

CONTRIBUTION AU DOSAGE DE L'AZOTE MINÉRAL PAR MICRODIFFUSION ET COLORIMÉTRIE

par

J. SUSINI et C. N'GANDJUI *

avec la collaboration technique de **N. Ossamba ***

Plan

- A - Généralités
- B - Matériel
- C - Réactifs nécessaires
- D - Méthodes
 - 1 - Azote ammoniacal
 - gamme étalon
 - choix des conditions opératoires
 - agents de déplacement et temps de diffusion
 - diffusion
 - colorimétrie
 - tests de reproductibilité
 - essais avec différents anions
 - essais avec les amino-acides
 - 2 - Azote nitrique
 - 3 - Travail sur les sols
 - extraction
 - diffusion
 - colorimétrie
 - diffusion comparée
- E - Conclusions générales
- F - Bibliographie sommaire

*Jean SUSINI - chef du laboratoire des sols

Cyprien N'GANDJUI - adjoint au chef du laboratoire des sols

Nicolas OSSOMBA - aide-technique

Institut de Recherche Scientifique du Cameroun (I.R.C.AM.) - B.P. 193, Yaoundé.

A - GÉNÉRALITÉS

La méthode classique de dosage de l'azote minéral dans les sols et les végétaux présente de nombreux inconvénients. En effet, elle nécessite l'emploi de grandes quantités de produits ; une distillation, aussi douce soit-elle, provoque une attaque plus ou moins brutale par les bases, même faibles. Les modifications de YOVANOVITCH (3) et de KLEIN et TAUBOCK (3) demandent des manipulations compliquées ne permettant pas le travail en grande série. D'autre part, cette attaque plus ou moins brutale est une cause d'erreur due à une néoformation de l'ammoniac à partir des amino-acides du sol ou de toute substance contenant des protéines.

Dans cette étude nous nous proposons de déterminer séparément et simultanément l'azote ammoniacal et l'azote nitrique ; l'azote organique étant calculé par différence à partir de l'azote total dosé par la méthode Kjeldahl : minéralisation, distillation et volumétrie.

De nombreuses modifications sont apportées par différents auteurs au dosage de l'azote, adaptant la technique opératoire à des cas particuliers, améliorant sensiblement la précision des résultats (4) ; ainsi par microdiffusion suivie de nesslerisation, on dose 0,23 μ l d' NH_3 par centimètre cube, mais en faisant suivre la microdiffusion de la méthode de LUBOCHINSKY-ZALTA (7), on dose aisément 0,02 μ l d' NH_3 par centimètre cube de solution.

La méthode de LUBOCHINSKY-ZALTA retiendra plus particulièrement notre attention car elle permet un dosage à l'état de traces. La méthode peut être employée avantageusement dans l'étude de l'évolution de l'azote dans les sols des régions tropicales et équatoriales. En effet, dans ces régions, les sols sont soumis à des phénomènes atmosphériques incessants : orages de saisons chaudes se traduisant par un enrichissement en azote des sols et pluies abondantes de saisons humides provoquant un lessivage des sols.

Le principe du dosage de l'azote par microdiffusion est dû à SCHLOESING (8). Dès 1851, il a démontré qu'une dissolution aqueuse légèrement alcaline contenant de l'ammoniaque libre, exposée à l'air dans un vase large et sous une petite épaisseur, perd complètement son ammoniaque à la température ordinaire.

La méthode ne s'applique qu'aux substances volatiles et consiste à déplacer sélectivement les molécules du corps étudié d'une solution où leur tension est forte dans une solution où leur tension est nulle.

En 1885, FRESENIUS reprend la méthode pour le dosage de l'azote ammoniacal dans les substances organiques (5). La distillation ne permet pas de réussir un tel dosage, les lessives alcalines bouillantes attaquant aussi l'azote organique. Le procédé, tombé ensuite dans l'oubli, a été repris par E.J. CONWAY (4) et étendu en particulier dans le domaine biologique. Il a débordé ensuite le cadre de l'azote pour embrasser un grand nombre de substances volatiles (6) telles que les halogènes, les acides volatils, les composés organiques volatils, etc..

B - MATÉRIEL

Le matériel nécessaire est fort réduit. Depuis l'unité de diffusion de CONWAY, appelée aussi chambre à diffusion de CONWAY (fig. 1 a).

