

Mesure de l'azote dans des échantillons  
végétaux par microanalyse X en WDS

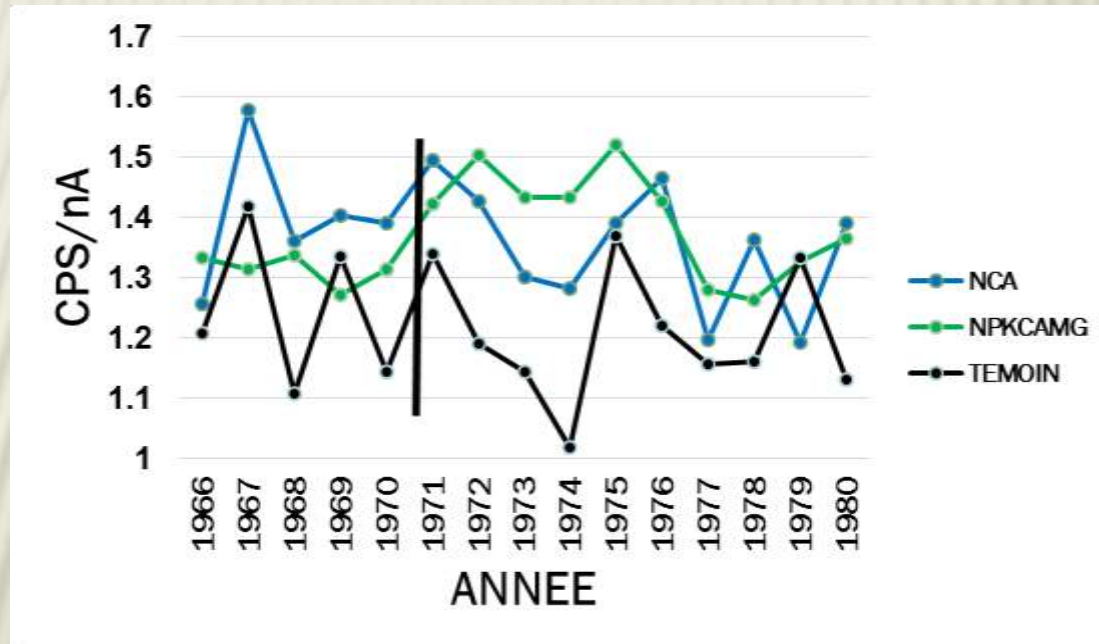
**Christophe Rose** [rose@nancy.inra.fr](mailto:rose@nancy.inra.fr)

**INRA NANCY-LORRAINE - UMR EEF-PTEF**

**54280 Champenoux**

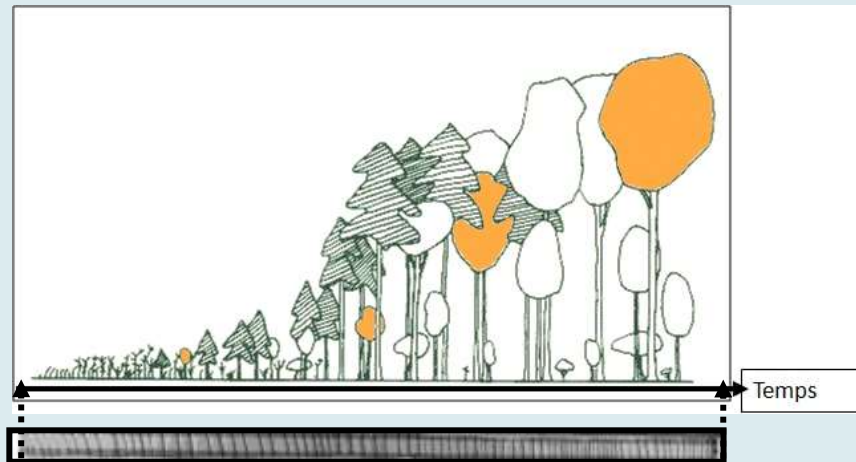
## Pourquoi l'azote ?

Variations interannuelles (microanalyses WDS) de l'azote dans du bois de chêne prélevé (carottes) sur des placeaux fertilisés ou non en 1970 en forêt domaniale de Bercé



## Objectifs scientifiques: Pourquoi l'azote ?

- × N : élément indispensable à la plante (acides aminés, acides nucléiques, enzymes,...)
  - × Facteur limitant fréquent
  - × Intrant indésirable
  - × dépôts azotés :  $13 \text{ kg N.ha}^{-1}.\text{an}^{-1}$  (Vosges)  
 $40 \text{ kg N.ha}^{-1}.\text{an}^{-1}$  (Ardennes)
- Recherche de marqueurs des variations spatiales et temporelles de la disponibilité de N pour les arbres

