

Développement d'une méthode d'extraction et purification des phosphates à partir de matrices sédimentaires pour l'analyse isotopique de leur oxygène

Chiara Pistocchi^{1,2}, Federica Tamburini³, Liliane Savoye¹, Mathieu Sebilou⁴
Ilaria Baneschi⁵, Danielle Lacroix¹, Pascal Perney¹, Jean-Marcel Dorioz¹

Résumé. Cette étude fait le point sur un ensemble de travaux réalisés pour développer une méthode d'extraction et de purification des phosphates à partir de matrices sédimentaires en vue d'une analyse de la composition isotopique de leurs atomes d'oxygène. La méthode choisie parmi les quelques procédures proposées par la littérature est décrite en détail ainsi que les tests auxquels nous l'avons soumise pour valider son application dans le contexte d'un travail portant sur la caractérisation des phosphates de sédiments.

Mots clés : phosphate, oxygène, isotope, $\delta^{18}\text{O}_p$, sédiment

Introduction

L'objectif de cette étude est de présenter un ensemble de travaux et d'essais réalisés pour développer une méthode d'extraction et de purification des phosphates de sédiments, en vue d'analyser la composition isotopique de leurs atomes d'oxygène.

Dans une première partie nous proposons un bref rappel de l'état des connaissances sur la spéciation du phosphore et la signature isotopique de l'oxygène dans les ions phosphates. Nous envisageons ensuite une brève revue comparée des différentes méthodes d'extraction et de purification disponibles dans la littérature. Connaissant les avantages et inconvénients de chacune d'elles nous choisissons la méthode mise au point par Tamburini et al. (2010). La procédure retenue est analysée, décrite et testée pour valider son application dans le contexte d'un travail préliminaire portant sur la caractérisation de sédiments du bassin versant du Lac Léman et du lac lui-même.

Signature isotopique des atomes d'oxygène dans les ions phosphates : variabilités et applications

Le phosphore (P) est un élément clé et souvent limitant de la productivité des écosystèmes terrestres et aquatiques. Bien que présent dans l'environnement quasi exclusivement sous forme de phosphate, il présente une spéciation complexe. Il est, soit dissous dans l'eau en tant que composé ionique issu de l'équilibre des formes de l'acide phosphorique selon le pH (H_3PO_4 , H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} et PO_4^{3-}), soit participe aux nombreux composés organiques (oses, esters...) et inorganiques se distribuant dans les phases solides et aqueuses ou dans les organismes biologiques. L'ensemble des composés en solution constitue le « P-dissous ». (**Tableau 1**). Les ions phosphates sont dans ce texte notés « PO_4 ». Le phosphore associé à la phase solide existe sous des formes chimiques très diverses dont l'ensemble constitue le « P-particulaire ».

¹ INRA UMR CARTELE, 0042, 75, Avenue de Corzent, BP 511, F-74203 Thonon-les-Bains Cedex, France ; liliane.savoye@thonon.inra.fr

² Institute of Life Sciences, Sant'Anna School of Advanced Studies, 56127 Pise, Italie

³ Plant Nutrition Group, ETH-Zurich, 8318 Lindau-Eschikon, Suisse

⁴ UPMC-BIOEMCO, F-75006 Paris, France

⁵ IGG-CNR, Via Moruzzi 1, 56127 Pise, Italie

Les ions phosphates en solution constituent la principale forme de phosphore directement assimilable par les plantes. Les autres formes ne sont pas pour autant totalement inactives biologiquement. A la suite d'hydrolyses enzymatiques ou dans le cadre d'interactions phase solide / phase liquide, elles peuvent fournir un flux d'ion phosphate potentiellement assimilable. Cette fraction constitue le P labile ou biodisponible.