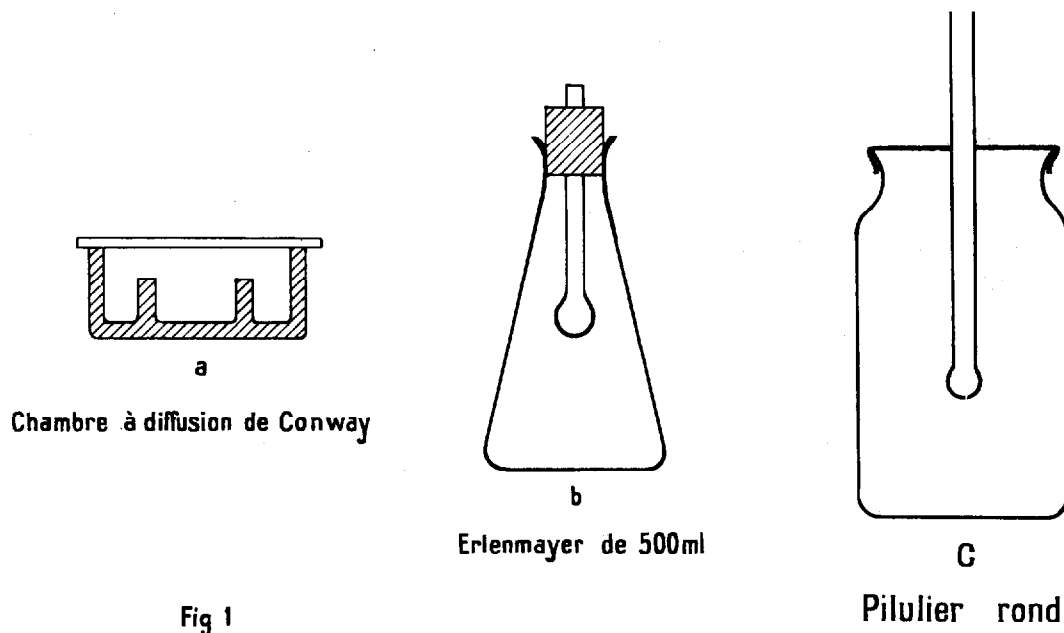


Fig 1

le matériel de micro-diffusion a subi des modifications. D'abord, les dimensions trop petites de l'unité de CONWAY, ne permettant la mise en diffusion que de très faibles volumes de solutions, (0,1 à 2 cc) ont été augmentées. Mais en raison de la nécessité d'agiter pour bien mélanger les réactifs, il se produisait bien souvent des contaminations entre le contenu de la chambre centrale et celui de la chambre externe. L'opération exigeait par conséquent de très nombreuses précautions pour être menée à bien. FERRY et BLACHERE (1) ont tourné la difficulté en employant un matériel complètement différent, le flacon dit pilulier rond (fig. 1 c) dont la fermeture est assurée par une cape en polythène ajustée sur un léger rebord. La cape est traversée en son centre par une tige d'agitateur en verre terminée par un bout arrondi qu'on trempe dans le réactif de fixation lors de la mise en diffusion. Contrairement à la chambre à diffusion, le pilulier ne nécessite aucun graissage. Par ailleurs, la chambre à diffusion est conçue plus particulièrement pour des dosages titrimétriques. En effet, le dosage colorimétrique exige un transfert dans une fiole jaugée et ce transfert est très malaisé lorsqu'on s'est servi de la chambre à diffusion.

Sur ce point, le pilulier, tout comme l'erlenmeyer que nous allons utiliser, a l'avantage de pouvoir permettre indifféremment des dosages titrimétriques ou colorimétriques. A en juger par les travaux de FERRY et BLACHERE (1), le pilulier permet d'obtenir des résultats satisfaisants. Nous avons adopté le même principe d'appareillage, mais en substituant au pilulier l'erlenmeyer de 500 cc (fig. 1 b).

Comme le pilulier, l'erlenmeyer est d'un maniement facile, commode et nécessite peu de soins. Il présente l'avantage majeur d'avoir une grande surface de base permettant alors la mise en diffusion d'une quantité appréciable de solution (1 à 10 cc) s'étendant sur une épaisseur de 0,03 à 0,25 cm. La fermeture de ce matériel de prix modique et d'un emploi courant dans tous les laboratoires, est assurée par un bouchon en caoutchouc muni d'un orifice central. Par cet orifice, on fait passer un agitateur en verre de diamètre suffisant pour assurer une fermeture hermétique. Le bout inférieur est arrondi en boule pour retenir le réactif de fixation du produit diffusé. Avant l'utilisation, l'erlenmeyer est soigneusement rincé à l'eau distillée ainsi que la partie de l'agitateur au-dessous du bouchon. Il est recommandé de laisser l'agitateur quelques secondes dans un mélange sulfochromique avant emploi. En effet, si la boule n'est pas bien propre, après trempage dans l'acide sulfurique, il ne se forme pas autour d'elle une pellicule uniforme d'acide et l'absorption de l'ammoniac diffusé par le liquide en étude est irrégulière. La position convenable pour une absorption correcte est celle où la boule se trouve à mi-hauteur de l'erlenmeyer, soit à environ 8 cm au-dessous du bouchon. Les autres positions essayées ont donné des résultats très divergents.

C - RÉACTIFS NÉCESSAIRES

- 1 - agent de fixation : acide sulfurique normal
- 2 - agent d'extraction : chlorure de potassium demi-normal
- 3 - agents de déplacement : carbonate de potassium en solution saturée ; mélange alcalin de CONWAY formé d'une partie de potasse à 40 % et de trois parties de carbonate de potassium à saturation
- 4 - agent de réduction : alliage de Dewarda R.P. en poudre pour analyses de composition Al 50 % Cu 45 % et Zn 5 % ; 1 g de cet alliage dégage 50 cc d'hydrogène
- 5 - réactif de LUBOCHINSKY-ZALTA pour la colorimétrie :
 - solution de phénate de sodium préparée en neutralisant à 30°, 5 g de phénol pur cristallisé blanc avec 2,5 g de soude caustique qu'on amène à 100 cc. Les 2,5 g de soude sont dissous avec le moins possible d'eau (25 à 50 cc) dans un bécher. On laisse refroidir jusqu'à 30° et on ajoute le phénol qu'on agite jusqu'à dissolution complète. On transvase en se servant d'un petit entonnoir dans une fiole jaugée de 100 cc. On rince le bécher avec de l'eau distillée et le rinçat est ajouté dans la fiole. On complète ensuite à 100 cc à l'aide d'une pissette. La solution est incolore. S'il apparaît la moindre coloration, il est nécessaire de refaire une autre solution.
 - solution de phosphate disodique M/5. Le phosphate disodique cristallise avec 12 molécules d'eau et a pour formule $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ de poids moléculaire 358,2. Pour un litre de solution, on prend le cinquième de ce poids, soit 71,65g de sel disodique
 - solution de nitroprussiate de sodium à 1/2 000 , préparée extemporanément à partir d'une solution à 1 %. La solution à 1 % est rouge orangé et la solution 1/2 000 presque incolore. Si la solution à 1 % présente une coloration différente de celle ci-dessus indiquée, il faut aussitôt refaire une solution fraîche
 - solution d'hypochlorite de sodium à 4° chlorométrique obtenue à partir d'une solution commerciale à 20-22° chlorométrique, la dilution se faisant au moment de l'emploi.

