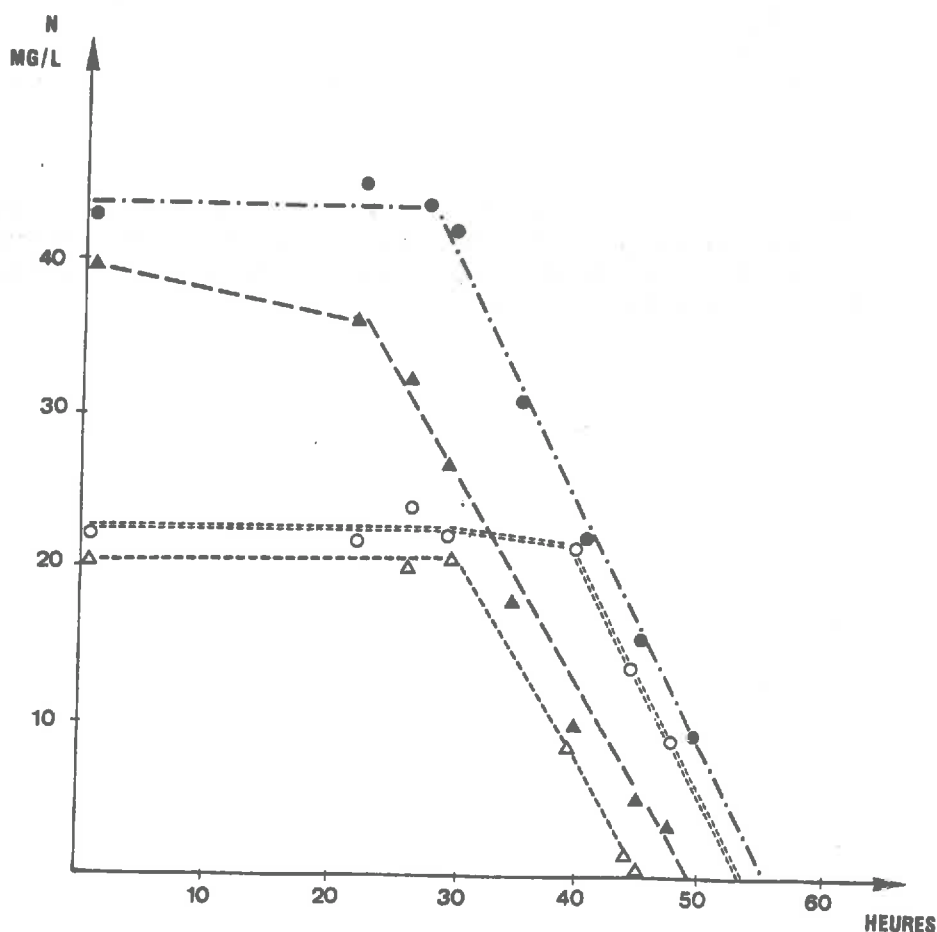


Figure 48: Utilisation de l'azote par une "population mixte" extraite du sol cultivée sur
 - milieu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Δ — Δ
 - milieu KNO_3 \bullet — \bullet
 - milieu NH_4NO_3 : ammonium (Δ ---- Δ) et nitrate (\circ ==== \circ)

Milieu	0 - 44 h	44 - 63 h	0 - 63 h
Glucose 2 g/l			
NH ₄	0,555	0,048	0,116
NO ₃	0	0,080	0,148
NH ₄ NO ₃	0,543	0,051	0,122
Glucose 4 g/l			
NH ₄	0,327	0,039	0,079
NO ₃	0	0,074	0,074
NH ₄ NO ₃	0,214	0,052	0,115

Tableau 30 : Rapports N consommé / C consommé au cours de la croissance de la souche Ex50 cultivée à deux concentrations en glucose. Bilans effectués sur les périodes 0-44 heures, 44-63 heures et 0-63 heures.

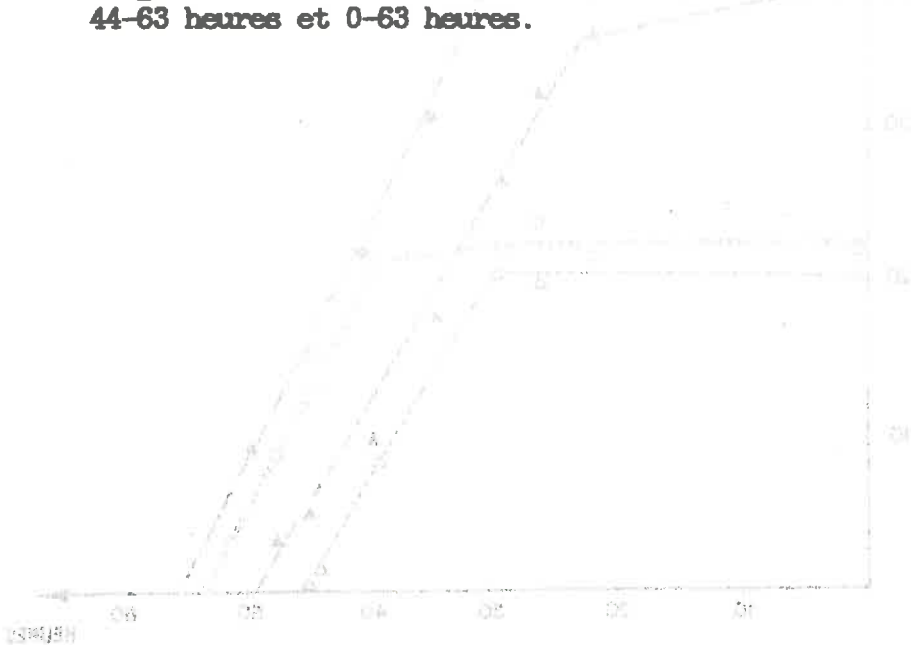


Figure 48 : Utilisation de l'azote par une population microbienne cultivée sur extrait de sol cultivé sur - milieu (NH₄)₂SO₄ (---Δ---) - milieu NO₃ (---●---) - milieu NH₄NO₃ (---□---) et nitrate (---○---)

234 - Utilisation du glucose

Sur les cultures précédentes nous avons suivi l'utilisation du glucose, en dosant celui-ci dans le milieu de culture.

Nous avons observé, pour les milieux NH_4 , NO_3 et NH_4NO_3 , un décalage des rythmes d'utilisation du carbone et de l'azote : les premières phases de la croissance sont caractérisées par une forte consommation de l'azote par rapport à celle du C-glucose (N consommé/C consommé = 0,41 à 0,67 pendant la période 0-44h) alors que la croissance s'accompagne ensuite d'une très forte consommation de carbone (N assimilé/C consommé = 0,041 à 0,080 pendant la période 44-63h) .

Cette consommation de glucose continue au delà de la disparition de l'azote du milieu de culture et s'accompagne d'une forte augmentation de la D.O.

Nous avons obtenu, pour la souche EX50, un rapport N consommé/C consommé de 0,125 pour une concentration en C-glucose de $0,8 \text{ g.l}^{-1}$ un rapport N/C de 0,076 pour une concentration en C-glucose de $1,6 \text{ g.l}^{-1}$, alors que dans les deux cas, le glucose reste non limitant en fin d'incubation (tableau 30). La disparition du glucose ne correspond donc pas aux simples besoins en carbone et en énergie nécessaires à l'édification des corps microbiens.

Pour les différentes raisons évoquées, il n'est pas possible, par de simples mesures de disparition d'azote et de carbone du milieu de culture, de discuter d'un "rendement " de l'assimilation.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

DISCUSSION

Organisation dans le sol sans apport de glucose

Nous avons observé sur les quatre sols incubés, à 20°C comme à 10°C, une organisation très faible de l'azote en absence de carbone apporté, l'organisation aux dépens du nitrate étant quasiment nulle. Cependant pour le traitement "nitrate marqué" (KN) dans nos conditions d'incubation, les quantités d'ammonium initialement présentes ou apparues suite à l'ammonification sont faibles (inférieures à 5 mg N.kg⁻¹ sol) face au pool de nitrate (110 mg N.kg⁻¹ sol). Cela suppose donc un mécanisme très performant de contrôle de l'assimilation du nitrate en présence d'ammonium, même à l'échelle de l'ensemble des populations microbiennes. Fresneau (1982), Wickramasinghe et al (1985) ont obtenu, dans le même type d'expérimentations, une organisation un peu plus importante du nitrate, mais également un écart net avec le sulfate d'ammonium.

Ces résultats paraissent donc pouvoir être généralisés à tous les sols : l'organisation affecte préférentiellement l'ammonium au nitrate. Trois hypothèses explicatives peuvent être émises :

- * un déséquilibre quantitatif des populations capables d'assimiler l'ammonium d'une part, le nitrate d'autre part ;
- * une différence de rendement d'organisation de l'ammonium et du nitrate pour une quantité de carbone assimilable donné ;
- * une inhibition partielle ou totale de l'organisation du nitrate en présence d'ammonium.

