LABORATOIRE DES SCIENCES DU SOL
INRA-ENSA MONTPELLIER

URA-GERDAT
CIRAD

CERTIFICAT D'ETUDES SUPERIEURES D'AGRONOMIE

METHODOLOGIE D'EXTRACTION ET DOSAGE PAR CHROMATOGRAPHIE IONIQUE DE L'OXALATE DE CALCIUM EN SOLS CALCAIRES ET DANS LE MICROENVIRONNEMENT DE RACINES MYCHORHIZEES.

par

Georges PIOMBO

Soutenu le 30 juin 1994

Jury :

P.HERMANN Professeur en Sciences du Sol E.N.S.A.M.
J.C. ARVIEU Directeur de Recherche I.N.R.A.
G. CALLOT Directeur de Recherche I.N.R.A.
P.de REFFYE Directeur des Recherches du GERDAT-CIRAD
P. FALLAVIER Directeur de l'URA GERDAT-CIRAD

AVANT-PROPOS

Je remercie vivement, Messieurs Patrick Hermann, Jean-Claude Arvieu et Gabriel Callot, d'avoir accueilli dans leur laboratoire un "étudiant" supplémentaire, et d'avoir encadré ce travail.

Je suis reconnaissant à Monsieur Philippe De Reffye de participer au jury de ce mémoire.

J'adresse mes plus vifs remerciements à Monsieur Paul Fallavier, pour ses conseils, ses encouragements et sa disponibilité à mon égard.

Je souhaite exprimer, aussi, toute ma gratitude à Monsieur Daniel Babre qui m'a soutenu et guidé durant tout l'exercice.

Je remercie, enfin tous mes collègues et en particulier Sandrine Renoir qui m'ont aidé et encouragé à réaliser ce document.

SOMMAIRE

RESUME 1

1 INTRODUCTION 2

2 ETUDE THEORIQUE 3
2-1 Propriétés de l'acide oxalique 3
2-2 Speciation de l'acide oxalique 3
2-3 Etude de la solubilisation de l'oxalate de calcium par HCl 5
2-3-1 Etude des reactions 6
2-3-2 Modélisation 6
2-4 Etude d'une simulation plus complexe 7
2-5 Elimination de l'effet du fer 10
2-5-1 Etude de la complexation du fer 10
2-5-1-1 EDTA 10
2-5-1-2 KCN 12
2-5-1-3 Stabilite du complexe oxalo-ferrique 13
2-5-2 Reduction du fer 13
2-5-2-1 Acide ascorbique 13
2-5-2-2 L'hydroxylamine 14
2.6 Mode operatoire pour l'extraction de l'oxalate de calcium d'un sol calcaire . 15

3 ETUDES EXPERIMENTALES 17
3-1 Cinétique de l'extraction 17
3.2 Purification de l'extrait 18
3-2-2 Elimination des cations 19
3-2-2-1 Choix de la résine 19
3-2-2-2 Mode opératoire 20
3-2-3-1 Fixation par une résine anionique 21
3-2-3-2 Précipitation directe des ions chlorures 21
3-2-3-3 Colonnes ON-GUARD Ag+ 21
3-3 mode operatoire de l'extraction et de la purification d'un échantillon de sol calcaire en vue du dosage chromatographique de l'oxalate 22

4 CHROMATOGRAPHIE IONIQUE 23
4-1 Matériel 23
4-1-1 Principe 23
4-1-2 Dispositif analytique 23
4-1-3 Colonne 23
4-1-4 Neutralisation chimique 24
4-1-5 Détection 24
4-1-6 Calculs 24
4-2 Protocole analytique 24
4-2-1 Eluants 24
4-2-2 Gradient 24
4-2-4 Volume d'injection 25
4-2-5 Etalonnage 27
4-2-6 pH de l'extrait 27
4-3 Conservation 28
4-3-1 Figures 28
4-3-2 Commentaires 30
4.4 protocole analytique retenu pour le dosage de l'acide oxalique 31

5 APPLICATIONS 32
5-1 sols enrichis 32
5-1-1 Choix des sols calcaires 32
5-1-2 Analyses préliminaires 32
5-1-3 Supplémentation en oxalate de calcium 34
5-1-4 Commentaires 34
5-2 echantillons naturels 35
5-2-2 analyses préliminaires 35
5-2-3 Commentaires 36
5-4 Echantillons Rhizosphèriques 37
5-4-1 Extraction des ions organiques 37
5-4-2 Extraction de l'oxalate de calcium dans les racines mycorhizée . . . 37
5-4-3 Tableaux de résultats 37
5-4-4 commentaires 38

6 CONCLUSION 39

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 40

RESUME

L'oxalate (anion organique) joue un rôle important dans les relations sol, racine, micro-organismes.
Le but de ce travail est de proposer une méthode d'analyse du dosage de l'oxalate.
L'extraction est réalisée par l'acide chlorhydrique normal à chaud avec un volume déterminé d'après la teneur en calcaire de l'échantillon.
Une étude théorique préalable réalisée à l'aide du logiciel de calcul GEOCHEM (détermination de la composition à l'équilibre des différents éléments présents dans la solution étudiée), montre que pour solubiliser complètement l'oxalate il faut se trouver en milieu suffisament acide et libérer par ailleurs l'oxalate de ses complexes avec le fer par réduction de cet élément.
En vue du dosage par chromatographie ionique de l'oxalate, la solution ainsi obtenue est purifiée par élimination des cations (résine de type Amberlite IR 77), pour éviter une redistribution des espèces, et des chlorures en excès par l'emploi de colonnes contenant un sel d'argent (On-Guard Ag+ préconisées par Dionex). La méthode d'analyse conduit à un taux de recouvrement de 100 % d'oxalate de calcium introduit.

1 INTRODUCTION

Les ions organiques et en particulier l'ion oxalate jouent un rôle important dans les relations sol, plante, micro-organismes.
Ainsi l'étude des couples symbiotiques mycorhiziens met en évidence la fonction fondamentale de l'acide oxalique sécrété par les champignons (K. Cromack 1979, N. Malajczuk 1982, F. Lapeyrie 1987). Il permet dans les conditions peu favorables d'un sol calcaire une redistribution des molécules phosphatées. L'oxalate libéré piège les ions calcium en formant de l'oxalate de calcium et favorise l'absorption du phosphate par les plantes, tout en limitant celle du calcium (D. Tilak 1993).
On retrouvera la présence d'acide oxalique exsudé par les végétaux dans les milieux de cultures utilisés au laboratoire.
L'acide oxalique a des propriétés spécifiques, il entre dans de nombreux équilibres chimiques complexes entre la phase solide et la solution du sol.
La quantification de cet anion organique est essentielle pour une interpétation pertinente de l'interaction sol-racine.
Il convient au stade de l'analyse de maîtriser l'extraction, la conservation, et la quantification de ce ligand.
Les méthodes d'analyses utilisant la colorimétrie ne sont pas spécifiques, la détermination de l'acide oxalique par voie enzymatique est contraignante et coûteuse. Celles faisant appel à la chromatographie gazeuse (J. Mee 1972) ou liquide à haute pression (détection par un spectrophotomètre U.V.) manquent de précision ou de sensibilité (T.G. Howe 1990). L'avènement de la chromatographie ionique et la détection conductimétrique, nous laissent entrevoir de nouvelles possibilités (W.J.Hurst 1989, E.Smolders 1990, B.C. Liliehom 1990).
Le but de ce travail est de proposer des solutions analytiques pour doser l'oxalate par chromatographie ionique dans les différentes matrices proposées : sols, racines.
Dans un premier temps nous nous efforcerons de mettre au point une méthode d'extraction de l'oxalate de calcium dans des sols calcaires, compatible avec le dosage par chromatographie ionique, de surmonter les contraintes liées à cette technique de dosage (milieu acide, excès d'ion Cl^-, chelates). La méthode sera testée sur des sols calcaires contenant de nombreuses mycorhizes.
Dans un deuxième temps nous essaierons d'adapter cette technique analytique pour doser l'acide oxalique et l'oxalate de calcium dans des matrices végétales.

2 ETUDE THEORIQUE

2-1 Propriétés de l'acide oxalique

L' acide oxalique se trouve à l'état naturel sous forme d'acide ou d' anion (sécrété par des champignons) (V. Grignard 1958) et d'oxalate de calcium et de potassium dans les feuilles, racines, rhizomes de diverses plantes. Il existe naturellement aussi dans le monde animal. L'acide oxalique est le seul diacide ayant une liaison directe entre les groupements carboxylés ce qui entraine une acidité relativement forte ($pK_2=1.25$). La faible distance (1.43 A) entre les deux carbones montre qu'il existe un effet de résonance entre les deux atomes, dû aux doubles liaisons des deux groupements carboxyliques. La rotation autour de la liaison C-C n'est pas possible (R.C.Evans 1954). L'acide oxalique est polymorphique, la forme rhombique (forme α) est thermodynamiquement stable à température ambiante, la forme monoclinique (forme ß) est instable (C.A.Bernales 1985).
A haute température l'acide se décompose :

$$H_2C_2O_4 \xrightarrow{+160°\ C} CO + CO_2 + H_2O$$

Il est réducteur à chaud. Il est oxydé par l'oxygène de l'air. L'acide oxalique, diacide, par ses propriétés complexantes, provoque la fixation de cations métalliques et en particulier du calcium dans les sols calcaires :

$$H_2C_2O_4 + CaCO_3 \longrightarrow CaC_2O_4 + CO_2 + H_2O$$

Il forme aussi avec les ions ferriques et aluminium des complexes stables .
L'oxalate de calcium est pratiquement insoluble ($Ks=10^{-8.5}$) et sa formation autour des racines d'une plante permet à celle-ci de s'adapter au milieu calcaire : l'oxalate de calcium formé empêche le calcium excédentaire d'être absorbé par la plante et évite une toxicité calcique (D.Tilak, 1993).

2-2 Spéciation de l'acide oxalique

Ses réactions de dissociation montrent que, en fonction du pH, il se présente sous trois formes possibles :

$$H_2C_2O_4 \longrightarrow HC_2O_4^- + H^+$$

$$HC_2O_4^- \longrightarrow C_2O_4^{=} + H^+$$

Les constantes sont les suivantes :

$$K2=\frac{[C_2O_4H^-]\ [H^+]}{[H_2C_2O_4]}=10^{-1.2}$$

$$K1 = \frac{[C_2O_4^{--}]\ [H^+]}{[HC_2O4-]} = 10^{-4.3}$$

La concentration totale en oxalate peut s'exprimer en fonction des différentes espéces en présence :

[C totale] = $[H_2C_2O_4]$ + $[HC_2O_4^-]$+ [$C_2O_4^=$]

$$[Ctotale] = \frac{\frac{[C_2O_4^{--}]\ [H^+]^2}{K1}}{K2} + \frac{[HC_2O_4^-]\ [H^+]}{K1} + [C_2O_4^{--}]$$

$$[Ctotale] = [C_2O_4^{--}]\ (\frac{[H^+]^2}{K1K2} + \frac{[H^+]}{K1} + 1)$$

$$[C_2O_4^{--}] = \frac{(Ctotale)}{\frac{[H^+]^2}{K1K2} + \frac{[H^+]}{K1} + 1}$$

En raisonnant en pourcentage, les différentes formes peuvent être exprimées de la façon suivante :

$$\%C_2O_4^{--} = \frac{100 \times [C_2O_4^{--}]}{[C_2O_4^{--}]\ (\frac{[H^{+2}]}{K1K2} + \frac{[H^+]}{K1} + 1)} = \frac{100}{\frac{[H^+]^2}{K1K2} + \frac{[H^+]}{K1} + 1}$$

$$\%HC_2O_4^- = \frac{100 \times [H^+]}{K1\ (\frac{[H+]^2}{K1K2} + \frac{[H^+]}{K1} + 1)} = \frac{100}{\frac{H}{K2} + 1 + \frac{K1}{H}}$$

$$\%H_2C_2O_4 = \frac{100}{\frac{K1K2}{[H^+]^2} + \frac{K2}{[H^+]} + 1}$$

La répartition des différentes formes de l'ion oxalate en fonction du pH est représentée dans la figure 1 (Tableau annexe 1).

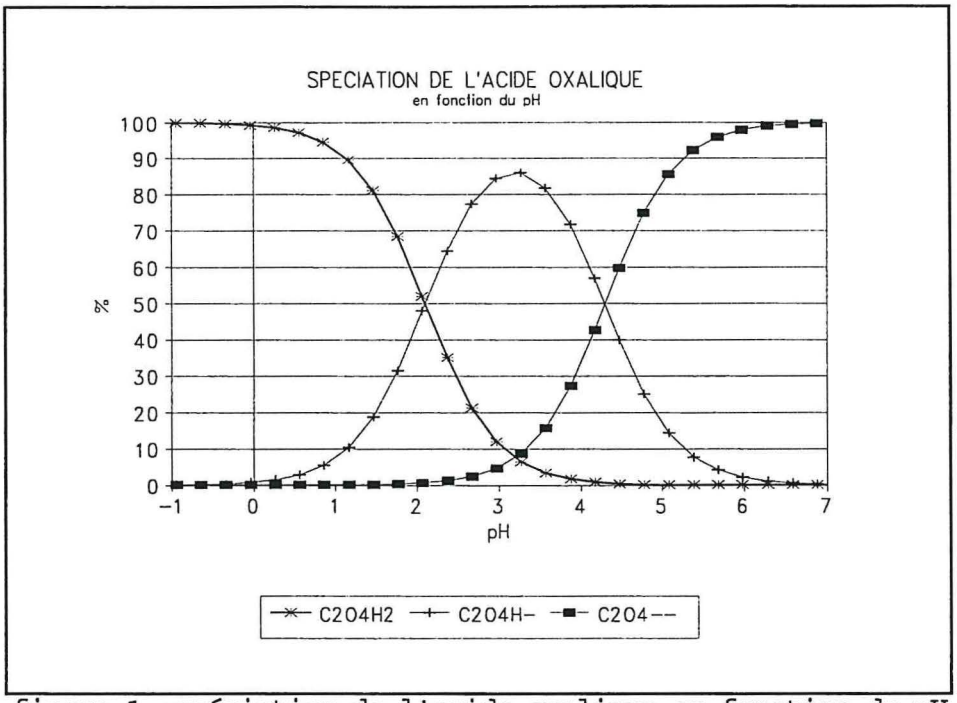


figure 1 :spéciation de l'acide oxalique en fonction du pH

L'acide oxalique se présente sous trois formes différentes suivant le pH de la solution. A pH<0.80 il se trouve à 95% sous sa forme acide, non dissociée. L'extraction acide de l'oxalate de calcium devra se faire à un pH inférieur à 0.8. Mais l'injection dans la colonne de séparation va modifer fortement le pH (éluant soude) et donc la forme de l'ion oxalate. Ces changements de spéciation rendront nécessaires la purification de l'extrait.
Ces considérations seront reprises pour la suite de l'étude théorique à l'aide du logiciel GEOCHEM (Sposito et Mattigod, 1980). Le logiciel GEOCHEM par sa base de données importante (comprenant entre autres, les constantes chimiques de la plupart des composés en solution) et par des calculs appropriés, du même type que celui développé au paragaphe précédent, permet de déterminer la composition à l'équilibre des différents éléments présents dans la solution étudiée à partir des concentrations molaires totales des composés en solution et du pH du milieu réactionnel. Le logiciel GEOCHEM calcule la répartition de tous les cations et anions selon leurs différentes espèces.Les précipités qui se produisent sont indiqués et leur quantité est calculée.

2-3 Etude de la solubilisation de l'oxalate de calcium par HCl

L'oxalate de calcium insoluble dans l'eau ($Ks=10^{-8.5}$) est solubilisé dans la plupart des acides forts sauf l'acide acétique (HAND BOOK OF CHEMISTRY). Parmi les acides les plus couramment utilisés, H_2SO_4 et HNO_3 sont à écarter, car l'excès de leur anion associé $SO4^-$ et $NO3^-$ pourrait masquer la détection de l'ion oxalate par chromatographie ionique; de plus, l'acide nitrique est un oxydant puissant. Nous utiliserons l'acide chlorhydrique molaire (Liliehom 1992). Le but de cette attaque est d'extraire l'oxalate après avoir solubilisé le carbonate de calcium.
GEOCHEM permet de prévoir les meilleures conditions d'extraction pour obtenir le maximun de

recouvrement d'acide oxalique après réaction.
Nous avons décidé, arbitrairement, de considérer une masse de 5 grammes de sol. A titre d'exemple, la simulation est réalisée pour un sol contenant 35% de calcaire et 2% d'oxalate de calcium.

2-3-1 Etude des réactions :

1 $CaCO_3 + 2\ HCl \longrightarrow CO_2 + Ca^{++} + 2\ Cl^- + H_2O$

2 $CaC_2O_4 + 2\ HCl \longrightarrow H_2C_2O_4 + Ca^{++}\ 2\ Cl^-$

Les deux réactions nécessitent des volumes réactionnels suivants :

5g de sol	$CaCO_3$ CaC_2O_4 grammes	$CaCO_3$ CaC_2O_4 millimoles	HCl millimoles	HCl 1M millilitres
35 % de $CaCO_3$	1.75	17.5	35	35
2 % de CaC_2O_4	0.1	0.78	1.56	1.56

Tabeau 1 : Quantités d'acide nécessaires pour dissoudre le carbonate de calcium et l'oxalate de calcium pour une prise d'essai de 5 grammes.

2-3-2 Modélisation

En considérant un échantillon hypothétique contenant:
carbonate de calcium 35 %
oxalate de calcium 2 %
nous avons calculé en fonction de la quantité d'HCl ajoutée, le pH du milieu et le % d'oxalate et de calcium dissous sous forme moléculaire, ionique, ou complexée: $H_2C_2O_4$, Ca^{++}, $CaHC_2O_4^+$, $CaCl^+$
Le tableau (annexe 2) et la figure N° 2 présentent les résultats de l'étude.