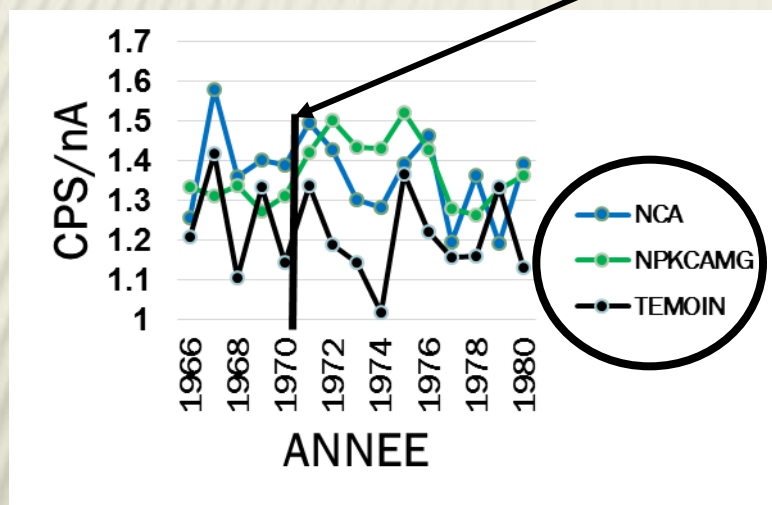




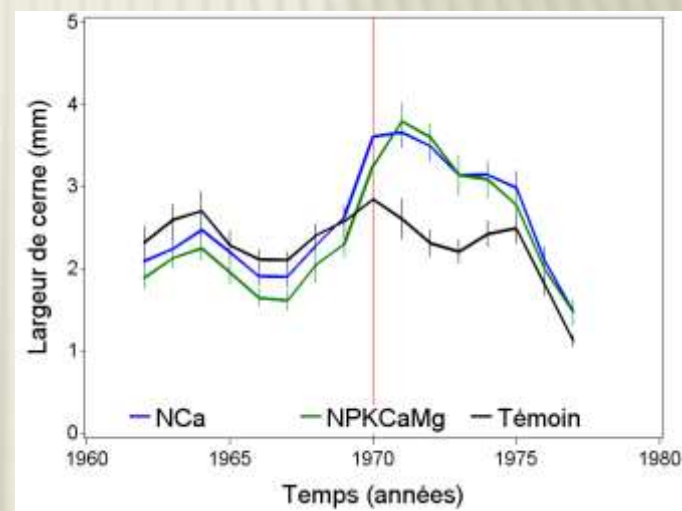
# Objectifs scientifiques: Pourquoi l'azote ?

## Dendrochimie

fertilisation

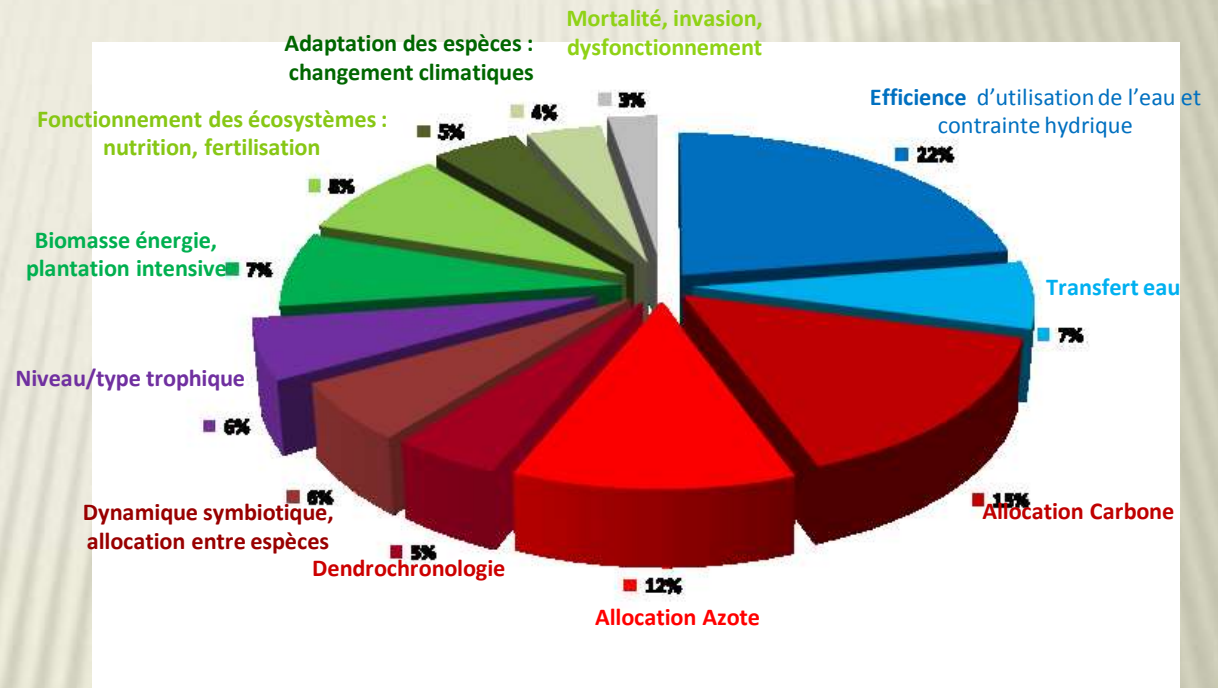


## Croissance radiale annuelle

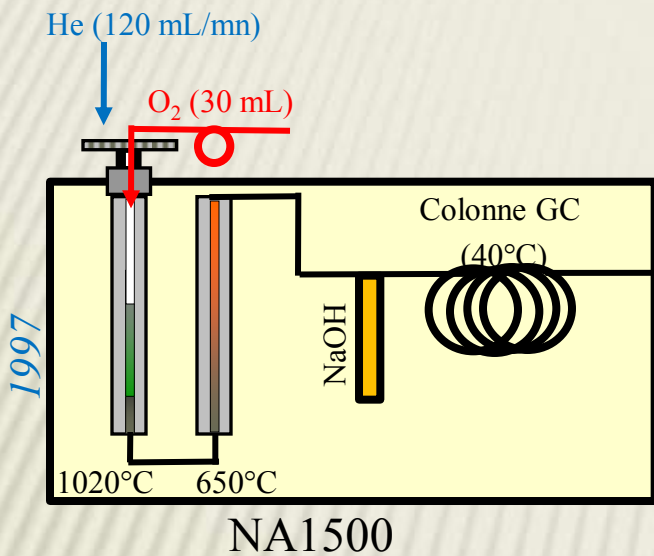


## PLATEFORME TECHNIQUE D'ÉCOLOGIE FONCTIONNELLE (label CNOC INRA 2013 Plateforme à Rayonnement Régional)

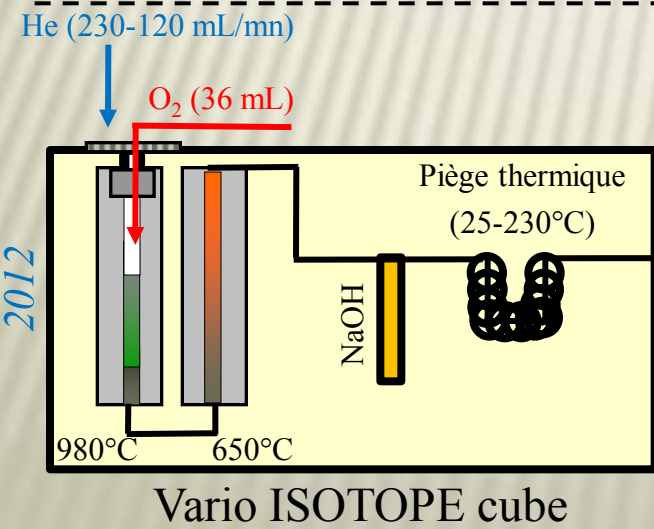
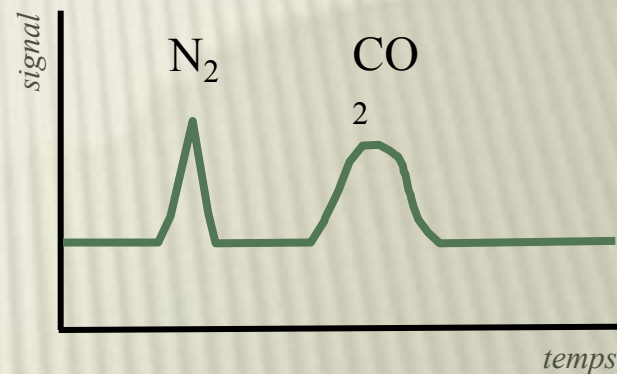
### Support à la Recherche



