



Food and Agriculture
Organization of the
United Nations

Procédure opératoire standard pour l'analyse de l'azote du sol Méthode de Kjeldahl

Dr Zouahri Abdelmjid, NENALAB Chair, INRA Morocco

GLOSOLAN
training sessions

2022



Plan

- Introduction.
- Portée et champ d'application.
- Principe de la méthode.
- Appareillage.
- Matériaux.
- Santé et sécurité:
 - Sécurité du personnel.
 - Risques chimiques.
- Préparation de l'échantillon.
- Procédure.
- Calcul.
- Assurance de la qualité/contrôle de la qualité.

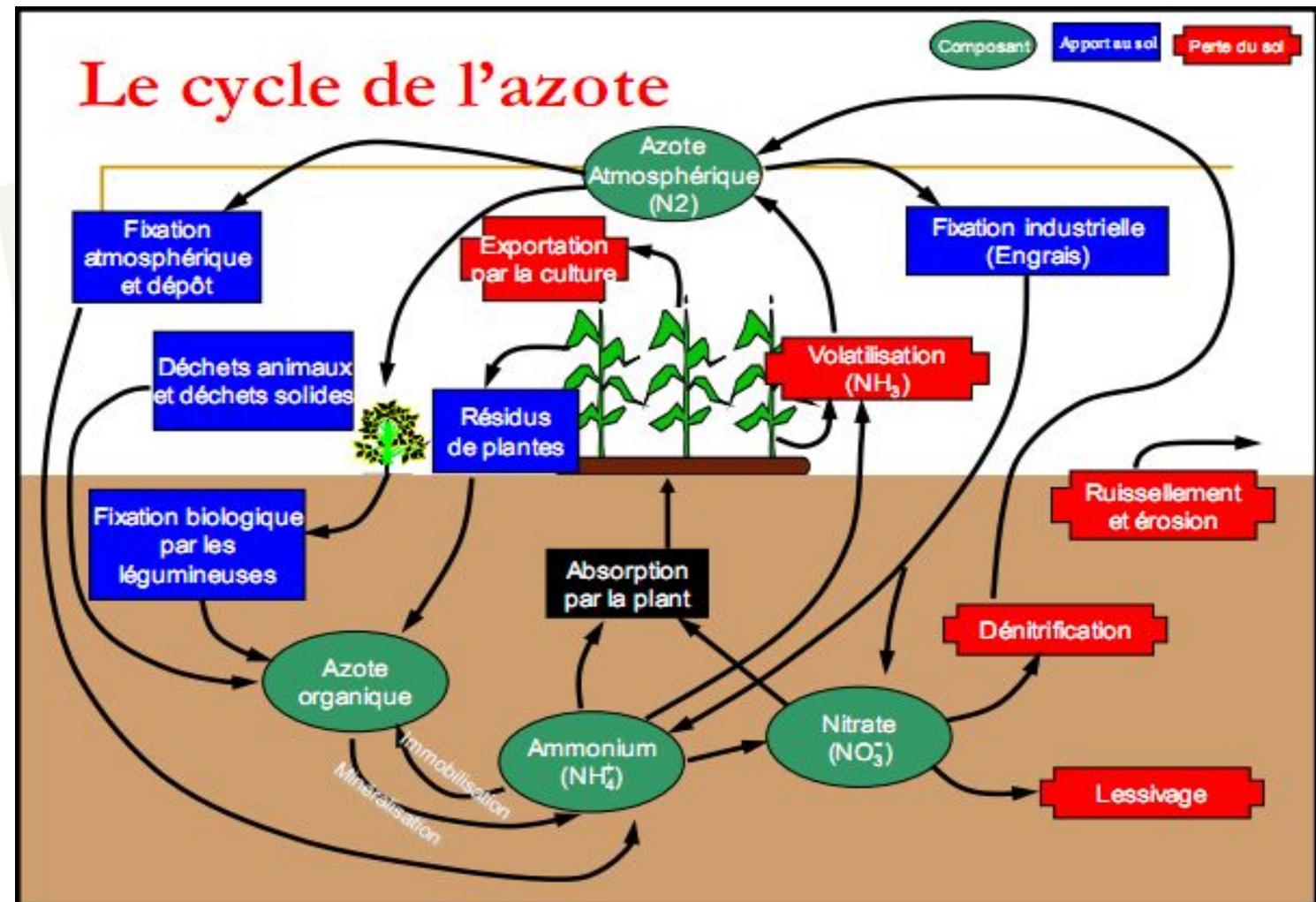
Introduction

- ❖ L'azote (N) est prélevé en plus grandes quantités que les autres éléments
- ❖ Il est l'élément nutritif le plus limitant pour les cultures
- ❖ Composant principal de la chlorophylle
- ❖ Nécessaire pour la production des protéines des Cellules
- ❖ Donne une couleur verte foncée et améliore la qualité du feuillage
- ❖ Il a des impacts sur la quantité (grains, racines) et sur la qualité (protéine, teneur en sucre) de la récolte.

Cycle de l'azote

Le cycle de l'azote consiste en neuf processus majeurs:

- Absorption par la plante,
- Echange,
- Nitrification,
- Dénitrification,
- Volatilisation,
- Minéralisation,
- Immobilisation,
- Fixation de N_2
- Lessivage



Cycle de l'azote

• Absorption par la plante

Les plantes absorbent la plupart de leur besoin en azote sous forme NH_4^+ et NO_3^- . Les nitrates sont souvent la source la plus dominante car ils se trouvent en concentration élevée dans les sols et sont mobiles et atteignent les racines facilement soit par mouvement en masse ou par diffusion.

• Échange

L'échange indique que des ions (ou des molécules chargées) sont attirés par une surface du sol.

