

Enregistrement scientifique n° : 1129
Symposium n° : 07
Présentation : oral

**Thirteen years of soil organic carbon dynamics
investigation using the natural ^{13}C labelling technique.
Evaluation and perspective**
**Treize ans d'investigation de la dynamique du carbone
organique des sols au moyen des abondances naturelles en
 ^{13}C . Bilan et perspectives**

BALESDENT Jérôme (1), CERRI Carlos C. (2), FELLER Christian (3), GUILLET Bernard (4), LICHTFOUSE Eric (5), MARIOTTI André (6).

- (1) CEA - DEVM, Centre de Cadarache, 13108 Saint-Paul lez Durance, France
(2) CENA - USP, CP 96, 13400 Piracicaba SP, Brazil
(3) ORSTOM, L.C.S.C., 911 Av. Agropolis PB 5045, 34032 Montpellier cedex 1, France
(4) Univ.d'Orléans, Lab. de Géochimie Organique BP 6759, 45067 Orléans cedex 2, France
(5) ENSAIA, Lab. Sols et Environnement BP 172, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy cedex, France
(6) Univ. Paris VI, Lab. de Biogéochimie Isotopique T264E, 75252 Paris cedex 05, France

The ^{13}C natural labelling technique uses the natural difference in ^{13}C to ^{12}C ratio between C4 vegetation and C3 vegetation. Where C4 vegetation has been installed on a soil previously under C3 vegetation, or vice versa, the ^{13}C analysis of soil organic matter (SOM) allows the measurement of the fraction that is derived from the new inputs. The investigation at known dates after the vegetation change allows a direct measurement of SOM turnover, and that of any separable subfraction. Since its use by Cerri and coworkers in 1985, the method has proven to be a very powerful tool to quantify *in situ* SOM dynamics in various sites, on time scales ranging from the season to the millenia. It has found applications in three main SOM research fields : construction or assessment of models of SOM dynamics ; search for indicators of models compartments and SOM status ; origin of SOM and pathways of SOM degradation, humification or protection.

Among the recent or original results acquired through the method, we report on bulk SOM dynamics, significance of physical and chemical fractions to SOM dynamics, contribution of root-derived carbon, turnover and heterogeneity of microbial biomass, physical protection of SOM, nature of passive, recalcitrant SOM. Some precautions regarding site quality and isotope effects are nevertheless required for a proper use of the method.

At present, the coupling of isotope ratio measurements with chromatographic and pyrolytic methods allows to quantify the dynamics of a wide range of individual molecules or fragments. In 1998, the perspective offered by the natural ^{13}C labelling technique still appear infinite. The method will surely increase our knowledge of either pollutant fate, biological activity and metabolisms, physical protection, processes of SOM degradation and formation.

Key-words : ^{13}C , carbon-13, soil organic matter dynamics, stable isotope, review

Mots-clés : ^{13}C , carbone 13, dynamique des matières organiques des sols, isotope stable, revue.

Enregistrement scientifique n° : 1129

Symposium n° : 07

Présentation : oral

**Thirteen years of soil organic carbon dynamics
investigation using the natural ^{13}C labelling technique.
Evaluation and perspective.
Treize ans d'investigation de la dynamique du carbone
organique des sols au moyen des abondances naturelles
en ^{13}C . Bilan et perspectives.**

**BALESDENT Jérôme (1), CERRI Carlos C. (2), FELLER Christian (3),
GUILLET Bernard (4), LICHTFOUSE Eric (5) et MARIOTTI André (6).**

(1) CEA - DEVM, Centre de Cadarache, 13108 Saint-Paul lez Durance, France

(2) CENA - USP, CP 96, 13400 Piracicaba SP, Brazil

(3) ORSTOM, L.C.S.C., 911 Av. Agropolis PB 5045, 34032 Montpellier cedex 1,
France

(4) Univ.d' Orléans, Lab. de Géochimie Organique BP 6759, 45067 Orléans cedex 2,
France

(5) ENSAIA, Lab. Sols et Environnement BP 172, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy cedex,
France

(6) Univ. Paris VI, Lab. de Biogéochimie Isotopique T264E, 75252 Paris cedex 05,
France