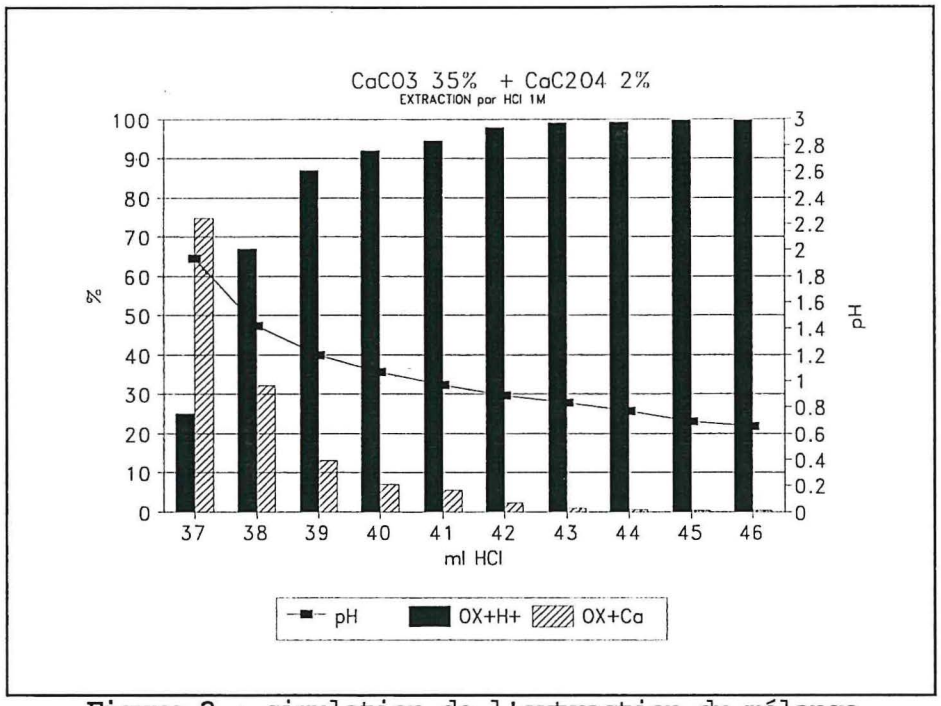


Figure 2 : simulation de l'extraction du mélange carbonate-oxalate de calcium

Commentaires

Le volume d'acide chlorhydrique calculé sur la base des deux réactions 1 et 2 (35 ml+ 1.56 ml) ne libère pas complétement l'acide oxalique . Il reste dans le milieu réactionnel environ 75% d'oxalate de calcium. Ce composé disparait rapidement après diminution du pH par ajout d'acide chlorhydrique molaire. Avec 10 millilitres supplémentaires soit un volume total de 45 millilitres, l'ion oxalate est complétement dissous sous forme $H_2C_2O_4$.

2-4 Etude d'une simulation plus complexe :

L'extraction de l'oxalate doit également tenir compte de la possibilité de complexation de l'oxalate dissous par le fer et l'aluminium éventuellement contenus dans l'échantillon de sol.Le logiciel GEOCHEM permet de calculer les effets du fer et d'aluminium sur le taux de recouvrement de l'oxalate sous forme de $H_2C_2O_4$.
Nous avons considéré des systèmes hypothétiques contenant $CaCO_3$, de l'oxyde de fer et de l'hydroxyde d'aluminium sachant que l'oxalate chélate le fer et l'aluminium.

* Réactions chimiques :

1 $CaCO_3 + 2\ HCl \longrightarrow CO_2 + Ca^{++} + 2\ Cl^- + H_2O$

2 $CaC_2O_4 + 2\ HCl \longrightarrow H_2C_2O_4 + Ca^{++} + 2\ Cl^-$

3 $Fe_2O_3 + 3\ HCl \longrightarrow 2\ (\ Fe^{+++} + 3\ Cl^-\ ) + H_2O$

4 $Al(OH)_3 + 2\ HCl \longrightarrow (Al^{+++} + 3\ Cl^-\ ) + H_2O$

Nous avons programmé plusieurs situations en faisant varier les teneurs en carbonate de calcium (1%, 35%, 80%) et en fixant les teneurs en oxyde de fer et d'hydroxyde d'aluminium à 1% (figures 3,4,5).

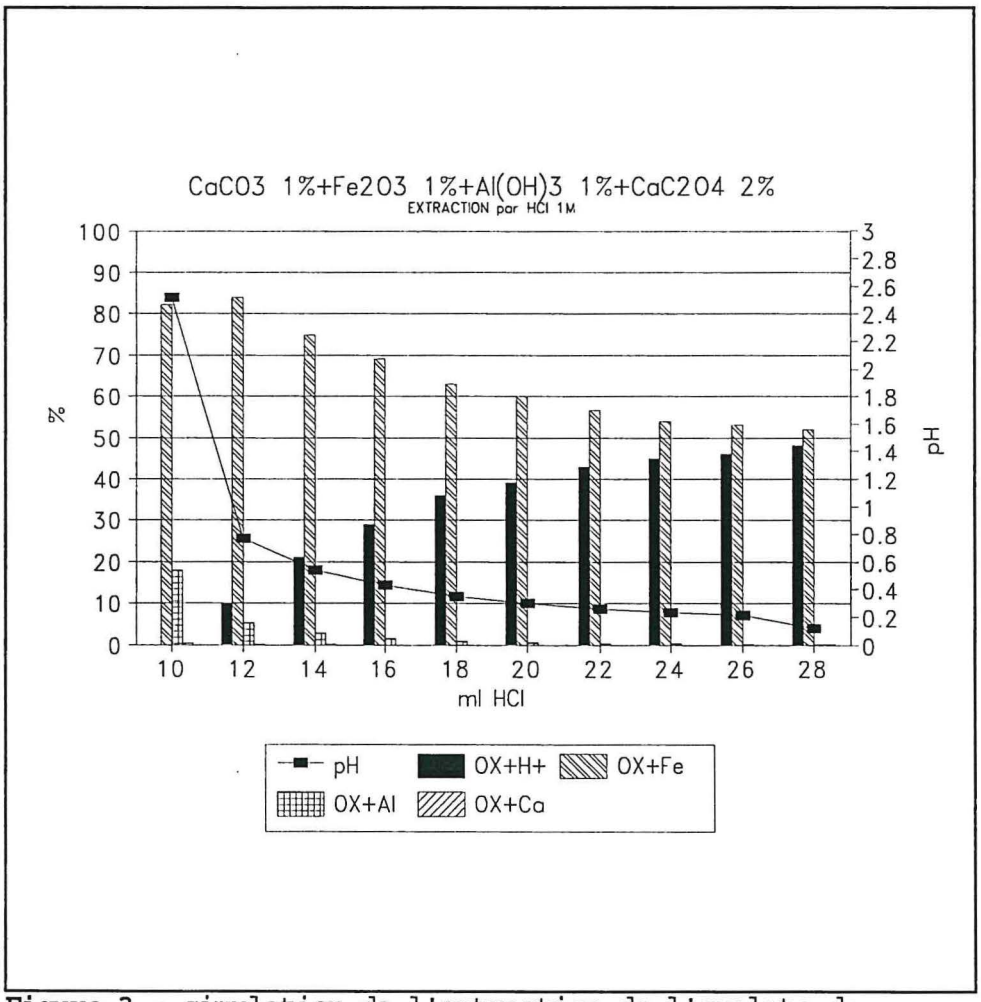


Figure 3 : simulation de l'extraction de l'oxalate de calcium dans un milieu calcaire (1%) contenant des composés métalliques

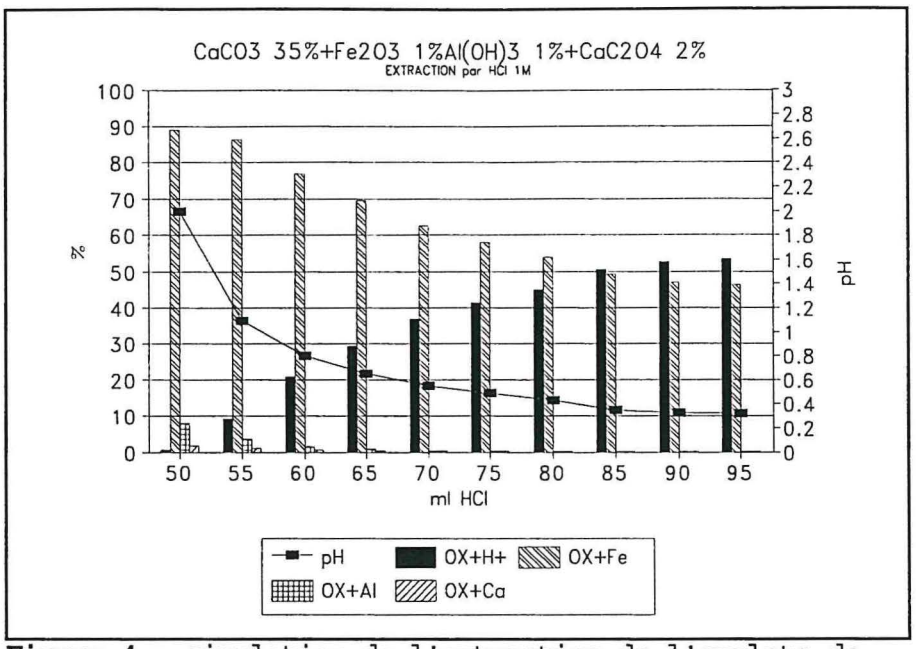


Figure 4 : simulation de l'extraction de l'oxalate de calcium dans un milieu calcaire (35%), contenant des composés métalliques

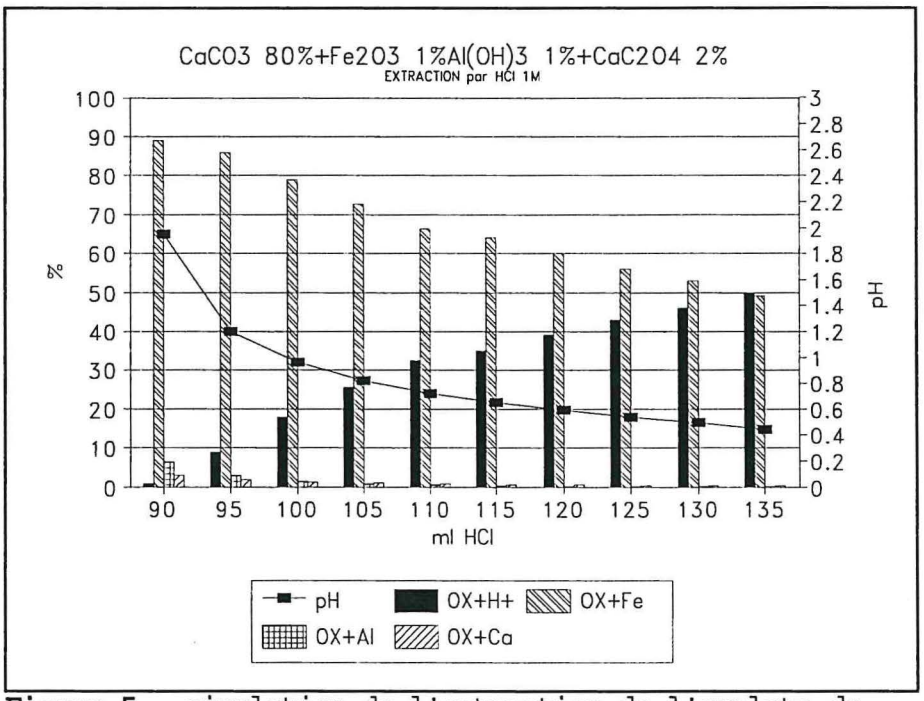


Figure 5 : simulation de l'extraction de l'oxalate de calcium dans un milieu calcaire (80%) contenant des composés métalliques

La simulation montre que le complexe Ox-Al n'est pas stable au dessous de pH 0.8, mais qu'une partie importante de l'oxalate reste compléxée par Fe quelle que soit la quantité d'acide ajoutée de sorte qu'on n'obtient pas un taux de recouvrement de 100 % d'acide oxalique "libéré" même à pH très bas (pH<0.2).

Il est donc nécessaire de lever cette interférence du fer.

2-5 Elimination de l'effet du fer

Parmi les techniques possibles nous pouvons envisager la complexation et la réduction de Fe^{3+} .

2-5-1 Etude de la complexation du fer :

Il s'agit de trouver un complexant plus puissant que l'oxalate afin de complexer le fer et de libérer ainsi l'oxalate sous forme d'acide oxalique facilement dosable.

2-5-1-1 EDTA

Nous avons d'abord utilisé l'EDTA (l'acide éthylènediaminetétraacétique).
L'EDTA posséde une configuration électronique et une stéréochimie plus appropriée donc un pouvoir complexant plus fort .
Les complexes EDTA - fer sont plus stables que ceux formés entre l'oxalate et le fer, comme le confirment les valeurs de leurs constantes globales de formation:(M. Roche 1990)
Fe^{3+} - oxalate, pK = 21
Fe^{3+}- EDTA, pK = 25.5
Plusieurs situations sont simulées à l'aide de GEOCHEM.
La teneur moyenne en carbonate de calcium est fixée à 35%,le fer sous forme d'oxyde varie de 1 à 8%. Les quantités d'EDTA nécessaires à sa complexation sont de 0,5g à 1,1g, l'hydroxyde d'aluminium reste à 1% .(figures n° 6, 7, 8)

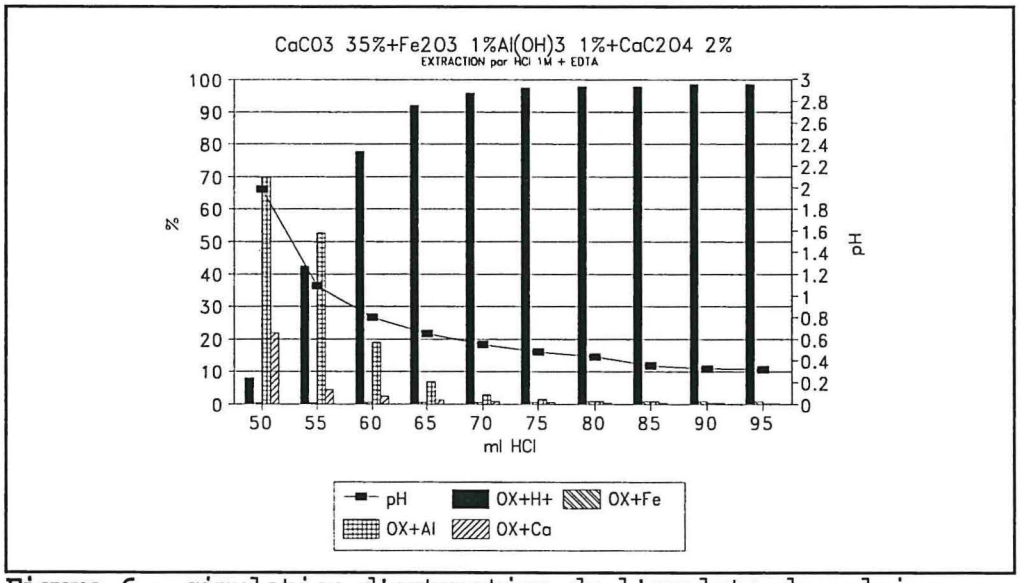


Figure 6 : simulation d'extraction de l'oxalate de calcium dans un milieu calcaire (35%) contenant 1% d'oxyde de fer III avec ajout d'EDTA

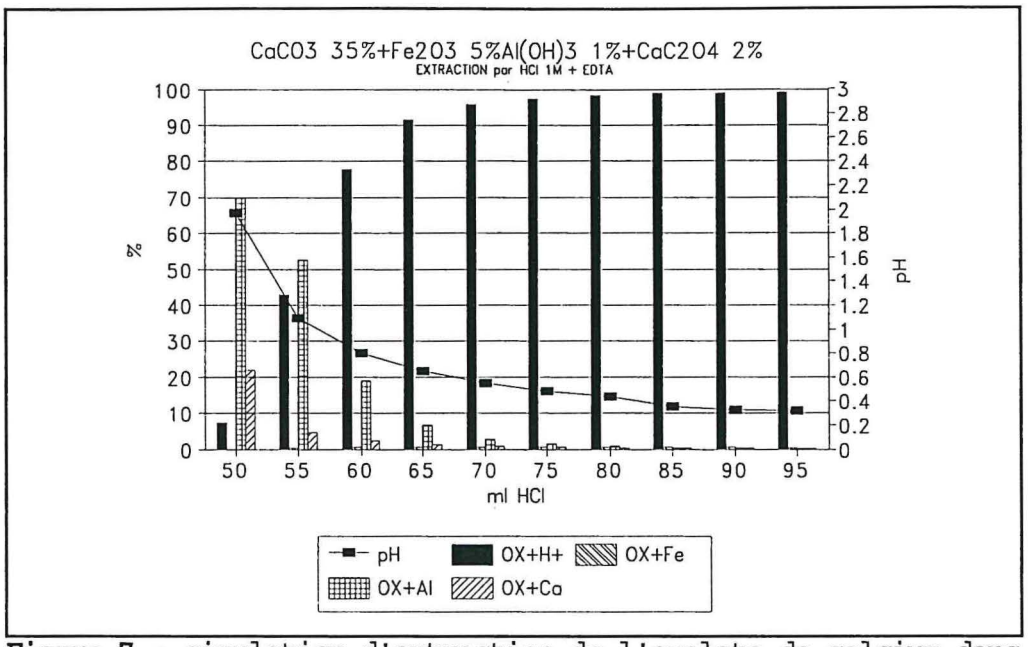


Figure 7 : simulation d'extraction de l'oxalate de calcium dans un milieu calcaire (35%) contenant 5% d'oxyde de fer III avec ajout d'EDTA

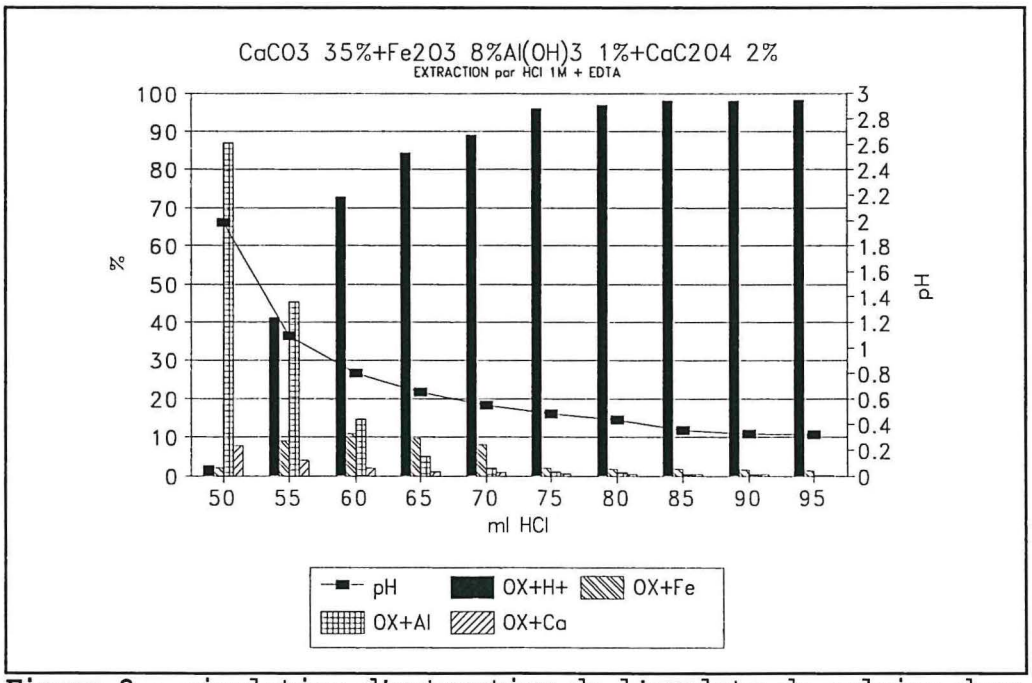


Figure 8 : simulation d'extraction de l'oxalate de calcium dans un milieu calcaire (35%) contenant 8% d'oxyde de fer III avec ajout d'EDTA

Commentaires

Les diagrammes montrent que pour des teneurs en carbonate de calcium de 35%, des teneurs en fer de 1% à 8% et pour un pH<0.6; le fer est compléxé par l'EDTA et l'ion oxalate se retrouve sous sa forme acide. Le résultat est analogue pour des teneurs en carbonate de calcium plus importantes, ou pour des simulations prenant en compte la présence de carbonate de magnésium . La concentration en EDTA dans la solution est fonction de la teneur en fer du sol étudié .
Or l'expérience montre que lors du dosage chromatographique, l'EDTA est susceptible d'interférer pour des concentrations supèrieures à 0.5 g/l (c'est à dire pour des teneurs en fer de 0.2 %).Il interfère fortement au dela et le chromatogramme n'est plus exploitable.