Les quatre solutions-mères entrant dans la composition du réactif de LUBOCHINSKY-ZALTA sont conservées à la glacière ou à défaut, dans une salle bien climatisée.

D - MÉTHODE

1 - Azote ammoniacal

Gamme étalon :

Nous avons établi une gamme étalon en prenant comme substance de référence le sulfate d'ammonium R.P. pour analyses de degré de pureté 99,5 - 100 %. Une solution à 1 g/l a été préparée. Au moment d'utilisation, on dilue 200 fois, 1 cc de la solution diluée contient 1,29 μ de NH_3 . La colorimétrie effectuée d'une part sur la solution sans diffusion et d'autre part après diffusion, donne des résultats identiques à ± 2 % près.

CHOIX DES CONDITIONS OPÉRATOIRES OPTIMUM

Cuves :

L'appareil utilisé est le spectrophotomètre JEAN et CONSTANT. Nous disposons de cuves de trois épaisseurs différentes : 10, 20 et 40 millimètres. Les essais effectués avec ces différentes cuves ont montré que seules les cuves de 20 millimètres permettent d'obtenir des résultats corrects et reproductibles pour des concentrations de 0 à 5 microgrammes environ d'ammoniac dans 25 cc ; les cuves de 10 et 40 millimètres donnant des résultats plus dispersés.

Longueurs d'onde :

La colorimétrie s'effectue en lumière monochromatique. La solution en étude est bleue et doit absorber normalement l'orangé. Afin de déterminer la zone exacte d'absorption maximum avec le plus de stabilité, nous avons étudié l'absorption dans une zone allant du jaune-orangé à l'orangé-rouge, soit de 5900 à 6500 Å. Les meilleurs résultats sont obtenus pour deux longueurs d'onde :

- 6200 Å, sensibilité 4 ou 5 et cellule C. A cette longueur d'onde on peut employer indifféremment la cellule A ou la cellule C ; les résultats sont sensiblement les mêmes, mais un tout petit peu plus faibles pour la cellule A ;
- 6500 Å, sensibilité 3 ou 4 et cellule C. A cette longueur d'onde, la cellule A ne peut plus être employée, sa zone de sensibilité allant des plus faibles longueurs d'onde à 6200 Å environ (note du constructeur du spectrophotomètre).

Tous les résultats de la figure 2 sont obtenus en opérant à 6200 Å.

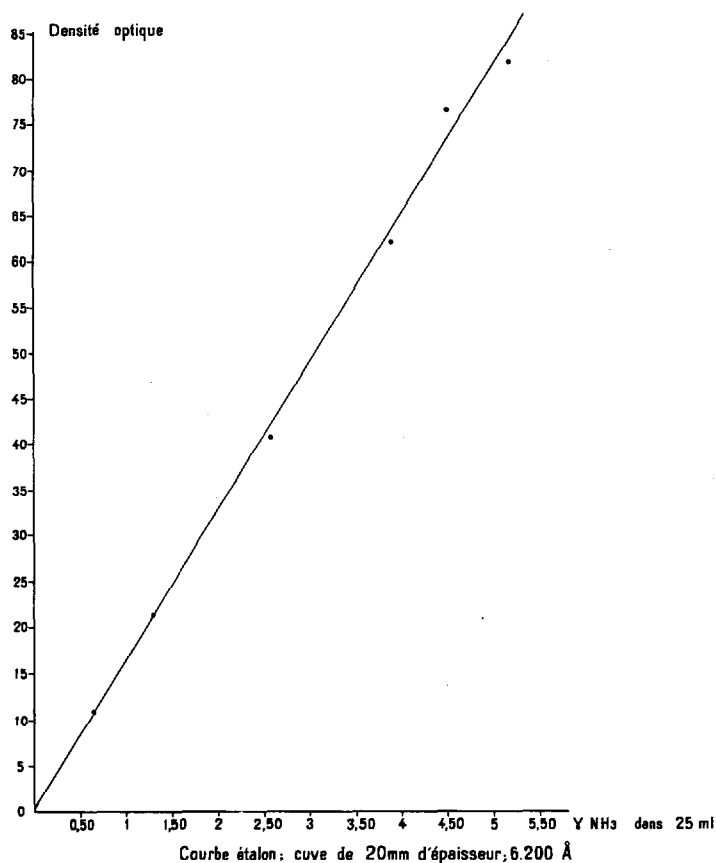


Fig II

AGENTS DE DÉPLACEMENT ET TEMPS DE DIFFUSION

En l'absence d'azote organique, on peut employer indifféremment le carbonate de potassium en solution saturée ou le mélange de CONWAY. Par contre, s'il y a de l'azote organique, c'est plutôt le carbonate seul qui est conseillé ; car le mélange de CONWAY attaque partiellement l'azote organique (8). Le carbonate n'a qu'une action très réduite sur l'azote organique. BLACHERE et FERRY (1) signalent que 1 % d'azote organique est déplacé par le carbonate de potassium à 1/3 saturation. Le carbonate de lithium a été essayé sans succès. YOVANOVITCH (3) préconise son emploi à la température de 40-50° et sous vide partiel.