Introduction. Les méthodes traditionnelles de traçage isotopique au service de l'étude de la dynamique des matières organiques du sol font appel à l'incorporation de composés artificiellement enrichis en ^{15}N , ^{14}C ou, plus récemment, ^{13}C . Ces méthodes ont été complétées par la datation au carbone 14 des matières organiques des sols, qui exploite le marquage fortuit de toutes les végétations de la planète par le $^{14}\text{CO}_2$ atmosphérique d'origine thermonucléaire des années 1955-1964. A la fin des années 1960, la différence naturelle de rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ entre les plantes à cycle photosynthétique C4 et les plantes à cycle photosynthétique C3 est mise en évidence (Bender, 1968). Rapidement, la trace de cette signature isotopique dans les matières organiques des sols est exploitée comme indicateur de changements passés de végétation (Stout *et al.*, 1975). Les applications paléoécologiques et paléoclimatologiques de la méthode sont, depuis, très nombreuses (Tieszen, 1991). En 1984, deux groupes ont l'idée d'utiliser cette différence naturelle de rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ comme marqueur isotopique du carbone de la végétation actuelle, pour suivre son incorporation progressive dans le sol et ainsi mesurer les cinétiques de renouvellement du carbone du sol (Cerri *et al.* 1985, Balesdent *et al.*, 1987). La méthode, baptisée technique de traçage par les abondances naturelles en ^{13}C , s'est depuis avérée très puissante pour les investigations de la dynamique du carbone des sols, elle est

de plus en plus utilisée actuellement. On rapporte ici, au vu des données récentes, son principe, ses limites et son potentiel.

Principe

Les rapports $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ sont conventionnellement exprimés sous la forme :

$\delta^{13}\text{C}$ (‰) = [$(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{échantillon}} / (^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{référence}} - 1$] x 1000, où la référence est le standard international PDB. Cette unité $\delta^{13}\text{C}$ peut être considérée comme linéaire avec la concentration en ^{13}C dans le carbone ($^{13}\text{C} / \text{C}$), et manipulée comme telle.

L'objectif du traçage naturel est typiquement d'estimer, sur un site dont la végétation a été modifiée du type C3 vers le type C4, la proportion de carbone provenant de la nouvelle végétation C4, à partir du $\delta^{13}\text{C}$ de l'échantillon. Historiquement utilisée sur les sites qui avaient toujours porté initialement une végétation C3, la proportion de carbone d'origine C4 était calculée par :

$$\begin{aligned} C_{\text{tot}} \delta_{\text{tot}} &= C_{\text{C3}} \cdot \delta_{\text{C3}} + C_{\text{C4}} \cdot \delta_{\text{C4}} \\ C_{\text{tot}} &= C_{\text{C3}} + C_{\text{C4}} \end{aligned}$$

$$\text{d'où } C_{\text{C4}} / C_{\text{tot}} = (\delta_{\text{tot}} - \delta_{\text{C3}}) / (\delta_{\text{C4}} - \delta_{\text{C3}}) \quad [1]$$

C_{tot} et δ_{tot} sont le carbone total dans le sol portant la végétation C4 et son $\delta^{13}\text{C}$.

C_{C4} et δ_{C4} sont le carbone provenant du carbone incorporé par la nouvelle végétation C4 et son $\delta^{13}\text{C}$, souvent estimé comme celui de la végétation elle-même.

C_{C3} et δ_{C3} sont le carbone provenant de la végétation C3 initiale et son $\delta^{13}\text{C}$, souvent estimé sur un site de référence sous la végétation initiale C3.

L'analyse de fractions du carbone nécessite la séparation de la même fraction sur le site de référence. Si l'analyse est répétée dans le temps, l'équation [1] donne une courbe cumulée de la distribution des âges du carbone dans le sol ou dans la fraction séparée : la proportion de carbone d'âge inférieur à t en fonction du temps t.