Le P-particulaire est la fraction largement dominante dans les sols et sédiments et en rivière lors des crues. L'extrême diversité des composés qui constitue cette fraction, rend la détermination exhaustive des espèces moléculaires phosphatées impossible et non pertinente. La spéciation est donc caractérisée par des extractions sélectives séquentielles basées sur les différences de réactivité des solides contenant du P, vis-à-vis d'extractants. De nombreuses méthodes classiques plus ou moins raffinées, sont disponibles (Chang et Jackson, 1958 ; Gachon 1972 ; Hedley et al., 1982 ; Ruttenberg, 1992 ; Ruttenberg et al., 2009 ; Williams et al. 1976, 1980). Elles différencient des groupes de composés homologues par rapport à la technique d'extraction choisie et donc vis-à-vis de certains comportements physico-chimiques. Du fait des incertitudes associées à ces méthodes et des possibilités d'évolutions bio-physico-chimiques du phosphore dans les divers compartiments de l'environnement et lors des transferts, la spéciation du P ne constitue pas un traceur très puissant des sources de phosphore du milieu aquatique.

Tableau 1. Spéciation simplifiée du phosphore

<i>Fraction</i>	
P-dissous	Ion phosphate (PO ₄) P-organique (Phosphonate, ATP, ADN, ...) Polyphosphate
P total	
P-particulaire	P-biologique P-sorbé (argiles, CaCO ₃ ...) Formes cristallisées (divers minéraux primaires) Formes précipitées avec cations (Fe ³⁺ , Ca ²⁺ , Al ³⁺ , ...)

Contrairement à l'azote, au carbone, à l'oxygène et au soufre, le phosphore n'a qu'un isotope stable (³¹P). Il ne peut donc pas être tracé à partir du rapport de ses isotopes stables. L'isotope radioactif ³²P est largement utilisé en agronomie (Fardeau, 1993) mais son usage est exclu dans les travaux in situ.

Dans tous les composés présents dans la nature, le phosphore est fortement lié avec l'oxygène qui lui présente trois isotopes stables: ¹⁶O 99,757%, ¹⁷O 0,038% ¹⁸O 0,205%. L'analyse de la composition isotopique de ces atomes d'oxygène des ions phosphates ($\delta^{18}O_p$) peut fournir une signature caractéristique de l'origine et des processus de fractionnement isotopique. L'état de connaissance concernant ces processus est encore fragmentaire, bien qu'en plein développement. Les acquis opérationnels sont néanmoins suffisants pour d'ores et déjà envisager des applications. Nous mentionnons les principaux acquis ci-dessous.

(1) En l'absence d'activité biologique, la liaison P-O des phosphates organique et minéral, résiste à l'hydrolyse dans les conditions de température (inférieure à 80°C), de pH et de pression habituelles de l'environnement (Lecuyer et al., 1999). Par conséquent, dans les écosystèmes, les échanges d'oxygène entre phosphates et eau associés à des processus abiotiques d'hydrolyse, sont négligeables. Aucune évolution significative de la signature isotopique ne leur est due.

(2) La précipitation et la dissolution de différents minéraux phosphatés, ainsi que les phénomènes d'absorption et désorption à la surface des minéraux entraînent un fractionnement faible de l'ordre de 1‰ $\delta^{18}O_p$, (Liang et Blake, 2007 ; Jaisi et Blake, 2010).

(3) Les processus biologiques réalisant l'hydrolyse enzymatique des liaisons P-O permettent un échange avec des atomes d'oxygène de l'eau impliquée dans l'hydrolyse. Ce mécanisme est rapide et peut engendrer des fractionnements isotopiques importants.

La signature isotopique de l'oxygène du PO₄ est donc susceptible d'être modifiée principalement par des processus métaboliques mettant en jeu :

(1) un équilibre de **fractionnement thermodynamique fonction de la température** (Longinelli et Nuti, 1973) qui est décrit par l'équation empirique : $\delta^{18}\text{O}_p = [(111.4-T)/4.3] \cdot \delta^{18}\text{O}_{\text{eau}}$; (T en °C). Des travaux plus récents (Blake et al., 1997, 2000, 2005 ; Colman et al., 2005) montrent que cet équilibre résulte souvent d'un phénomène dominant, l'activité intracellulaire d'une enzyme clé du métabolisme cellulaire du phosphore : la pyrophosphatase (**Figure 1**) ;

(2) des **fractionnements cinétiques sont dus à la minéralisation extracellulaire du P organique** (**Figure 2**) (Blake et al., 2005 ; Liang and Blake, 2006) ; il s'agit probablement de fractionnements enzymes spécifiques. La phosphatase alcaline et la 5'-nucléotidase induisent expérimentalement un fractionnement respectivement de -30‰ à -10‰ $\delta^{18}\text{O}_p$ des phosphates résultants. Mais nombre d'autres enzymes restent encore à tester, notamment les phosphoestérase et les ribonucléases. De fait, toutes les hydrolyses de composés organiques du P sont susceptibles de modifier la signature du PO₄ (**Figure 2**) ;

(3) un **fractionnement cinétique associé à l'adsorption** par les cellules vivantes ; en 2005, Blake et al. montrent que les cellules de *E. coli* adsorbent préférentiellement du phosphate léger (enrichi en ¹⁶O).