Plus d'ammonium est retenu par des sols à pH élevé (neutres à alcalins) et inversement, l'ammonium se déplace plus aisément à travers les sols à pH bas (acides).

Cycle de l'azote

•Nitrification

L'ammonium (NH_4^+) du sol peut être rapidement converti (heures à quelques semaines) en nitrite (NO_2^-) et ensuite en nitrate (NO_3^-). Ce processus, connu sous le nom de nitrification, se produit en présence d'oxygène seulement, et il sera lent ou inexistant en cas d'excès d'eau ou dans des sols anaérobiques.

•Dénitrification

La dénitrification fait référence au processus où le nitrate (NO_3^-) se transforme en azote gaz (N_2). La dénitrification exige l'absence d'oxygène (conditions anaérobiques). Les sols mal drainés peuvent générer une perte de 4-5% de nitrate par jour qui peut causer des pertes de rendement substantielles.

•Volatilisation

La volatilisation de l'ammoniac (NH_3) fait référence à la perte de l'ammoniac comme gaz dans l'atmosphère, ce qui peut être une source de perte de N. Le processus est accentué à haut pH parce que NH_4^+ se convertit plus facilement en NH_3 à pH élevé.

Cycle de l'azote

•Minéralisation

La décomposition de la matière organique par les microorganismes et la libération de l'ammonium.

Les quantités minéralisées sont plus élevées dans les sols ayant des teneurs élevées en matière organique et par conséquent.

Comme ordre de grandeur, **20 à 30 kg N/ha sont minéralisés par 1% de matière organique.**

•Immobilisation

L'immobilisation N fait référence au processus par lequel N minéral (NO_3^- ou NH_4^+) est converti biologiquement en N organique, ce qui est essentiellement l'inverse de la minéralisation.

Cycle de l'azote

- **Fixation de l'azote**

L'azote gaz (N_2) peut être converti en des formes disponibles de N à travers le processus de 'fixation de l'azote'.