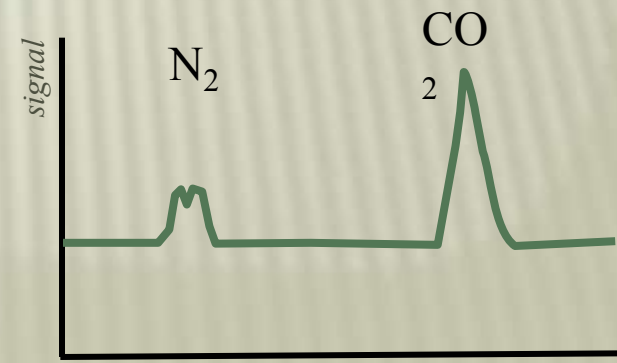
# Equipements Analytiques



Delta S



Isoprime 100



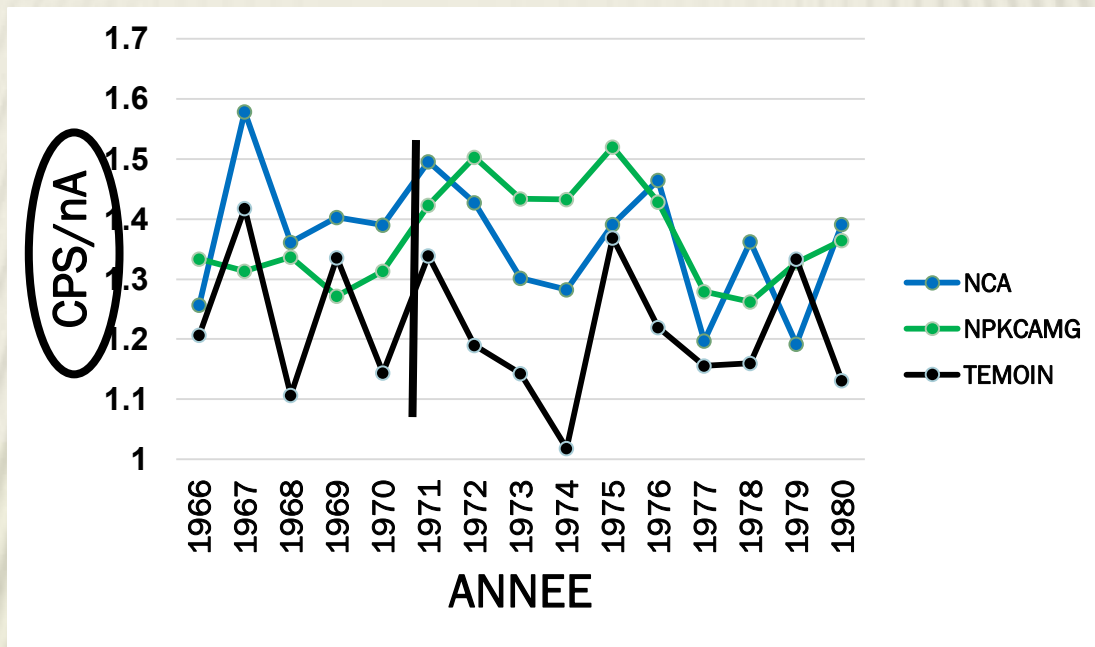
## Equipements Analytiques

**Spectromètre en dispersion de longueur d'onde (WDS 2006)**



**Spectromètre en sélection d'énergie (EDS-SDD 80 mm<sup>2</sup> 2001)**



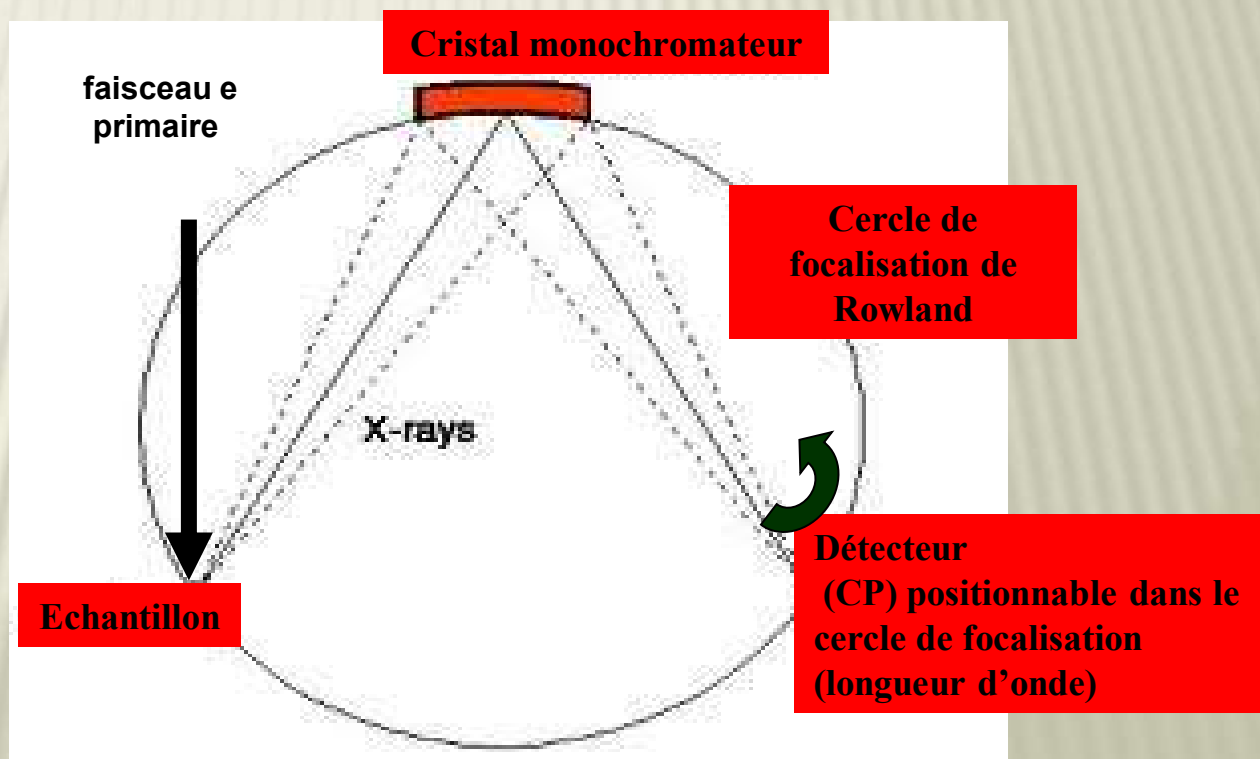
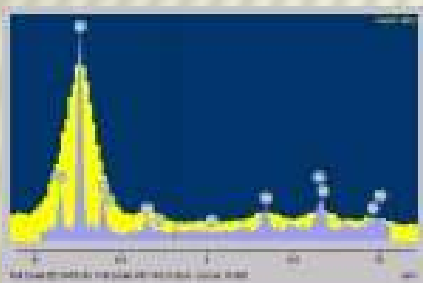