Assimilation de l'azote par les micro-organismes

Les expérimentations menées nous ont permis de constater que tous les micro-organismes isolés par nos techniques, peuvent assimiler l'ammonium et que la majorité est capable d'utiliser efficacement le nitrate. Cependant dans ce dernier cas, la réponse individuelle des organismes est plus variable: la croissance est aussi rapide que sur milieu ammoniacal, ou plus lente; sur les souches testées, un retard de la croissance sur milieu nitrique est observé, suivi ensuite de vitesses similaires d'assimilation pour les deux milieux. Cette capacité de la plupart des souches à utiliser le nitrate, est confirmée par les résultats disponibles dans la bibliographie.

Nous avons pu constater que lorsqu'une bactérie est en présence des deux sources, elle utilise d'abord l'ammonium puis le nitrate. La similitude des résultats obtenus lors de l'expérience menée avec une suspension de sol, montre que ce qui a été observé sur quelques micro-organismes paraît être une loi générale : les micro-organismes du sol ont alors un système efficace de contrôle de l'utilisation du nitrate en présence d'ammonium.

Cette réponse est conforme à celles obtenues pour d'autres micro-organismes et notamment pour des champignons (cf partie bibliographique).

Ces résultats nous amènent à conclure que la différence d'organisation de l'ammonium et du nitrate observée, ne peut donc pas être due à un déséquilibre quantitatif dans le sol entre populations capables d'assimiler l'ammonium et populations capables d'assimiler le nitrate. Elle serait expliquée par une inhibition métabolique de l'assimilation du nitrate en présence d'ammonium.

Pendant il est certain que les conditions de milieu (température, humidité, pH) vont déterminer la compétitivité des souches les unes par rapport aux autres .

Contrôle de l'organisation du nitrate par l'ammonium dans le sol

Nous avons mis, en fournissant 500 mg C pour 100 mg N.kg⁻¹ terre (50 de NH₄ et 50 de NO₃), les micro-organismes en situation de "choix" entre les deux formes apportées simultanément. Dans ce cas, le nitrate est très peu organisé (quelques mg N.kg⁻¹ terre). Voici donc confirmé, à l'échelle du sol, le fait qu'en présence d'ammonium, l'assimilation du nitrate est faible, voire nulle.

Il est donc par ailleurs très probable que, dans les traitements ¹⁵N-urée ou ¹⁵N-NH₄, l'organisation se soit faite pratiquement exclusivement aux dépens de l'ammonium marqué et non aux dépens du nitrate marqué après nitrification.

Rendement d'organisation de l'ammonium et du nitrate

Nous avons cherché à tester l'hypothèse d'une différence de rendement entre formes d'azote.

Quand le nitrate est la seule forme d'azote apportée, on observe une organisation qui n'est la plupart du temps pas significativement différente de celle obtenue avec l'ammonium, la cinétique d'organisation étant légèrement différée dans le temps.

Les quantités d'azote organisé sont également équivalentes pour

les traitements sulfate d'ammonium, nitrate de potassium, urée et nitrate d'ammonium, même lorsque les quantités d'azote apportées sont différentes (50 et 100 mg N.kg⁻¹ terre sèche). La quantité de carbone disponible assimilable détermine strictement les quantités d'azote susceptible d'être organisé.

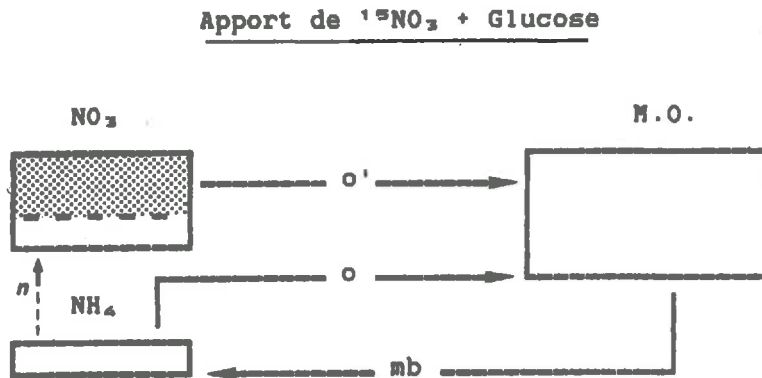
Les différences apparues de manière systématique dans les traitements NH₄ et NO₃ sans glucose et, en présence de glucose, dans le sol de craie peuvent-elles être attribuées à une différence de "rendement" d'assimilation ? Avant d'en tirer cette conclusion, il est impératif de prendre en compte les trois aspects suivants :

1- La dilution de l'azote marqué par l'azote minéral présent sous la même forme dans le sol, au début de l'expérimentation. La dilution n'est pas toujours négligeable en particulier pour la forme nitrique. Nous en avons tenu compte en calculant l'organisation en % de l'azote présent au temps t = 0. Par contre si l'organisation est exprimée en % de l'azote 15 apporté, elle apparaît beaucoup plus faible que pour le traitement NH₄.

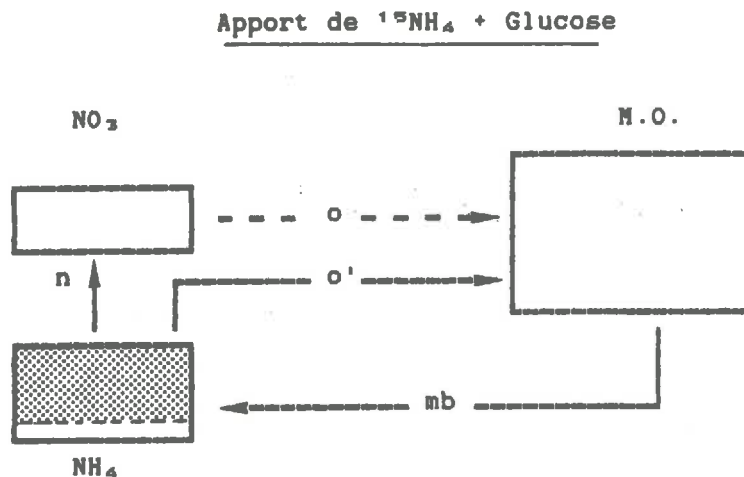
2- La fixation de l'azote ammoniacal, celle-ci restant difficile évaluer autrement que par une extraction au temps 0 (après 2 minutes de contact sol-solution). Dans nos sols, elle s'est avérée faible, mais ce ne semble pas être toujours le cas général (Jansson 1958, Nommik et Vahtras 1982).

3- La présence d'un pool NH₄ dans le sol : les incubations menées sans glucose avec ammonium ou nitrate ont montré une organisation de 4 mg N.kg⁻¹ de ¹⁵NH₄ alors que le ¹⁵NO₃ n'est pas organisé. Dans ce cas, les différences d'organisation entre les deux formes sont expliquées par l'organisation de l'ammonium natif du sol: l'organisation de 4 mg N.kg⁻¹ qui s'est faite aux dépens du ¹⁵NH₄ se produit également dans le traitement ¹⁵NO₃, mais aux dépens de l'ammonium natif pré-existant ou produit par ammonification. C'est un effet de substitution de pool.

Si l'on tient compte de ces trois aspects, on peut recalculer les quantités réellement organisées dans les trois sols étudiés avec glucose, en tenant compte des schémas suivants :



Hypothèse : L'organisation affecte le pool NH_4 au fur et à mesure de sa production par la minéralisation brute. Puisque les besoins de l'organisation sont élevés et que la vitesse d'organisation est supérieure à la vitesse de nitrification, les quantités de NH_4 nitrifiés sont très faibles



Hypothèse : L'organisation porte quasi-exclusivement sur le pool ammoniacal (excédentaire par rapport aux besoins de l'organisation). Il n'y a pas d'organisation du pool NO_3

Dans le cas de l'apport de $^{15}\text{NO}_3^-$, on peut alors écrire :

$$\Delta \text{NH}_4 = m_b - o$$

d'où $o = m_b - \Delta \text{NH}_4$

Pour l'expérience menée avec les trois sols, et les traitements AS, KN, G-AS et G-KN, il est possible de faire les calculs suivants:

* Pour évaluer l'organisation de l'ammonium (o), il est nécessaire de déterminer la minéralisation brute des sols (mb). Cette minéralisation brute est appréciée sur les témoins sans glucose en supposant qu'elle est identique sur les deux traitements : dans ces témoins on a $m_b = m_n + i$ (mn étant la minéralisation nette et i étant l'organisation brute de l'azote).

* NH_4 est mesuré sur les traitements G-KN.

On obtient alors, pour la période 0-6 jours :

sol	Mesuré dans le témoin			Mesuré avec glucose	
	m_n	i	m_b	NH_4	o
Bourguignon	0,7	1,8	2,5	+0,7	1,8
Etrepilly	0,2	2,0	2,2	-0,1	2,3
Livry	2,2	1,5	3,7	-2,0	5,7

Si l'on reprend le tableau 27, on peut ainsi recalculer les quantités d'azote organisé au cours de l'incubation :

	Bourguignon		Etrepilly		Livry	
	G-AS	G-KN	G-AS	G-KN	G-AS	G-KN
Organisation mesurée (o')*	24,4	21,6	23,2	23,1	24,1	17,8
Organisation NH_4 natif (o)	-	1,8	-	2,3	-	5,7
Total	24,4	23,4	23,2	25,4	24,1	23,5

Tableau 31 : Calcul des quantités d'azote réellement organisées (mg N.kg^{-1} terre sèche), en tenant compte de l'organisation de l'azote ammoniacal natif du sol.