Diffusion :

Nous avons déjà noté que la diffusion s'effectue dans des erlenmeyer de 500 centimètres cubes équipés comme le montre la figure 1 b. La prise d'essai introduite dans l'erlen, on ajoute 1,5 cc de carbonate de potassium et on bouche après avoir trempé la boule de l'agitateur dans une solution d'acide sulfurique N. On prend soin que la goutte ne puisse pas tomber, on agite et laisse au repos un minimum de 36 heures. Par précaution, on peut verser à la pissette de l'eau entre le bouchon et le rebord de l'erlenmeyer ; cette eau forme un anneau autour du bouchon constituant ainsi un joint hydraulique qui évite les fuites de gaz. Tout le gaz ammoniac déplacé par le carbonate de potassium vient se fixer quantitativement sur l'acide sulfurique de la boule. Après 36 à 48 heures, on débouche et avec un jet de pissette, on fait passer par rinçage tout le sulfate d'ammonium formé sur la boule dans une fiole jaugée de 25 cc.

Colorimétrie :

La colorimétrie est très délicate et nécessite les plus grands soins :

- n'utiliser que des produits fraîchement préparés, notamment le nitroprussiate à 1/2 000 et l'hypochlorite à 4° chlorométriques,
- employer des cuves bien propres intérieurement et extérieurement rincer l'intérieur de la cuve avec la solution à doser et la garnir ensuite ; bien essuyer le liquide coulant le long de la paroi extérieure des faces transparentes avec une peau de chamois ou un linge doux bien propre. Adopter une position bien déterminée dans le porte-cuves et opérer en plaçant toujours la cuve dans cette même position.

Au début de cette étude, nous avons employé le réactif de NESSLER et la colorimétrie, effectuée à 4 100 Å, a donné de bons résultats ; mais on ne peut pas descendre au-dessous de 4 % environ d' NH_3 dans 25 cc. D'autre part, ce réactif ne donne pas une solution vraie et se trouble rapidement, aussi la colorimétrie doit être faite dans les dix minutes suivant la mise en réaction. Nous employons donc la méthode de LUBOCHINSKY-ZALTA qui permet d'atteindre des traces.

Dans la fiole de 25 cc contenant le rinçat, on introduit dans l'ordre :

- 2 cc de phénate de sodium,
- 2 cc de phosphate disodique M/5,
- 0,5 cc de nitroprussiate de sodium 1/2 000,
- 2 cc d'hypochlorite de sodium à 4° chlorométriques.

Ne pas oublier d'agiter après chaque addition de réactif. On complète ensuite à 25 cc avec de l'eau distillée, agite bien par retournements successifs et laisse la coloration se développer pendant un minimum de trente minutes à l'obscurité.

Des nécessités techniques nous ont amené à modifier les proportions de réactifs préconisées par FERRY et BLACHERE (1), à savoir 2 cc de phénate, 2 cc de phosphate, 2 cc de nitroprussiate et 0,5 cc d'hypochlorite. Avec ces proportions, nous avons obtenu une coloration plutôt verte. Avec notre formule, la coloration est franchement bleue et stable.

On effectue ensuite la colorimétrie dans les conditions mentionnées plus haut. La coloration bleue obtenue est très stable et dure plus de 24 heures sans détérioration, ce qui est un avantage car on peut effectuer plusieurs fois les mesures sur la même solution, procéder même à des dilutions si la solution est trop concentrée. Dans ce dernier cas, le témoin qui est obligatoire doit subir une dilution dans la même proportion. Le pH des solutions varie entre 10,85 et 11. Les essais faits

en ajoutant de la soude pour porter le pH de 11 à 12 n'ont pas apporté de modifications sensibles à nos résultats.

TESTS DE REPRODUCTIBILITÉ

Une méthode, aussi séduisante soit-elle, ne présente d'intérêt réel que si elle donne des résultats reproductibles avec une marge d'erreurs tolérable. A cet effet, nous étudierons le test de reproductibilité à deux stades : test de colorimétrie et test de diffusion.

1 - Test de colorimétrie

Ce test est fait sur des solutions n'ayant pas subi la diffusion. On introduit directement dans une fiole de 25 cc une quantité connue d' NH_3 (solution de sulfate d'ammonium à 1,29 % de NH_3 par centimètre cube). On ajoute le réactif de LUBOCHINSKY-ZALTA, complète à 25 cc avec de l'eau distillée et effectue la colorimétrie après le temps prévu pour le développement à l'obscurité de la coloration. Les essais effectués sur des concentrations différentes ont donné les densités optiques consignées dans les tableaux 1 à 6. Pour chaque concentration, nous avons effectué plusieurs répétitions. Il ressort des densités optiques obtenues que l'absorption est la même aux erreurs d'expérience près pour une concentration donnée. Les erreurs possibles sont calculées avec un intervalle de confiance de 95 %.

Tableau 1 0,64 % d' NH_3 . Moyenne des densités optiques 11,1. Ecart type 0,41.

N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9
D.O.	11,2	11,5	11,5	11,1	10,5	11,2	11	12,2	10,5
Ecart par rapport à la moyenne	-0,1	+0,4	+0,4	0	-0,6	+0,1	-0,1	+1,2	-0,6
N°	10	11	12	13	14	15	16	17	
D.O.	10,5	10,7	11,7	11,7	11	10,5	10,7	11,5	
Ecart par rapport à la moyenne	-0,6	-0,4	+0,6	+0,6	-0,1	-0,6	-0,4	+0,4	

L'erreur possible sur une détermination isolée est égale à $\pm 0,86$ division de densité optique, ce qui correspond, suivant la courbe étalon à $+ 0,06$ % d' NH_3 . La concentration est comprise entre 0,58 et 0,70 % NH_3 pour 0,64 % mis.

Tableau 2 1,29 % d' NH_3 : Moyenne des D.O. 21,4 ; Ecart type 0,81.