2-5-1-2 KCN

L'ion cyanure est aussi un complexant trés puissant du fer, le pK du complexe fer-cyanure est de 43.9 (G. Charlot, 1983). Nous allons simuler l'interaction des ions ferriques en présence d'oxalate et de cyanure.
(figure n° 9).

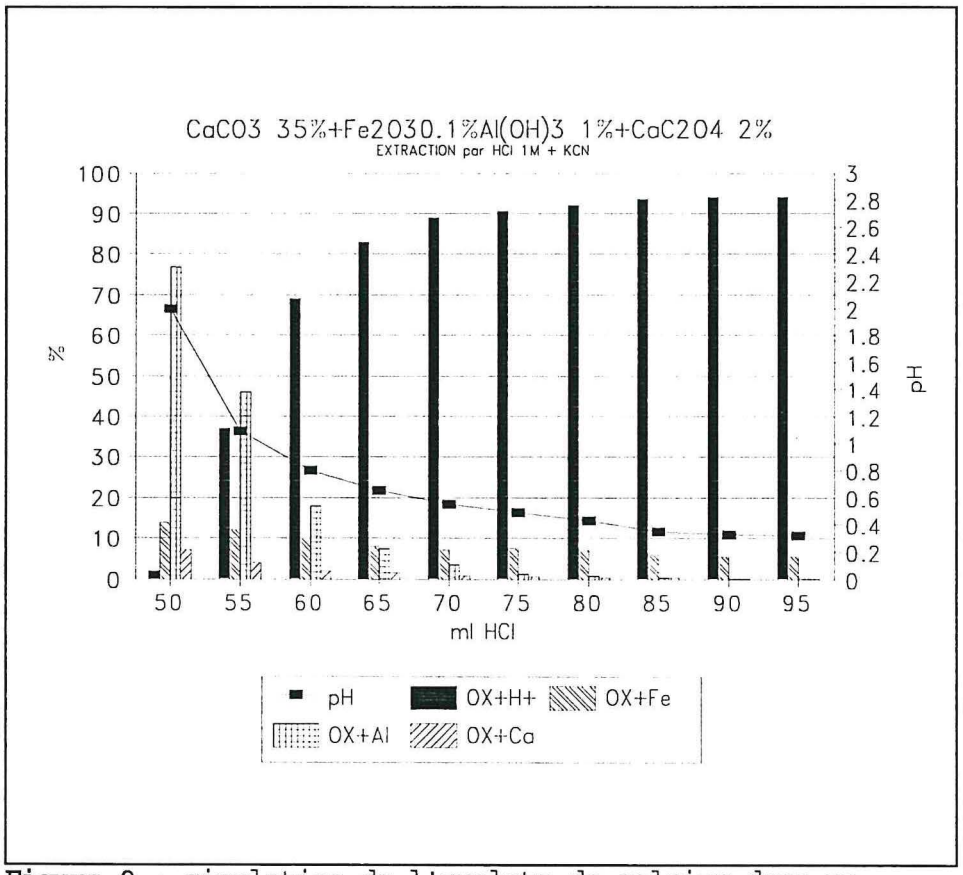


Figure 9 : simulation de l'oxalate de calcium dans un milieu calcaire de 35% et ferrique de 1% avec ajout de KCN complexant du fer

Commentaires :
Le cyanure de potassium n'interfére pas sur le dosage chromatographique . C'est un acide faible (pka=9.3) et en présence d'acide chlorhydrique molaire il se forme de l'acide cyanhydrique,qui est dangereux. De plus, pour des teneurs en fer de l'ordre de 0.1% le complexe fer-oxalate n'est pas complètement détruit (10% à pH=0.3) malgré un excés d'acide chlorhydrique important. Ces remarques condamnent l'utilisation de ce complexant pour cette étude.

2-5-1-3 Stabilité du complexe oxalo-ferrique

Nous avons programmé GEOCHEM pour étudier la stabilité du complexe ferrique en fonction du pH. Comme le montre le diagramme correspondant, (figure 10) le complexe évolue à partir de pH=6 jusqu'a disparaitre totalement à pH=9, il se forme alors de l'hydroxyde ferrique. Nous pourrions donc écarter les ions ferriques par précipitation en amenant la solution à un pH supérieur à 9, mais à pH basique le calcium va reformer un précipité avec l'oxalate, le dosage chromatographique de l'acide oxalique ne sera plus possible.
De plus le précipité d'hydroxyde de fer colloïdal risque d'entraîner d'autres éléments.

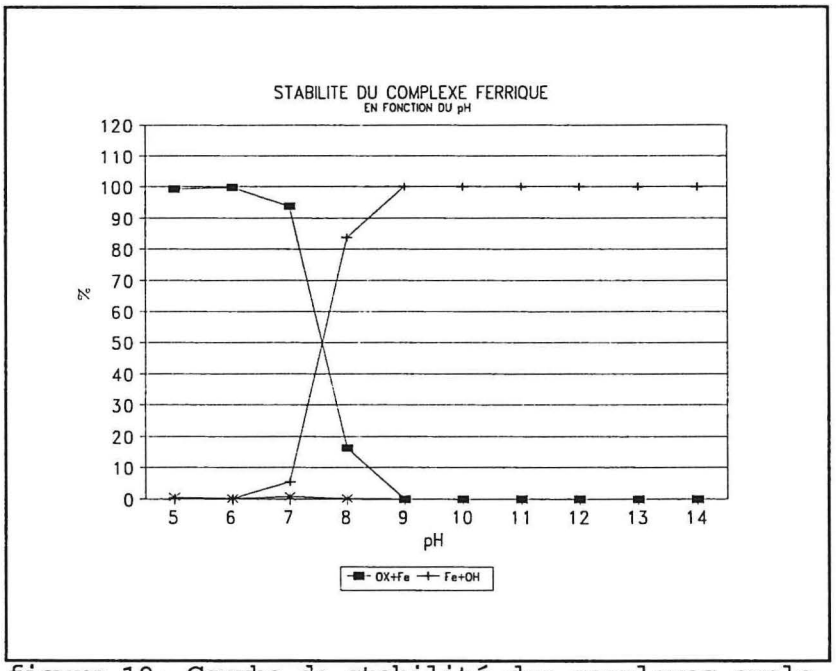


figure 10: Courbe de stabilité des complexes oxalo-ferriques et d'hydroxyde de fer en fonction du pH

La complexation du fer ne donnant pas de bonnes solutions, nous avons étudié l'effet de la réduction du fer sur l'extraction de l'oxalate.

2-5-2 Réduction du fer

Les constantes d'équilibre des complexes oxalo-ferreux (8.2) sont plus faibles que celles des complexes ferriques (21) , donc moins stables (G. Charlot).
L'acide ascorbique et l'hydroxylamine sont souvent utilisés pour réduire les ions ferriques dans différents milieux.

2-5-2-1 Acide ascorbique

L'acide ascorbique réducteur puissant peut être envisagé pour répondre au problème posé.
Potentiel d'oxydo réduction :
de l'acide ascorbique 0.18 volts
du Fe++/Fe+++ 0.77 volts
Mais en chromatographie ionique, avec une colonne de séparation AS11, l'ion ascorbate (ion associé au diacide) et l'ion oxalate ont le même temps de rétention. Dans ces conditions l'étude avec l'acide ascorbique n'a pas été poursuivie.

2-5-2-2 L'hydroxylamine

L'hydroxylamine, puissant réducteur en milieu basique réduit aussi les ions ferriques en ions ferreux en milieu acide. La réaction provoque un dégagement gazeux, elle est irréversible et lente en milieu acide.

***couple d'oxydo-réduction:**

$$2\,Fe\,(III) + 2N\,(-I) \longrightarrow 2Fe\,(II) + N_2\,(0)$$

La figure 11 représente une simulation du milieu réactionnel, analogue aux précédents, en présence d'ions Fe++.

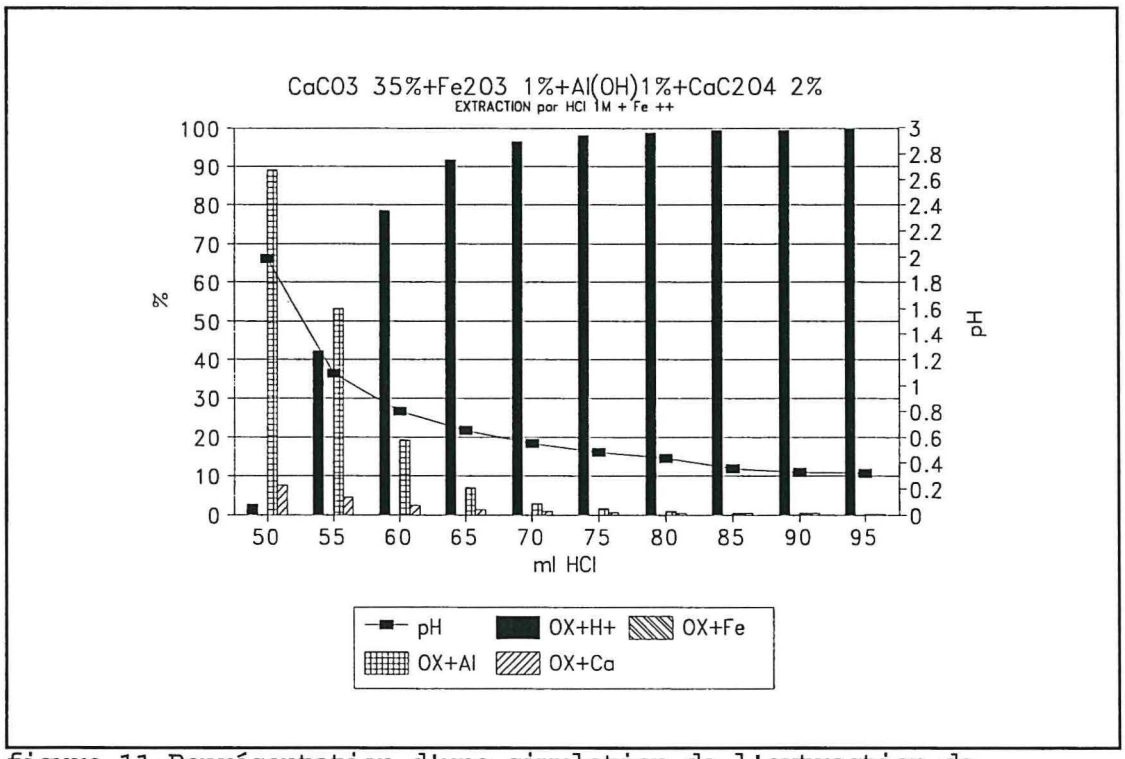


figure 11:Représentation d'une simulation de l'extraction de l'oxalate de calcium , en milieu calcaire et ferrique avec ajout d'hydroxylamine(réduction du fer).

Commentaires

Le diagramme n°11 montre qu'en présence d'ions ferreux le recouvrement total de l'oxalate est atteint pour un pH de l'ordre de 0.6. Ce pH est obtenu avec la quantité nécessaire d'HCl pour dissoudre $CaCO_3$, CaC_2O_4 et les oxydes ou hydroxydes métalliques contenus dans la solution + 20 ml d'excés. Nous pouvons remarquer la complète disparition du complexe oxalo-aluminium à PH=0.6. Le complexe oxalo-ferreux n'existe pas dans ce système même à pH=2.2 .
Les simulations d'autres situations, (présence d'oxalate de calcium supérieure à 2%, sols contenant de 1 à 80% de calcaire, de 1 à 10% de fer), ne montrent pas de différences significatives par rapport aux résultats présentés dans le graphique 11 à condition de respecter les quantités d'acide chlorhydrique requises par la composition du milieu réactionnel.
L'interférence du fer est levée si les ions ferriques sont réduits en ions ferreux.A cet effet l'hydroxylamine peut être utilisée.

2.6 Mode opératoire pour l'extraction de l'oxalate de calcium d'un sol calcaire

- **Pour solubiliser l'oxalate de calcium nous utilisons l'acide chlorhydrique molaire.**

- **La quantité d'acide nécessaire à la solubilisation de l'oxalate de calcium est calculée à partir de la teneur en calcaire de l'échantillon considéré. Nous avons tracé une courbe de proportionnalité à cet effet (figure 12). Nous rajoutons à ce volume calculé, 20 ml d'acide chlorhydrique 1M pour être dans des conditions de pH favorables à l'obtention d'un recouvrement total de l'acide oxalique et pour éviter la formation de chélates métalliques.**

- **La décomposition des oxydes ou hydroxydes métalliques (par HCl) exige une quantité d'ions H+ non négligeable. Par exemple pour une masse de sol de 5 grammes : des teneurs en fer (minéralisés) de 1% nécessitent 1,5 millilitre d'HCl 1M.**

- **Pour éviter la formation d'un chélate Fe^{3+}-oxalate nous ajoutons dans le milieu réactionnel de l'hydroxylamine afin de réduire les ions Fe^{3+} en Fe^{2+}.**

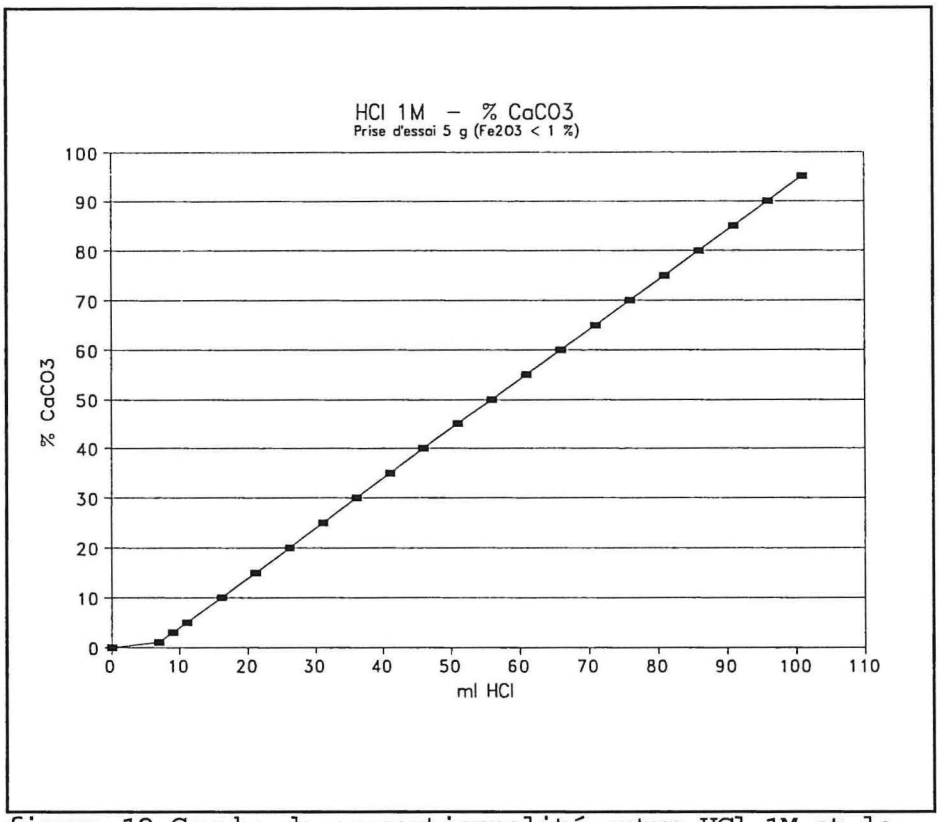


figure 12:Courbe de proportionnalité entre HCl 1M et la teneur en calcaire d'un sol, pour une prise d'essai de5g.

La solution d'extraction obtenue dans les conditions décrites ci-dessus contient du fer, de l'aluminium, des ions calcium, de l'acide oxalique non dissocié (95%), elle est fortement acide. Or la chromatographie ionique, se fait à pH basique imposé par l'éluant (NaOH 0.05M). Dans ces conditions, il va apparaître une redistribution des espèces lors de l'injection de l'extrait dans la colonne de séparation : formation de phosphate de calcium,d'hydroxydes de fer et d'aluminium et d'oxalate de calcium. Pour éviter ces phénomènes, il faut supprimer de l'extrait les cations susceptibles de précipiter.

Les ions chlorures présents dans le milieu réactionnel seront dilués ou écartés dans la mesure du possible en vue du dosage chromatographique. Leur concentration excessive pourrait masquer d'autres ions organiques.