* l'azote rétrogradé (mesure t=0) a été déduit

Nous concluons donc à l'absence d'écart significatif de rendement entre les deux formes d'azote, pouvant être appréciée à notre échelle de travail.

Ces aspects n'ont pas toujours été pris en compte dans l'interprétation des écarts obtenus entre formes d'azote. En particulier Ahmad et al (1972) obtiennent des différences systématiques entre traitements ammoniacal et nitrique, différences qu'ils attribuent au coût énergétique supérieur de l'assimilation du nitrate.

Une organisation moindre pour les sols de Bourguignon, Livry et Etrépilly comparée au sol de Mons a été observée: l'organisation est respectivement de 48 et 60 mg N.g⁻¹ C apporté sous forme de glucose. Nous formulons l'hypothèse que l'utilisation d'une partie du glucose dans les processus de dénitrification a limité l'organisation dans ces trois premiers sols.

Nous avons enfin observé que l'organisation s'effectue pratiquement au même rythme quelque soit la vitesse de nitrification du sol : il n'y a pas eu plus d'organisation de l'azote marqué dans le sols qui ont nitrifié plus lentement. Ceci résulte du poids prépondérant du carbone (quantité, nature) sur le rythme et l'intensité de l'organisation.

Ainsi la vitesse d'organisation de l'azote ne parait pas un critère de discrimination entre les sols, avec ou sans apport de carbone. Ceci se conçoit relativement bien si l'on considère la grande diversité des populations microbiennes impliquées dans l'assimilation. Par contre les processus de (re)minéralisation, non abordés dans cette étude, sont beaucoup plus dépendants des caractéristiques des sols : ils vont être notamment liés à la capacité de protection des sols vis-à-vis de la biomasse microbienne (Ladd et al 1981, Chaussod et al 1986).

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

Les résultats que nous avons obtenus confirment notre hypothèse de départ à savoir qu'une prise en compte des phénomènes d'organisation permet une meilleure compréhension de l'utilisation de l'engrais par la plante.

L'étude menée en sol cultivé a permis d'observer l'organisation de l'azote après un apport en fonction notamment de la forme d'apport et de la situation pédo-climatique.

L'organisation préférentielle de l'ammonium est observée systématiquement dans tous les essais au champ, dans les premiers jours qui suivent les apports d'azote : on constate alors une vitesse plus faible de l'organisation du nitrate. Cela se traduit dans de nombreux cas par des quantités maximales organisées plus faibles, aux dépens de la forme nitrate. Cependant nous n'avons pas pu mettre en évidence de relation généralisable entre le coefficient d'utilisation et le taux d'organisation de l'azote. Cela résulte de l'existence de pertes gazeuses (volatilisation, dénitrification) qui, dans certaines circonstances, se sont avérées beaucoup plus élevées que ne l'avaient laissé penser les travaux antérieurs.

Nous avons pu constater, lors de l'étude de l'assimilation des formes ammoniacale et nitrique par les micro-organismes hétérotrophes du sol, que les différences d'organisation entre les deux formes ne peuvent pas être expliquées par un déséquilibre quantitatif des populations aptes à assimiler soit l'une soit l'autre de ces formes. En effet, la totalité des micro-organismes est capable d'assimiler l'ammonium et la grande majorité des micro-organismes est susceptible d'assimiler le nitrate.

Nous n'avons pas mis en évidence de différences de rendement d'organisation entre les deux formes, et le coût énergétique de l'assimilation du nitrate ne paraît donc pas, lui non plus, rendre compte des différences d'organisation observées.

Cependant lorsque le nitrate et l'ammonium sont disponibles simultanément et au même endroit, le fonctionnement physiologique de la microflore provoque invariablement une organisation quasi-exclusive de l'ammonium : nous avons observé ce phénomène à des degrés divers de complexité des systèmes : culture en milieu liquide de micro-organismes isolés, culture d'une population mixte, incubations de sols en conditions contrôlées. La régulation de l'assimilation du nitrate en présence d'ammonium paraît très stricte : elle se produit même pour des concentrations en nitrate très supérieures aux concentrations en ammonium.

Compte-tenu des conditions expérimentales dans lesquelles nous avons opéré et de la convergence de ces résultats avec ceux disponibles dans la bibliographie, ce processus nous paraît généralisable et nous permet d'expliquer de manière satisfaisante une partie des observations faites en sol cultivé.

Ce fonctionnement induit des effets qu'il est important de prendre en compte, tant pour l'interprétation des résultats expérimentaux que pour la modélisation du cycle "interne" de l'azote dans le sol :

* lorsque dans un milieu comme le sol, ammonium et nitrate sont simultanément présents, l'organisation affecte davantage ou exclusivement l'ammonium. Le taux respectif d'organisation va dépendre de la quantité de carbone assimilable disponible, le nitrate étant organisé après que l'ammonium ait disparu du milieu. En contre-partie, inévitablement le nitrate est potentiellement plus disponible pour les autres processus et en particulier pour l'absorption par la plante.

* l'interprétation des résultats N15 doit tenir compte de manière rigoureuse des phénomènes de substitution de pool qui découlent de ce mode de fonctionnement : l'ammonium natif minéralisé est préférentiellement organisé par rapport au nitrate marqué; il en résulte une plus faible organisation du nitrate en termes de proportion de l'apport et une sous-estimation de la minéralisation de l'azote natif.

* la modélisation des flux d'azote devra tenir compte également de ce mode de fonctionnement de l'organisation lié étroitement à la présence simultanée de deux pools d'azote minéral et à leur localisation respective.

Pour accéder à une explication générale des faits observés à divers niveaux de complexité (sol cultivé, sol nu), nous avons jugé nécessaire de recourir à une étude du fonctionnement des micro-organismes. Compte-tenu de la diversité des populations impliquées dans l'assimilation, notre option méthodologique a été d'étudier de manière non spécialisée les capacités potentielles d'une population isolée du sol. Ce choix s'est avéré justifié : il nous a permis, par la mise en oeuvre de moyens relativement simples, d'établir deux points essentiels : d'une part la capacité des populations à utiliser l'une ou l'autre forme d'azote minéral; d'autre part le contrôle de l'assimilation du nitrate par l'ammonium.

La seule étude de la bibliographie, qui présente essentiellement des travaux portant sur des micro-organismes particuliers, n'aurait pas permis d'extrapoler ce fonctionnement. Il est cependant à noter que les résultats de ces travaux confirment ceux que nous avons obtenus.

Les protocoles au champ ont bien répondu à notre attente en ce qui concerne l'effet de la forme d'apport sur l'organisation et l'utilisation. L'espacement des mesures et leur positionnement dans le temps nous ont effectivement permis de prendre en compte l'évolution des pools ammonium et nitrate dans le sol et de cerner les premières étapes de transformation.

Les quantités d'azote organisé à partir de l'engrais sont apparues paradoxalement constantes à la floraison, quelles que soient la forme (urée ou nitrate d'ammonium) et la situation expérimentale. Ceci résulte probablement d'une double compensation: dans le temps, parce que l'organisation se prolonge au delà de la période de nitrification; dans l'espace, parce qu'elle se produit également en profondeur aux dépens de la forme nitrate, seule mobile.

Cependant, la relative constance des quantités organisées, constatée sur 4 situations, ne peut être considérée comme un résultat stable et définitivement établi. Les dispositifs et protocoles expérimentaux utilisés ne nous permettent pas d'en expliciter les causes. A cet égard, il faut noter les écarts très importants de dynamique d'organisation entre 2 apports réalisés sur le même essai mais à des dates différentes. Cet effet date d'apport renvoie à la variation simultanée de plusieurs facteurs tels que carbone disponible, stade de la culture, conditions climatiques. La compréhension du processus d'organisation au champ et de ses conséquences passera nécessairement par un découplage de ces différents facteurs dont les effets, dans nos situations expérimentales d'observation, sont subis et confondus.

La prise en compte de l'organisation pourrait déboucher sur une amélioration des pratiques culturales, des prescriptions de fumure et de la gestion des résidus de récolte. Pour y parvenir, nous pensons qu'un concept à la fois explicatif et prédictif à introduire serait un "potentiel d'organisation", variable dans le temps, et qui dépendrait :

- de la quantité, de la nature, de l'état de décomposition, de la répartition dans le profil, des résidus ;
- de l'état de développement du système racinaire de la culture en place, dont dépend l'exsudation et le renouvellement des racines ;

Pour caractériser ce potentiel, nous pensons que, parallèlement à la poursuite d'expérimentations au champ, il est nécessaire de mieux quantifier les interactions Carbone-Azote par des études en conditions contrôlées.