- **Lessivage**

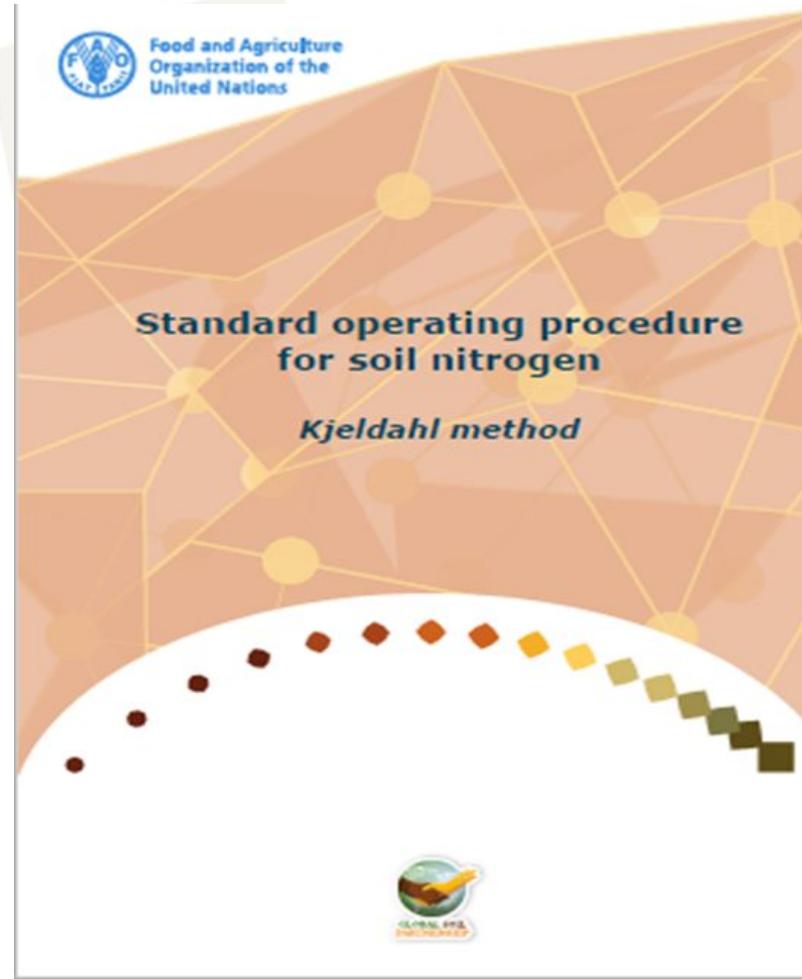
La quantité de N perdue par lessivage dépend des conditions climatiques et des pratiques culturales et ne concerne que N sous forme nitrates.

Analyse de l'azote

- ❖ L'azote (N) est considéré comme le nutriment le plus important en agriculture en raison de son rôle clé dans la formation des protéines, de l'ADN, de l'ARN...
- ❖ L'azote du sol est présent sous forme organique ou inorganique.
- ❖ Le suivi de la dynamique de l'azote dans les sols est également important d'un point de vue environnemental.
- ❖ La méthode d'analyse utilisée pour mesurer l'azote du sol définira la fraction d'azote à quantifier.
- ❖ L'azote organique plus une fraction d'azote inorganique, qui se présente sous la forme de NH_4^+ , sont communément appelés **azote total ou azote Kjeldahl (KjN)**.

Procédure opératoire standard pour l'azote du sol Méthode de Kjeldahl

Méthode harmonisée par GLOSOLAN



GLOSOLAN
training sessions
2022



Portée et champ d'application

- ✓ La procédure opératoire standard (SOP) décrit la quantification de la teneur en KjN dans les échantillons de sol.
- ✓ Cette méthode permet la quantification de l'azote sous forme de NH_4^+ et d'azote organique.
- ✓ Elle permet d'obtenir une bonne estimation de la teneur totale en N du sol.
- ✓ Une limite typique de détection est de 0,01 % de N, et une limite typique de quantification est de 0,03 % de N.
- ✓ Cette procédure normalisée est applicable à tous les types de sols.