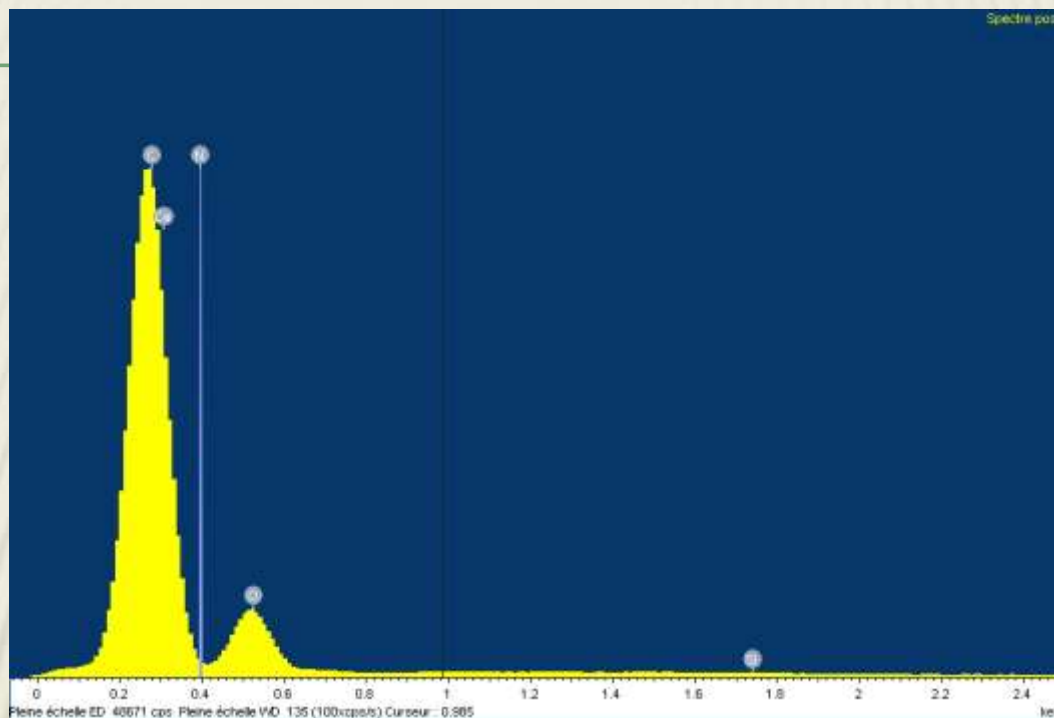
## INTERACTION ELECTRON-MATIERE

### Spectrométrie en dispersion de longueur d'onde

Cet équipement permet une microanalyse élémentaire à l'échelle cellulaire .

Traitement numérique des signaux transmis par le compteur proportionnel : pics (cps/nA)





**Le choix du spectromètre WDS s'impose**

**Utilisation d'un cristal monochromateur dédié à L'azote**

**Mesures en 'hauteur' de pic total**

**Gestion d'un courant de faisceau constant pendant tout le temps des mesures (plusieurs heures) par ajustement automatisé**

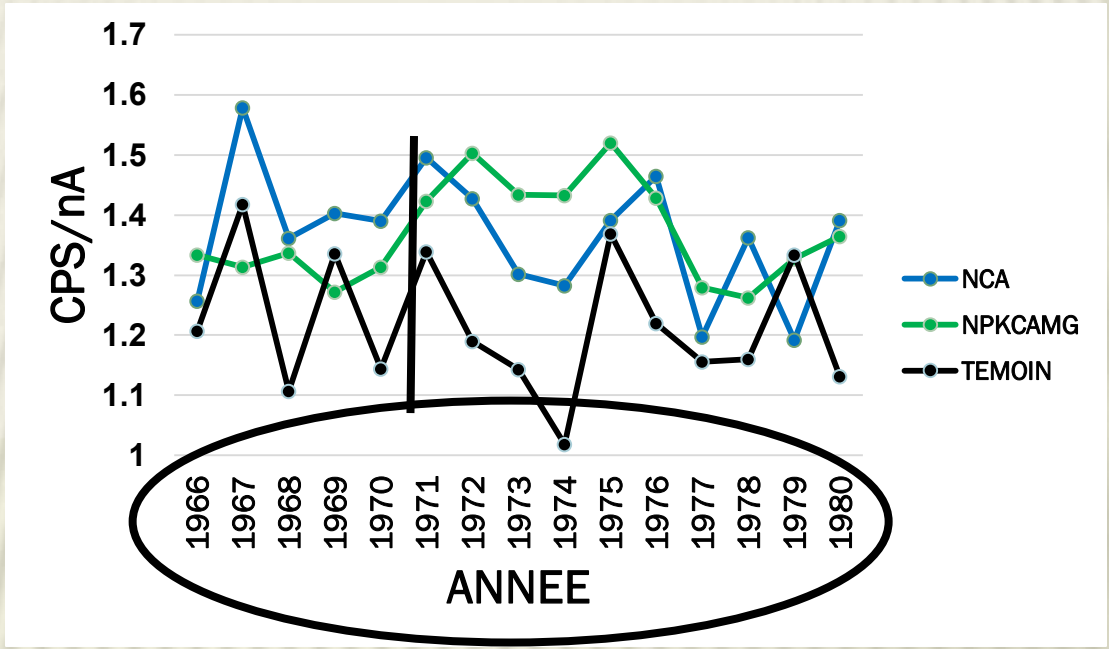
ELEMENTS Transition K $\alpha$	Energie kev
C	0.277
N	0.392
O	0.525