Ce potentiel d'organisation serait à confronter d'une part à la disponibilité en azote minéral, d'autre part au potentiel d'absorption de la culture en place pendant un intervalle de temps déterminé. On pourrait déboucher alors sur une possibilité de prévision des risques de carence temporaire en azote.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Adu KJ et Oades JM 1978 Utilization of organic materials in soil aggregates by bacteria and fungi. *Soil Biol.-Biochem*, 10, 117-122.
- Ali AH et Hipkin CR 1985 Nitrate assimilation in the Basidiomycete yeast Sporobolomyces roseus. *J. of Gen. Microbiol.*, 131, 1867-1874.
- Ali AH et Hipkin CR 1986 Nitrate assimilation in Candida Nitratophila and other yeasts. *Arch. Microbiol.*, 144, 263-267
- Ahmad Z, Kai H et Harada T 1969 Factors affecting immobilization and release of nitrogen in soil and chemical characteristics of the nitrogen newly immobilized. II-Effect of carbon sources on immobilization and release of Nitrogen in soil. *Soil Sci. and Plant Nutr.*, 15, 6, 252-258
- Ahmad Z, Kai H, Harada T 1972 Effect of nitrogenous forms on immobilization and release of nitrogen in soil. *J. Pac. Agric. Kyushu Univ.*, 17, 49-65
- Aulakh MS et Rennie DA 1984 Transformations of fall-applied ¹⁵N labelled fertilizers. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 48, 1184-1189
- Azam F, Malik KA et Hussain F 1986 Microbial biomass and mineralization-immobilization of nitrogen in some agricultural soils. *Biol. Fertil. Soils*, 2, 157 - 163.
- Barraclough PB et Leigh RA 1984 The growth and activity of winter wheat roots in the field; the effect of sowing date and soil type on root-growth of high-yielding crops. *J. Agric. Sci. Camb.* 103, 59-74
- Betlach HR, Tiedje JM et Firestone RB 1981 Assimilatory nitrate uptake in Pseudomonas fluorescens studied using Nitrogen 13. *Arch. Microbiol.*, 129, 135-140.
- Bjarnason S 1987 Immobilization and remineralization of ammonium and nitrate after addition of different energy sources to soil. *Plant and Soil*, 97, 381-389
- Boniface R, Fardeau JC, Guiraud G et Trocme S 1979 Utilisation du phosphore et de l'azote appliqué en couverture sur blé. Etude à l'aide d'éléments marqués. *Agrochem. XXIII*, 3-4, 165-178
- Bouwmeester RBJ, Vlek PLG et Stumpe JM 1985 Effect of Environmental Factors on ammonia volatilization from urea-fertilized soil *Soil Sc. Soc. Am. J.*, 49, 376-381
- Boyd SA et Mortland MM 1985 Urease activity on a clay-organic complex. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 49, 619 - 622.
- Bremner JM 1965a Total nitrogen in *Methods of Soil Analysis*. Black CA et al, American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, USA, 1149-1178

- Broadbent FE 1965 Effect of fertilizer nitrogen on the release of soil nitrogen. Soil Sc. Soc. Proc. 692 - 696.
- Broadbent FE et Nakashima T 1968 Plant uptake and residual value of six tagged nitrogen fertilizer. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 32, 388-392
- Brown CM 1980 Ammonia assimilation and utilization in bacteria and fungi. in Microorganisms and nitrogen sources. JW Payne Editor, John Wiley and Sons Ltd, 511-437
- Brown CM, Mac Donald-Brown DS et Meers JL 1974 Physiological aspects of microbial inorganic nitrogen metabolism. Adv. Microbiol. Physiol., 11, 1-52
- Brownlee AG et Herbert NA 1983 Nitrate uptake in Aspergillus nidulans and involvement of the third gene of the nitrate assimilation gene cluster. J. of Bacteriology, 1138 - 1146.
- Bruinenberg PH, Van Dijken et Scheffers WA 1986 A radiorespirometric study on the contribution of the Hexose Monophosphate Pathway to glucose metabolism in Candida utilis CBS 621 grown in glucose-limited chemostat cultures. J. of General Microb., 132, 221-229
- Buresh RJ, Vlek PLG et Stumpe JM 1984 Labeled nitrogen fertilizer research with urea in the semi-arid tropics Plant and Soil, 80, 3-19
- Burns RG 1982 Enzyme activity in soil : Location and a possible role in microbial ecology. Soil Biol. Biochem., 14, 423-427.
- Campbell CA et Paul EA 1978 Effects of fertilizer N and soil moisture on mineralization, N recovery and A values under spring wheat grown in small lysimeters. Can J. Soil Sci. 58, 39-51
- Campbell CA, Myers RJR, Catchpole VR, Valles I et Weier KL 1984 Laboratory study of transformation and recovery of Urea-Nmin tree Queensland soils. Aust. J. Soil Res., 22, 433 - 441.
- Chabaliier PF, Guiraud G, Pichot J et Remy JC 1975 Evolution de l'azote des engrais dans les sols cultivés: utilisation de l'azote 15" C.R. fin d'études IRATCU-INRA-CEA, 147p
- Chaussod R, Nicolardot B, Catroux G et Chrétien J 1986b Relations entre les caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques de quelques sols cultivés. Science du sol, 2, 213-226
- Christensen S et Tiedje JM 1988 Denitrification in the field, analysis of spatial and temporal variability . Proceedings of the CEC Seminar "Nitrogen Efficiency in Agricultural Soils", Edinburgh 16-18 Sept. 1987, sous presse
- Connolly MG, O Toole P et Morgan MA 1980 Urease activities and comparative transformations of urea and ammonium nitrate in some Irish soils under laboratory and glasshouse conditions. J. Life Sci. Dubl. Soc. 1, 157-165

- Cove DJ et Pateman JA 1969 Autoregulation of the synthesis of nitrate reductase in Aspergillus nidulans. J. of Bacteriology, 97, 3, 1374-1378
- Cove JA 1976 Microbial gas metabolism. Adv. Microbial Physiol. 14, 1 - 92.
- Dalton H 1979 Utilization of inorganic nitrogen by microbial cells. in International Review of Biochemistry, JR Quayle Editor, Microbial Biochemistry, 21, 226-266
- Dev G et Rennie DA 1979 Isotope studies on the comparative efficiency of nitrogenous sources. Aust. J. Soil Res. 17, 155-162
- Domenach MM 1987 Estimation de la fixation symbiotique chez des plantes herbacées et ligneuses : utilisation et validité de la méthode basée sur la mesure des abondances isotopiques naturelles de l'azote. Thèse Doctorat d'Etat, Lyon, 193 p.
- Dorich RA et Nelson DW 1983 Direct colorimetric measurement of ammonium in potassium chloride extracts of soils. Soil Sci. Soc. Am. J., 47, 883-836
- Dowdell RJ et Cress R 1980 The uptake of ¹⁵N-labelled fertilizer by winter wheat and its immobilization in a clay soil after direct drilling or ploughing. J. Sci. Food Agric., 31, 992-996
- Dunn-Coleman NS et Pateman JA 1977 Mol. Gen. Genet. 152, 285-293
- Dunn-Coleman NS, Smarrelli J, Garrett RH 1984 Nitrate assimilation in eukaryotic cells. Intern. Rev. of Cytology, 92, 1 - 50.
- Faurie G, Bardin R, 1979a La volatilisation de l'ammoniac.
I - Influence de la nature du sol et des composés azotés. Ann. Agron. 4.
- Faurie G, Bardin R, 1979b La volatilisation de l'ammoniac.
II - Influence des facteurs climatiques et du couvert végétal. Ann. Agron., 5.
- Faurie G 1980 Devenir de l'ammonium en sol calcaire: nitrification et volatilisation de l'ammoniac. Thèse d'état, Lyon I, 220p.
- Farquhar GD, Wetselaar R et Weir B 1983 Gaseous nitrogen losses from plants in Gaseous Loss of Nitrogen from Plant-Soil Systems. EDS Freney JR et Simposon JR, pp 159-180, Martinus Nijhoff publishers, The Hague, The Netherlands
- Fearon WR 1939 Cx the carbamido diacetyl reaction : a test for citrulline. Biochem., 902 - 907.
- Fresneau C 1982 Contribution à l'étude du devenir de l'urée en sol de limon et en sol calcaire. Thèse d'Université Lyon I, 131 p.
- Friedrich B et Magasanik B 1977 Urease of Klebsiella aerogenes. Control of its synthesis by glutamine synthetase. J. of Bacteriol., 446-452