Principe

- ❑ Cette procédure implique la digestion d'un échantillon de sol, la distillation du NH_3 produit et sa quantification par titrage (ou colorimétrie).
- ❑ Le sol est digéré dans de l'acide sulfurique concentré, en présence d'un mélange de catalyseurs permettant de réguler la température d'ébullition, jusqu'à dissolution et oxydation complète.
- ❑ L'azote organique contenu dans l'échantillon est oxydé en ammonium (sous forme de sulfate d'ammonium).

Principe

- ❑ Le N-NH_4^+ du digestat est quantifié par collecte du NH_3 libérée par la distillation à la vapeur du digestat et titrée avec une solution acide par volumétrie.
- ❑ Si la quantification des nitrates est requise, il est possible d'inclure certaines modifications permettant la réduction et la transformation de cet anion en ammonium, par exemple, avec l'ajout d'acide salicylique (non inclus dans cette SOP).

Appareillage

- Matériel de laboratoire habituel:
 - Balance à trois décimales - 0,001 g.
 - Balance analytique à quatre décimales - 0,0001 g.
 - Unité de digestion ou bloc-digesteur, adapté à la digestion des échantillons avec de l'acide sulfurique à $390^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$, avec système d'extraction des fumées.
 - Tubes de digestion Kjeldahl, de volume nominal 100 ml, adaptés à l'unité de digestion.
 - Unité de distillation, avec générateur de vapeur.
 - Burette, graduée avec appréciation 0,01 mL.
 - Agitateur magnétique.



Réactifs

- Tous les réactifs doivent être de qualité analytique. Utiliser de l'eau de grade 2 conforme à la norme ISO 3696.
- Sulfate de cuivre pentahydraté ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)
- Sulfate de potassium (K_2SO_4).
- Acide sulfurique, $\rho(\text{H}_2\text{SO}_4) = 1,84 \text{ g cm}^{-3}$
- On peut aussi utiliser l'acide chlorhydrique, $\rho(\text{HCl}) = 1,19 \text{ g cm}^{-3}$.
- Acide borique (H_3BO_3)
- Hydroxyde de sodium (NaOH)
- Vert de bromocrésol
- Rouge de méthyle
- Éthanol 96 %



Préparation des solutions

- Mélange catalytique.

-Broyer et mélanger soigneusement 6 g de sulfate de cuivre pentahydraté ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) et 94 g de sulfate de potassium (K_2SO_4).

- Solution d'acide borique à 2 % :

-Dissoudre $20,0 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$ de H_3BO_3 dans 800 mL d'eau préchauffée à une température inférieure à $60 \text{ }^\circ\text{C}$.

-Refroidir à la température ambiante. Ajuster le pH de 4,8 à 5.0 en ajoutant prudemment de l'hydroxyde de sodium, $[\text{NaOH}] = 0.1 \text{ M}$ (mol L^{-1}) ou de l'acide sulfurique (H_2SO_4), $[\text{H}^+] = 0.1 \text{ M}$ (mol L^{-1}) selon les besoins.

Enfin, amener au volume final de 1000 mL avec de l'eau.



Préparation des solutions

- ❑ Hydroxyde de sodium, $[\text{NaOH}] = 10 \text{ M}$: Dissoudre 400 g de NaOH dans 800 mL d'eau, en réfrigérant commodément.

Refroidir à température ambiante et porter au volume final de 1000 mL avec de l'eau.

- ❑ La concentration d'acide sulfurique (H_2SO_4), $[\text{H}^+] = 0,01 \text{ M}$ doit être vérifiée si elle est préparée au laboratoire.