N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9
D.O.	22	21,2	22,7	22	21,2	22,5	22,5	22,5	22,2
Ecart par rapport à la moyenne	+0,6	-0,2	+1,3	+0,6	-0,2	+1,1	+1,1	+1,1	-0,8
N°	10	11	12	13	14	15	16	17	
D.O.	20,5	20,5	21,2	21	20,7	20,7	21	20,5	
Ecart par rapport à la moyenne	-0,9	-0,9	-0,2	-0,4	-0,7	-0,7	-0,4	-0,9	

Erreur possible sur une détermination isolée $\pm 1,70$ divisions de densité optique, soit $+ 0,18 \%$ d' NH_3 . La concentration est comprise entre 1,19 et 1,39 $\%$ NH_3 pour 1,29 $\%$ mis.

Tableau 3 2,58 $\%$ d' NH_3 ; moyenne des D.O. 40,8 ; écart type 0,73.

N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
D.O.	40	39,7	41,2	41	41,2	40,5	39,5	41,5	42	41,5	41,2	40,5	41,5	40,2
Ecart par rapport à la moyenne	-0,8	-1,1	+0,4	+0,2	+0,4	-0,3	-1,3	+0,7	+1,2	-0,3	+0,4	-0,3	+0,7	-0,6

Erreur possible sur une détermination isolée $\pm 1,56$ divisions de D.O., soit $\pm 0,09 \%$ NH_3 . La concentration est comprise entre 2,49 et 2,67 $\%$ NH_3 pour 2,58 $\%$ mis.

Tableau 4 3,87 $\%$ d' NH_3 ; moyenne des D.O. 62,1 ; écart type 1,05.

N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
D.O.	63,5	63,5	63	61,5	62,7	63	61,5	60,5	61,5	61,7	63	60,7	61	63
Ecart par rapport à la moyenne	+1,4	+1,4	+0,9	-0,6	+0,6	+0,9	-0,6	-1,6	-0,6	-0,4	+0,9	-1,4	-1,1	+0,9

Erreur possible sur une détermination isolée $\pm 2,25$ divisions de D.O., soit $\pm 0,14 \%$ NH_3 . La concentration est comprise entre 3,73 et 4,01 $\%$ NH_3 pour 3,87 $\%$ mis.

Tableau 5 4,51 $\%$ d' NH_3 ; moyenne des D.O. 76,6 ; écart type 0,89

N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
D.O.	75,5	76,7	75,7	77	76	76,5	76,7	78,2	76,2	78
Ecart par rapport à la moyenne	-1,1	+0,1	-0,9	+0,4	-0,6	-0,1	+0,1	+1,6	-0,4	+1,4

Erreur possible sur une détermination isolée ± 2 divisions de D.O., soit $\pm 0,12 \%$ NH_3 . La concentration est comprise entre 4,39 et 4,63 $\%$ NH_3 pour 4,51 $\%$ mis.

Tableau 6 5,16 $\%$ d' NH_3 ; moyenne des D.O. 81,9 ; écart type 0,92.

N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
D.O.	83,5	83,5	82	81,7	82	82	81,5	80,7	81,2	81,2
Ecart par rapport à la moyenne	+1,6	+1,6	+0,1	-0,2	+0,1	+0,1	-0,4	-1,2	-0,7	-0,7

Erreur possible sur une détermination isolée ± 2 divisions de D.O., soit $\pm 0,12 \%$ d' NH_3 . La concentration est comprise entre 5,04 et 5,28 $\%$ NH_3 pour 5,16 $\%$ mis.

Ainsi qu'on peut le constater sur la courbe étalon construite avec la moyenne des résultats obtenus pour chaque concentration (fig. 2) et les écarts par rapport à chaque moyenne pour une concentration donnée (tableaux 1 à 6), la colorimétrie est parfaitement fidèle et reproductible avec des variations qui n'introduisent que de très faibles erreurs. En effet, de 0,64 à 5,16 $\%$ d' NH_3 , l'erreur varie de

NH_3 mis	0,64	1,29	2,58	3,87	4,51	5,16
Erreurs	9,3 %	7,7 %	3,4 %	3,6 %	2,6 %	2,3 %

Tableau 7 Variation de l'erreur en fonction de la concentration.

L'erreur diminue à mesure que la concentration augmente, conséquence plausible des faibles concentrations des solutions traitées et de très petits volumes de celles-ci utilisés pour les déterminations, les pipettes employées à cet effet n'étant graduées qu'au 1/10 de ml.

2 - Test de diffusion

L'agent de diffusion utilisé est une solution de carbonate de potassium à saturation à raison de 1,5 cc par exemplaire : les opérations de diffusion ont porté sur dix exemplaires du même échantillon (sulfate d'ammonium) contenant chacun 1,29 $\%$ d' NH_3 . Un seul exemplaire sur dix a donné un résultat aberrant (1,51 $\%$ NH_3).

Les neuf autres résultats sont rassemblés dans le tableau 8 ci-dessous :

N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9
$\%$ NH_3 trouvés	1,30	1,24	1,32	1,26	1,25	1,29	1,32	1,20	1,27
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Ecart par rapport à 1,29 $\%$	+0,01	-0,05	+0,03	-0,03	-0,04	0	+0,03	-0,09	-0,02

Tableau 8 Test de diffusion du sulfate d'ammonium.

Ce qui donne un écart type de 0,04. Le chiffre de lecture est vrai avec 95 % de chances de se trouver compris entre 1,29 \pm 0,09 $\%$ d' NH_3 , soit 1,20 et 1,38 $\%$ d' NH_3 .

Conclusion

les différents résultats obtenus tant pour le test de colorimétrie que pour le test de diffusion montrent que la méthode est fidèle et précise et peut donc s'appliquer correctement pour la détermination de très faibles quantités d'ammoniaque.