En fait, il existe des enrichissement isotopiques dans le sol qui rendent approximatives les estimations de δ_{C4} et δ_{C3} et l'équation [1] (Balesdent et Mariotti, 1996). D'autre part, la méthode peut être utilisée sur des sites dont l'histoire de la végétation est beaucoup plus complexe, comportant par exemple un passé mixte C3/C4, ou des rotations plantes C3/plantes C4. On donne donc ci-dessous une formulation générale des équations nécessaires à l'estimation de la proportion de carbone nouveau. L'exploitation de la méthode s'appuie toujours sur un couple de situations. Toutes deux sont supposées avoir une partie de leur histoire identique. En dehors de cette ou de ces périodes, l'un des sites (A) porte une végétation de type C4 (vegA), l'autre (B) une végétation de référence de type C3 (vegB), ou l'inverse. La végétation de référence peut être la même que la végétation initiale. Qu'il s'agisse du carbone de l'ensemble de l'échantillon de sol ou d'une fraction séparée, au temps T, on peut définir dans chacun de ces systèmes (ici sur l'exemple A) :

C_{totA} et δ_{totA} , le carbone total dans le sol du site A et son $\delta^{13}\text{C}$.

C_{dfA} et δ_{dfA} , le carbone provenant du carbone incorporé par la végétation A et son $\delta^{13}\text{C}$

C_{comA} et δ_{comA} , le carbone provenant, dans le site A, des végétations communes et son $\delta^{13}C$.

δ_{vegA} le $\delta^{13}C$ moyen de la végétation A.

Les bilans de masse du carbone ^{13}C et du carbone total ($^{12}C + ^{13}C$) donnent sur les deux sites, respectivement :

$$C_{totA} \cdot \delta_{totA} = C_{comA} \cdot \delta_{comA} + C_{dfA} \cdot \delta_{dfA}$$

$$C_{totA} = C_{comA} + C_{dfA}$$

$$C_{totB} \cdot \delta_{totB} = C_{comB} \cdot \delta_{comB} + C_{dfB} \cdot \delta_{dfB}$$

$$C_{totB} = C_{comB} + C_{dfB}$$

Sur l'ensemble des deux sites, on suppose que sont mesurés, donc connus, C_{totA} , C_{totB} , δ_{totA} , δ_{totB} . Ce système à quatre équations et à huit inconnues nécessite quatre équations indépendantes supplémentaires pour déterminer C_{dfA} et/ou C_{dfB} . Il s'agira d'approximations, et celles-ci pourront être variables selon la situation, pourront dépendre de la ressemblance entre les deux végétations, entre les deux dynamiques du carbone, et du temps. Une première consiste à supposer que la composition isotopique du carbone commun est proche dans les deux sites ($\delta_{comA} \# \delta_{comB}$). Une deuxième consiste à estimer que la signature isotopique de la nouvelle végétation est conservée dans le sol ($\delta_{dfA} \# \delta_{vegA}$ et $\delta_{dfB} \# \delta_{vegB}$). Une alternative, plus faible, consiste à supposer que le carbone nouveau a subi un enrichissement isotopique, mais identique dans les deux cas ($\delta_{dfA} - \delta_{dfB} \# \delta_{vegA} - \delta_{vegB}$). D'autres portent sur les quantités de carbone ancien dans le système de référence B ($C_{ancB} \# C_{ancA}$ ou $C_{ancB} / C_{totB} \# C_{ancA} / C_{totA}$). Toutes autres approximations peuvent être exploitées: enrichissements isotopiques estimés, dépendant du temps, couplés à la biodégradation du C, pris en compte dans un modèle de dynamique du carbone analysant l'ensemble des données etc. Il est recommandé de chiffrer ces approximations pour en estimer la répercussion sur le résultat final. Il ressort de cette analyse que les systèmes où le risque de biais est le plus faible sont ceux où la dynamique du carbone, et la nature biochimique des deux végétations sont très similaires dans les deux sites, par exemple les systèmes analysant une culture C4 (maïs) avec une autre culture de plante annuelle C3 comme référence.