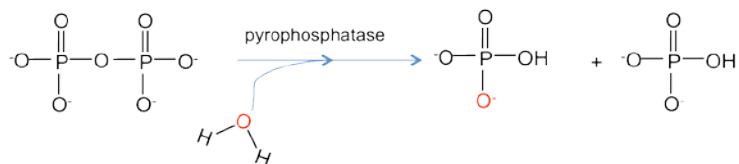


Figure 1. Métabolisation des phosphates par la pyrophosphatase.

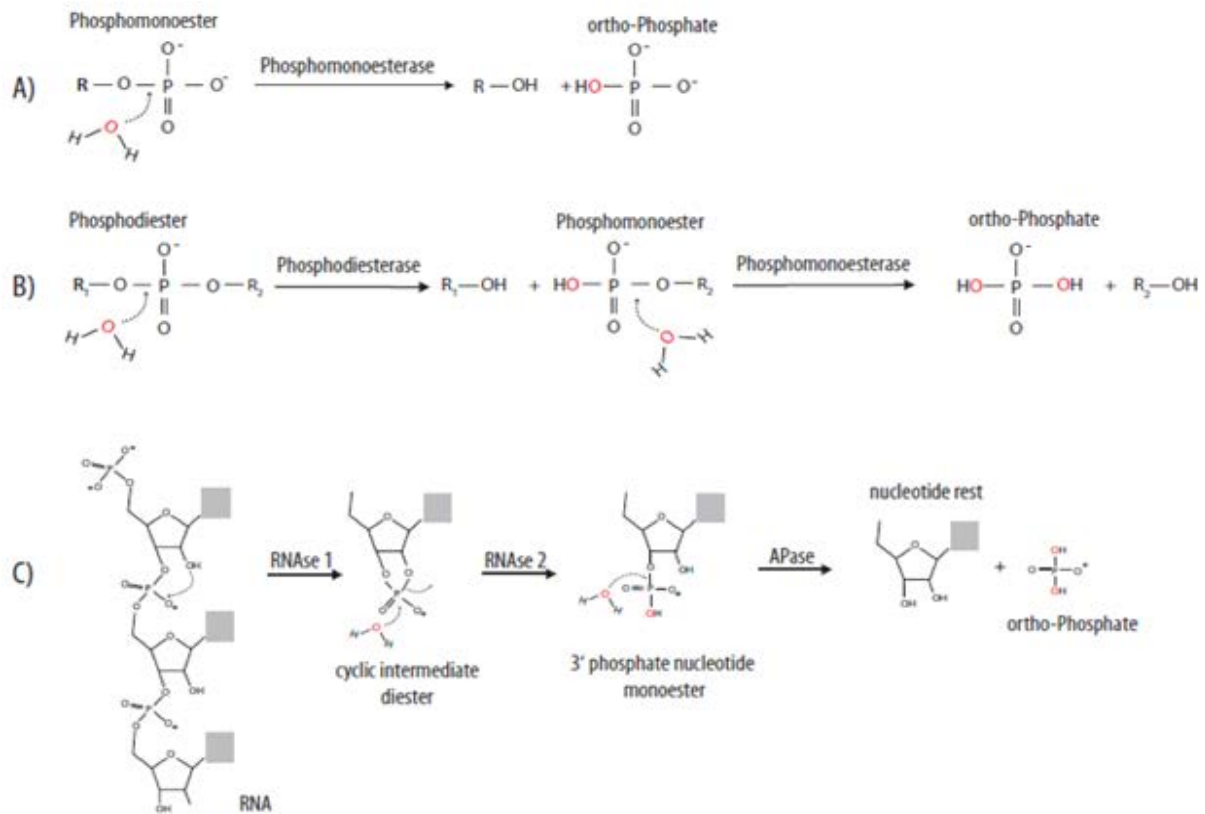


Figure 2. Mécanismes d'hydrolyse enzymatique des phosphoesters ; RNase = ribonucléase, catalyse les premières étapes de l'hydrolyse du ARN, APase = phosphatase alcaline (d'après Liang et Blake, 2006).