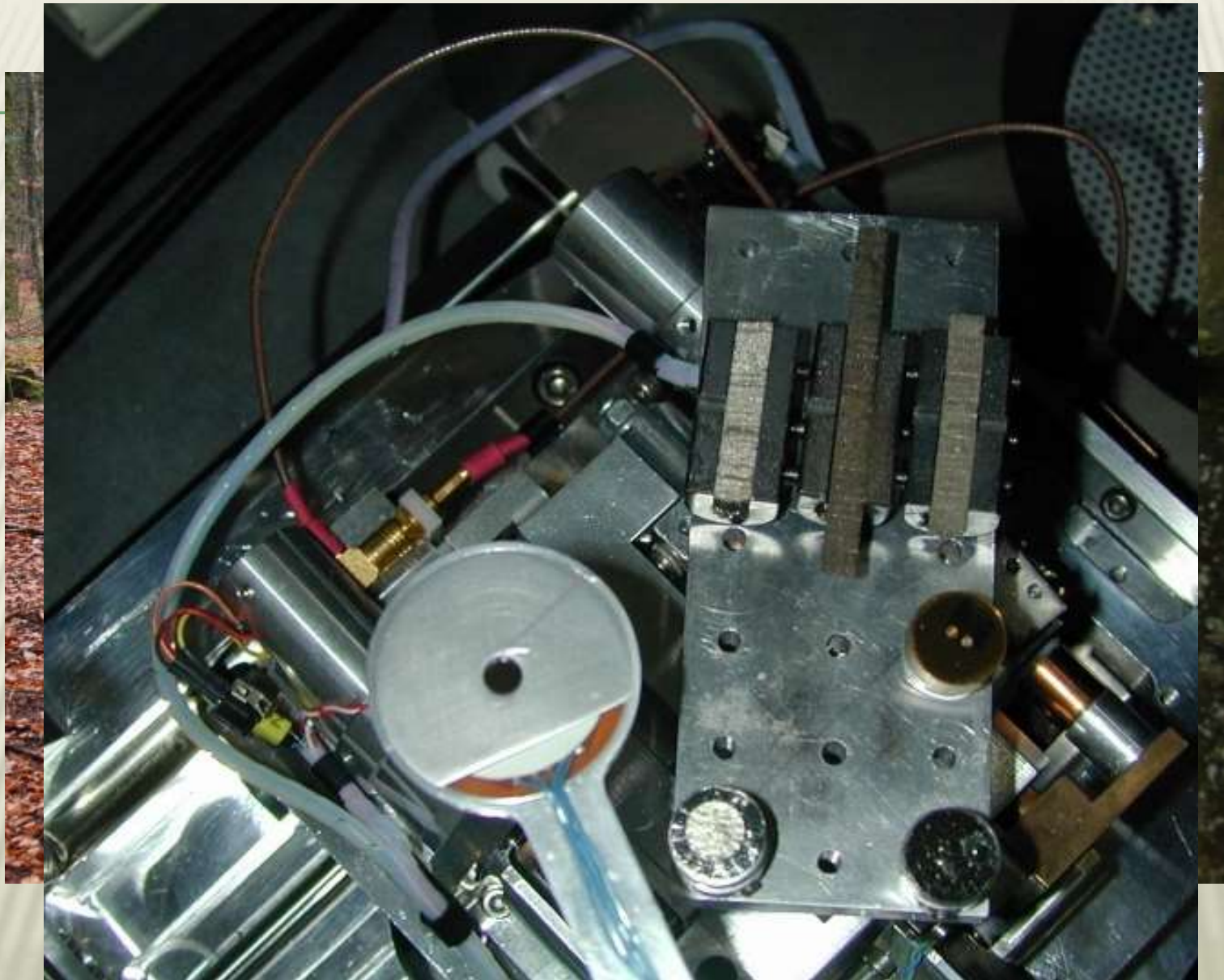
# Solutions Analytiques

## Gestion automatisée du faisceau et traçage des paramètres MEB

AVANTCORREC	COURANT CORRIGE	DATE	HEURE	GRAND	HT	ISONDE	POS X	POS Y	POS Z
INIT	-30.27	24/04/2014	1:26:51 PM	10000	10000	13.896709	13.996	79.363	24.766
-30.23	-30.23	24/04/2014	1:27:10 PM	1		-0.04	-0.04		
-29.69	-30.62	24/04/2014	1:34:00 PM	2		-0.58	-0.35		
-30.62	-30.62	24/04/2014	1:40:59 PM	1					
-30.67	-30.67	24/04/2014	1:48:07 PM	1					
-30.76	-30.76	24/04/2014	1:54:54 PM	1					
-30.81	-29.84	24/04/2014	2:01:51 PM	2					
-29.93	-29.93	24/04/2014	2:08:52 PM	1					
-30.03	-30.03	24/04/2014	2:16:04 PM	1					
-30.08	-30.08	24/04/2014	2:23:01 PM	1					
-29.93	-29.93	24/04/2014	2:30:01 PM	1					