Intérêt et limites de la méthode

La méthode de traçage naturel par le carbone 13 peut être comparée aux autres méthodes d'investigation de la dynamique du carbone des sols, faisant appel ou non aux traceurs. Les méthodes qui ne font pas appel aux traceurs ne permettent d'étudier que les systèmes où il y a eu un changement important de la dynamique du carbone, faisant diminuer ou augmenter significativement le carbone ou certaines de ses fractions. Par rapport à ces dernières, l'utilisation du traceur a deux avantages principaux. Le premier, théorique et évident, est de décomposer un écart de carbone observé $\Delta C / \Delta t$ en composante sortant et composante entrant. Le deuxième avantage concerne la sensibilité : sans traceur, la sensibilité sur l'estimation de ΔC , basée sur la comparaison de deux sites, est particulièrement faible. En revanche la donnée brute donnée par le $\delta^{13}C$, de type $\Delta C / C$, est, elle, particulièrement robuste, en particulier quand il s'agit de

comparer entre eux deux systèmes de gestion du sol, ou deux fractions du carbone du sol. Par rapport aux autres méthodes de traçage isotopique, la méthode par le ^{13}C naturel présente deux spécificités. Sa sensibilité est relativement faible : dans les meilleurs conditions, la méthode permet de détecter 1% de C nouveau dans le C de l'échantillon. La méthode donne une quantité de carbone nouveau *intégrée dans le temps* : la distribution des âges, ce qui permet assez difficilement de remonter aux flux, mais donne une bonne représentation de la dynamique de l'ensemble de la fraction analysée. Ses avantages incontestables sont cependant de tracer le carbone produit *in situ*, y compris les apports souterrains, de suivre la dynamique sur des durées longues, jusqu'au siècle sur certaines expérimentations.

Exemples d'utilisation

Les situations qui ont été exploitées sont variées (Balesdent et Mariotti, 1996) : déforestations tropicales (forêt-canne à sucre, forêt-maïs, forêt-pâturages) ou tempérées (forêt-maïs), afforestations tropicales (savanne-forêt), cultures tropicales (Soja-maïs) ou tempérées (blé ou céréales-maïs, prairie -maïs).

Concernant les différents aspects de la dynamique du C, ont été évalués (Balesdent et Mariotti, 1996) : la dynamique du carbone total, la quantification de carbone stable, millénaire du sol, la dynamique des fractions granulométriques ou granulodensimétriques, de différents extraits par des méthodes chimiques (tableau), du carbone des vers de terre, l'origine du CO_2 respiré *in vitro* ou *in situ*, et, plus récemment, du carbone de la biomasse microbienne du sol (Ryan et Aravena, 1994; Bruulsema et Duxbury, 1996), le devenir des apports rhizosphériques (Balesdent et Balabane, 1996; Quian *et al.*, 1997) le couplage de la dynamique des matières organiques et de l'agrégation (Golchin *et al.*, 1995; Puget *et al.*, 1995; Besnard *et al.*, 1996; Jastrow *et al.*, 1996). La méthode a pu servir au calage de modèles (Balesdent, 1996) ou d'indicateurs du statut organique des sols (Feller, 1993).

Développements récents et futurs

La technique de mesure des rapports isotopiques a vu une évolution importante à la fin des années 1980. La méthode classique consiste à envoyer le CO_2 pur dans le spectromètre de masse, où un système dit de double introduction permet d'injecter alternativement standard et échantillon, à pression identique, et constante. La nouvelle méthode est dite "flux continu" (CFIRMS : continuous flow isotope ratio mass spectrometry) : le CO_2 est purifié par chromatographie en phase gazeuse, et l'ensemble CO_2 gaz porteur (He) est introduit de façon continue dans le spectromètre de masse, la pression de CO_2 , qui est celle du pic de chromatographie, est donc variable dans le temps. Le gaz de référence est introduit en alternance, dans le flux de gaz vecteur. C'est un capillaire qui permet le passage continu de la pression élevée au niveau de l'introduction, à une pression très faible dans le spectromètre de masse. Cette nouvelle méthode est moins sensible (la précision maximale est de l'ordre de 0,15‰ au lieu de 0,05‰) et sa réponse est moins linéaire, mais elle a permis de coupler l'analyse isotopique avec différents systèmes de préparation de l'échantillon. Les analyseurs de C et N par combustion sèche permettent l'analyse automatisée sur échantillons secs, et l'analyse simultanée de ^{13}C et ^{15}N . Les chromatographes en phase gazeuse (GC)

permettent l'analyse d'atmosphères : CO₂, CH₄ et gaz azotés, et enfin l'analyse des composés organiques volatils ou rendus volatils, au niveau moléculaire. Le pic de chromatographie est alors brûlé (Combustion) avant analyse du CO₂ (GC-C-CFIRMS).