ESSAIS AVEC DIFFÉRENTS ANIONS

Le cation ammonium se comporte-t-il de la même façon et quantitativement vis-à-vis de la colorimétrie d'une part et de la diffusion d'autre part, quel que soit l'anion auquel il est lié ?

Afin de trouver un élément de réponse à cette question, nous avons passé en revue quelques sels usuels d'ammonium : acétate, nitrate, phosphate et chlorure. Nous opérons conformément au mode opératoire indiqué plus haut pour les tests de colorimétrie et de diffusion du sulfate d'ammonium. Les différents résultats sont rassemblés dans les tableaux 9 et 10.

	Nombre d'exempl.	γ NH ₃ mis	Extrêmes trouvés en γ NH ₃	Ecart
Acétate	8	1,10	1,02 à 1,16	0 à 7,2 %
	5	3,30	3,07 à 3,25	1,5 à 6,9 %
Nitrate	7	3,18	3 à 3,34	1,2 à 5,6 %
Phosphate	6	1,29	1,18 à 1,32	2,3 à 6,9 %
Chlorure	8	1,59	1,50 à 1,98	3,1 à 25,1 %

Tableau 9 Test de colorimétrie de quelques sels d'ammonium.

	Nombre d'exempl.	γ NH ₃ mis	Extrêmes trouvés en γ NH ₃	Ecart
Acétate	5	1,10	1,08 à 1,16	0 à 5,4 %
	5	3,30	3,06 à 3,37	2,1 à 7,2 %
Nitrate	5	1,06	0,98 à 1,10	0,9 à 7,5 %
Phosphate (bi)	6	1,29	1,20 à 1,30	0,7 à 6,9 %
Chlorure	5	1,59	1,49 à 1,64	0,6 à 6,2 %

Tableau 10 Test de diffusion de quelques sels d'ammonium.

Il ressort de l'examen du tableau 9 que :

- 1 - pour les acétate, nitrate et phosphate, les résultats sont constants ; ces anions ne semblent donc pas interférer sur la colorimétrie ;
- 2 - pour le chlorure, les chiffres sont trop dispersés et généralement forts.

Par contre, en examinant les résultats du tableau 10, on constate une plus grande cohésion, la détermination colorimétrique étant faite sur l'ammonium lié au sulfate. Nous sommes donc en mesure de penser que les chlorures ont une action exaltante sur le dosage colorimétrique de l'ammonium par le réactif de LUBOCHINSKY-ZALTA. Malgré la non-interférence des autres anions, il est cependant préférable de ramener l'ammonium toujours à l'état de sulfate, ce sel étant le terme de référence et de contrôle.

ESSAIS AVEC LES AMINO-ACIDES

Nous avons jugé indispensable d'étudier le comportement de l'azote organique en présence du carbonate de potassium saturé et du mélange alcalin de CONWAY. En effet, dans le sol, on trouve, en plus de l'azote minéral, de l'azote organique sous forme soit d'amine $R - \underset{\text{NH}_2}{\text{CH}} - \text{COOH}$ soit d'amide $R - \text{CO} - \text{NH}_2$, $R - \text{CO} - \text{NH} - R'$ où R et R' sont des radicaux pouvant renfermer encore des fonctions amine ou amide ou autres. Pour étudier le comportement de l'azote de ces substances vis-à-vis des agents de déplacement, on fait appel à leurs constituants élémentaires : les acides aminés. A cet effet, nous avons pris deux types d'acides : l'un à chaîne linéaire : l'asparagine $\text{NH}_2 - \text{CO} - \text{CH}_2 - \underset{\text{NH}_2}{\text{CH}} - \text{COOH}$ et l'autre à chaîne cyclique : la tyrosine



CONWAY (4) avait préconisé l'emploi du carbonate de potassium saturé. Des tests montrèrent que ce réactif décompose certains amines et amides tels que la glucosamine et la glutamine dans une proportion notable. BREMNER et SHAW (2) en utilisant l'oxyde de magnésium, constatèrent que la glucosamine n'était pas touchée, mais que la glutamine était décomposée (2% de son azote libéré en ammoniac). D'autres chercheurs ont déjà montré que plus le réactif de déplacement est alcalin, plus la décomposition des matières organiques azotées est avancée. Nous avons pris deux exemples d'acides aminés de stabilité différente pour essayer d'établir l'importance de la décomposition en fonction d'une part de la nature du composé étudié et d'autre part de l'alcalinité du réactif de déplacement employé. Les essais effectués en employant 1,5 cc de carbonate de potassium saturé ou du mélange de CONWAY et en laissant diffuser 48 heures à la température ambiante ont fourni les pourcentages d'azote détruit rassemblés dans le tableau 11.

	Asparagine			Tyrosine		
K ₂ CO ₃ saturé	1	à	5,8 %	0,2	à	1 %
Mélange de CONWAY	5	à	12 %	0,6	à	2,5 %

Tableau 11 Dégradation des acides aminés par le carbonate de potassium et le mélange de CONWAY.

De ces résultats, il ressort :

- 1 - que le carbonate est moins énergique que le mélange de CONWAY sur l'azote organique ;
- 2 - que l'asparagine est plus facilement détruite que la tyrosine. En effet, le noyau benzénique confère à la chaîne latérale une plus grande résistance aux agents de destruction.

Au stade actuel, il n'est pas possible de doser l'azote organique par cette méthode : elle permet simplement d'en déceler la présence. En effectuant plusieurs déterminations avec les deux réactifs, on peut arriver à dire si le produit analysé renferme des composés organiques azotés instables et stables. BLACHERE et FERRY (1) mentionnent que la potasse normale déplace environ 50% d'azote organique, les résultats ci-dessus montrent que le mélange de CONWAY, moins alcalin que la potasse seule en détruit moins de 20%.