DATE	HEURE	HT	IECH	PASG	POS	POS X	POS Y	POS Z	POST	POS R	POS M	MAG	WD	SURF
24/04/2014	1:30:18 PM	10000	-20.36212	PASG2	POS1	0.0244364	0.0640372	0.025884	0	350.99997	0	506.82739	0.015	0.215286
24/04/2014	1:30:52 PM	10000	-19.87382	PASG2	POS2	0.0244364	0.0648448	0.025884	0	350.99997	0	506.57391	0.015	0.215286
24/04/2014	1:31:28 PM	10000	-21.87585	PASG2	POS3	0.030163	0.051288	0.025884	0	350.99997	0	506.32059	0.015	0.215286
24/04/2014	1:32:03 PM	10000	-21.6317	PASG2	POS4	0.0296246	0.0516919	0.025884	0	350.99997	0	506.06741	0.015	0.215286
24/04/2014	1:32:37 PM	10000	-21.48521	PASG2	POS5	0.0296246	0.0508843	0.025884	0	350.99997	0	505.8143	0.015	0.215286
24/04/2014	1:33:12 PM	10000	-21.58287	PASG2	POS6	0.0307014	0.0508843	0.025884	0	350.99997	0	505.56131	0.015	0.215286
24/04/2014	1:33:47 PM	10000	-21.28989	PASG2	POS7	0.0307014	0.0516919	0.025884	0	350.99997	0	505.3085	0.015	0.2172657
24/04/2014	1:35:30 PM	10000	-21.72936	PASG2	POS8	0.038163	0.039653	0.026836	0	350.99997	0	505.2709	0.015	0.2172657
24/04/2014	1:36:05 PM	10000	-22.07117	PASG2	POS9	0.0376246	0.0400568	0.026836	0	350.99997	0	507.33469	0.015	0.215286
24/04/2014	1:36:40 PM	10000	-22.41298	PASG2	POS10	0.0376246	0.0392492	0.026836	0	350.99997	0	507.08099	0.015	0.215286





# Dendrochimie Scan-MEB

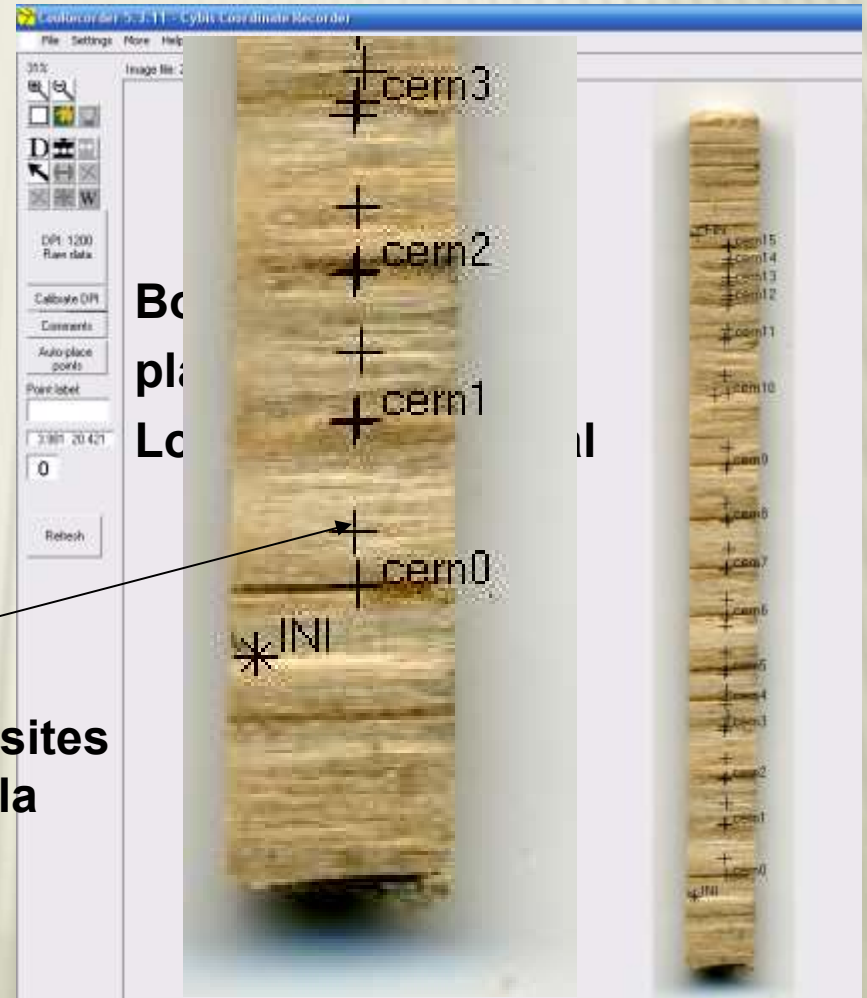
Etude dendrochronologique:

Etude dendrochimique:

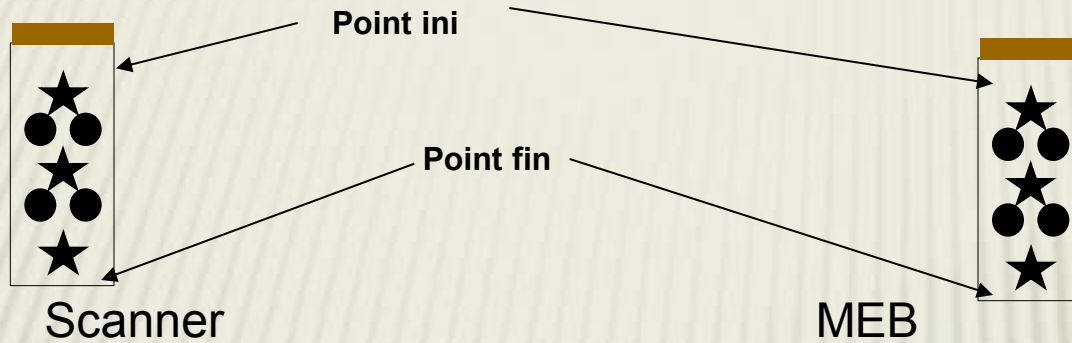
**Bois brut  
plan  
Tangentiel-Radial**



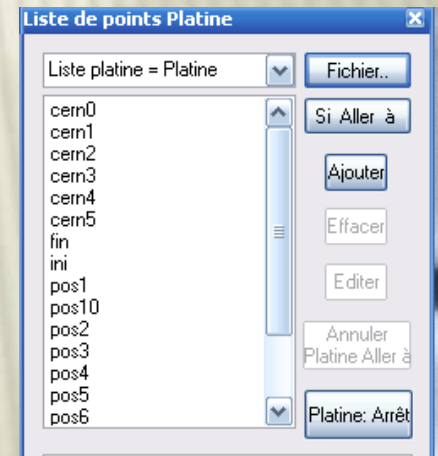
**Enregistrement manuel des sites  
d'analyses intra-cerne pour la  
dendrochimie**



## Approche corrélative Scanner-Meb



Macro programmation excel (VBA)



---

**Et le quanti ????**

# Mesures Quantitatives?

## Méthodologie

---

Standardisation de mesures quantitatives en azote par WDS

Standard constructeur : BN (N 56.4 % ; B 43.6%)



1ère Etape: 2011-2012

Norme ISO 16592 (2006)

Standardisation INRA : Dosage du Carbone dans les végétaux étalonnés et mesurés en WDS

d'étalonnage



2ème Etape: 2012-20..