Cette nouvelle méthode de couplage avec les chromatographies permet l'analyse au niveau moléculaire. Ainsi, en GC, Lichtfouse *et al.* (1995, 1997), ont pu estimer le renouvellement des alcanes et de la plupart des lipides simples, démontrant l'origine végétale ou microbienne des alcanes. Récemment, l'analyse isotopique peut être ainsi effectuée sur les produits d'oxydation des lignines (Goni et Eglinton, 1996), ou sur les produits de pyrolyse. Cependant, la majorité des molécules du sol sont polaires et peu volatiles : la séparation en GC de telles molécules requiert des dérivatisations, qu'il est difficile de rendre compatibles avec l'analyse isotopique au niveau des abondances naturelles. Si bien que les couplages de l'analyse isotopique avec les méthodes de chromatographies liquides sont très attendus. Il n'est pas exclu, non plus, de rêver à des méthodes d'imagerie des rapports isotopiques au niveau des abondances naturelles.

Conclusions

La méthode offre un outil puissant et irremplaçable d'investigation quantitative de la dynamique du carbone des sols et un outil privilégié de calage des modèles et d'investigation des conséquences de l'usage des sols sur le cycle du carbone. Le développement de l'analyse au niveau moléculaire pourra permettre d'évaluer l'intérêt des biomarqueurs, d'accéder à l'âge des polymères du vivant dans les sols et des monomères constitutifs des composés humiques et ainsi permettre des avancées significatives sur la protection physique des matières organiques, sur les voies de l'humification, sur la dynamique du processus d'humification.

Note : Les auteurs disposent à Versailles, France, d'une expérimentation au champs, spécialement destinée à l'exploitation de la méthode. Il s'agit de parcelles en maïs mises en place sur un précédent de blé, où, chaque année de 1993 à 2000, de nouvelles parcelles sont mises en monoculture de maïs, si bien que n'importe quelle année, une chronoséquence (de 6 ans en 1998 et de 8 ans en 2000) de marquage du carbone du sol par le maïs est disponible pour n'importe quelle étude de la dynamique du carbone. Les 28 parcelles, en trois réplifications randomisées, mesurent chacune 96 m². Votre étude y est la bienvenue.

Tableau : Age moyen (ans) du carbone de différentes fractions et extraits organiques de l'horizon Ap de cambisols cultivés en maïs en France. L'âge moyen est estimé à partir de l'enrichissement en ^{13}C après 2, 5 et 20 ans, avec l'hypothèse d'un renouvellement exponentiel (d'après Balesdent, 1996, Puget et al., 1995)

Carbone total	45	C extractible à l'eau	35
		biomasse microbienne (mai)	12
Fractions granulométriques			
légère >2000 μm	0.5	Extraits de la fraction 0-50 μm	
légère 200-2000 μm	3	hydrosoluble à 120°C, 1h	50
légère 50-200 μm	15	non hydrosoluble à 120°C	90
0-50 μm	70	acides fulviques	95
20-50 μm	55	acides humiques	65
2-20 μm	60	humine	80
0,2-2 μm	80	résidu d'hydrolyse H^+	80
0-0,2 μm	65	Extrait H_2O_2	45
		Résidu H_2O_2	100
agrégats stables >0,2 mm	40	Rés. de combustion 370°C	110
agrégats < 0,2 mm	60	Rés. de pyrolyse 510°C	85