3 ETUDES EXPERIMENTALES

3-1 Cinétique de l'extraction

*** Réaction 1 :** extraction du carbonate de calcium par l'acide chlorhydrique normal.

L'expérimentation nous montre que la réaction est instantanée et complète (dégagement gazeux de CO_2) à température ambiante.

*** Réaction 2 :** extraction de l'oxalate de calcium par l'acide chlorhydrique normal.

La réaction 2 est ausi très rapide, à température ambiante, nous avons atteint un recouvrement de 100% d'acide oxalique après 30 minutes de réaction (84% après 15 minutes).

*** Réaction 1 et 2 :** extraction des deux composés, en mélange, par l'acide chrorhydrique normal

Nous avons constaté que la réaction 1 était instantanée.Le dégagement gazeux de CO_2 nous laisse supposer que l'équilibre est complètement déplacé vers la droite. En considérant la réaction 1 terminée, il doit rester alors dans la solution une quantité d'acide suffisante pour que la deuxième réaction soit totale.

***Expérimentation :**

Le système contenant 35% de carbonate de calcium et 2% d'oxalate de calcium réagit avec la quantité nécessaire d'acide chlorhydrique molaire pour effectuer la première réaction. Puis nous avons rajouté 10 ml d'acide molaire afin de réunir les conditions théoriques pour que l'oxalate de calcium soit complétement solubilisé. Nous avons étudié la vitesse de réaction en fonction du temps à la température ambiante et à la température d'ébullition de l'acide chlorhydrique molaire, environ 101° C . (figure 14) .

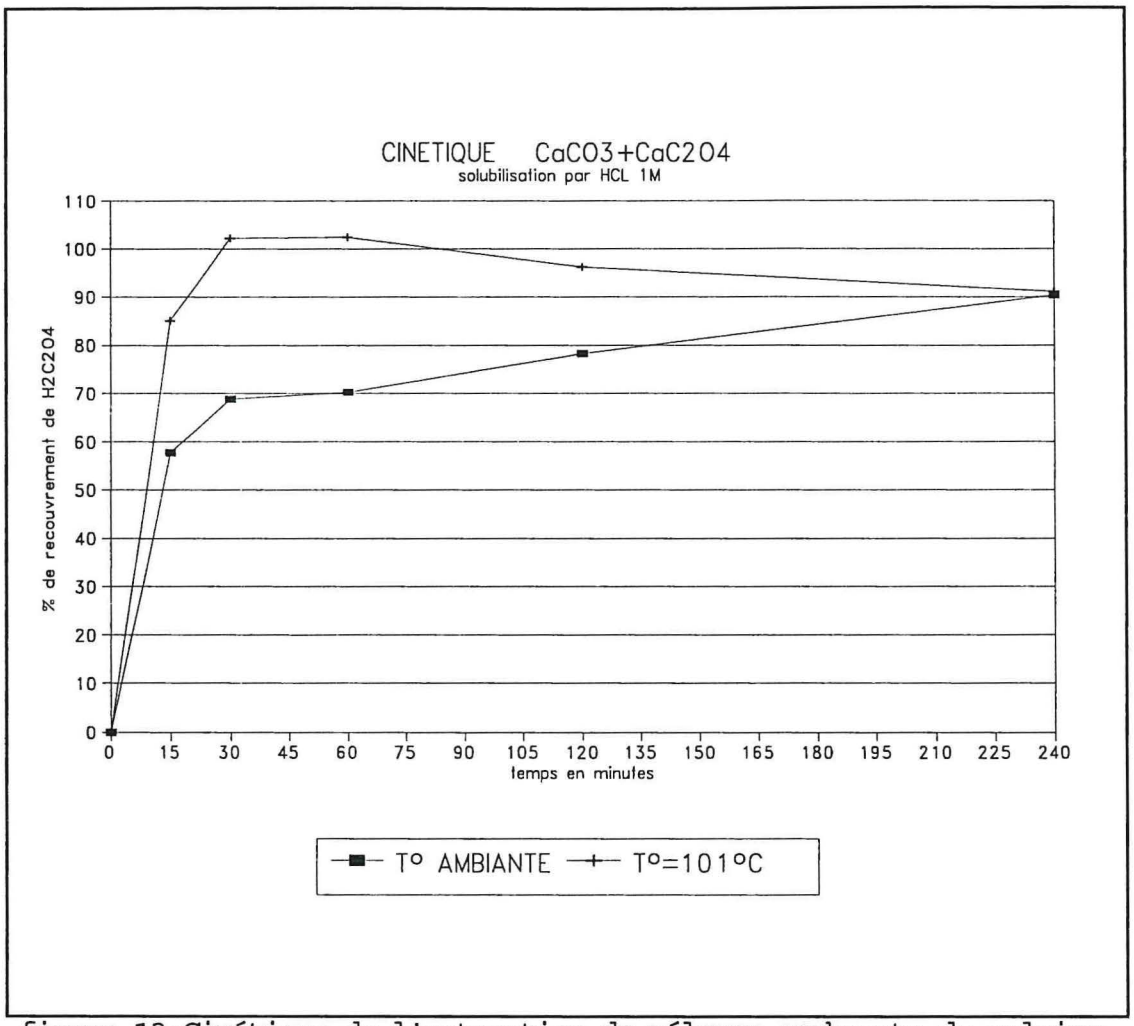


figure 13:Cinétique de l'extraction du mélange carbonate de calcium-oxalate de calcium

*** Commentaires**

Les courbes représentées (figure 13) montrent que l'extraction de l'oxalate est lente à la température ambiante alors qu'elle est complète en 30 minutes à la température d'ébullition de l'acide chlorhydrique molaire. Après avoir atteint rapidement le maximun de recouvrement, l'acide oxalique est stable pendant 60 minutes, puis sa réponse diminue (hypothèse : oxydation à chaud en milieu acide).
L'extraction de l'oxalate de calcium, par HCl 1 N, devra donc se faire à chaud, à ebullition douce, sous reflux, pendant une heure.

3.2 Purification de l'extrait :

3-2-1 Effets de l'hydroxylamine :

Les essais de dosage du chlorhydrate d'hydroxylamine en chromatographie ionique, montrent que pour des concentrations de l'ordre de 10 grammes par litre, nous n'avons pas d'artéfact sur le chromatogramme.

La réaction schématique d'oxydo-réduction nous laisse supposer que le fer réagit avec l'hydroxylamine mole à mole. Les quantités nécessaires d'agent réducteur seront donc fonction de la concentration en fer dissous dans l'extrait. A titre d'exemple : pour une teneur en fer dissous de 1%(50 milligramme pour 5 grammes de sol), nous ajoutons dans le milieu réactionnel 100 mg de chlorhydrate d'hydroxylamine.(soit 20 % supplémentaire à la quantité calculée).

3-2-2 Elimination des cations :

Ce chapitre fait largement référence aux travaux entrepris au laboratoire (N. Pisenti, D. Babre, 1994) sur l'utilisation des résines échangeuses pour séparer les cations dans les extraits de sols.

3-2-2-1 Choix de la résine

Nous avons choisi une résine fortement acide Amberlite IR-77.
Elle est constituée de billes de sulfonate de polystyrène réticulées par le divinylbenzène (8% de DVB). Le groupement fonctionnel SO_3H est extrêmement stable quelles que soient les conditions de pH et de température. Les billes sphériques ont une bonne résistance mécanique. La stabilité osmotique de la résine dépendra des tensions subies lors des échanges ioniques. La résine est toujours conservée à l'état humide; sa rétention d'eau et sa capacité d'échange sont fonction de son taux de réticulation.

*** capacité d'échange**

La capacité d'échange est fonction du taux de réticulation de la résine; pour un taux de 8% elle est de 2 milliéquivalents par millilitre de résine humide (T.V. Arden, 1975).
Nous avons déterminé la capacité d'échange de cette résine par la mesure suivante :

$$R\text{-}H^+ + Na^+ + OH^- \longrightarrow R\text{-}Na^+ + H_2O$$

30 Ml de soude 1N sont mis en contact avec 4 grammes de résine humide sous forme H^+ pendant une heure. La soude est dosée avant et après échange sur une prise d'essai de 20 millilitres par HCl 1 M .

<u>Résultats</u> : les volumes d'acides nécessaires pour neutraliser la soude avant et après échange sont respectivement de 19,5 et 14 ml. Ils conduisent à une valeur de CEC de 2,06 meq/g.

*** détermination de v**

La mise en oeuvre des résines par contact avec la solution dans un bécher (par opposition à celle plus classique dite de percolation) introduit une indétermination sur le volume final de la solution. L'appréciation du volume v d'eau introduit avec la résine est effectuée en établissant un bilan élémentaire après échange entre la résine et une solution, ces deux phases contenant initialement des cations stables.

$$R\text{-}H^+ + Na^+Cl^- \rightleftharpoons R\text{-}Na^+ + H^+Cl^-$$

Le bilan d'échange peut s'établir comme suit :

	[H^+]	[Na^+]	vol. de solution	
unités	µeq/ml	µeq/ml	ml	ml
Avant échange	0	Co	Vo	
Après échange	C	C_1		Vo + v

La conservation des charges entraîne :

$$VO \times CO = (VO + v) \times (C + C1)$$

$$soit \quad v = \frac{VO \times CO - VO(C+C1)}{C+C1} = \frac{Vo(Co-C-C1)}{(C+C1)}$$

Pour 4 grammes de résine, on a utilisé une solution de Na à 209 meq/l (Co), avec un volume de 10ml.
Après échange on a mesuré C1= 44 meq/l et C=132 meq/l

$$d'où \quad v = \frac{10(209-44,3-132)}{132+44} = 1,85ml$$ pour 4g de résine

3-2-2-2 Mode opératoire

*** conditionnement**

Nous travaillons avec une résine conditionnée sous forme H^+ pour rester dans des conditions de pH fortement acide :

$$R^- H^+ + An^- M^+ \longrightarrow R^- M^+ + An^- H^+$$

Nous savons par les travaux cités en référence que les bilans d'échanges sont bouclés à 100% quel que soit le cation fixé.
La résine est lavée à l'eau déminéralisée jusqu'à obtenir une eau de rinçage de conductivité inférieure à 10µSiemens/cm. Elle est conditionnée sous forme H^+ en faisant percoler de l'acide chlorhydrique en excès (un litre d'acide 2N pour 200grammes de résine). La résine est alors lavée comme précédemment. Elle est stockée recouverte d'eau déminéralisée dans un récipient fermé.

*** manipulations**

Pour éliminer les cations de l'extrait nous mettons la résine en contact avec l'extrait, filtré et dilué

au dixième (1ml d'extrait et 9ml d'eau), dans un godet en polyéthylène. Quatre grammes de résine, (pesée après avoir été égouttée sur tamis) correspondent à 8 milliéquivalents de capacité d'échange, capacité largement exédentaire par rapport aux concentrations de cations à fixer par millilitre d'échantillon.L'expérience montre que pour obtenir un échange rapide il convient d'agiter la solution pendant 5 minutes sur un agitateur magnétique. Sans agitation, l'échange nécessite une heure de contact .

3-2-3 Elimination des chlorures

La solubilisation de l'oxalate de calcium par HCl amène un excès d'ions chlorures qui peuvent perturber, suivant leur concentration, la chromatographie et la détection d'autres anions (formiate, pyruvate, glutarate). Nous avons essayé de les éliminer par différents procédés.

3-2-3-1 Fixation par une résine anionique

- Echangeuse d'anions fortement basique : Dowex 1

le groupement fonctionnel est formé par un groupement ammonium quaternaire $NH4^+$.
La difficulté est d'éliminer les ions chlorures sans piéger les autres anions et en particulier l'ion oxalate. La résine doit être conditionnée sous une forme qui pourra piéger les chlorures. L'échelle d'affinité vérifiée par les travaux de D. Babre est la suivante dans le sens de l'affinité croissante pour la résine : ——————————>
$F^- < CH_3COO^- < Cl^- < CO_3^- < H_2PO_4^- < HCO3^- < OH^- < NO_3^- < (CO_3^- + HCO_3^-) < SO_4^- < HSO_4^-$.

Pour que l'échange des chlorures soit le plus efficace nous devons conditionner la résine sous forme F^-.

- Essais :

Les ions fluorures ont un temps de rétention inférieur à celui des chlorures, mais à concentration égale, leur réponse à la détection conductimétrique est 2 fois supérieure à celle des chlorures, ce qui surcharge le chromatogramme.
Malgré le pH très acide (0.8), les ions oxalates sous forme acide se fixent sur la résine anionique DOWEX 1 (20 à 50% de perte en moyenne). Il est probable que la dissociation de l'acide oxalique est favorisée par l'action de la résine.

3-2-3-2 Précipitation directe des ions chlorures

Les ions chlorures peuvent être précipités par Ag^+.Mais l'anion de sel de Ag^+ utilisé ne devra pas interférer le chromatogramme (éviter: NO_3^-, SO_4^-). Le pH acide du milieu augmente sensiblement la solubilité d'AgCl; de plus, il peut se former $(Ag)_2C_2O_4$. Suite à ces difficultés, cette technique ne sera pas utilisée.

3-2-3-3 Colonnes ON-GUARD Ag+

Ces colonnes contiennent une résine échangeuse de cations sous forme Ag^+. Une cartouche peut fixer 2 milliéquivalents d'ion Cl. Cette fixation des Cl^- se fait selon le schéma réactionnel suivant:

$R\text{-}Ag^{+}$ cations(en solution) ——————>R-cations + Ag^{+}
Ag^{+} + Cl^{-}, anions ——————>AgCl + anions

Ces colonnes ont un prix de revient élevé,mais donnent de bons résultats pour l'acide oxalique (98% de recouvrement) et pour l'élimination des chlorures (chromatogrammes en annexe 3).

3-3 mode opératoire de l'extraction et de la purification d'un échantillon de sol calcaire en vue du dosage chromatographique de l'oxalate.

Prenons pour exemple un sol contenant 35 % de calcaire.

Peser 5 grammes de sol dans un erlenmeyer à col rodé , ajouter (40 ml +20 ml) 60 millilitres d'acide chlorhydrique normal, attendre la fin du dégagement gazeux.
Verser dans le récipient la quantité de chlorhydrate d'hydroxylamine nécessaire à la réduction des ions ferriques contenus dans l'échantillon.
Porter à ebullition douce, à reflux, sur agitateur magnétique chauffant, pendant une heure.
Laisser refroidir, filtrer sur papier filtre plissé,recueillir l'extrait dans un erlenmeyer.
Peser dans un godet en polyéthylène 4 grammes de résine Amberlite IR-77 égouttée sur tamis.
Prélever 1 millilitre d'extrait, ajouter 9 millilitres d'eau déminéralisée et verser la solution dans le godet contenant la résine.
Agiter 5 minutes sur agitateur magnétique,séparer l'extrait de la résine par décantation.
Prélever 5 millilitres de l'extrait purifié, les faire percoler sur une colonne On-guard Ag^{+}préalablement lavée à l'eau déminéralisée, écarter les 2 premiers millilitres recueillis,récupérer la solution restante.
Stocker l'extrait obtenu au congélateur.

4 CHROMATOGRAPHIE IONIQUE

4-1 Matériel

Les analyses sont effectuées par un appareil de chromatographie ionique (Dionex 4500I) complété par un passeur automatique (I.C.S.) et un intégrateur(Shimadzu CR5A).

4-1-1 Principe

La séparation des anions de l'extrait purifié est réalisée sur une colonne de résine anionique selon :

$$R^+ OH^- + Na^+ X^- \rightleftharpoons R^+ X^- + Na^+ OH^-$$

R^+ = résine échangeuse d'anions
X^- = anions à séparer

Il s'établit une compétition pour la résine, entre anions de l'échantillon.Cette compétition dépend de la force d'élution de l'éluant (NaOH).
Les temps de rétention des anions sur la colonne sont donc directement liés à la taille des anions,à leur valence, ainsi qu'au pH de l'extrait à injecter.

4-1-2 Dispositif analytique

La chaîne chromatographique, représentée à l'annexe 4, se compose d'une station d'alimentation d'éluants légèrement préssurisés par l'hélium, d'une pompe à gradient quaternaire; la vanne d'injection à mouvement transversal est munie d'une boucle de 15 μl . La séparation s'effectue sur une colonne AS11 précédée d'une précolonne contenant la même phase stationnaire. Un module de suppression chimique à membrane est positionné avant le détecteur conductimétrique, lui-même relié à un intégrateur (annexe 4).

4-1-3 Colonne

L'AS11 (4 * 250mm) a été conçue pour séparer les anions minéraux et organiques en une seule injection. Elle est composée de particules de polyethyldivinylbenzène et de divinylbenzène sulfonatées (fortement réticulée). Ce support est transformé en échangeur d'anions par la fixation d'une résine pelliculaire formée de billes de latex (13μm) portant un groupement aminé. Les ions monovalents ont un faible temps de rétention, les trivalents sont les plus retenus. Le gradient de soude préconisé ne provoque pas de changement de ligne de base supérieur à un microSiemens/cm. La possibilité d'utiliser des solvants organiques augmente la sélectivité de la colonne. Elle a une capacité de 45 microéquivalents.

4-1-4 Neutralisation chimique

Une des particularités fondamentales liée à la détection conductimétrique mise au point par la société Dionex est la neutralisation éléctrochimique de l'éluant. Elle est réalisée par une micromembrane constituée par des supports échangeurs de cations. L'éluant (NaOH + anions) après passage sur la colonne de séparation circule à l'intérieur de la membrane (fixation des ions Na^+). A contre courant, une solution d'acide sulfurique 0.02N passe à l'extérieur de la membrane et régénère les sites cationiques en échangeant ses ions H^+ avec les ions Na^+. Elle se charge aussi des cations présents dans le milieu. L'éluant ne contient plus alors, que les anions et le contre ion H^+ à analyser et de l'eau provenant de l'échange ionique précédent (schéma en annexe 5).

4-1-5 Détection

La détection est réalisée par un conductimètre. Le signal électrochimique est visualisé et restitué par un intégrateur.

4-1-6 Calculs

Les calculs sont effectués par intégration des surfaces des pics du chromatogramme après calibration de l'appareil avec une solution synthétique d'anions préparée au laboratoire (standard).

4-2 Protocole analytique

4-2-1 Eluants

Les éluants sont préparés à partir d'une eau ultra pure (15 mégaohms) et dégazés à l'hélium, et d'une soude en solution à 50 % en poids (BAKER).