Validation par l'expérimentation sur des échantillons bruts : Bois, feuilles,...



Centre de Recherche de Nancy



UNIVERSITÉ  
DE LORRAINE

IUT DE  
THONVILLE-YUTZ

**Camille Delaplace**

**Stage de fin d'études DUT Génie Biologique (Génie de l'Environnement)**

**du 10/04/2012 au 15/06/2012**

# **Mise au point d'un protocole de dosage de l'azote dans des échantillons végétaux par microanalyse X en WDS**

## Méthodologie 1ère ETAPE

---

- Déterminer les paramètres d'analyse qui influencent la mesure
- Déterminer leur valeur optimale
- Vérifier la reproductibilité des mesures
- Lier la mesure du WDS à la concentration en azote (courbe d'étalonnage)

### Choix des paramètres physiques expérimentaux :

Tension d'accélération du faisceau d'électrons

Le courant transmis à l'échantillon (courant de faisceau)

Temps d'acquisition de la mesure

Le grandissement

**Matériel biologique** : Travail sur 10 poudres certifiées



## Méthodologie 1ère ETAPE

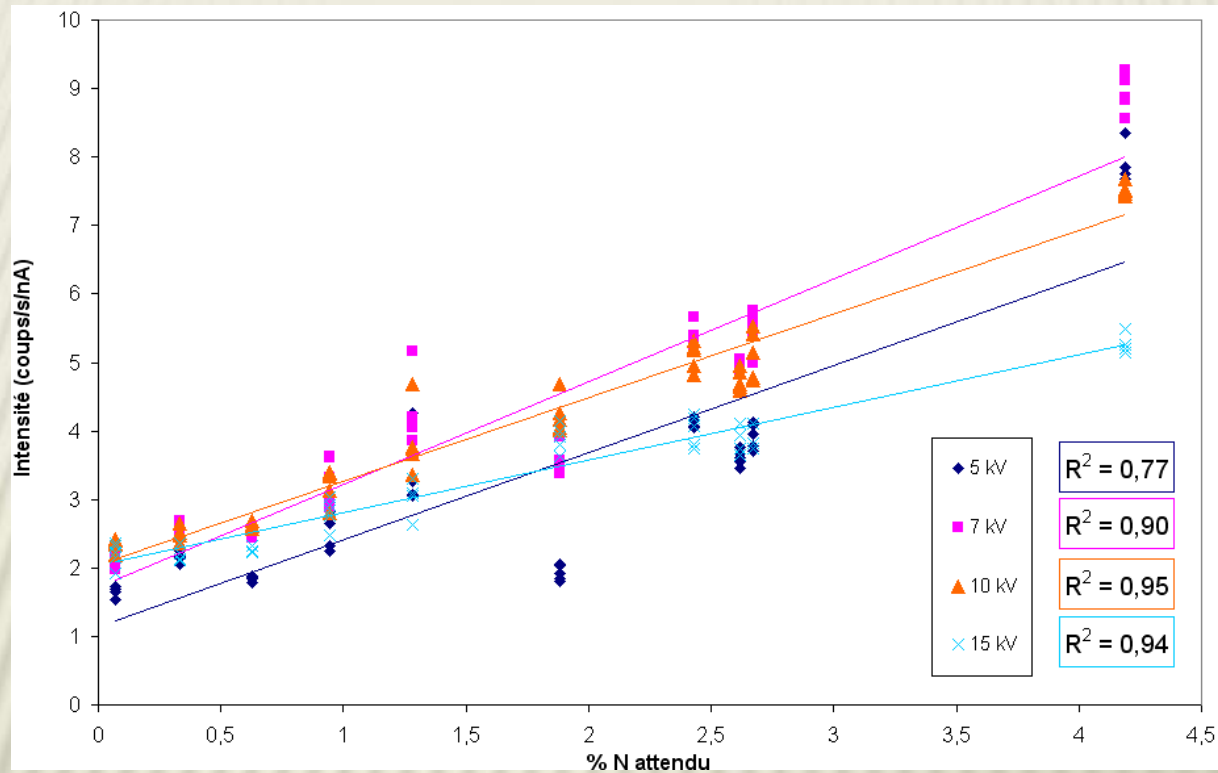
### Liste des étalons employés pour constituer la gamme :

Identifiant	Nom scientifique	Compartiment	Concentration en N (% de masse)
Noëlle 13 préparé par INRA	<i>Fagus sylvatica</i>	Bois	0,07
Pins certifié par C.I.I	<i>Pinus sylvestris</i>	Ecorce	0,33
Lichen tp24 certifié par BCR	Non renseigné	Lichen	0,63
Chêne certifié par BIPEA	<i>Quercus petraea</i>	Feuille	0,944
Maïs certifié par BIPEA	<i>Zea mays</i>	Feuille	1,28
Epicéa certifié par BCR	<i>Picea abies</i>	Feuille	1,88
Lichen tp25 certifié par BCR	Non renseigné	Lichen	2,43
Hêtre certifié par BCR	<i>Fagus sylvatica</i>	Feuille	2,62
Ray-grass préparé par INRA	<i>Lolium perenne L.</i>	Feuille	2,67
Acacia préparé par INRA	<i>Acacia aneura</i>	Feuille	4,19

### Recherche des valeurs optimales des paramètres instrumentaux et expérimentaux

Paramètres	Valeurs à tester	Valeurs fixes
Tension d'accélération (kV)	5 – 7 – 10 – 15	10
Courant Echantillon (nA)	10 – 30 – 50 – 150	50
Temps d'acquisition (s)	10 – 30 – 50	30
Grandissement (X)	200 – 500 – 1000 – 2000	1000