La première utilisation notable des isotopes $\delta^{18}\text{O}_p$ est due à Longinelli et Nuti (1973) qui se servent de cette signature sur des bio-apatites, (composées constitutifs des os et des dents) comme proxy de la température dans des études de paléo-environnement (Shemesh et al., 1988 ; Lecuyer et al., 1999 ; Zazzo et al., 2004). Plus récemment quelques auteurs appliquent cet outil isotopique au P-dissous des systèmes aquatiques (surtout en estuaires et milieux marins) pour tracer les différentes sources de P, décrire son utilisation biologique et son turnover dans ces écosystèmes (Markel et al., 1994 ; McLaughlin et al., 2004 ; Colman et al., 2005 ; McLaughlin et al., 2006a ; McLaughlin et al., 2006b;Elsbury et al., 2009). Elsbury et al., 2009 tentent de déduire de la variabilité isotopique la charge interne de lacs (transfert du phosphore à partir des sédiments vers le plan d'eau). Les investigations portant sur les milieux terrestres (système sol - plante) se développent depuis peu (Zohar et al., 2010 ; Tamburini et al., 2012 ; Angert et al., 2011) pour élucider différents aspects du cycle du phosphore : recyclage biologique par les microorganismes, prélèvement des plantes en relation avec les différents pools de P présents dans le sol. Au total l'utilisation du $\delta^{18}\text{O}_p$ pour décrire les cycles aquatique et terrestre du P n'a pas encore donné lieu à un grand nombre de travaux de recherche (une vingtaine de publication) bien que l'intérêt pour cet outil se soit largement accrue depuis 3 ou 4 ans. A noter qu'il n'existe aucune publication relative aux lacs européens, sauf une étude très préliminaire de Guyard (2010), alors qu'ils offrent toute une série de gradient de conditions climatiques (de méditerranéen à alpin), morphométriques (temps de résidence, relation lac / bassin versant et colonne d'eau / sédiment, etc.) et trophiques (de oligotrophe à eutrophe) et donc de cycle et de bio-utilisation du P.

Ce bref tour d'horizon bibliographique montre que la signature isotopique $\delta^{18}\text{O}_p$, peut contribuer à tracer certaines sources et processus de transformation du phosphore du milieu aquatique, à l'image de ce qui est réalisé couramment pour les nitrates et sulfates (Rafter et al., 2013 ; Lloyd, 2012). Plusieurs auteurs insistent sur la possibilité d'utiliser l'évolution de la signature isotopique pour compléter les connaissances concernant le

métabolisme global du P dans les écosystèmes lentique et lotique. Il est possible d'envisager d'obtenir des informations nouvelles sur le devenir et la biodisponibilité de certaines sources de P.

Les recherches envisageables se heurtent nécessairement au manque de connaissances sur les mécanismes du fractionnement isotopique des atomes d'oxygène des ions phosphates dans les écosystèmes. L'effet fractionnant associés aux différentes transformations biologiques du phosphore, qu'il s'agisse d'effets cinétiques ou d'équilibre thermodynamique, sont encore mal connus. Une caractérisation plus exhaustive des fractionnements associés à l'action des divers enzymes du cycle du phosphore reste à établir. L'étude de Blake et al. en 2005 fait figure d'exception. A ce jour, aucune étude n'est publiée en ce qui concerne les algues et une seule traite des plantes (Pfahler et al., 2013). La variation de la signature isotopique dans les sols due à l'assimilation du phosphore par les plantes n'est pas non plus connue.

Une autre contrainte prévisible résulte du manque de données sur la variabilité des signatures de l'isotope de l'oxygène dans les ions phosphates des diverses sources potentielles de phosphore des milieux aquatiques et terrestres (Figure 3).