4-2-2 Gradient

Le gradient est une technique d'élution,qui en jouant sur la variation de concentration de l'éluant autorise une plus grande action sur la séparation des composés.
Deux types de gradients conduisent à une séparation des anions avec la colonne AS11 :
Le détail de la programmation des gradients 1 et 2 est présenté en annexe 6

*** gradient 1**

1 NaOH 0.002 Moles/litre
2 NaOH 0.1 Moles/litre
4 H_2O
Le gradient soude 1 permet une bonne séparation des principaux anions minéraux et organiques,en 20 minutes avec un débit de 1 millilitre/minute. Les ions sulfates, oxalates sont distants de 0.5 à 0.6 minute.

*** gradient 2**

1 NaOH 0.002 Moles/litre
2 NaOH 0.1 Moles/litre
3 METHANOL 100 %
4 H_2O

La colonne AS11 offre la possibilité de travailler avec des solvants organiques. L'ajout de méthanol dans la phase éluante facilite la séparation de certains anions organiques (malate, succinate). L'alcool méthylique à 12 % provoque une diminution du temps de rétention de l'anion le plus hydrophobe du couple à séparer en l'occurence le succinate. Par contre, il rapproche l'oxalate du sulfate de plus de 60 % (en temps de séparation), pour un même débit de 1 millilitre/minute.
Le constructeur recommande d'utiliser une membrane de neutralisation (P/N 043074), ayant une meilleure capacité et une résistance mécanique compatible avec l'éluant organique.
En fonction de ces remarques le gradient 1 sera utilisé pour la suite de l'étude.
Les chromatogrammes témoins obtenus avec les gradients décrits ci-dessus, sont présentés en annexe 6'.

4-2-4 Volume d'injection

La calibration de l'appareil se faisant avec un seul standard, les limites de linéarité de la réponse doivent être connues pour garantir la justesse des résultats.
Afin d'éviter une surcharge de la colonne nous avons monté une boucle d'injection de 15 μl.
Les domaines de linéarité d'un anion minéral et d'un anion organique, avec une injection de 15 μl et une injection de 50 μl sont différents :

50 μl :	$8 > [Cl^-] > 3$mg/l	$10 > [C_2O_4^-] > 5$ mg/l
15μl :	$25 > [Cl^-] > 1$mg/l	$35 > [C_2O_4^-] > 5$mg/l

Pour des concentrations en oxalates différentes, il faut modifier la dilution de l'échantillon ou bien calibrer l'appareil avec une solution synthétique d'oxalate de même concentration que celle détectée dans l'extrait.
Avec une boucle de 50 μl les domaines de linéarité pour ces deux anions sont plus restreints (figure 15).

La reproductibilité de l'injection avec une boucle de 15μl est satisfaisante, le coefficient de variation pour 9 injections successives varie selon les anions de 1 à 3%, sauf pour le phosphate et le citrate qui sont en fin de chromatogramme : 3 et 4 % (tableau annexe 7).

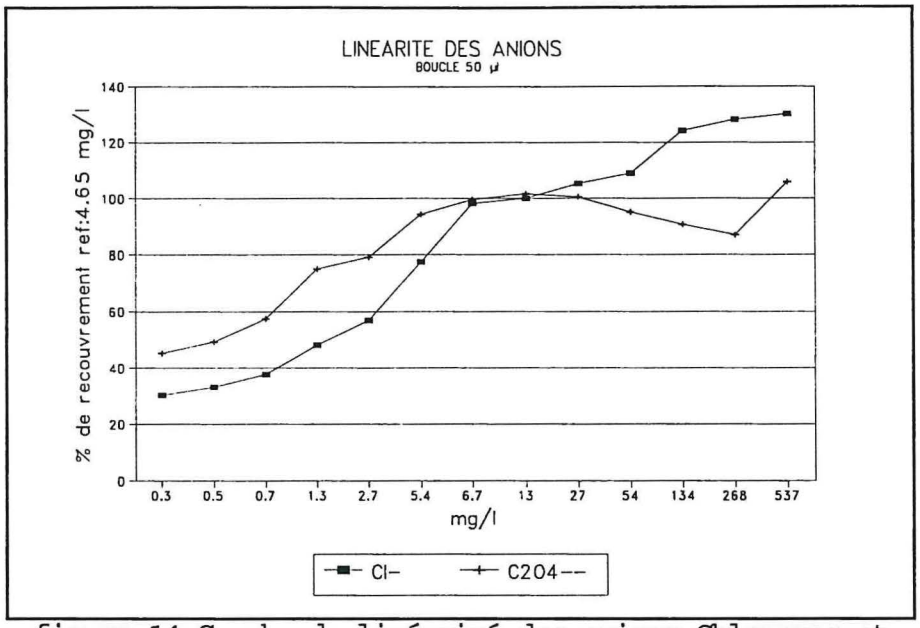


figure 14:Courbe de linéariré des anions Chlorures et oxalates : injection 50µl.

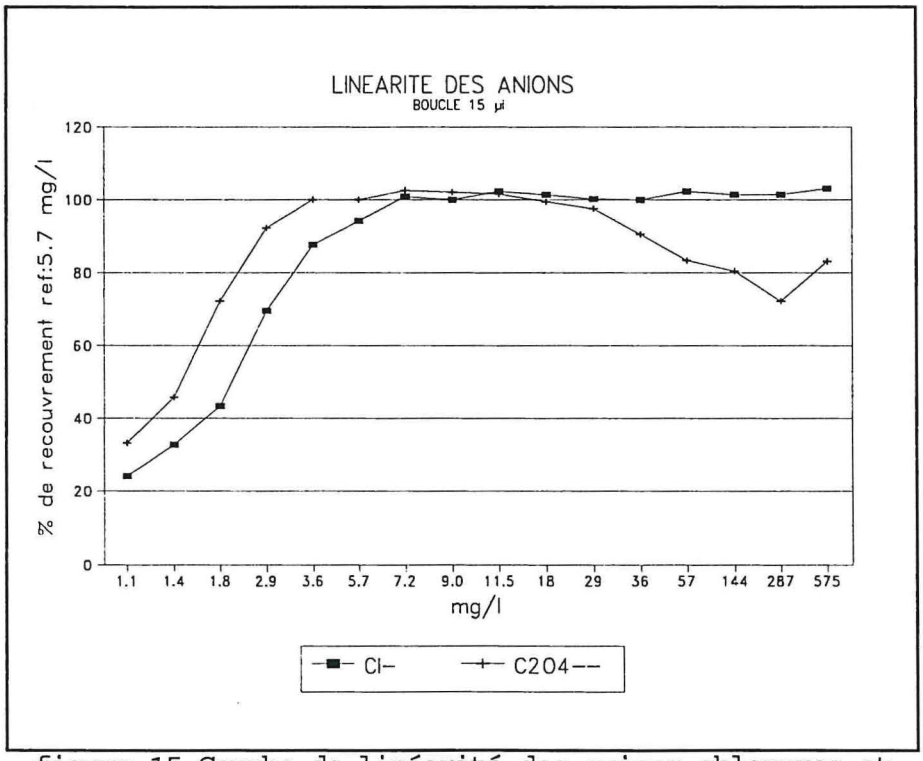


figure 15:Courbe de linéarité des anions chlorures et oxalates: injection 15µl.

CIDARC I.S.T. BIBLIOTHEQUE

4-2-5 Etalonnage :

- Préparation :

Les solutions standards sont préparées à partir de sels de sodium (MERCK). Les solutions mères d'anions minéraux et organiques contiennent environ 400 mg/l de chacun des anions,elles sont conservées à 4°C pour les anions minéraux, puis au congélateur pour les anions organiques. Elles sont diluées respectivement 1000 et 100 fois puis mélangées juste avant le dosage. La solution diluée peut être conservée pendant 48 heures au réfrigérateur ou plus d'un mois au congélateur.

4-2-6 pH de l'extrait

En chromatographie liquide d'une manière générale les solutions injectées doivent être miscibles ou compatibles avec les éluants.
Pour s'assurer de l'élimination des hydroxydes de fer ou d'aluminium dans l'extrait avant l'injection dans la colonne, et donc d'éviter l'apparition de précipités qui amèneraient une surpression dans le système, il semble confortable de rendre le soluté basique.
L'expérience nous montre que l'échange colonne-soluté est incompatible pour une solution dont le pH est supérieur à 12. L'excès d'ions hydroxyle entraine les anions de la même façon que le ferait un éluant trop basique. Nous nous en tiendrons à éliminer les cations avec une résine et à vérifier que le pH du soluté ne soit pas supérieur à 11 .

4-3 Conservation

Les études précédentes ont mis en évidence l'instabilité des anions surtout organiques dans les solutions.
La conservation des différentes espèces dans l'eau ou dans l'alcool éthylique à 20 %, à température ambiante et à 4 °C en fonction du temps a été étudiée.

Anions minéraux:
chlorure,nitrite,nitrate,sulfate, phosphate

Anions organiques:
formate,pyruvate,succinate-malate,malonate-tartrate,oxalate, citrate.

La programmation du gradient 1 n'assure pas la séparation des couples d'ions organiques cités ci-dessus.

4-3-1 Figures

16,17,18,19, anions minéraux
20,21,22,23, anions organiques

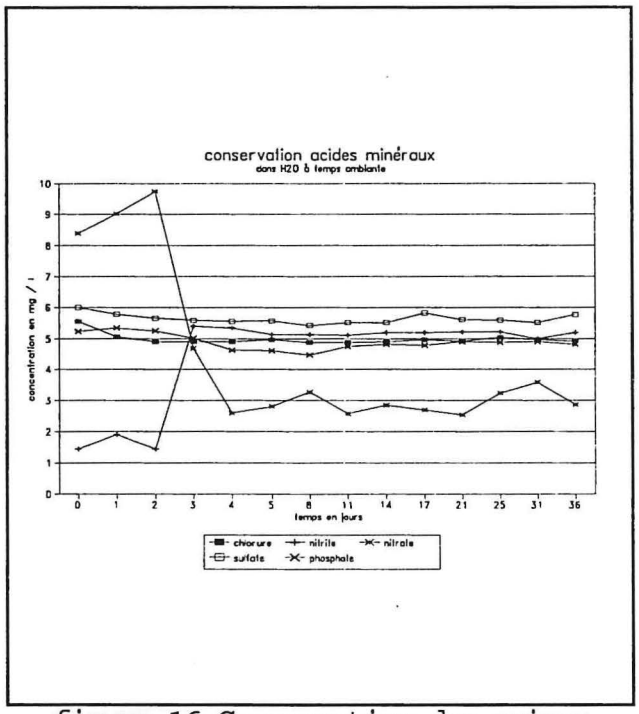


figure 16:Conservation des anions minéraux à température ambiante.

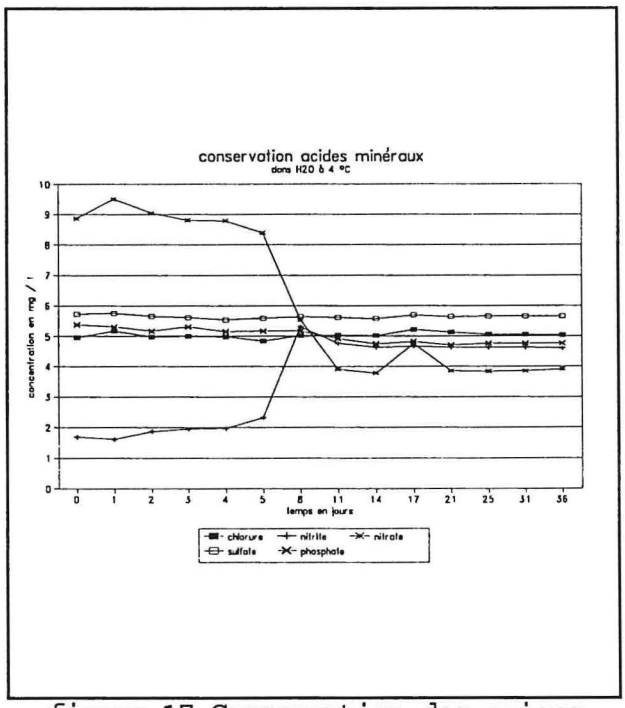


figure 17:Conservation des anions minéraux à 4°C.

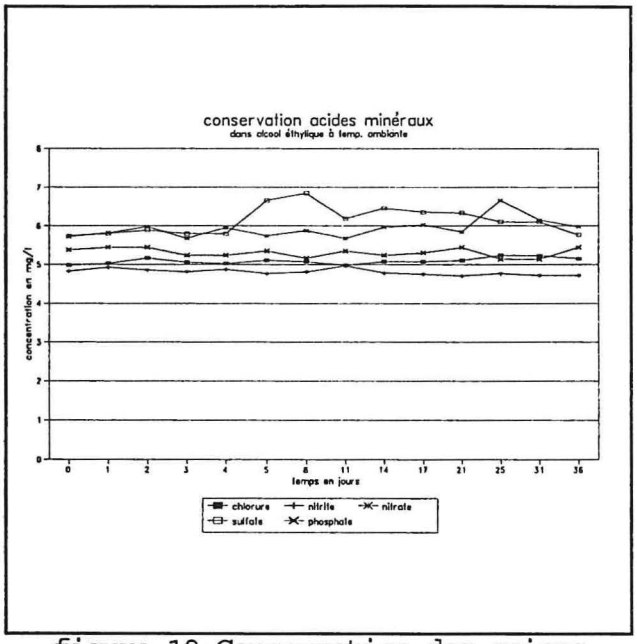


figure 18:Conservation des anions minéraux dans l'éthanol à 20% à température ambiante.

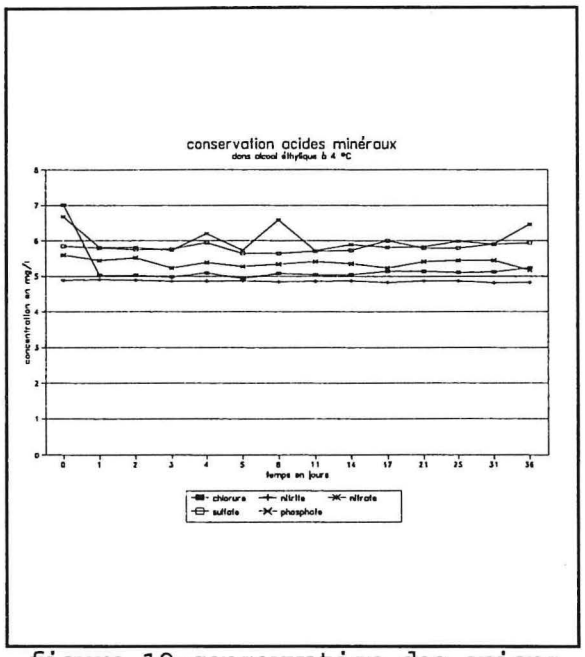


figure 19:conservation des anions minéraux dans l'éthanol à 20% à 4°C.

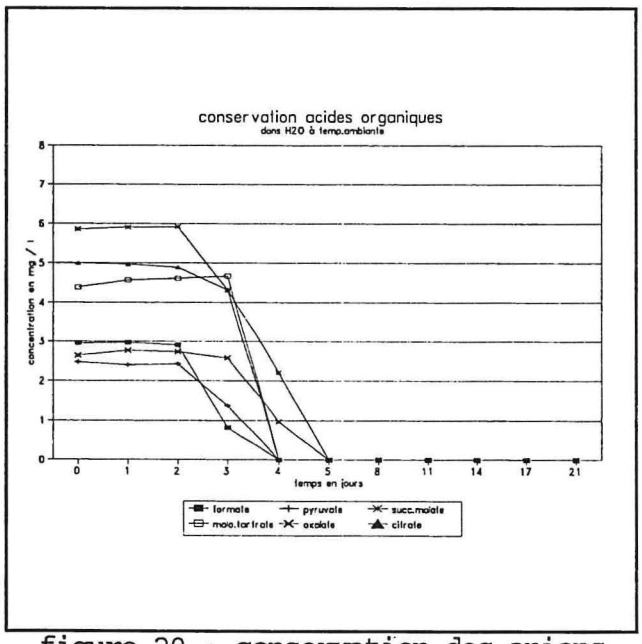


figure 20 : conservation des anions organiques à température ambiante

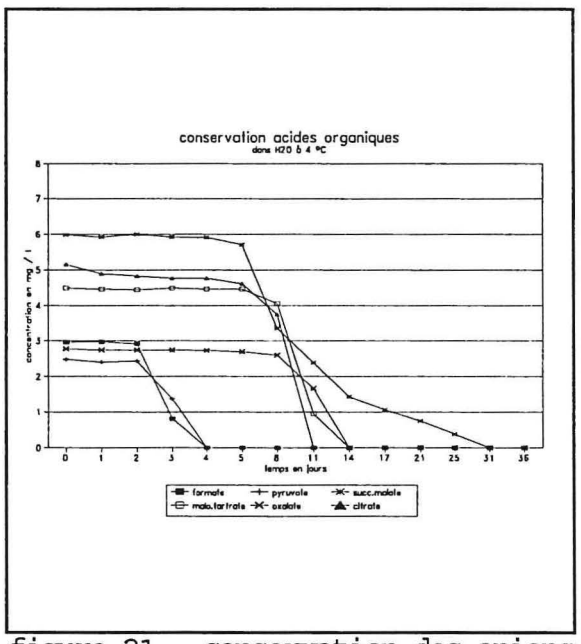


figure 21 : conservation des anions organiques dans l'eau à 4°C.

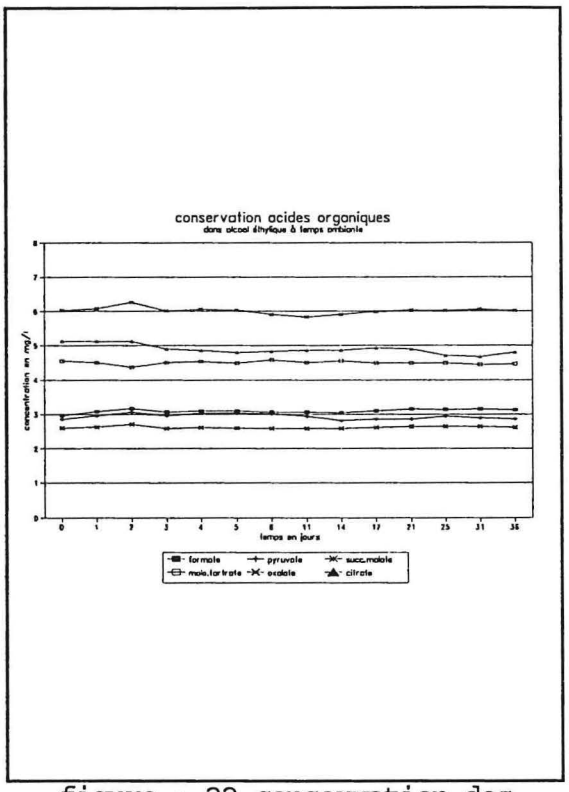


figure : 22 conservation des anions organiques dans l'éthanol à 20 % à température ambiante.