2 - Azote nitrique

La substance de référence est le nitrate de potassium R.P. pour analyses de degré de pureté 99,8 - 100%. Le dosage de l'azote nitrique nécessite une réduction avec l'alliage de DEWARDA suivie de diffusion. BREMNER et SHAW (2) ont étudié le temps de diffusion de 100 µg d'azote ammoniacal ou nitrique dans des volumes différents de solution, et ont trouvé que le temps de diffusion augmente avec la dilution. Ils ont constaté que 100 µg d'NH₃ dans 2, 4 et 6 cc, diffusent complètement en 24, 28 et 47 heures à 25°C dans l'unité modifiée de microdiffusion. Nous employons des concentrations plus faibles, de l'ordre de 5 µg car nous sommes limités par les densités optiques (voir fig. 2). Nous évitons les dilutions après diffusion pour ne pas risquer d'introduire d'autres causes d'erreur. La diffusion se faisant à la température de la salle, donc variable avec l'ambiance, nous la laissons se faire pendant 48 heures. Dans un erlenmeyer de 500 cc équipé comme pour le dosage de l'azote ammoniacal, on introduit le volume voulu de la solution étudiée, 40 à 50 mgg de l'alliage de DEWARDA, 1,5 cc du mélange de CONWAY et on bouche rapidement après avoir trempé la boule de l'agitateur dans l'acide sulfurique normal ; on agite et laisse la réduction et la diffusion se faire pendant le temps déterminé. En raison de l'hydrogène que libère l'alliage

de DEWARDA, la pression augmente dans l'erlenmeyer et il se produit souvent des échappements gazeux par le bouchon qui se soulève et retombe, jouant le rôle de soupape. On évite ces échappements gazeux qui peuvent conduire à des résultats erronés par suite de fuite d'ammoniac en même temps que l'hydrogène en posant un objet lourd sur le bouchon. Nous avons trouvé un moyen commode pour y remédier en employant des supports d'entonnoirs réglables en hauteur à plusieurs places. Il suffit d'y placer les erlenmeyer en faisant passer la partie supérieure de l'agitateur par l'évidement destiné normalement à recevoir la queue de l'entonnoir, le haut du bouchon venant butter contre la face inférieure de la barre horizontale. Les erlenmeyer mis en place, on visse les montants verticaux sur la barre inférieure du portoir. Plusieurs tests effectués avec le carbonate de potassium saturé ont donné des résultats toujours inférieurs à la quantité mise.

Les seize essais faits sur 1,68 l' d' NH_3 avec le mélange alcalin de CONWAY ont donné des résultats dont les extrêmes sont rassemblés dans le tableau 12 suivant :

Extrêmes trouvés en $\% \text{NH}_3$	Ecart type	Erreur possible sur une détermination	Coefficient de variation %
1,57 à 1,84	0,07	$\pm 0,14$	4,1

Tableau 12 Dosage colorimétrique de l'azote nitrique après réduction et microdiffusion.

La lecture est faite sur la courbe étalon construite à partir de la substance de contrôle : le sulfate d'ammonium. Les résultats font ressortir que le nitrate a été entièrement réduit et fixé en totalité aux erreurs d'expérience près par l'acide sulfurique de la boule.

3 - Travail sur les sols

La méthode, une fois mise au point, on procède à l'extraction de l'azote des sols.

1 - Extraction

L'agent d'extraction est le chlorure de potassium (0,5 N). Dans un erlenmeyer de 300 cc, on introduit 10 g de terre finement broyée et 100 cc de chlorure ; on agite mécaniquement pendant 30 minutes et on filtre. Sur le filtrat, on prélève suivant la richesse en azote du sol étudié, 1 à 10 cc de solution que l'on met en diffusion dans un erlenmeyer de 500 cc.

2 - Diffusion

La diffusion se fait en deux étapes :

1^{re} étape : azote ammoniacal

on ajoute dans l'erlenmeyer 1,5 cc de carbonate de potassium saturé et on ferme avec le bouchon muni de son agitateur dont la boule a été préalablement trempée dans l'acide sulfurique normal. On laisse diffuser 36 heures. Après ce temps, on débouche l'erlenmeyer, rince soigneusement la boule avec de l'eau distillée dans une fiole de 25 cc.

2^{me} étape : azote nitrique

dans le même erlenmeyer avec son contenu, on ajoute 50 à 50 mg de l'alliage de DEWARDA 1 cc du mélange alcalin de CONWAY et referme hermétiquement après avoir trempé la boule dans l'acide sulfurique normal. Afin de s'assurer que la fermeture est étanche, on

verse de l'eau entre les rebords du goulot et le bouchon ; si des bulles apparaissent, on enfonce plus profondément le bouchon et pose dessus un objet lourd pour éviter qu'il ne saute sous la pression de l'hydrogène dégagé. Après 48 heures de réduction et de diffusion, on ouvre et procède comme pour l'azote ammoniacal.

3 - Colorimétrie

Dans la fiole de 25 cc contenant le sulfate d'ammonium qui s'est formé sur la boule, on met le réactif de LUBOCHINSKY-ZALTA, on ajuste au trait de jauge avec de l'eau distillée. Après au moins 30 minutes de contact, on effectue la colorimétrie dans les conditions déjà mentionnées.

En vue d'applications pratiques, nous avons effectué des essais sur deux sols de régions bien distinctes ; l'un venant d'une région forestière (Nyong et Sanaga - Yaoundé) et l'autre d'une région de savane (Bénoué). Les résultats obtenus en opérant sur la terre séchée à l'air et dont le prélèvement sur le terrain date de plus d'un an sont donnés dans le tableau 13 ci-dessous où ils sont exprimés en p.p.m. d'azote, soit en microgrammes d'azote pour 1 gramme de terre.