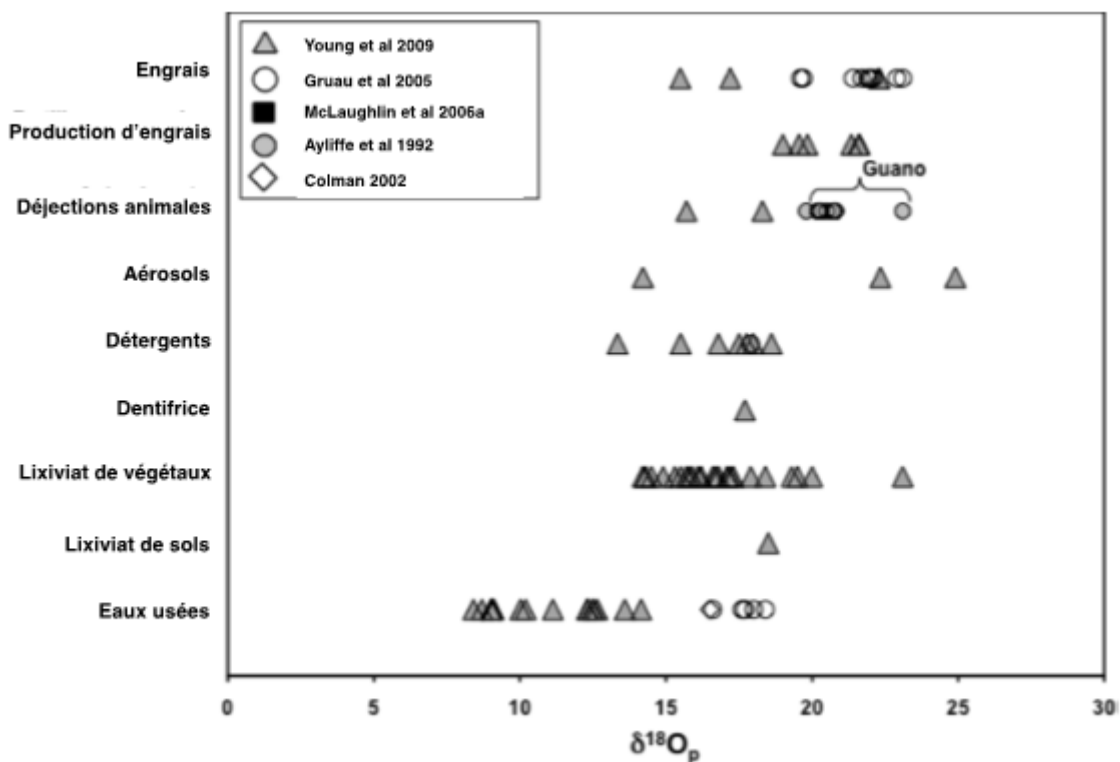


Figure 3. Signature isotopique ($\delta^{18}O_p$) de différentes sources potentielles de phosphates (Young et al., 2009).

Extraction et purification des phosphates dans une matrice solide pour l'analyse isotopique de l'oxygène : comparaison de méthodes

L'analyse isotopique de l'oxygène de l'ion phosphate nécessite toujours trois étapes :

(1) l'extraction - re-concentration des ions phosphates de la matrice solide (pour une matrice liquide, cette étape est réduite à la simple re-concentration des phosphates dans l'échantillon) ;

(2) la **purification - précipitation** qui vise à purifier l'extrait en supprimant la matière organique (MO), les chlorures, les nitrates...et permet de précipiter les phosphates sous forme d'un composé solide, le **phosphate d'argent** (Ag_3PO_4), adapté à l'analyse isotopique ;

(3) l'**analyse isotopique** du $\delta^{18}\text{O}_p$ par spectrométrie de masse.

L'extraction - re-concentration

L'étape d'extraction - re-concentration à partir d'une matrice solide comprend : (1) toujours une extraction adaptée de méthodes d'extraction séquentielle déjà existantes et développées par ailleurs pour caractériser les différents pools de phosphore dans les sols et les sédiments (**Tableau 1**) ; (2) suivi parfois d'une re-concentration utilisant la méthode MAGIC, méthode qui est basée sur une co-précipitation du PO_4 avec de l'hydroxyde de magnésium (Karl et Tien, 1992).