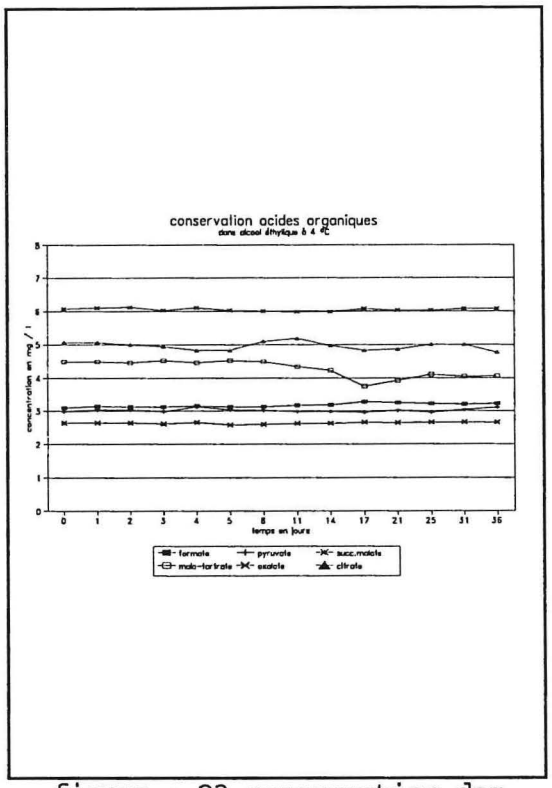


figure : 23 conservation des anions organiques dans l'éthanol à 20 % à 4 °C

4-3-2 Commentaires

Dans la solution aqueuse certains anions minéraux se conservent sans difficulté (Cl^-,SO_4^{--},PO_4^{---}) ,les coefficients de variation de l'étude sont compris entre 1.75 et 5 % .Par contre les ions nitrates et nitrites ne sont pas stables. Dans un premier temps les nitrites sont oxydés en nitrates .Puis les échantillons étant stockés dans des récipients fermés,les nitrates sont réduits en nitrites.

$$NO_2^- \xrightarrow{H_2O} NO_3^- + 1\ e^-$$

Ces réactions ne se produisent pas dans un milieu éthanol, l'alcool ayant un rôle anti-oxydant.
Les anions organiques dans un milieu aqueux s'oxydent rapidement et sont détruits par des micro organismes. En solution dans l'eau,à température ambiante,ils commencent à disparaître après 48 heures .A 4 °C ,ils se dégradent 72 heures après la mise en solution.
Conservés dans l'éthanol à 20 % ,les anions organiques ont toujours la même concentration 36 jours après leur mise en solution.Les coefficients de variation pour les essais de conservation des ions organiques dans l'éthanol à 20 %,à température ambiante ou à 4°C, sont faibles: 0.9 <C.V.> 2.8% (Tableaux annexe 8).

4.4 protocole analytique retenu pour le dosage de l'acide oxalique

- **L'extrait après décongélation est homogénéisé. Pour assurer sa conservation, il suffit de le fixer à l'éthanol (amener l'alcool à 20% dans l'extrait).**

- **Les éluants sont préparés à partir de soude non carbonatée.**

- **Injecter dans la colonne (AS 11) 15 microlitres**
  Calibrer l'appareil avec une solution synthétique d'acide oxalique (de 5 à 35 milligrammes par litre) préparée dans l'éthanol à 20 % .

- **Pour assurer un contrôle de qualité du dosage il est possible d'ajouter un étalon interne dans le soluté(ex:bromure),et d'injecter une solution de référence toutes les 20 analyses (ex:eau minérale peu carbonatée : Volvic).**

Les protocoles d'extraction et de dosage ainsi définis,vont être testés dans un premier temps sur des échantillons témoins de terre supplémentés en oxalate de calcium ,puis sur des échantillons de sols plus ou moins calcaires récoltés à proximité de racines mycorhizées et succeptibles de contenir naturellement de l'oxalate. Enfin la méthode sera adaptée pour des échantillons rhizosphèriques mycorhizés.

5 APPLICATIONS

5-1 sols enrichis

5-1-1 Choix des sols calcaires

Nous avons choisi trois sols calcaires de la région de Montpellier,et un quatrième non calcaire du Cameroun,pauvre en matière organique (0.45%) et en argile (4%) auquels nous avons ajouté du carbonate de calcium (50% pondéral) afin de tester un sol (artificiellement) calcaire et pauvre en argile. Dans ces sols qui ne contiennent pas naturellement d'oxalate nous avons rajouté des quantités connues d'oxalate de calcium pour tester les protocoles d 'extraction et de dosage par chromatographie ionique.

5-1-2 Analyses préliminaires

Afin d'appliquer le protocole proposé, il convient de connaitre les teneurs en calcaire et en fer. Le dosage du calcaire total est effectué avec le calcimètre Bernard, le dosage du fer (après extraction au mélange fluoro-nitrique) par absorption atomique (méthode URA-GERDAT).

N°	IDENTIFICAT. SOLS	CALCAIRE TOTAL %	FER TOTAL %	FER EXTRAIT HCL 1M %	FER APRES. ECHANGE RESINE %
CE 1	VALFLAUNES Vigne H.	27.94	1.20	0.78	0.01
CE 2	VALFLAUNES Vigne B.	41.03	1.25	0.70	0.01
CE 3	St. GELY du FESC	49.3	1.75	0.80	0.01
CE 4	N GONG CAMEROUN	"50.0"	0.33	0.22	0.01

Tableau : Dosage du calcaire et du fer dans 4 sols calcaires

La quantité de fer extraite par HCl 1M représente en moyenne 50 à 65 % de la totalité du métal présent dans l'échantillon, mais le passage sur résine cationique permet de l'éliminer de l'extrait dans des proportions satisfaisantes.

5-1-3 Supplémentation en oxalate de calcium

En fonction des résultats précédents et en considérant une prise d'essai de cinq grammes par échantillon,la solubilisation de l'oxalate de calcium se fera avec les quantités d'acide suivantes (voir figure 13) :

	ml HCl 1M
CE 1	50
CE 2	60
CE 3	70
CE 4	70

A cette prise d'essai nous avons ajouté 10 à 40 mg d'oxalate de calcium soit environ 0.1 à 0.5 % d'anion oxalate .
Nous avons analysé les extraits obtenus aux diverses étapes du traitement de purification :

1. injection de l'extrait sans purification
2 . injection après passage sur résine cationique
3 . injection après passage sur résine et addition de 100 mg d'hydroxylamine.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de recouvrement.A l'exception du traitement 1 ,ils représentent la moyenne de trois essais.

	TRAIT. 1	TRAIT. 2	TRAIT. 3
CE 1	24	73	98
CE 2	18	71	93
CE 3	30	78	99
CE 4	30	76	101

Tableau : Pourcentages de recouvrement en ion oxalate après extraction par HCl 1M de 4 sols calcaires en fonction du traitement appliqué.

5-1-4 Commentaires

Sans réduction des ions ferriques par l'hydroxylamine et sans l'élimination des cations par la résine,le recouvrement en acide oxalique n'est pas satisfaisant.Par contre après addition d'hydroxylamine dans le milieu la quantité d'acide oxalique libéré est pratiquement totale pour les quatre types de sols calcaires .
Ces résultats sont confirmés par une expérimentation menée sur un milieu synthétique composé de carbonate de calcium(50 %),d'oxyde ferrique (Fe_2O_3 1 %) et d'oxalate de calcium.Le pourcentage de recouvrement de l'acide oxalique libéré atteint 100 % avec un ajout de 100 mg d'hydroxylamine dans le milieu d'extraction et 80 % en l'abscence d'agent réducteur du fer.
L'ajout se fait directement dans l'erlemmeyer de réaction.L'expérience nous a montré la formation d'un complexe de couleur blanche pendant l'extraction révélateur de la présence de Fe^{2+}.

5-2 Echantillons naturels

5-2-1 Présentation des échantillons

La méthode proposée a été testée sur 2 échantillons de sols calcaires et 1 non calcaire, prelevés à proximité de racines mycorhizées, en provenance de la région de Montpellier; sur une série de sols truffiers et des échantillons rhizosphèriques de pins .
Ces sols et ces racines nous ont été fournis par Mr.Callot.

CE 5 sol de Montferrier calcaire avec mycorhizes.
CE 6 sol très calcaire nombreuses mycorhizes de pins enterrés sous recouvrement de terre.
CE 7 sol non calcaire rouge nombreuses mycorhizes
CE 8 litiére humifiée (critaux d'oxalate) sur argile rouge sous chène pubescent.
CE 9 "oxalate" sur boulettes fécales de vers de terre
CE 10A boulettes fécales d'iules (sur argile rouge)
CE 10B boulettes fécales d'iules (sur argile rouge) recouvertes d'une pellicule de cristaux
CE 11 sol truffier Sorgues (conservé 4 mois au congélateur)
CE 12 sol "prêt pour entrée en production "(conservé 4 mois au congélateur)
CE 13 sol non truffier (conservé 4 mois au congélateur)
CE 14 racines(de l'année) de pins; critaux sur le cortex peu de filaments mycéliens associés.
CE 15 racines plus fines (1 an) , cordons mycéliens nombreux blancs, jeunes mycorhizes.
CE 16 racines plus agées (3 ans), glomérules de mycorhizes coralloïdes avec boulettes fécales.
CE 17 racines mycorhizées de pins associées au sol CE 5.

5-2-2 analyses préliminaires

IDENT.	pH	CaCO3 %	Fer %	Carbone % Organique	Azote %
CE 5	7.65	32.05	1.75	4.15	0.26
CE 6	7.39	28.8	1.55	6.55	0.34
CE 7	6.41		4.23	2.02	0.16
CE 8	5.8		1.91	23.45	0.97
CE 9	6.89		3.27	12.51	0.84
CE 10A	6.87		3.33	11.85	0.76
CE 11	8.13	19.2	4.23	2.45	0.24
CE 12	8.23	25.6	4.60	2.46	0.25
CE 13	8.19	29.6	3.69	1.80	0.24

Tableau : Résultats des analyses préliminaires des différents échantillons de sols.

L'application des méthodes d'extraction et de dosage de l'oxalate de calcium précédement décrites ont donné les résultats suivants:

IDENT	C2O4-- % traitement 2	C2O4-- % traitement 3	C(C2O4) % $C(C_{ORGA})$
CE 5	0.39	0.39	2.56
CE 6	1.99	2.57	10.64
CE 7	2.01	2.88	38.72
CE 8	3.54	4.16	4.85
CE 9	0.16	0.25	0.55
CE 10A	0.16	0.23	0.52
CE 10B		0.78	
CE 11	0.023	0.024	0.26
CE 12	0.010	0.011	0.12
CE 13	0.004	0.006	0.09

Tableau :Résultats en % pondéral d'ion oxalate des différents échantillons analysés

5-2-3 Commentaires

Tous les sols renfermant des mycorhizes, calcaires ou non calcaires (CE 7) contiennent de l'oxalate annexe 9.
L'ajout d'hydroxylamine conduit généralement à des résultats plus élevés que ceux obtenus après simple passage sur résine. Le sol (CE 5) de Montferrier donne la même quantité d'oxalate avec ou sans hydroxylamine, le fer semble être sous forme réduite dans son milieu naturel. Les essais de supplémentation en oxalate de calcium entrepris pour cet échantillon ont été concluants (100 % de recouvrement).
La reproductibilité de l'analyse, extraction et dosage (sur un échantillon CE 5) est satisfaisante avec un coefficient de variation de 4.3 % pour 10 essais.
Pour le sol non calcaire 10 ml d'HCl 1M+40ml d'eau déminéralisée ont permis de mener à bien l'analyse.
Les échantillons CE 10 ont été compartimentés, la concentration d'oxalate déterminée par l'analyse est 3 fois plus importante dans ce compartiment B, contenant les boulettes recouvertes de cristaux blancs.

5-4 Echantillons Rhizosphèriques

L'extraction de l'ion oxalate des végétaux ne présente pas les contraintes analytiques liées à un sol calcaire. Par contre l'extraction de l'oxalate de calcium dans ou autour des racines mycorhizées ne sera possible que si les conditions d''extraction ont les mêmes caractéristiques que celles retenues pour l'analyse des sols calcaires.

5-4-1 Extraction des ions organiques

Les méthodes proposées (A.Peyric 1986 et J.Barloy 1993) préconisent l'utilisation d'une solution d'éthanol comme extractant.
L'extraction des acides organiques dans une solution d'éthanol à 20% semble être le meilleur compromis pour extraire les composés organiques et les conserver.

5-4-2 Extraction de l'oxalate de calcium dans les racines mycorhizées :

La méthode d'extraction est une adaptation de la méthode proposée pour les sols calcaires .Pour solubiliser l'oxalate de calcium il suffit d'avoir dans le milieu une quantité d'acide chlorhydrique suffisante pour atteindre le pH requis.

Exemple :
Pour une prise d'essai de 0.5 grammes, il suffit de 0.156 ml d'acide 1M pour solubiliser 10mg (2%) d'oxalate de calcium.

D'une manière générale, la méthode utilisée est la suivante :
Pour une prise d'essai de 0.5 grammes, ajouter dans un erlem à col rodé 50ml d'une solution d'acide chlorhydrique 0.2N et 100mg de chlorhydrate d'hydroxylamine. Porter à ébullition sous reflux pendant 60 minutes, filtrer, éliminer les cations sur résine échangeuse de cations, puis les chlorures sur colonnes On guard Ag+ (si nécessaire) .

5-4-3 Tableaux de résultats

1 Extraction par une solution d'éthanol à 20 %
2 Extraction par HCl 1M.
3 Extraction par HCl 1 M + NH_2OH .
4 Carbone total de l'échantillon.
5 $C(C_2O_4^-)$ / C(carbone total)

IDENT.	1	2	3	4	5
CE 14	0.16	2.05	2.05	41.2	1.34
CE 15	0.15	1.03	0.98	30.4	0 .87
CE 16	0.10	1.60	1.58	17.0	2.56
CE 17	0.01	0.76	0.78	23.8	0.87

Tableau : Résultats en % pondéral d'ions oxalate des échantillons rhizosphériques.

5-4-4 commentaires

Pour ces échantillons végétaux l'ajout d'un agent réducteur n'amène pas de différence significative. Le rapport oxalate/carbone permet de mieux apprécier l'importance de cet élément par rapport au carbone organique, ainsi l'échantillon 16 contenant des glomérules de mycorhizes coralloïdes a un rapport deux fois plus élevé que l'échantillon 14 (critaux d'oxalate sur le cortex, peu de filaments mycéliens), alors que sa teneur pondérale en oxalate est inférieure (1.6 % pour 2.05 %).
Le coeficient de variation sur 5 mesures, (CE 16) est de 4.33 % .
Les premiers chromatogrammes (annexe 10) avec le mode d'extraction par l'éthanol à 20% laissent apparaitre des teneurs (de l'ordre de 0.1%) de fluorure, formiate, chlorure, malate ou succinate, sulfate, oxalate, phosphate et citrate dans les racines.

6 CONCLUSION

La mise au point d'une méthode d'extraction et de dosage de l'ion oxalate dans des sols calcaires contenant des mycorhizes a nécessité une approche analytique originale.Le calcul de la spéciation des oxalates en solution (GEOCHEM) permet de prévoir les conditions réactionnelles les plus efficaces pour l'extraction. Le dosage de l'oxalate est facilité par l'élimination des cations et l'usage d'un chromatographe ionique. Cet appareillage apporte une spécificité et une sensibilité nouvelle dans le domaine analytique.
Ce travail est testé sur des sols calcaires contenant des mycorhizes, poursuivi par une adaptation sur des échantillons rhizosphèriques.
La méthode est fiable et précise, elle est opérationnelle. Elle peut être affinée pour des dosages dans les milieux particulièrement faibles en oxalate. Elle peut aider à cibler un échantillonnage spécifique en fonction de caractéristiques géochimiques de terrain.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ARDEN T. V. , F. de DARDEL 1975
Opérations chimiques unitaires
Echanges d'ions
Techniques de l'ingénieur.
ROHM and HAAS.

BARLOY J. 1993
Note sur le dosage des acides organiques par chromatographie ionique.
ENSA Rennes

BERNALES C.A. dans KIRK OTHMER, 1985
Concise Encyclopédia of chemical Technology
Edition Wiley Inter Sciences

CHARLOT G., 1983
Les Méthodes de la Chimie Analytique
Editions Masson

CROMACK K., P. SOLLINS, W.C. GRAUSTEIN . 1979.
Calcium oxalate accumulation and soil wheathering in mats of the hypogeous fungus hysterangium crassum.
Soil Biol. Biochem. Vol 11 463-468

EVANS R.C., 1954
Chimie et structure cristalline
Editions Masson

GRIGNARD V., 1958
Précis de chimie organique
Editions Masson

HOWE T.G., L.M. DUDLEY, J.J.JURINAK 1990
Détermination of oxalic acid (ethanoic acid) in soil extracts using HPLC
Commun in Soil Sciences Plant Anal.
21(19-20), 2371-2378.

HURST W.J., J.M. McKIM 1986
HPLC determination of oxalic acid in cocoa.
Journal of Liquid Chromatography, Vol.9, n. 12, 2781-2789.