Références

- Balesdent J. 1996. The significance of organic separates to carbon dynamics and its modelling in some cultivated soils. *Europ. J. Soil Sci.*, 47, 485-493.
- Balesdent J. & Mariotti. A. 1996 Measurement of soil organic matter turnover using ^{13}C natural abundances. *In Mass Spectrometry of Soils* (T.W. Boutton & S.I. Yamasaki eds.). Marcel Dekker Inc., New York. pp 83-111.
- Balesdent J., Mariotti A. & Guillet B. 1987 Natural ^{13}C abundance as a tracer for soil organic matter dynamics studies. *Soil Biol. Biochem.*, 19, 25-30.
- Besnard E., Chenu C., Balesdent J., Puget P. & Arrouays D. 1996 Fate of particulate organic matter in soil aggregates during cultivation. *Europ. J. Soil Sci.* 47, 495-503.
- Bruulsema T. W. & Duxbury J. M. 1996 Simultaneous measurement of soil microbial nitrogen, carbon, and carbon isotope ratio. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 60, 1787-1791.
- Cerri C., Feller C., Balesdent J., Victoria R. & Plenecassagne A., 1985. Application du traçage isotopique naturel en ^{13}C à l'étude de la dynamique de la matière organique dans les sols . *C. R. Acad. Sc. Paris*, 300, série II, 9, 423-428.
- Feller C. 1993. Organic inputs, soil organic matter and functional soil organic compartments in low activity clay soils in tropical zones. pp 77-88 *In* : "Soil organic matter dynamics and sustainability (K. Mulongoy & R. Mercks eds). Wiley, Chichester.
- Goni M.A. & Eglinton T.I. 1996 Stable carbon isotopic analyses of lignin-derived CuO oxidation products by isotope ratio monitoring-gas chromatography-mass spectrometry (irm-GC-MS). *Organic Geochemistry*, 24 , 601-615.
- Golchin, A., Oades, J.M., Skjemstad, J.O. & P. Clarke. 1995 Structural and dynamic properties of soil organic matter as reflected by ^{13}C natural abundances, pyrolysis

- mass spectrometry and solid-state ^{13}C NMR spectroscopy in density fractions of an oxisol under forest and pasture. *Austr. J. Soil Res.*, 33, 59-76.
- Jastrow, J.D., Boutton, T.W. & Miller, R.M. 1996. Carbon dynamics of aggregate-associated organic matter estimated by carbon-13 natural abundance *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 60, 801-807.
- Lichtfouse E., Elbisser B., Balesdent J., Mariotti A. & Bardoux G. 1995 Isotope and molecular evidence for direct input of maize leaf wax *n*-alkanes into crop soils. *Organic Geochemistry*, 22, 349-351.
- Lichtfouse E., Budzinski H., Garrigues P. & Eglinton T.I. 1997 Ancient polycyclic aromatic hydrocarbons in modern soils : ^{13}C , ^{14}C and biomarker evidence *Organic Geochemistry* 24,
- Puget P., Chenu C. & Balesdent J. 1995 Total and young organic carbon distribution in aggregates of silty cultivated soils. *Europ. J. Soil Sci.*, 46, 449-459.
- Qian J. H., Doran J. W. & Walters D. T. 1997 Maize plant contributions to root zone available carbon and microbial transformations of nitrogen. *Soil Biol. Biochem.* 29, 1451-1462.
- Ryan M. C. & Aravena R. 1994 Combining ^{13}C natural abundance and fumigation-extraction methods to investigate soil microbial biomass turnover. *Soil Biol. Biochem.* 26, 1583-1585.
- Stout J.D., Rafter T.A. & Troughton J.H. 1975 The possible significance of isotopic ratios in paleoecology. In: Quaternary Studies (R.P. Suggate and M.M. Cresswell Eds.) pp 279-286, Royal Society of New Zealand, Wellington.
- Tieszen L.L. 1991 Natural variations in the carbon isotope values of plants: implications for archaeology, ecology and paleoecology, *J. Archaeol. Sci.* 18:227-248.
- Voir aussi : *Cahiers ORSTOM série Pédologie*. vol XXVI,n°4, 1991. Numéro spécial sur l'utilisation des abondances naturelles en carbone 13 dans les sols.

Key-words : ^{13}C , carbon-13, soil organic matter dynamics, stable isotope, review

Mots-clés : ^{13}C , carbone 13, dynamique des matières organiques des sols, isotope stable, revue