- ❑ Indicateur mixte. Dissoudre 0,10 g de vert de bromocrésol et 0,07 g de rouge de méthyle dans 100 mL d'éthanol (96%). Le mélange indicateur a une gamme de variation de pH qui va d'environ pH 4,8 (rose) à 5,5 (vert émeraude).



Préparation des solutions

- Hydroxyde de sodium, $[\text{NaOH}] = 0,1 \text{ M}$: Diluer la solution d'hydroxyde de sodium 10 M dans une fiole jaugée (1 mL et porter au volume final de 100 mL avec de l'eau désionisée).
- Acide sulfurique (H_2SO_4), $[\text{H}^+] = 0,1 \text{ M}$: Diluer l'acide sulfurique concentré dans une fiole jaugée (0.28 mL et porter au volume final de 100 mL avec de l'eau).
- Sulfate d'ammonium ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$).
- Pour la qualité des données et les contrôles de lots, il est recommandé d'utiliser un matériel de référence (MR) de sol dont la teneur en KjN et l'homogénéité sont connues.



Produits de contrôle

- ✓ Substances à teneur connue en N pour contrôler l'ensemble de la procédure. Il peut s'agir d'acide éthylènediamine-tétraacétique (EDTA), d'acétanilide, de l-asparaginacide, de sulfanilacide ou d'autres acides aminés dont la teneur en N est connue.
- ✓ Le sulfate d'ammonium ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) est utilisé pour contrôler la distillation.
- ✓ Échantillon de contrôle ou matériel de référence interne (MRI) approprié pour les échantillons à analyser.

Santé et sécurité

- Cette procédure implique l'utilisation de produits chimiques dangereux. Reportez-vous aux directives de sécurité du laboratoire ou à la fiche de données de sécurité (FDS) avant de procéder.

Sécurité du personnel

Éléments de protection personnelle

- Des lunettes de sécurité.
- Des gants.
- Des blouses de laboratoire.



doivent être portés lors de la manipulation de tout produit chimique et d'échantillons.

Sécurité du personnel

- ❑ Prenez les précautions nécessaires lors de la manipulation d'équipements à haute température.
- ❑ Suivez les consignes de sécurité du fabricant lorsque vous utilisez l'équipement.



Hygiène : Se laver les mains et nettoyer les autres zones exposées avec du savon doux et de l'eau après avoir utilisé tous les réactifs chimiques.



Risque chimique

- ❑ Acide sulfurique : Tenir à l'écart des flammes nues/de la chaleur.
- ❑ Effectuer les opérations sous une hotte avec aspiration/ventilation.
- ❑ Ne pas rejeter les déchets à l'égout.
- ❑ Ne jamais diluer en versant de l'eau dans l'acide.
- ❑ Toujours ajouter l'acide à l'eau.



Tous les titrages et la manipulation de produits chimiques doivent être effectués sous une hotte.

Préparation de l'échantillon

- La taille de l'échantillon varie de grammes (g) à milligrammes (mg), en fonction du K_jN de l'échantillon.
- Plus la taille de l'échantillon est petite, plus le broyage doit être fin pour obtenir une homogénéisation de l'échantillon.



En général, si on pèse une masse >1 g, on peut utiliser un échantillon de sol tamisé à 2 mm, mais si on pèse une masse < 1 g, il est recommandé de tamiser l'échantillon à travers une maille de 0,5 mm ou moins.