LAPEYRIE F. 1987
Les mycorhizes de l'Eucalyptus en conditions d'excés de carbonate de calcium
Thèse d'etat C.N.R.S. Villeurbanne

LILIEHOLM B.C., L.M. DUDLEY, and J.J. JURINAK 1992
Oxalate détermination in soils using ion chromatography.
Soils Sciences Soc. Am. J. Vol 56, 324-326

MALAJCZUK N, K. CROMACK . 1982.
Accumulation of calcium oxalate in the mantle of ectomycorrhyzal roots of Pinus radiata and Eucalyptus marginata.
New Phytologist, 92, 527-531

MEE J.M.L, R.W. STANLEY 1973
A rapid gas-liquid chromatographic method for determining oxalic acid in biological materials.
Journal of Chromatography, 76, 242-243

PEYRIC A. 1986
Mise au point d'une méthode de dosage des acides organiques sur fèves de cacao par HPLC
Maitrise des Sciences et Techniques des Industries Alimentaires.
I.S.I.M. U.S.T.L.

PISSENTI N., D. BABRE 1994
Rapport interne URA-GERDAT.

ROCHE M. , J.B. DESBARRES, C.COLIN, et cie. 1990
Chimie des solutions
Editions Lavoisier

SMOLDERS E., M. VAN DAEL and R. MERCKX 1990
Simultaneous determination of extractable sulphate and malate in plant extracts using ion chromatography.
Journal of Chromatography, 514, 371-376

SPOSITO G., S.V. MATTIGOD, 1980
GEOCHEM : a computer program for the calculation of chemical equilibria in soil solutions and other natural water systems.
The Kearney Foundation of Soil Sciences
University of California

TILAK D. 1993
Influence de l'ectomycorhization par rhizopogon rubescens (R19-1) et de la présence de carbonate de calcium sur la quantité d'oxalate produite par un système racinaire de Pinus Pinaster.
Diplome d'Etudes Approfondies. ENSAM
Chaire de Science du sol, Montpellier.

ANNEXES

SPECIATON DE L'ACIDE OXALIQUE
EN FONCTION DU pH

Ph	C2O4H2	C2O4H-	C2O4--
12	0,00	0,00	100,00
11,70	0,00	0,00	100,00
11,40	0,00	0,00	100,00
11,10	0,00	0,00	100,00
10,80	0,00	0,00	100,00
10,49	0,00	0,00	100,00
10,19	0,00	0,00	100,00
9,89	0,00	0,00	100,00
9,59	0,00	0,00	100,00
9,29	0,00	0,00	100,00
8,99	0,00	0,00	100,00
8,69	0,00	0,00	100,00
8,39	0,00	0,01	99,99
8,09	0,00	0,02	99,98
7,79	0,00	0,03	99,97
7,48	0,00	0,07	99,93
7,18	0,00	0,13	99,87
6,88	0,00	0,26	99,74
6,58	0,00	0,52	99,48
6,28	0,01	1,04	98,96
5,98	0,01	2,05	97,95
5,68	0,03	4,02	95,98
5,38	0,05	7,72	92,28
5,08	0,11	14,34	85,66
4,78	0,21	25,07	74,92
4,47	0,42	40,03	59,90
4,17	0,84	56,97	42,75
3,87	1,66	71,93	27,19
3,57	3,27	81,93	15,73
3,27	6,33	86,14	8,54
2,97	11,91	84,61	4,46
2,67	21,28	77,30	2,28
2,37	35,09	64,42	1,15
2,07	51,96	47,91	0,58
1,76	68,38	31,59	0,29
1,46	81,22	18,77	0,15
1,16	89,64	10,36	0,07
0,86	94,54	5,46	0,04
0,56	97,19	2,81	0,02
0,26	98,58	1,42	0,01

EXTRACTION DE L'ION OXALATE DANS L'OXALATE DE CALCIUM (35 % = 1.75 grammes)
PAR HCL 1 M

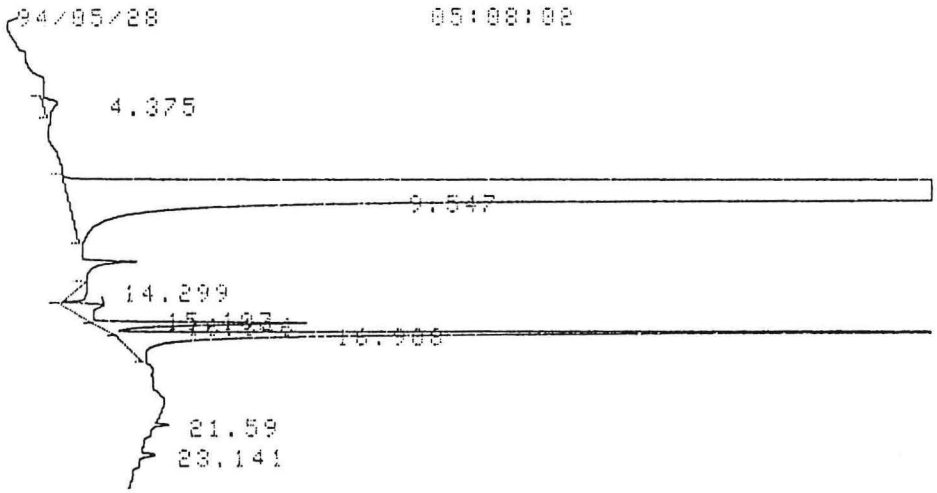
HCl 1M ml	HCl dispo ml	[C] M HCl	pH	% OXAL+H	% OXAL+Ca	Ca++	CaCl
37	0,44	0,01	1,93	85,32	14,23	94,54	4,85
38	1,44	0,04	1,42	96,84	3,07	94,89	5,18
39	2,44	0,06	1,20	98,63	1,33	94,39	5,55
40	3,44	0,09	1,07	99,20	0,78	94,07	5,89
41	4,44	0,11	0,97	99,47	0,52	93,63	6,35
45	8,44	0,19	0,73	99,84	0,16	94,53	5,46
50	13,44	0,27	0,57	99,95	0,07	93,93	6,06
55	18,44	0,34	0,47	99,97	0,05	93,40	6,58
60	23,44	0,39	0,41	99,98	0,03	92,90	7,07
65	28,44	0,44	0,36	99,97	0,03	92,60	7,40

* HCL dispo ml = HCl disponible après réaction 1.

Annexe 3

SOLUTION DE CHLORURE DE SODIUM ET D'ACIDE OXALIQUE
AVANT ECHANGE SUR ON-GUARD

Echantillon N: 2



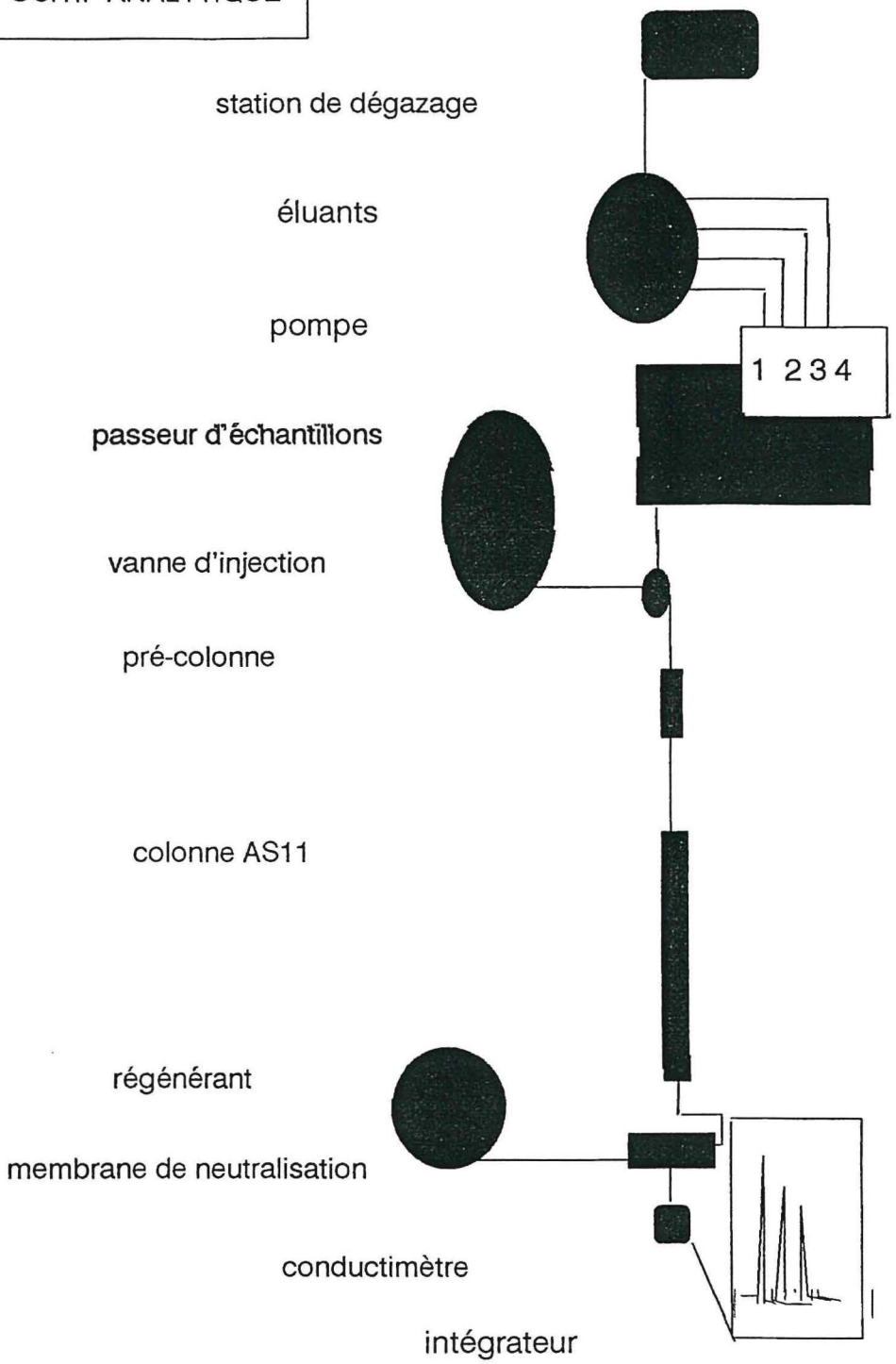
CHROMATOGRAM 1 MEMORIZED

C-R5A CHROMATOPAC

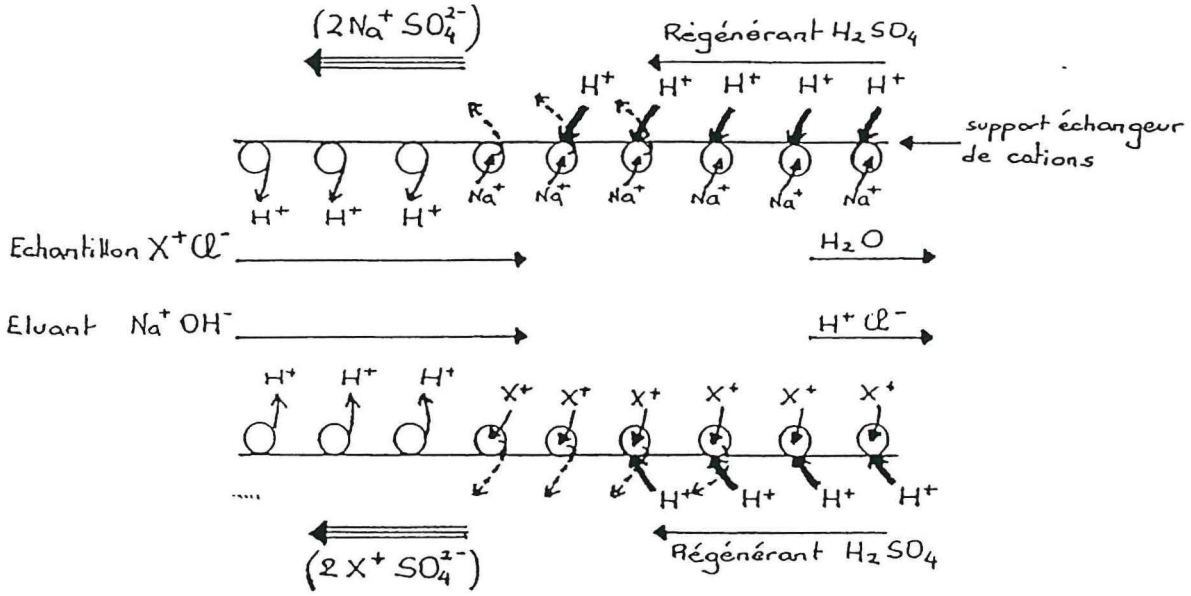
CHANNEL NO	1	FILE	0
SAMPLE NO	0	METHOD	64
REPORT NO	730	SAMPLE WT	100

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC mg/l	NAME
1	4.375	92869		2	0.3786	FORMATE
2	9.547	60403428	E	5	211.2694	CHLORURE
3	14.299	183939		7	1.2633	MALATE + SUC
4	15.187	258765				
5	16.346	577040		8	1.9545	SULFATE
6	16.908	2312218		9	15.5955	OXALATE

DISPOSITIF ANALYTIQUE



Le schéma ci-après explique le principe de fonctionnement de la micromembrane qui est,en fait, constituée par des supports échangeurs de cations à l'intérieur desquels s'écoule l'éluant NaOH à la sortie de la colonne de séparation.



TABLEAUX DES GRADIENTS EMPLOYES EN CHROMATOGRAPHIE IONIQUE

GRADIENT N°1

1 NaOH 0.002 MOLES
2 NaOH 0.1 MOLES
3 METHANOL
4 EAU

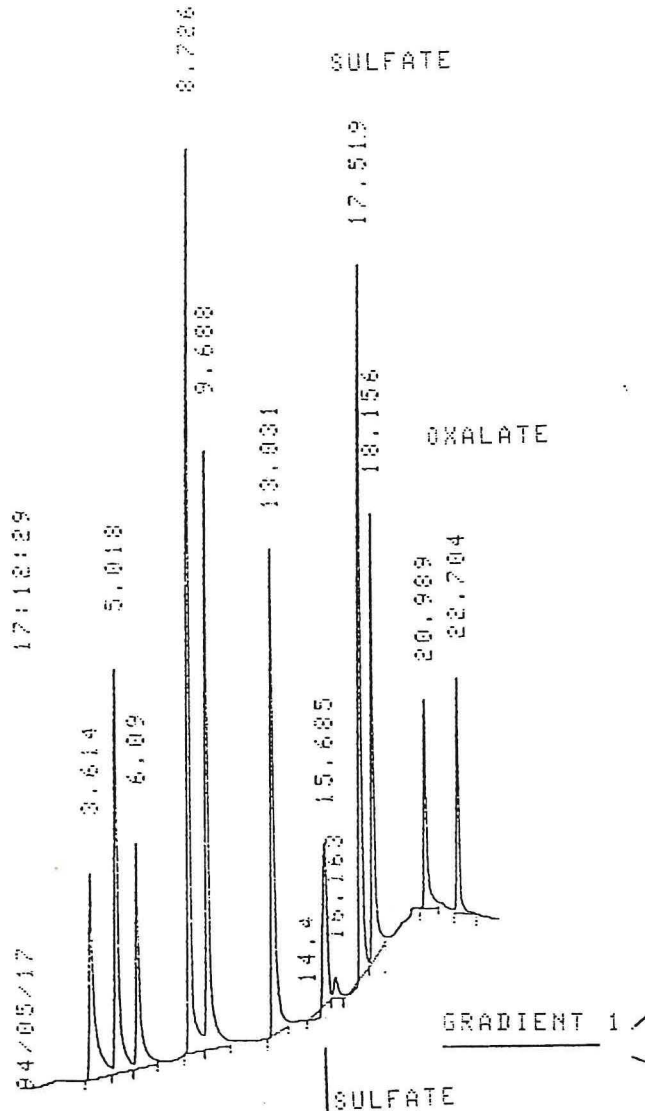
Temps minutes	éluant 1	éluant 2	éluant 3	éluant 4	injection 5	débit millilitres
0	20	0	0	80		1
0,1	20	0	0	80	on	1
0,5	20	0	0	80	off	1
5	56	4	0	40		1
10	90	10	0	0		1
12	85	15	0	0		1
16	60	40	0	0		1

GRADIENT N°2

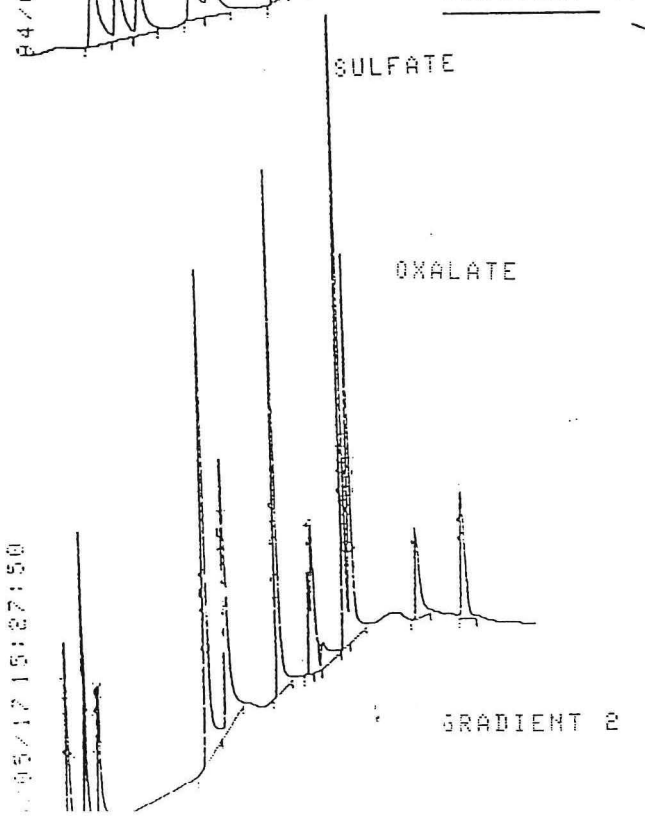
1 NaOH 0.002 MOLES
2 NaOH 0.1 MOLES
3 METHANOL
4 EAU

Temps minutes	éluant 1	éluant 2	éluant 3	éluant 4	injection 5	débit millilitres
0	15	0	12	73		1
0,1	15	0	12	73	on	1
0,5	15	0	12	73	off	1
5	20	0	12	68		1
16	43	45	12	0		1