- Germon JC, Couton Y, Catroux G et Guiraud 1983 Etude des paramètres contrôlant la dénitrification dans les sols cultivés. Convention de recherche 81-283. Ministère de l'environnement Paris, 23p
- Germon JC, Couton Y, Jacques D, Guiraud G et Catroux G 1985 Etude de la dénitrification dans les sols cultivés; effets des facteurs pédologiques, climatiques et culturaux. C.R. congrès "Les nitrates dans les eaux", Paris, 101-108
- 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 d'état, Université PM. Curie, Paris, 335p.
- Guiraud G, Christmann J, Lindemann Y et Marol C 1986 Utilisation de l'azote 15 dans les études sur betterave sucrière. C.R. Acad. Agric. Fr. 72, 5, 439-446
- Harper LA, Sharpe RR, Langdale GM et Giddens JE 1987 Nitrogen cycling in a wheat crop : soil, plant and aerial nitrogen transport. Agron. J., 79, 965 - 973.
- Hart PBS, Rayner JH et Jenkinson DS 1986 Influence of pool substitution on the interpretation of fertilizer experiments with 15 N. J. Soil Sci. 37, 389-403
- Hauck RD et Bremner JM 1976 Use of tracers for soil and fertilizer nitrogen research. Adv. Agron., 28, 219 - 261.
- Hebert J 1975 Données récentes sur la fertilisation du blé. Journée nationale d'information sur les techniques nouvelles de production du blé, ITCF
- Henriksen A et Selmer-Olsen A 1970 Automatic methods for determining nitrate and nitrite in water and soils extracts. Analyst, 95, 514-518
- Hooker ML, Sander DH, Peterson GA et Daigger LA 1980 Gaseous N losses from Winter Wheat. Agron. J. 72, 5, 789-792
- Inubushi K et Watanabe I 1987 Microbial biomass nitrogen in anaerobic soil as affected by N immobilization and N_2 fixation
- Jansson SL 1958 Tracer studies on nitrogen transformations in soil with special attention to mineralization-immobilization relationships. Kungl. Lantbrukshögskolans annaler, 24, 101-361
- Jansson SL, Hallam MJ et Bartholomew WV 1955 Preferential utilization of ammonium over nitrate by micro-organisms in the decomposition of oat straw. Plant and Soil, VI, 382 - 390.
- Jansson SL et Persson J 1982 Mineralization and immobilization of soil nitrogen. In Nitrogen in Agricultural Soils. Ed. PJ Stevenson, 229 -252.

- Jenkinson DS et Powelson DS 1976 The effect of biocidal treatments on metabolism in soil. V- A method for measuring soil biomass. *Soil Biol. Biochem.*, 8, 209-213
- Jenkinson DS, Fox RL et Rayner JH 1985 Interactions between fertilizer nitrogen and soil nitrogen - the so-called priming effect. *J. Soil Sci.* 36, 425-444.
- Kai H, Ahmad Z et Harada T 1973 Factors affecting immobilization and release of nitrogen in soil and chemical characteristics of the nitrogen newly immobilized. *Soil Sci. Plant Nut.*, 19 (4), 275-286
- Kelley KR et Stevenson FJ 1987 Effects of carbon Source on immobilization and chemical distribution of fertilizer-nitrogen in Soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 51, 946-951
- Klemedtsson L, Berg P, Clarholm M et Schnürer 1987 Microbial nitrogen transformations in the root environment of Barley. *Soil Biol. Biochem.*, 19, 551 - 558.
- Koreishi T et Hino S 1984 Assimilatory nitrate reductase of some soil bacteria. *J. Gen. App. Microbiol.*, 30, 317-327
- Kubat B, Novak B, Kralova M et Drazdak K 1981 The process of nitrogen immobilization in soil at various temperatures. *Zblat. Bakt.*, 136, 543-547
- Kumar V et Wagenet RJ 1984 Urease activity and kinetics of urea transformation in soils. *Soil Sci.* 137, 4, 263-269
- Ladd JN et Paul EA 1973 Changes in enzymic activity activity and distribution of acide-soluble, amino acid-nitrogen in soil during nitrogen immobilization and mineralization. *Soil Biol. Biochem.*, 5, 825-840
- Ladd JN, Oades JM, Amato M 1981 Microbial biomass formed from ¹⁴N, ¹⁵N labelled plant material decomposing in soils in the field . *Soil Biol. Biochem.*, 13, 119-126
- Lewis OAM, Soares MIM et Lips SH 1985 A photosynthetic and ¹⁵N investigation of the differential growth response of barley to nitrate, ammonium and nitrate+ammonium nutrition. in "Fundamental, Ecological and Agricultural Aspects of Nitrogen Metabolism in Higher Plants" . Eds H Lambers, JJ Neeteson and P Stulen, Martinus Nijhoff publishers, pp 295-301
- Lhotellier H et Ségard E 1983 Dynamique de l'urée : Etude comparée en sols cultivés. Utilisation de l'azote 15. Rapport de stage COFAZ/INRA, 62 p.
- Lyster S, Morgan MA, O'Toole P 1980 Ammonia volatilization from soils fertilized with urea and ammonium nitrate. *J. Life Sci. R. Dubl. Soc.*, 1, 167 - 176

- Machet JM, Pierre D, Recous S et Remy JC 1987 Signification du coefficient réel d'utilisation et conséquences pour la fertilisation azotée des cultures. CR Acad.Agric.Fr. 73,3,39-57
- Mahli SS et Nyborg M 1983 Field study of the fate of fall-applied ¹⁵N-labelled fertilizers in three Alberta soils. Agron J. 75, 71-74
- Mariotti A 1982 Apports de la géochimie isotopique à la connaissance du cycle de l'azote. Thèse d'Etat. Univ.Paris VI, 476 p.
- Marschner H et Römheld V 1983 In vivo measurement of root-induced pH changes at the soil-root interface : Effect of plant species and nitrogen source. Z. Pflanzen Physiol. Bd., 111 S, 241-251.
- Marschner H, Römheld V, WJ Horst et Martin P 1986 Root-induced changes in the rhizosphere : Importance for the mineral nutrition of plants. Z. Pflanzenernaehr. Bodenk., 149, 441-446.
- Marshall RB et Whiteway JN 1985 Automation of an interface between a nitrogen analyser and a isotope ratio mass spectrometer . Analyst, 110, 867-887
- Martens R 1987 Estimation of microbial biomass in soil by the respiration method : importance of soil pH and flushing methods for the measurement of respired CO₂. Soil Biol.Biochem., 19, 1, 77-81
- Mary B 1979 Principe du dosage du CO₂ par absorption dans la soude NaOH, Document interne INRA
- Mary B 1987 Rôle des résidus de récolte dans la disponibilité en azote minéral. C.R. contrat 2535A, Ministère de l'environnement, 18p
- Mary B, Recous S et Machet JM 1988 A comprehensive approach to the fertilizer part of plant nitrogen uptake. Proceedings of the CEC seminar "Nitrogen Efficiency in Agricultural Soils", Edinburgh, 16-18 Sept. 1987, sous presse
- Mc Duff JH et Hopper MJ 1985 Effects of root temperature on uptake of nitrate and ammonium ions by barley grown in a flowing-solution culture. in Fundamental, Ecological and Agricultural Aspects of Nitrogen Metabolism in Higher Plants. Eds H Lambers, JJ Neeteson and P Stulen. Martinus Nijhoff publishers, pp 37-41
- Mc Millan A 1954 The entry of Ammonia into Fungal cells. J. of Experimental Botany, 7, 19, 113-126
- Meynard JM, Boiffin J, Caneill J, Sebillotte M 1981 Elaboration du rendement et fertilisation azotée du blé d'hiver en Champagne Crayeuse. II-Types de réponse à la fumure azotée et application de la méthode du bilan prévisionnel. Agronomie, 1, 9, 795- 806.
- Morton AG et Mac Millan A 1953 The assimilation of nitrogen from ammonium salts and nitrate by fungi. J. Exp. Bot., 5, 232-252

- Mulvaney RL et Bremner JM 1979 A modified diacetyl monoxime method for colorimetric determination of urea in soil extracts. *Commun. in Soil Sci. and Plant Anal.* 10, 8, 1163-1170
- Nannipieri P, Johnson RL, Paul EA 1978 Criteria for measurements of microbial growth and activity in soil. *Soil Biol. Biochem.*, 10, 223 - 229.
- Nannipieri P, Miccini L, Ciardi C 1983 Microbial biomass and enzyme activities, production and persistence. *Soil Biol. Biochem.*, 15 (6), 679 - 686.
- Nannipieri P, Ciardi C et Palazzi T 1985 Plant uptake, microbial immobilization and residual soil fertilizer of urea nitrogen in a grass-legume association. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 49, 452-457
- Nicholas DJD 1965 Utilization of inorganic nitrogen compounds and amino acids by Fungi. *in* "The Fungi" vol.1 The fungal cell. Ed. EC Ainsworth. AS Sussan, Academic Press, 1965.
- Nielsen NE et Jensen HE 1986 The course of nitrogen uptake by spring barley from soil and fertilizer nitrogen. *Plant and Soil*, 91, 391-395
- Nielsen NE, Schjorring JK et Jensen HE 1988 Efficiency of fertilizer nitrogen uptake by spring barley. Proceedings of the CEC Seminar "Nitrogen Efficiency in Agricultural Soils" Edinburgh, 16-18 Sept. 1987, sous presse
- Nelson DW 1982 Gaseous losses of nitrogen other than through denitrification *in* Nitrogen in Agricultural Soils. *Agronomy n°22, FT Stevenson ed, ASA publishers, 327-358*
- Neeteson JJ, Greenwood DJ et Habets EJ 1986 Dependence of soil mineral N on fertilizer application. *Plant and Soil* 91, 417-420
- Nomik H et Vahtras K 1982 Retention and fixation of ammonium and ammonia in soils *in* Nitrogen in Agricultural Soils, *Agronomy 22, ASA-CSSA-SSSA, 123 - 171.*
- O'Deen WA et Porter LK 1987 Wheat volatilized ammonia and resulting N isotopic fractionation. *Annual Meetings from the American Society of Agronomy, ASA publishers, pp 211*
- Ohmori H, Ohmori K et Strotmann H 1977 Inhibition of nitrate uptake by ammonia in a Blue-green Alga, *Anabaena cylindrica*. *Arch. of Microbiology*, 114, 225 - 229.
- Okereke GV et Meints VM 1985 Immediate immobilization of labeled ammonium sulfate and urea nitrogen in soils. *Soil Sci.* 140, 2, 105-108
- Olson RV, Murhpy LS, Moser HC et Swallow CW 1979 Fate of napped fertilizer nitrogen applied to winter wheat. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 43, 973 - 975.