	Nyong et Sanaga		Bénoué	
	profondeur 0 à 5 cms	5 à 35 cms	profondeur 0 à 10 cms	25 à 40 cms
Azote total déterminé par Kjeldahl	1 624	700	924	420
Azote ammoniacal par microdiffusion	63,7	30,5	14	9,8
Azote nitrique par réduction microdiffusion	28,8	4,1	3,3	4,1
Azote organique obtenu par différence	1 531,5	665,4	906,7	406

Tableau 13

Remarque : Les échantillons étudiés ont été prélevés depuis 1962 ; l'azote présent a donc eu le temps de subir des transformations du fait des micro-organismes du sol. Par conséquent, les résultats obtenus ne présentent qu'un intérêt analytique et les proportions respectives de chacune des trois formes de l'élément sont certainement loin de traduire la réalité dans le milieu naturel. Donc, pour que les résultats aient une signification réelle, il convient d'opérer sur des échantillons fraîchement prélevés, conservant leur humidité naturelle. En même temps qu'on effectue la prise d'essai pour le dosage, on prélève un poids connu (5 g par exemple) de terre pour déterminer l'humidité après séchage à 105-110° à l'étuve pendant une nuit. On fait ensuite les calculs, compte tenu de l'humidité, pour exprimer les résultats en p.p.m. de la terre séchée à 105-110°.

Diffusion comparée :

Nous avons vu plus haut que le carbonate de potassium, base faible, a une action très réduite sur les acides aminés et que le mélange de CONWAY, base forte, dégrade plus profondément ces acides, libérant de l'ammoniac. Il est donc possible, en employant l'un et l'autre comme agent de déplacement, de pouvoir prouver l'absence ou la présence de matières organiques azotées. La présence des protéines et d'autres composés organiques azotés se manifeste par le déplacement de l'ammoniac néoformé en présence du mélange de CONWAY. Les résultats expérimentaux obtenus sur deux échantillons de terre de la région de Bertoua et exprimés en p.p.m. de N sont consignés dans le tableau 14 suivant :

Tableau 14 action comparée du K_2CO_3 à saturation et du mélange de CONWAY sur l'azote organique.

	Bertoua	
	Mélange de CONWAY	64,5
K_2CO_3 à saturation	58,5	13,4
Différence = (NH_3) néoformé	6	4,3

La mention Différence = NH_3 néoformé ne traduit pas tout l'ammoniac néoformé car il s'en produit également un peu même en présence du carbonate seul. Cette différence montre que dans la terre traitée, il y a de la matière organique azotée soluble partiellement ou en totalité dans le chlorure de potassium.

Conclusion

La diffusion comparée permet de révéler la présence de la matière organique azotée dans la solution d'extraction, ce qui est très important. En effet, le mélange de CONWAY sans alliage de DEWARDA n'a aucune action sur l'azote nitrique. Or, au cours d'un dosage de l'azote nitrique, l'alliage de DEWARDA opère une réduction de $N - NO_3$ en $N - NH_3$ déplacé par le mélange de CONWAY ; en plus, ce mélange réagit partiellement sur l'azote organique du milieu. Si bien qu'en définitive, le résultat trouvé est une somme $N - NO_3 + NH_3$ néoformé aux dépens des composés organiques azotés présents.

E - CONCLUSIONS GÉNÉRALES

La conclusion qu'on peut tirer de cette étude se résume en trois points :

- 1 - par microdiffusion, il est possible de doser simultanément l'azote ammoniacal ($N - NH_3$) et l'azote nitrique ($N - NO_3$), à l'état de traces ;
- 2 - l'agent de déplacement est différent suivant qu'il s'agit d'azote ammoniacal ou nitrique ;
- 3 - une diffusion comparée permet de révéler la présence ou l'absence d'acides aminés. Vu que le mélange de CONWAY dégrade partiellement les acides aminés de façon plus ou moins notable suivant qu'ils sont linéaires ou cycliques, une correction s'impose sur les résultats d'azote nitrique.

Malgré cette cause d'erreur (dégradation partielle des acides aminés par le mélange de CONWAY en particulier), la méthode est suffisamment précise pour permettre un dosage de l'azote minéral à l'état de traces dans les sols et la mise en œuvre instrumentale très simple en fait un procédé très commode pour le travail en grandes séries.

F - BIBLIOGRAPHIE SOMMAIRE

- 1 - BLACHERE (H.), FERRY (P.) - Dosage de l'azote minéral dans les sols par microdiffusion. *Ann. Agron.*, 1957, 8, 1, p.111-118 ; 1957, 8, 3, p.495-498.
- 2 - BREMNER (J.M.), SHAW (K.) - Studies on the estimation and decomposition of amino sugars in soil. *J. Agric. Sc.*, 1954, 44, 2, p.152-159.
- 3 - BRUNEL (A.) - Traité pratique de Chimie végétale.
Dosage de l'azote ammoniacal, méthode de YOVANOVITCH, p.438.
Méthode de KLEIN et TAUBOCK, p.441.
- 4 - CONWAY (E.J.) - Microdiffusion analysis and volumetric error. *London*, 1962, 5° éd.
- 5 - FRESENIUS (R.) - Traité d'analyse chimique quantitative. 1885.
- 6 - LABBE (J.P.) - La technique de microdiffusion en chimie analytique. *Chimie anal.*, 1963, 45, 6, p.296-302.
- 7 - LUBOCHINSKY (B.), ZALTA (J.P.) - Microdosage colorimétrique de l'azote ammoniacal. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1954, 36, 9, p.1363-1366.
- 8 - SCHLOESING (Th.) - *Ann. Chim. Phys.*, 1851, 31, 153.