ELUTION D'UNE SOLUTION STANDARD SUIVANT GRADIENT 1 - GRADIENT 2



PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	3.614	914407		1	1.59	FLUORURE
2	5.018	1226433	V	2	5	FORMATE
3	6.09	688025	V	3	5.72	PYRUVATE
4	8.726	1993408		4	4.72	CHLORURE
5	9.688	1470420	V	5	5.143	NITRITE
6	13.031	1382248		6	6.065	NITRATE
7	15.685	531871		7	3.6529	MALATE + SUC
8	16.163	75285		7	0.5171	MALATE + SUC
9	17.519	1609053		8	5.45	SULFATE
10	18.156	1142404		9	5.379	OXALATE
11	20.989	518103		11	5.167	PHOSPHATE
12	22.704	652517		14	6.456	CITRATE
	TOTAL	12211169			54.91	



45 18 - Telex 265 689 F

Moyennes et coefficients de variation de l'injection avec une boucle de 15 µl

REPRODUCTIBILITE DE L'INJECTION
BOUCLE DE 15 MICROLITRES RESULTATS EXPRIMES EN MILLIGRAMMES PAR LITRE

	fluorure	formate	pyruvate	chlorure	nitrite	nitrate	malate	sulfate	oxalate	phosphate	citrate
1	1.59	2.50	2.86	4.75	5.14	6.07	3.70	5.45	2.69	5.17	3.23
2	1.57	2.40	2.74	4.57	4.94	5.94	3.59	5.38	2.76	5.07	2.87
3	1.56	2.40	2.74	4.62	4.94	6.07	3.54	5.32	2.87	5.26	2.96
4	1.55	2.45	2.82	4.53	4.91	5.82	3.54	5.38	2.78	5.45	2.91
5	1.55	2.35	2.66	4.62	5.01	6.11	3.54	5.32	2.89	4.98	2.91
6	1.60	2.38	2.78	4.64	4.91	5.90	3.54	5.25	2.76	5.35	2.96
7	1.59	2.40	2.78	4.64	4.87	6.23	3.49	5.35	2.89	5.35	2.91
8	1.57	2.42	2.86	4.57	4.94	5.86	3.59	5.32	2.78	5.45	2.78
9	1.54	2.36	2.78	4.55	4.84	5.90	3.54	5.32	2.76	5.35	3.05
moyenne	1.57	2.41	2.78	4.61	4.95	5.99	3.56	5.34	2.80	5.27	2.95
ecart	0.02	0.04	0.06	0.06	0.08	0.13	0.06	0.05	0.07	0.16	0.12
C.V.	1.35	1.81	2.13	1.32	1.68	2.13	1.58	0.99	2.36	2.96	4.01

Moyennes et coefficients de variation pour l'essai de conservation des anions minéraux dans H2O

CONSERVATION DES ANIONS MINERAUX
DANS H2O

	chlorure	nitrite	nitrate	sulfate	phosphate
ST 1	4,98	5,40	5,85	5,75	5,49
2	5,01	5,39	5,90	5,75	5,25
3	4,98	5,38	5,86	5,73	5,25

temp.ambiante

jours	chlorure	nitrite	nitrate	sulfate	phosphate
0	5,55	1,45	8,38	6,00	5,22
1	5,05	1,90	9,03	5,79	5,33
2	4,89	1,43	9,73	5,65	5,25
3	4,90	5,39	4,67	5,59	5,00
4	4,90	5,33	2,61	5,55	4,62
5	4,95	5,12	2,81	5,56	4,60
8	4,88	5,12	3,27	5,41	4,46
11	4,87	5,11	2,58	5,51	4,73
14	4,89	5,18	2,85	5,52	4,81
17	4,96	5,18	2,70	5,81	4,79
21	4,92	5,21	2,54	5,61	4,89
25	5,04	5,21	3,23	5,59	4,87
31	4,95	5,00	3,59	5,51	4,89
36	4,92	5,18	2,87	5,77	4,81
moyenne	4,98	4,41	4,35	5,63	4,88
ecart	0,17	1,48	2,53	0,15	0,24
C.V. %	3,39	33,53	58,09	2,67	5,00

temp.04°C

	chlorure	nitrite	nitrate	sulfate	phosphate
0	4,96	1,68	8,87	5,73	5,38
1	5,16	1,61	9,51	5,74	5,30
2	4,97	1,87	9,05	5,65	5,17
3	4,99	1,94	8,81	5,61	5,30
4	4,97	1,95	8,80	5,54	5,14
5	4,83	2,32	8,38	5,58	5,17
8	5,01	5,31	5,53	5,63	5,17
11	5,02	4,75	3,92	5,62	4,92
14	5,01	4,62	3,78	5,57	4,73
17	5,20	4,66	4,74	5,69	4,81
21	5,12	4,63	3,85	5,63	4,70
25	5,05	4,62	3,83	5,65	4,76
31	5,05	4,62	3,85	5,65	4,76
36	5,02	4,60	3,92	5,65	4,76
moyenne	5,03	3,51	6,20	5,64	5,01
ecart	0,09	1,42	2,39	0,05	0,24
C.V. %	1,76	40,35	38,55	0,94	4,80

Moyennes et coefficients de variation pour l'essai de conservation des anions minéraux et organiques dans l'alcool éthylique à 20 % .

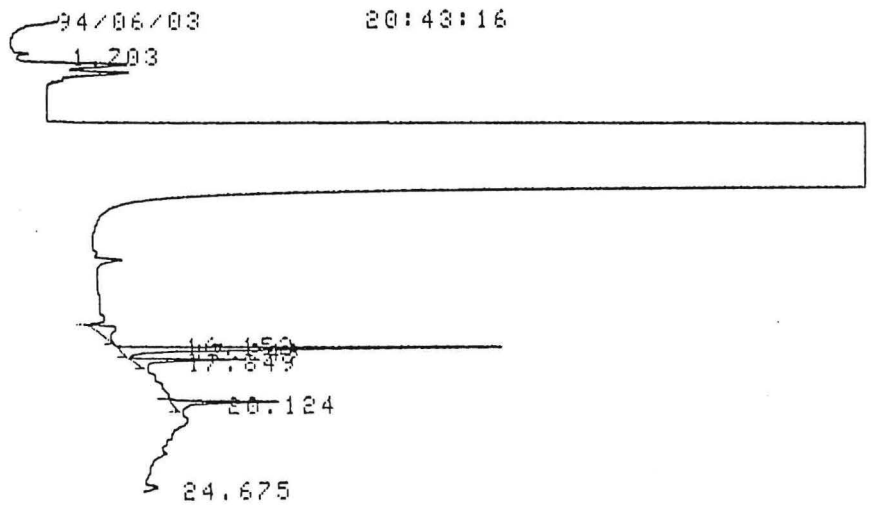
CONSERVATION DES ANIONS MINERAUX ET ORGANIQUES
DANS L'ALCOOL ETHYLIQUE A 20 %

		formate	pyruvate	chlorure	nitrite	nitrate	suc.malate	malo.tartrate	sulfate	oxalate	phosphate	citrate
ST	1	2.97	2.62	4.98	5.40	5.85	6.08	4.49	5.75	2.67	5.49	5.21
	2	2.98	2.62	5.01	5.39	5.90	6.08	4.53	5.75	2.70	5.25	5.05
	3	2.95	2.62	4.98	5.38	5.86	6.08	4.53	5.73	2.68	5.25	5.05

temp.ambiante

jours	formate	pyruvate	chlorure	nitrite	nitrate	suc.malate	malo.tartrate	sulfate	oxalate	phosphate	citrate
0	2.98	2.87	4.99	4.83	5.72	6.03	4.56	5.74	2.60	5.38	5.12
1	3.07	2.96	5.03	4.93	5.82	6.08	4.51	5.80	2.63	5.44	5.12
2	3.17	3.06	5.17	4.86	5.98	6.26	4.37	5.89	2.71	5.44	5.12
3	3.06	2.96	5.05	4.81	5.68	6.00	4.51	5.79	2.59	5.25	4.90
4	3.09	3.04	5.03	4.87	5.94	6.05	4.53	5.79	2.62	5.25	4.86
5	3.10	3.04	5.11	4.77	5.74	6.03	4.49	6.66	2.60	5.36	4.80
8	3.06	3.01	5.07	4.81	5.87	5.90	4.58	6.84	2.59	5.17	4.83
11	3.06	2.94	4.99	4.96	5.68	5.83	4.51	6.18	2.59	5.36	4.86
14	3.05	2.82	5.07	4.79	5.97	5.90	4.56	6.45	2.59	5.25	4.86
17	3.10	2.87	5.07	4.75	6.03	5.98	4.49	6.36	2.62	5.30	4.93
21	3.15	2.87	5.10	4.70	5.85	6.03	4.49	6.33	2.64	5.44	4.90
25	3.14	2.94	5.25	4.77	6.66	6.00	4.49	6.11	2.64	5.14	4.70
31	3.15	2.89	5.22	4.71	6.15	6.05	4.44	6.11	2.64	5.14	4.67
36	3.12	2.87	5.15	4.73	5.98	6.00	4.46	5.77	2.62	5.44	4.80
moyenne	3.09	2.94	5.09	4.81	5.93	6.01	4.50	6.13	2.62	5.31	4.89
ecart	0.05	0.07	0.08	0.07	0.24	0.10	0.05	0.35	0.03	0.11	0.14
C.V. %	1.58	2.55	1.50	1.55	4.09	1.58	1.15	5.64	1.18	2.05	2.79

Echantillon N:



CHROMATOGRAM 1 MEMORIZED

C-R5A CHROMATOPAC
CHANNEL NO 1 FILE 0

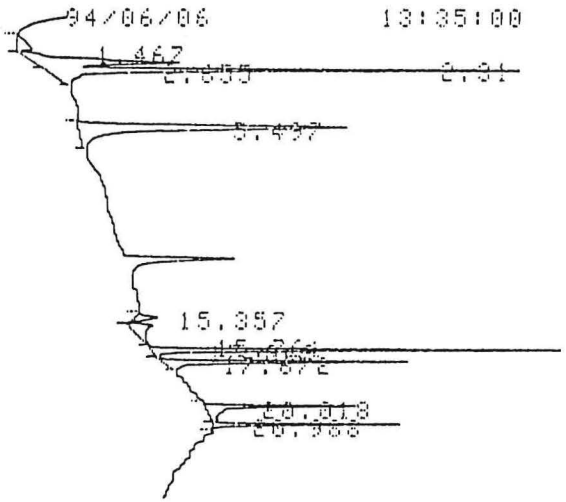
SAMPLE NO 0 METHOD 64
REPORT NO 855 SAMPLE WT 100

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	16.152	150733		7	0.7334	MALATE + SUC
2	17.249	856436		8	2.7193	SULFATE
3	17.849	255074		9	0.9882	OXALATE
4	20.124	225635		11	1.9889	PHOSPHATE
	TOTAL	1487878			6.4298	

CHROMATOGRAMME CE 11 :SOL TRUFFIER SORGUES

Annexe 9

Echantillon N:



CHROMATOGRAM 1 MEMORIZED

C-R5A CHROMATOPAC

CHANNEL NO	1	FILE	0
SAMPLE NO	0	METHOD	64
REPORT NO	951	SAMPLE WT	100

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1.467	107559				
2	2.31	666121		1	0.8999	FLUORURE
3	2.655	1073817	V	2	5.6111	FORMATE
4	5.497	1152109		4	3.4261	CHLORURE
5	15.357	95837		7	0.4663	MALATE + SUC
6	15.761	132973		7	0.647	MALATE + SUC
7	17.049	836890		8	2.6572	SULFATE
8	17.672	522899		8	1.6603	SULFATE
9	20.018	317924		11	2.8024	PHOSPHATE
10	20.988	303360		14	2.7913	CITRATE

CHROMATOGRAMME CE 16 :RACINES ET GLOMERULES DE MYCORHIZES

Annexe 10

PHOTOS

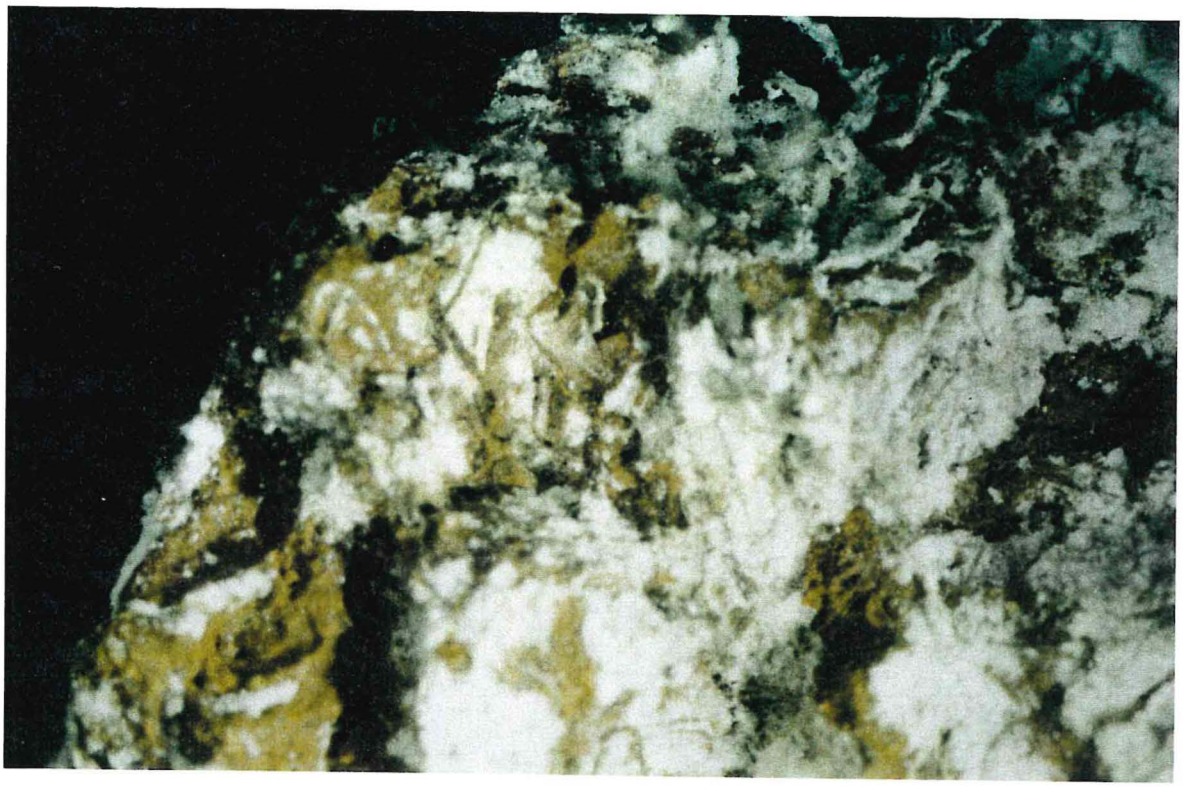
CE 6 : **PRECIPITATIONS D'OXALATE ET CARBONATE DE CALCIUM AUTOUR DE RACINES DE PINS (pinus alepensis) MYCORHIZEES.**

- Zones très blanches à dominante d'oxalate de calcium.
- Zone blanc-cru à dominante de carbonate de calcium.

]——[150 µm

]——[100 µm

CE 7 : PRECIPITE D'OXALATE DE CALCIUM (EN BLANC) SUR DES PARTICULES DE SOL ROUGE CALCIQUE, NON CALCAIRE, COLONISEES PAR DES HYPHES MYCELIENS.

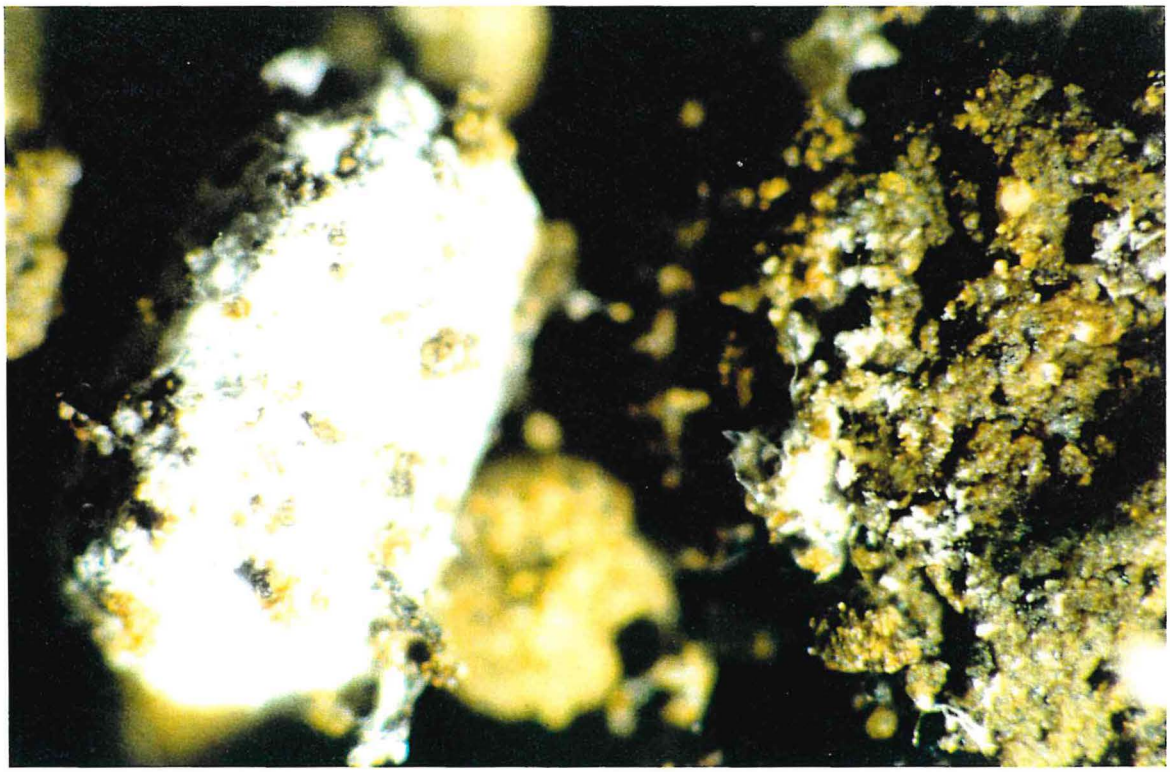


]——[150 µm

]——[100 µm

CE 10 : **PELLICULE BLANCHE (PRECIPITE d'OXALATE) AUTOUR DE BOULETTES FECALES D'IULES.**

]——[150 µm



]——[100 µm

CE 9 : PRECIPITE DIFFUS D'OXALATE SUR BOULETTES FECALES DE VERS DE TERRE.

]——[150 µm