- Olson RV et Swallow CM 1984 Fate of labelled nitrogen fertilizer applied to winter wheat for five years. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 48, 583-586
- Olson RV 1987 Effect of field fertilizer practices on labelled ammonium nitrogen transformations and its utilization by winter wheat. *Plant and Soil*, 97, 189-200
- O'Toole P, Morgan MA et McAleese DM 1982 Effects of soil properties, temperature and urea concentration on patterns and rates of urea hydrolysis in some Irish soils. *Ir. J. agric. Res.* 21, 185-197
- O'Toole P et Morgan MA 1984 Thermal stabilities of urease enzymes in some Irish soils. *Soil Biol. Biochem.* 16, 5, 471 - 474.
- O'Toole P et Morgan MA 1988 Efficiency of fertilizer urea : the Irish experience. Proceedings of the CEC seminar "Nitrogen Efficiency in Agricultural Soils", Edinburg, 16-18 sept.87.
- Parkin TB 1987 Soil microsites as a source of denitrification variability. *Soil Soc. Am. J.*, 51, 1194 - 1199.
- Pateman JA, Dunn E, Kingborn JR et Forbes EC 1974 The transport of ammonium and methylammonium in wild type and mutant cells of Aspergillus nidulans. *Molec. Gen. Genet.*, 133, 225-236
- Pateman JA et Kinghorn 1976 Nitrogen metabolism. In *Filamentous Fungi*, 2, (JE Smith and D. Berry eds), Edward Arnold, London, 159 -237.
- Pateman JA, Dunn E et Mackay EM 1982 Urea and thiourea transport in Aspergillus nidulans. *Biochemical Genetics*, 20, 7-8, 777-790
- Paulson KN, Kurtz LT 1969 Locus of urease activity in soil. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 33, 897 - 901.
- Payne JW (Editor) 1980 *Microorganisms and Nitrogen sources*. John Wiley and Sons Ltd, 870 pp.
- Pichinoty 1964 A propos des nitrate-réductases d'une bactérie dénitrifiante. *Biochim. Biophys. Acta*, 89, 378 - 381.
- Pierre D et Bordes JP 1983 Etude de quelques facteurs influençant l'utilisation réelle des engrais azotés par des cultures de Blé, Maïs et Sorgho. *APC/ESAP*, 153 p.
- Pierre D et Castadere P 1984 Etude de quelques facteurs influençant l'utilisation réelle des engrais azotés par des cultures de Blé, Colza, Tournesol et Sorgho. *CDF Chimie AZF/ESAP*, 122 p.
- Pierre D et Decau ML 1985 Etude isotopique de la dynamique de l'azote sur Blé d'hiver. *CDF Chimie AZF/ESAP*, 125 p.
- Pochon et Tardieux 1962 *Techniques d'analyse en microbiologie du sol*. Editions de la Tourelle, St Mandé, 111 p.

- Powlson DS, Hart PBS, Pruden G et Jenkinson DS 1986 Recovery of ^{15}N -labelled fertilizer applied in autumn to winter wheat at four sites in Eastern England. *J.Agric.Sci.Camb.*, 107, 611-620.
- Powlson DS 1988 Measuring and minimizing losses of fertilizer nitrogen in arable agriculture. Proc. of the CEC seminar "Nitrogen Efficiency in Agricultural Soils", Edinburgh, 16-18 Sept. 1987, sous presse
- Powlson DS, Pruden G, Johnston AE et Jenkinson DS 1986 The nitrogen cycle in the Broadbalk wheat experiment: recovery and losses of ^{15}N -labelled fertilizer applied in spring and inputs of nitrogen from the atmosphere. *J.Agric.Sci.Camb.* 107, 591-609
- Raabo E et Terkildsen TC On the enzymatic determination of blood glucose. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 12, 402
- Rachhpal-Singh et Nye PH 1984 Diffusion of urea, ammonium and soil alkalinity from surface applied urea. *J. of Soil Sc.* 35, 529 - 538.
- Recous S 1983 Utilisation réelle de l'engrais azoté par une culture de blé. 4 années d'expérimentation avec l'azote 15. Etude INRA/ITCF, 57 p + annexes.
- Rennie DA et Fried M 1971 An interpretative analysis of the significance in soil fertility and fertilizer evaluation on ^{15}N labelled fertilizer experiments conducted under field conditions. *FAD/IAEA Division of Atomic Energy, Vienne*, 639 - 656.
- Rémy JC et Hébert J 1977 Le devenir des engrais azotés dans le sol. *C.R. Acad. Agric.*, 11, 700 - 714.
- Rémy JC et Viaux Ph 1982 The use of nitrogen fertilizers in intensive wheat growing in France. *Proc.Fertil.Soc. London*, 211
- Rémy JC, Revillon A et Viaux Ph 1983 Programme informatisé de calcul de la fumure azotée sur céréales à paille AZOTITCF/INRA. *Perspectives Agricoles*, 72, 26 - 33.
- Rémy JC 1985 Soil and fertilizer nitrogen utilization by the plant as estimated by the nitrogen utilization coefficient, and the significance of the A-value for nitrogen. Proc. of the symposium "Assesment of Nitrogen Fertilizer Requirement", Haren, 67-92.
- Revilla E, Cejudo PJ, Llobell A et Paneque A 1986 Short-term ammonium inhibition of nitrate uptake by Azotobacter chroococcum. *Arch Microbiol.*, 144, 187-190
- Revilla E, Llobell A et Paneque A 1986 Energy-dependence of the assimilatory Nitrate-réductase in Azotobacter chroococcum. *J. of General Microbiol.*, 132, 917-923
- Rice CW et Smith MS 1984 Short-term immobilization of fertilizer nitrogen at the surface of no-till and plowed soils. *Soil Sci. Soc.Am. J.* 48, 295-297

- Rittenberg D 1948 The preparation of gas sample for mass spectrographic isotope analysis. in DW Wilson, A.D.C., Nier, PS Rieman. Preparation and measurement of isotopic tracers, 31 -42. Edwards Ann. Abor. Mich.
- Roon RJ, Eren HL, Dunlop P and Larimore FL 1975a Methylamine and ammonia transport in Saccharomyces cerevisiae. J. Bacteriol. 122, 502 - 509.
- Salsac L, Chaillou S, Morot-Gaudry JF, Lesaint C, Jolivet E 1987 Nitrate and ammonium nutrition in plants. Plan Physiol. Biochen. 25 (6), 805 - 812
- Singh YP et Singh CP 1986 Effect of different carboneous compounds on the transformation of soil nutrients. I-Immobilization and mineralization of applied Nitrogen. Biologic. Agriculture and Horticulturæ, 4, 19-26
- Sims AP, Folkes BF et Bussey AH 1968 Mechanisms involved in the regulation of nitrogen assimilation in micro-organisms and plants. in Recents Aspects of Nitrogen Metabolism in plants (EJ Hewitt and CV Cutting Editors) 91-119
- Smith TL, Peterson GA et Sander DH 1983 Nitrogen distribution in roots and tops of winter wheat. Agron. J. 75, 1031-1036.
- Soubies L, Cadet R et Lenain M 1955 Recherches sur l'évolution de l'urée dans les sols et sur son utilisation comme engrais azoté. Annales Agronomiques VI, 997-1033
- Steele KH, Saunders MMH et Wilson AT 1980 Transformation of ammonium and nitrate fertilizers in two soils of low and high nitrification activity. J. of Agric. Res., 23, 305 - 312.
- Sumrada R., Gorski M et Cooper T 1976 Urea transport defective strains of Saccharomyces cerevisiae. J. of Bacteriol., 125, 1048-1056
- Tabatabai MA et Brenner JM 1972 Assay of urease activity in soils. Soil Biol. Biochem. 4, 479 - 487.
- Tempest DW et Neijssel OM 1978 Eco-physiological aspects of microbial growth in aerotic nutrient-limited environments. Adv. in Microbial Ecology, 2, 105 - 153.
- Terman GL 1979. Volatilization losses of nitrogen as ammonia form surface-applied fertilizers, organic amendements, and crop résidues. Adv. in Agron. 31, 189 - 223.
- Van Lierop W et Tran TS 1980 The comparative use of nitrate, ammonium and urea fertilizers by oats and wheat as determined by ¹⁵N techniques. Commun. in Soil and Plant analysis, 11, 3, 231-250