Les procédures utilisées pour cette première étape diffèrent selon les auteurs et les matrices. Il existe différentes méthodes d'extraction (**Tableau 2**), par exemple avec un acide, une solution basique ou avec une résine anionique. Pour le traitement des matrices solides, il convient de noter que les différences de procédure se traduisent par des conditions d'extraction plus ou moins agressives qui ont des conséquences importantes en ce qui concerne les formes de P composant l'extrait (Zohar et al., 2010). C'est un choix essentiel à raisonner en considérant le milieu et les objectifs du travail.

La purification - précipitation

Il existe trois procédures de purification des ions phosphates (**Tableau 2**) : (1) l'utilisation de résines échangeuses d'ions, (2) la précipitation de composés minéraux du phosphore associée à l'emploi de résines cationiques (McLaughlin et al., 2004 ; Tamburini et al., 2010) et (3) la combinaison de l'adsorption sur des hydroxydes de fer et l'usage de résines anioniques (Gruau et al., 2005). Ces différentes procédures visent à éliminer la matière organique, les chlorures et les cations (**Figure 4**).

Les conditions requises

Les étapes d'extraction-re-concentration et de purification doivent satisfaire aux conditions suivantes :

(1) il est primordial d'obtenir au final du phosphate d'argent avec un degré de pureté élevé. La présence d'impuretés, tel que matières organiques et / ou nitrates, qui contiennent de l'oxygène et possèdent en conséquence leur propre signature isotopique, peut altérer la détermination isotopique des phosphates. Il faut aussi éliminer les ions chlorures en solution susceptibles de précipiter sous forme de chlorure d'argent (AgCl) en compétition avec la formation des phosphates d'argent ;

(2) les différentes étapes d'extraction et de purification ne doivent pas produire de fractionnement isotopique. Ce risque existe si les réactions de précipitation ne sont pas complètes et / ou si d'autres espèces de phosphore (P-organique ou P-condensé, c'est-à-dire des composés avec un rapport O/P inférieur à 4) s'hydrolysent par l'action d'acides forts. Pour contrôler cet artefact analytique certains auteurs (McLaughlin et al., 2006 ; Tamburini et al., 2010) recommandent de traiter les échantillons en double, l'un avec du milieu réactif marqué avec de l'eau enrichie à ^{18}O et l'autre avec du réactif non marqué ; cette procédure permet de mettre en évidence une éventuelle hydrolyse ;

(3) finalement, il est nécessaire d'obtenir une quantité de matière suffisante pour l'analyse de spectrométrie de masse isotopique, c'est-à-dire 600-1200µg de phosphate d'argent marqué et non-marqué de manière à pouvoir faire l'analyse au moins en duplicat.

L'analyse isotopique de l'oxygène

Pour l'étude isotopique de leur oxygène, les phosphates sont préalablement convertis en phosphate d'argent : cet analyte a l'avantage d'être un composé solide stable et de faible hygroscopicité (Venneman et al., 2002).

La spectrométrie de masse isotopique est basée sur la pyrolyse de l'analyte. Dans ce cas d'étude, l'oxygène lié au phosphore est converti en monoxyde de carbone (CO). Pour cela, une quantité connue comprise entre 300 et 600µg de Ag_3PO_4 est déposée dans une capsule en argent puis est introduite dans le TC/EA (analyse élémentaire par conversion haute température - pyrolyse) via un passeur automatique, dont le four est maintenu à une température suffisante pour la pyrolyse (1450°C). Les gaz ainsi produits, sont transportés par un flux d'hélium jusqu'à une colonne de chromatographie gazeuse pour séparer le monoxyde de carbone des autres gaz produits. Le monoxyde de carbone est ensuite envoyé au spectromètre de masse où il est ionisé ; les ions sont collectés en fonction de leur rapport masse / charge dans des cuves de Faraday et convertis en valeurs $\delta^{18}O$ (Equation 1) par rapport à une valeur de référence internationale, généralement le VSMOW (eau océanique moyenne normalisée de Vienne). La calibration et la correction de la dérive de l'appareillage sont effectuées par la mesure répétée de standards.

$$\delta^{18}O = \frac{R_{éch} - R_{st}}{R_{st}} \times 1000 \text{ (Équation 1) ou } R_{éch} \text{ est le rapport isotopique (}^{18}O/^{16}O\text{) de l'échantillon and } R_{st} \text{ est le rapport isotopique de référence (VSMOW)}$$