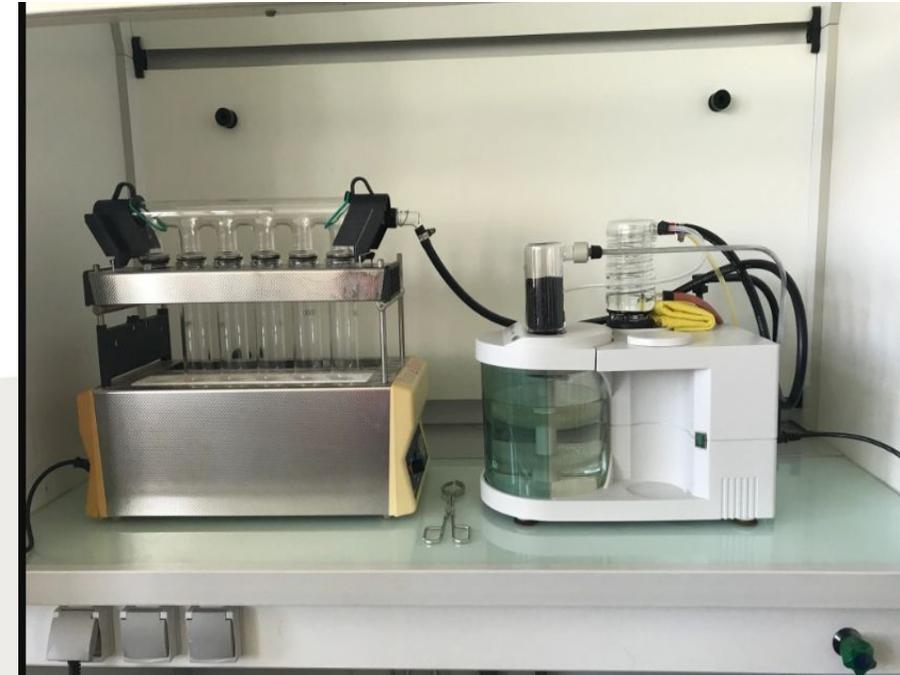
Digestion

Tableau. Poids recommandé de l'échantillon pour l'analyse

Poids (g)	KjN (%)	CO (%)	Couleur
0,2	0,5	5	Noir gris foncé, brun foncé
0,5	0,2	2	Brun -brun foncé, gris -gris foncé
1,0	0,1	1	Brun

Digestion

- ✓ Ajouter à la prise du sol environ 1 à 2 g de mélange de catalyseurs , 3 à 5 ml de H₂SO₄ concentré, et agiter soigneusement jusqu'à ce que l'acide soit bien mélangé à l'échantillon.
- ✓ Placer les tubes dans le bloc digesteur et augmenter lentement le réglage de la température à 390°C ± 10°C, sans dépasser 410°C.
- ✓ Faire bouillir jusqu'à ce que le mélange de digestion devienne clair, puis poursuivre la digestion pendant au moins dix minutes,
- ✓ Pour la plupart des sols, un temps de digestion de 30-60 minutes est suffisant
- ✓ Chaque lot de 20 à 40 échantillons doit contenir au moins deux blancs de réactifs (sans sol), et un ou plusieurs étalons chimiques, échantillons de contrôle (IRM) ou MRC.



Digestion

- ✓ Sortir le portoir de tubes du bloc-digesteur, le placer avec précaution sur un support de portoir et laisser refroidir les tubes.
- ✓ Ajouter lentement, en remuant, environ 20 mL d'eau aux tubes et laisser refroidir. Cela permet la mise en suspension des matières insolubles dans la solution.
- ✓ Si le contenu des tubes est solidifié et ne se dissout pas, chauffer à nouveau les tubes jusqu'à ce que le précipité se dissolve, puis refroidir avec de l'eau du robinet.
- ✓ Si une unité de distillation automatique est utilisée avec la capacité de distribuer l'eau avant le début du processus de distillation, il est recommandé de ne pas laisser les digests refroidir complètement.



Distillation et titrage

Ajustement des conditions de distillation - Blanc de distillation

- ❖ Ajouter 20 mL de solution de H_3BO_3 dans un erlenmeyer. Placer le ballon sous l'extrémité du condensateur, avec l'extrémité touchant la surface de la solution.
- ❖ Placer un tube propre et vide dans l'unité de distillation et ajouter 20 mL d'eau et 20 mL de solution de NaOH .
- ❖ Distiller environ 100 mL de condensat, rincer l'extrémité du condensateur.
- ❖ Lorsque la distillation à la vapeur est utilisée, un taux de distillation allant jusqu'à environ 25 mL min⁻¹ est appliqué pour maintenir la température du distillat en dessous de 22 °C.