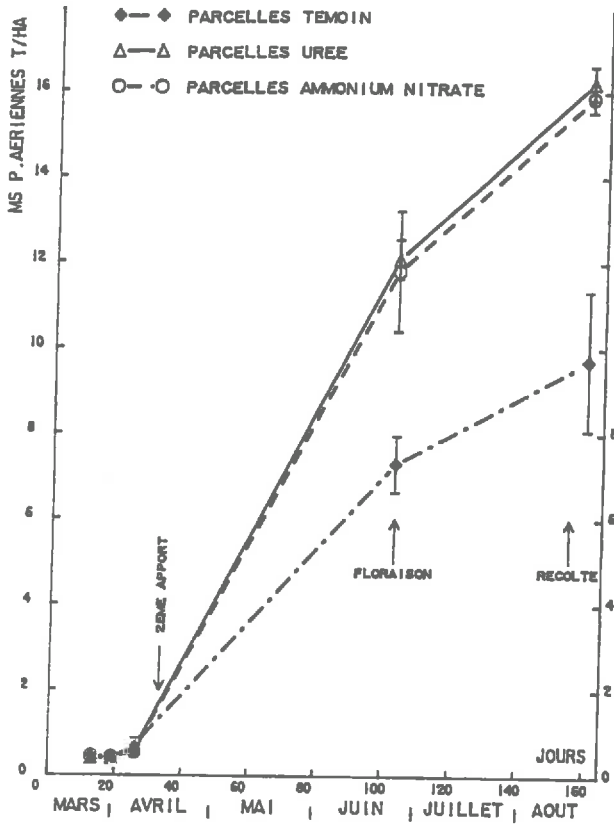
- Van Veen JA, Ladd JN et Amato M 1985 Turnover of carbon and nitrogen through the microbial biomass in a sandy loam and a clay soil incubated with (^{14}C (U)) glucose and $^{15}\text{N}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ under different moisture regimes. *Soil Biol. Biochem.*, 17 (6), 747-756.
- Verdow H 1977 Ammonia determination based on indophenol formation with sodiumsalicylate. *Water Research*, 12, 399-402
- Viaux Ph 1980 Fumure azotée des céréales d'hiver. *Perspectives Agricoles*, 43, 10 - 26.
- Viaux Ph et Lesire C 1981 Conservation des échantillons de sol en vue du dosage de l'azote minéral. Coll. "Humus - Azote", du 7 au 10 juillet 1981, Reims.
- Vlek PLG et Carter MF 1983 The effect of soil environment and fertilizer modifications on the rate of urea hydrolysis. *Soil Sci.* 136, 1, 56-63
- Westerman RL et Kurtz LT 1973 Priming effect of ^{15}N labelled fertilizers on soil nitrogen in field experiments. *Soil Sc. Soc. Am. Proc.*, 37, 725 - 727.
- Wetselaar R et Farquhar GD 1980 Nitrogen losses from tops of plants. *Adv. Agr.* 33, 263-302
- Wickramasinghe KN, Rodgers GA et Jenkinson DS 1985 Transformations of nitrogen fertilizers in soil. *Soil Biol. Biochem.* 17, 5, 625-630
- Zantua MI et Bremner JM 1976 Comparison of methods of assaying urease activity in soils. *Soil Biol. Bioch.* 7, 4/5, 291 - 295.
- Zantua MI et Bremner JM 1976 Production and persistence of urease activity in soils. *Soil Biol. Biochem.*, 8, 369 - 364.

ANNEXES

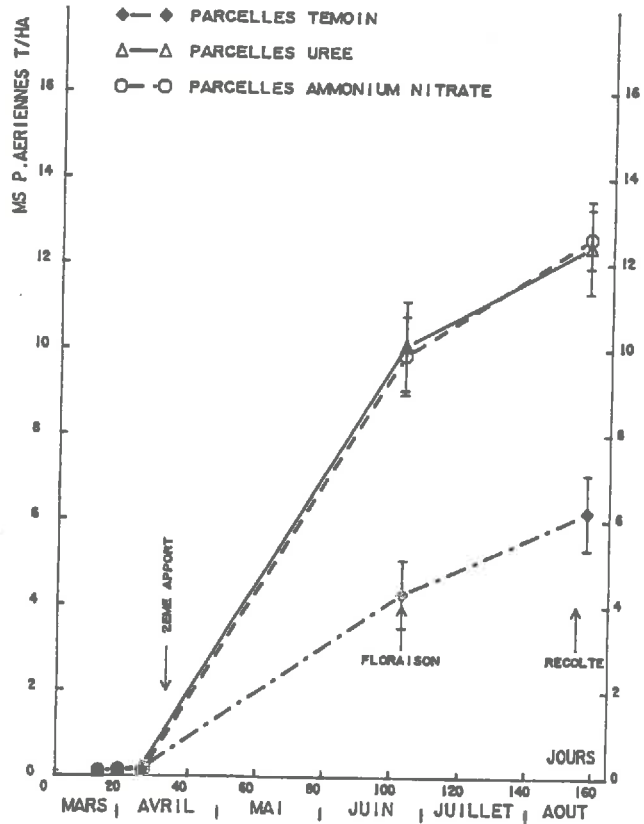
LISTE DES ANNEXES

Evolution des matières sèches des parties aériennes	183
Matière sèche et azote absorbé par les parties aériennes du blé à la récolte. Essais 1987	184
Matière sèche, N absorbé et C.R.U. des racines. Essais 1987	185
Dosage colorimétrique de l'urée	186
Composition des solutions pour la culture des microorganismes	187
Excès isotopiques de l'azote organique obtenus par minéralisation Kjeldahl et par combustion Dumas	188

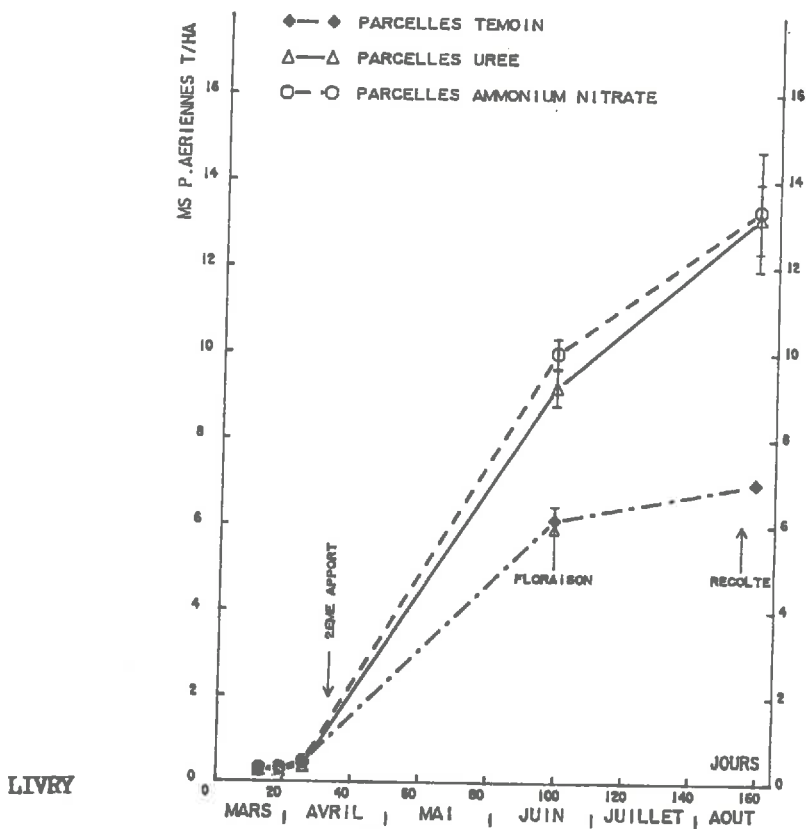
EVOLUTION DES MATIERES SECHES DES PARTIES AERIENNES



BOURGOIGNON



ETREPILLY



LIVRY

**MATIERE SECHE ET AZOTE ABSORBE PAR LES
PARTIES AERIENNES DU BLE A LA RECOLTE
ESSAIS 1987**

Traitement	Matière sèche totale t ha ⁻¹	N absorbé total kg ha ⁻¹	Rendement Grain 85% MS t ha ⁻¹	N Grain kg ha ⁻¹
Témoin	7.0 (0.05)	63.4 (2.8)	4.1 (0.06)	51.3 (2.5)
Urée	13.1 (0.8)	141.9 (1.2)	8.0 (0.5)	111.4 (2.7)
Ammonium nitrate	13.3 (0.9)	158.6 (11.9)	8.0 (0.6)	118.5 (9.6)