Tableau 2. Synthèse des méthodes d'extraction et de purification des phosphates existantes dans la littérature

	Colman et al., 2005 ; Goldhammer et al., 2011	Gruau et al., 2005	McLaughlin et al., 2006c	McLaughlin et al., 2004	Tamburini et al., 2010	Liang et Blake, 2009	Zohar et al., 2010	Jaisi et Blake, 2010	
1. Matrice	Eaux douces, eau de mer, sédiments	Eaux douces et usées, engrais	Sédiments, sols	Eau de mer	Sols, engrais	Solution artificielle	Sols	Sédiments	
2. Etape d'extraction - re-concentration	MAGIC ^(a) répété	-	Digestion HNO ₃ à 50°C	MAGIC ^(a)	Extraction avec HCl 1 M	-	Extraction séquentielle selon Hedley (1982) modifiée + MAGIC ^(a)	Extraction séquentielle avec procédure SEDEX ^(c) + MAGIC ^(a)	
3. Purification - précipitation	Elimination de la matière organique	Résine anionique	Charbon actif	-	-	Résine anionique	Précipitation des acides humiques et/ou résine DAX ^(d) + H ₂ O ₂ après précipitation du Ag ₃ PO ₄	Précipitation APM et MAP	
	Elimination des chlorures	MAGIC ^(a) répété lors de l'extraction	Adsorption sur hydroxydes de fer ferreux	Précipitation CePO ₄	Précipitation CePO ₄	résine DAX ^(d) + Précipitations APM et MAP ^(b)	Précipitation du CePO ₄		
	Elimination des cations	Résine cationique	+ résine anionique	Résine cationique	Résine cationique	Résine cationique	Résine cationique	Résine cationique	
	Précipitation de Ag₃PO₄	Micro-précipitation	Non spécifiée	Précipitation rapide	Précipitation rapide	Précipitation, micro-précipitation	Précipitation lente	Non spécifiée	Précipitation lente

^(a)MAGIC = Co-précipitation induite avec du magnésium (Karl et Tien, 1992) ; ^(b) APM = phosphomolybdate d'ammonium, MAP = magnésium ammonium phosphate ; ^(c) voir Ruttenberg, 1992 ; ^(d) Résine Supelite DAX-8 (N° CAS 11104-40-8)

Les avantages et inconvénients des différentes méthodes d'extraction et de purification des phosphates

Notre choix initial s'est porté sur les méthodes de McLaughlin et al. (2004), Tamburini et al., (2010) et Colman et al., (2005), les autres protocoles ayant été écartés d'emblée car soit représentant une combinaison des précédentes ou n'ayant pas été testés sur des matrices solides complexes.

Parmi les méthodes citées (**Tableau 2**), nous avons appliqué le protocole de McLaughlin et al. (2004) sur des échantillons d'eau et d'engrais (Guyart, 2010) et mis en évidence les difficultés suivantes :

- (1) la faible reproductivité des analyses ;
- (2) les rendements de récupération du PO_4 initial faibles (< 60%) ;
- (3) la nécessité d'un ajustement très précis et difficile à obtenir du pH à 5,5 pour la précipitation du phosphate de cérium.

Tamburini et al. (2010) montrent par ailleurs que la plupart des échantillons de sol traités par la méthode de McLaughlin pré-citée, présentent une contamination de l'analyte par de la matière organique résiduelle.

La méthode de Colman (2002) basée sur l'utilisation successive de résines échangeuses anionique et cationique pour purifier les phosphates, s'avère, selon son auteur, performante pour de très petites quantités mais coûteuse et difficile à mettre en œuvre. Elle nécessite en effet un équipement dédié (pompe péristaltique, colonnes de résine), une connaissance très précise des temps de transit des divers espèces à travers les résines, et finalement un contrôle rigoureux du pH sans lequel il existe un risque de perte d'une fraction importante des ions phosphates.

Par conséquent, ces deux protocoles d'extraction et de purification des phosphates pour l'analyse isotopique de l'oxygène sont écartés. La méthode mise au point par Tamburini et al. (2010) est choisie, appliquée et testée, sur des matrices solides, type de matrices pour lesquelles cette méthode a été initialement mise au point.