Distillation et titrage

- ❖ Titrer avec une solution de H_2SO_4 ($c(\text{H}^+) = 0,01 \text{ mol.L}^{-1}$) jusqu'au point final de l'indicateur. Enregistrer le volume de l'acide utilisé (mL).
- ❖ Lorsqu'on utilise un titrage potentiométrique, le point final du titrage devrait se situer à environ $\text{pH} = 5$. Dans ce cas, le point final du titrage correspond au pH du virage de l'indicateur.
- ❖ Cette procédure de distillation des blancs doit être répétée au moins trois fois avant de distiller les blancs de réactifs, les MRI et les échantillons.



Calcul

$$N(\text{g/Kg}) = \frac{(V_1 - V_0) \times [H^+] \times MN}{m}$$

V_1 = le volume de la solution H_2SO_4 utilisée pour le titrage de l'échantillon.

V_0 = la valeur moyenne de l'essai à blanc.

MN = la masse molaire de N (elle est de 14,0067).

m = la masse de la prise d'essai.

- N C'est la concentration d'azote dans le sol, en milligrammes de N par gramme de sol (ou en grammes de N par kilogramme de sol) ;
- N(%) on divise par 10

Assurance de la qualité/contrôle de la qualité

❖ Pour vérifier la performance de la méthode

☐ des répliques ou répétitions d'échantillons.

☐ des MRC (matériel de référence certifié)

☐ des substances à teneur connue en N.

☐ des échantillons de contrôle (MRI) et des blancs doivent être incorporés à intervalles réguliers dans chaque lot d'essai.

☐ il est recommandé d'inclure au moins deux blancs de réactifs et un ou plusieurs étalons chimiques ou échantillons de contrôle (IRM) pour chaque lot de 20 à 40 échantillons.

Assurance de la qualité/contrôle de la qualité

- Essai de précision: - Au moins cinq pour cent des échantillons d'un lot d'essai doivent être des répliques, ce qui garantit au moins un échantillon en double si le lot est petit.

$$\% RSD = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

s = écart-type du résultat du duplicata

\bar{x} = moyenne

% RSD= le pourcentage d'écart-type relatif .

Assurance de la qualité/contrôle de la qualité

❖ Test de récupération:

Effectuer une analyse en trois exemplaires du matériau de référence certifié de la matrice analysée (sol) (MRC) ou d'un matériau de référence interne (MRI),

$$\% \text{ Récupération} = \frac{\text{moyenne des valeurs d'observation}}{\text{valeur réelle}} \times 100$$

Assurance de la qualité/contrôle de la qualité

❖ Comparaison interlaboratoire:

- Au moins une fois par an, le laboratoire doit participer à un essai d'aptitude interlaboratoire.
- Si le résultat obtenu est douteux ou insatisfaisant, il est nécessaire de procéder à une évaluation, d'identifier la cause du problème et de développer des actions correctives et préventives.
- Plusieurs laboratoires ont participé au Proficiency Test by GLOSOLAN (PT 2021)



GLOSOLAN
training sessions
2022



Assurance de la qualité/contrôle de la qualité

❖ Carte de contrôle:

- ❑ Effectuez l'analyse répétée d'un échantillon de contrôle ou d'un MRI dans un lot d'échantillons de test.
- ❑ Tracer le résultat sur une carte de contrôle.
- ❑ Surveiller les résultats.
- ❑ Si les résultats sont en dehors des limites spécifiées (ou tendent à l'être), une évaluation doit être faite. La cause de la non-conformité doit être identifiée pour développer des actions correctives et préventives.



Food and Agriculture
Organization of the
United Nations

Merci pour votre attention