Essai de LIVRY LOUVERCY

Traitement	Matière sèche totale t ha ⁻¹	N absorbé total kg ha ⁻¹	Rendement Grain 85% MS t ha ⁻¹	N Grain kg ha ⁻¹
Témoin	9.7 (1.6)	78.1 (10.4)	4.9 (0.7)	63.4 (7.6)
Urée	16.2 (0.4)	179.2 (15.6)	6.9 (0.2)	127.5 (5.3)
NH ₄ NO ₃	15.9 (0.8)	167.9 (15.5)	7.1 (0.6)	126.1 (12.1)

Essai de BOURGUIGNON

Traitement	Matière sèche totale t ha ⁻¹	N absorbé total kg ha ⁻¹	Rendement Grain 85% MS t ha ⁻¹	N Grain kg ha ⁻¹
Témoin	6.2 (0.8)	70.7 (9.3)	2.9 (0.4)	51.0 (8.1)
Urée	12.4 (1.0)	142.2 (18.6)	5.6 (0.8)	93.3 (13.2)
NH ₄ NO ₃	12.6 (1.0)	149.5 (13.5)	5.5 (0.5)	94.3 (8.8)

Essai d'ETREPILLY

**MATIERE SECHE, N ABSORBE ET
C.R.U. DES RACINES ESSAIS 1987**

Traitement	Jours	Matière sèche t ha ⁻¹	Azote absorbé kg ha ⁻¹	C.R.U. racines %
T	26	0.17	3.0	-
	99	4.55	48.4	-
	159	1.91	27.4	-
*U	26	0.24	4.0	0.5
	99	5.64	72.2	12.5
	159	3.93	44.4	7.4
A*N	26	0.35	7.2	0.8
	99	4.36	59.8	19.9
	159	2.14	35.2	12.3
*AN	26	0.45	8.8	1.3
	99	4.13	55.0	8.8
	159	2.32	36.2	5.3

Essai de LIVRY LOUVERCY

Traitement	Jours	Matière sèche t ha ⁻¹	Azote absorbé kg ha ⁻¹	C.R.U. racines %
T	26	0.73	10.5	-
	103	3.98	37.3	-
	160	1.72	20.8	-
*U	26	0.62	11.1	2.0
	103	4.11	59.2	10.6
	160	2.60	54.2	9.1
A*N	26	0.46	7.4	1.6
	103	3.52	47.2	12.0
	160	3.47	50.8	12.6
*AN	26	0.35	5.6	0.8
	103	3.72	49.5	7.2
	160	3.56	54.8	9.0

Essai de BOURGUIGNON

Traitement	Jours	Matière sèche t ha ⁻¹	Azote absorbé kg ha ⁻¹	C.R.U. racines %
T	26	0.31	4.5	-
	103	3.26	38.8	-
	160	2.22	21.8	-
*U	26	0.28	4.5	1.5
	103	3.60	54.4	12.2
	160	3.29	43.7	8.4
A*N	26	0.30	4.5	1.8
	103	3.89	53.2	12.7
	160	3.66	43.0	9.7
*AN	26	0.25	4.4	2.6
	99	3.60	50.6	10.4
	159	3.21	49.0	10.5

Essai d'ETREPILLY

COMPOSITION DES SOLUTIONS POUR LA CULTURE DES MICROORGANISMES

Solution d'oligo-éléments

MnSO ₄ , 7 H ₂ O	0.8 g
ZnSO ₄ , 7 H ₂ O	0.6 g
CuSO ₄ , 7 H ₂ O	0.1 g
(NH ₄) ₂ TO ₇ O ₂₄ , 4 H ₂ O	0.2 g
CoSO ₄ , 7 H ₂ O	0.01 g

eau 1000 ml

Solution de citrate de fer

Acide citrique	1 g
Citrate ferrique	1 g

eau 100 ml

Solution de vitamines

Thiamine	10 mg
Acide Nicotinique	50 mg
Pyridoxine	50 mg

eau 100 ml

**Excès isotopiques de l'azote organique
obtenus par minéralisation Kjeldahl
et par combustion Dumas**

Dans l'expérience méthodologique (paragraphe 5 page 39) ont été comparé les excès isotopiques obtenus sur les échantillons ayant subi des extractions successives et un tamisage à 0,1mm (LT) et sur les échantillons de sol dosés directement (nLnT). Tous ces échantillons sont dosés:

- soit après minéralisation Kjeldahl (Kj)
- soit par combustion "Dumas" sur l'échantillon humide ou sec (ana humide, ana sec).

Traitement "non lavé-non tamisé" nLnT					Traitement "lavé-tamisé" LT			
	Kjeldahl	ana humide	ana sec	Kj/ana H	Kjeldahl	ana humide	ana sec	Kj/ana H
A.1	.0319	.0412	.0411	0.77	.0262	.0372	.0389	0.70
N.1	.0112	-	.0152	0.73	.0092	ND	.0120	0.76
A.2	.0419	.0434	.0472	0.96	.0306	.0320	.0326	0.95
N.2	.0210	.0233	.0217	0.90	.0162	.0097	.0100	1.74
C.V.	4.4 %	17.5%	5.5 %	-	4.1 %	7.2 %	5.8 %	-

Excès isotopiques (%) obtenus selon les différents traitements pour les échantillons A1, N1 et A2, N2

C.V : coefficient de variation

Excès isotopiques : les rapports des excès isotopiques Kj / ana h montrent que les excès isotopiques de l'azote organique sont plus faibles après une minéralisation Kjeldahl. L'échantillon N.2-LT ne suit pas cette règle ; les excès isotopiques obtenus à l'analyseur d'azote paraissent particulièrement faibles (le rapport nLnT/LT est faible comparé à celui des autres échantillons). Nous ne pouvons exclure une erreur méthodologique.

Il y a bonne concordance entre les excès isotopiques obtenus sur les échantillons secs et humides pour les terres tamisées et lavées. La variabilité des mesures est supérieure sur les échantillons humides.

Les coefficients de variation des excès isotopiques (moyenne des C.V. obtenus pour chaque traitement à partir de 3 échantillons) sont plus faibles par la minéralisation Kjeldahl (4 %). Les coefficients obtenus sur les excès isotopiques des échantillons nLnT humides sont élevés; ils rendent compte de l'hétérogénéité de l'échantillon dosé.

Si on effectue, par échantillon, 2 répétitions du dosage par l'analyseur, on diminue considérablement la variation.

La précision d'un dosage isotopique à l'analyseur d'azote peut donc être moins bonne que celle obtenue après une minéralisation Kjeldahl. Ceci est lié à la taille de la prise d'échantillon, compte tenu de l'hétérogénéité du marquage de la matière organique végétale ou du sol. Par exemple pour le sol, le poids de l'échantillon analysé est généralement de 500 à 1000 mg sol sec pour une minéralisation Kjeldahl, alors que la prise d'essai pour l'analyseur est de 30 à 50 mg de sol sec.

ANNEE : 1988

NOM DE L'AUTEUR : RECOUS SYLVIE

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I

RESUME :

La dynamique de l'organisation microbienne après un apport d'azote et son importance quantitative ont jusqu'à présent peu été décrits en conditions de plein champ.

Une première étape consiste à examiner s'il est possible de dégager une relation entre l'organisation microbienne de l'azote dans le sol et l'utilisation de l'azote par un peuplement de blé, en fonction notamment de la forme d'apport (^{15}N -urée, $^{15}\text{NH}_4\text{NO}_3$, $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$), de la date d'apport (tallage et début montaison) et de la situation pédo-climatique (4 sites d'expérimentation). La dynamique de l'azote dans le sol et la plante est décrite grâce à des prélèvements échelonnés entre l'apport d'azote et la récolte du blé. Une organisation préférentielle de l'ammonium est observée systématiquement dans tous les essais au champ, dans les premiers jours qui suivent les apports. Les quantités d'azote organisé aux dépens de l'apport réalisé au tallage du blé sont constantes pour les 4 sites étudiés ($15 \text{ kg N}\cdot\text{ha}^{-1}$ à la floraison), et plus variable entre les deux dates d'apport (respectivement 15 et $25 \text{ kg N}\cdot\text{ha}^{-1}$ à la floraison). Une relation généralisable entre le coefficient d'utilisation mesuré dans la plante entière et le taux d'organisation dans le sol n'est pas mise en évidence, en raison de l'existence de pertes gazeuses (volatilisation, dénitrification), parfois importantes.

Les études menées en conditions contrôlées (incubations de sol) montrent que l'organisation est réalisée uniquement aux dépens de la forme ammoniacale lorsque ammonium et nitrate sont simultanément disponibles, et que cette organisation préférentielle correspond à une inhibition de l'utilisation du nitrate en présence d'azote ammoniacal chez les micro-organismes du sol; ceci est démontré, en cultures pures, sur quelques souches bactériennes isolées du sol.

Les résultats confirment le rôle prépondérant de la quantité et de la nature du carbone assimilable disponible dans l'organisation de l'azote par les micro-organismes hétérotrophes du sol.

MOTS CLES :

Assimilation microbienne de l'azote minéral, azote 15 , blé, coefficient d'utilisation, dynamique de l'azote dans le sol, expérimentation au champ, fertilisation, organisation de l'azote