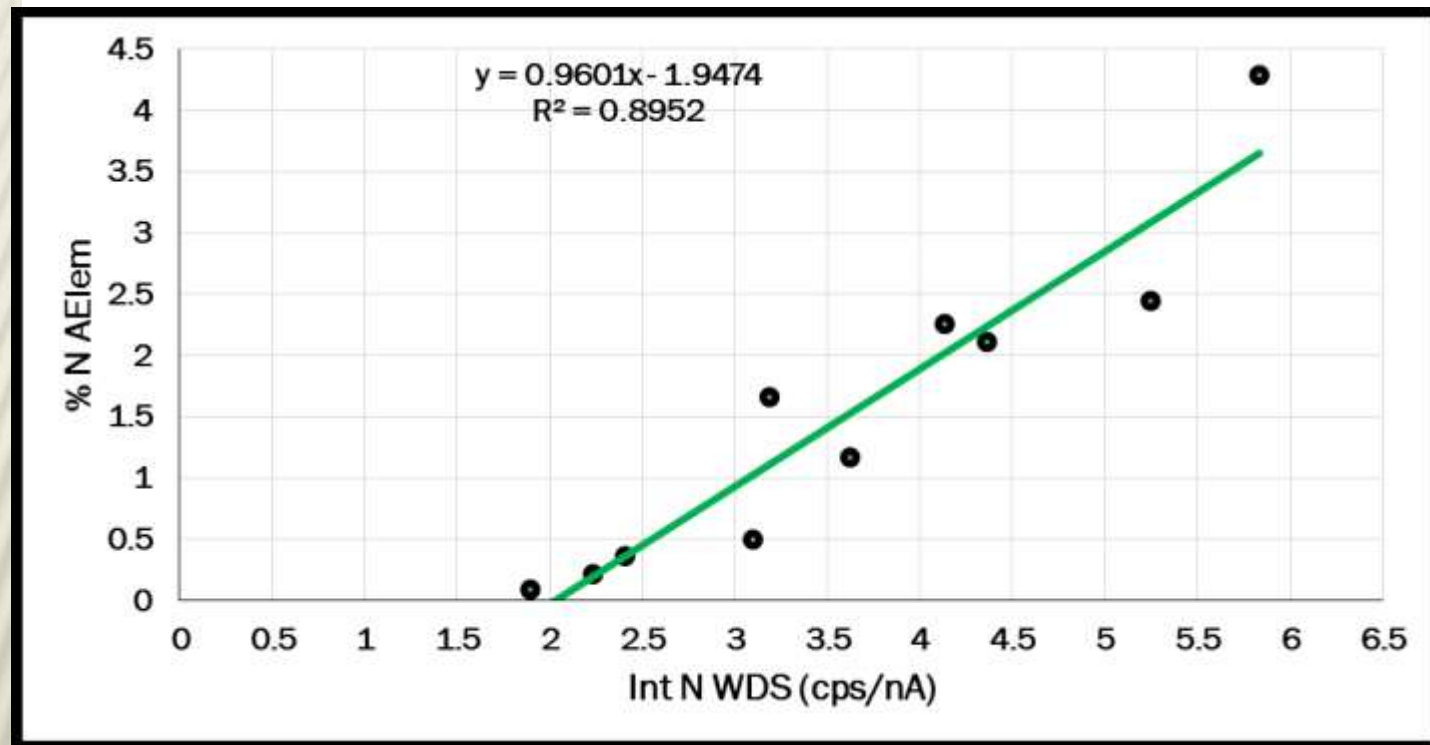
## Tension d'accélération



→ Valeur retenue : 10 kV

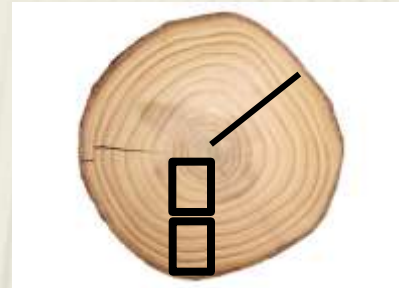
## Méthodologie 1ère ETAPE

→ Valeurs retenues : 10kV; 30 nA; 30 s ; 500x



Première droite d'étalonnage mettant en relation les intensités mesurées en micro-analyse WDS (conditions optimisées) de l'azote dans des poudres végétales avec les titres massiques en pourcentages connus résultants d'une analyse élémentaire .

Site atelier de Breuil (Morvan)  
fertilisation (azote notamment) en 1980 de  
placeaux d'Epicea et de Douglas



-Prélèvement de  
**carottes(120) à coeur**  
avant la coupe et le  
découpage en rondelles

-Extraction des cernes annuels  
(barreaux dans la rondelle) et  
broyage des barreaux:  
**150 Echantillons de poudre**  
(mélange de 5 cernes du bois  
broyés)

La **Pierre de Rosette** est un fragment de stèle gravée de L'Egypte Antique portant trois versions d'un même texte qui a permis le déchiffrement des hieroglyphes au XIX<sup>e</sup> siècle

- Micro-analyse WDS de l'azote contenu dans les poudres pastillées (cps/nA)
- Analyse Élémentaire en azote d'une aliquote de chacune de ces poudres (AE INRA)
- Micro-analyse WDS de l'azote contenu dans les cernes annuels de bois à partir des carottes
- Calibration et estimation des teneurs réelles en azote par traitement statistique et inter comparaison des résultats obtenus avec les poudres certifiées et les analyses élémentaires.

---

## Conclusions

La mesure fiable et d'ordre semi quantitatif des variations en Azote dans les végétaux par micro-analyse (échelle cellulaire ou tissulaire) est rendue possible par l'utilisation d'équipements performants et adaptés (sensibilité , justesse) et par le suivi et le respect des protocoles et développements dédiés à cette mesure ( répétabilité, comparaison des mesures entre elles).

Les études en cours, de calibration par des courbes d'étalonnage établies avec des matrices biologiques et la mise en correspondance de résultats obtenus par différentes méthodes (AE-micro-analyses WDS) sont tout fait prometteuses pour l'évaluation quantitative des teneurs en azote dans des matrices végétales à partir de nos équipements de micro-analyse

---

A photograph of a forest with a surveying instrument on a tree trunk. The forest floor is covered in fallen leaves and branches. The text "MERCI POUR VOTRE ATTENTION" is overlaid in white capital letters on the image.

**MERCI POUR VOTRE ATTENTION**