Mode opératoire d'extraction et de purification des phosphates

Principe général

Le protocole de Tamburini et al. (2010) comprend une extraction des phosphates de la matrice solide. Cette extraction ne nécessite pas d'étape de re-concentration (**Tableau 2**). Elle est suivie directement d'une série de précipitations et dissolutions dont objectif est d'éliminer tous les éléments de la solution initiale pouvant affecter l'analyse isotopique. A l'issue de cette procédure, les phosphates sont isolés sous forme de phosphate d'argent, produit final qui permet de procéder à l'analyse isotopique de l'oxygène.

Protocole

Le protocole synthétique est représenté sur la **Figure 4** et le mode opératoire détaillé est disponible sur demande. Nous insistons ci-dessous sur quelques points importants.

Tamburini et al. (2010) réalise l'étape initiale d'extraction avec une solution d'acide chlorhydrique 1M sous agitation pendant 16 h. Il est important de ne pas dépasser cette molarité pour éviter l'hydrolyse massive de

certaines composés phosphorés. A noter que pour des sédiments fortement carbonatés présentant une effervescence lors de l'ajout de l'extractant, nous avons été amenés, pour extraire des quantités de phosphore comparables aux autres échantillons, à doubler le volume d'HCl (1/20 de sol ou sédiment versus HCl 1M). Ceci nous permet d'obtenir un pH comparable (pH # 1) pour tous nos mélanges acide - sédiment.

Chaque échantillon est traité en double en utilisant de l'acide marqué avec de l'eau enrichie à l' ^{18}O (au 97%, Aldrich) et de l'acide non marqué. En effet, l'extraction avec un acide fort peut donner lieu à l'hydrolyse du P-organique ou de P-condensé, d'où le risque d'incorporer des atomes d'oxygène de la solution acide dans les phosphates. Dans ce cas, les ions phosphates de la solution marquée prennent des valeurs isotopiques plus élevées que ceux de la solution non marquée et il est possible de calculer la valeur initiale du $\delta^{18}\text{O}$ avec un simple bilan de masse :

$$\delta^{18}\text{O}_{ech\delta} = x \cdot \delta^{18}\text{O}_{initial} + (1-x)\delta^{18}\text{O}_{eau\delta} \text{ (Équation 2)}$$

$$\delta^{18}\text{O}_{ech} = x \cdot \delta^{18}\text{O}_{initial} + (1-x)\delta^{18}\text{O}_{eau} \text{ (Équation 3)}$$

$\delta^{18}\text{O}_{ech\delta}$ et $\delta^{18}\text{O}_{ech}$ sont les rapports isotopiques mesurés sur l'échantillon marqué et non marqué, $\delta^{18}\text{O}_{eau\delta}$ et $\delta^{18}\text{O}_{eau}$ sont les rapports isotopiques mesurés dans l'eau des solutions HCl marqué et non marqué, $\delta^{18}\text{O}_{initial}$ est le rapport isotopique initial inconnu et x c'est la quantité inconnue d'oxygène qui a été échangé avec l'eau

Cet artéfact analytique doit être évalué pour tout nouveau type de matrices solides.

Après l'extraction, le mélange extractant - matrice est filtré et le filtrat collecté. Une fraction du filtrat est prélevée et analysée selon Afnor NF EN 1189 pour vérifier si la quantité de PO_4 présente est suffisante pour entamer la procédure de purification. Pour être utilisée avec succès, cette méthode nécessite au moins 10-20 μmoles de phosphore dans l'extract.

Le protocole de purification a été mis au point par Tamburini et al. (2010) initialement sur des sols et des échantillons riches en matières organiques tels que des engrais organiques. Par rapport à ce protocole de référence publié, le passage sur une résine DAX s'est avéré inutile, l'élimination des composés organiques se produisant ultérieurement (Tamburini, com. pers.). Les ions phosphates du filtrat sont donc directement précipités en milieu acide sous forme de phosphomolybdate d'ammonium (APM). Ce précipité est dissous et les ions phosphates sont reprécipités en milieu basique sous forme de magnésium ammonium phosphate (MAP ou struvite). Cette double précipitation permet d'éliminer les chlorures (étape MAP) et la matière organique (étapes MAP et AMP).

Pour certains échantillons très riches en carbonate de calcium, lors de la précipitation de l'APM de couleur jaune, un autre solide de couleur blanche (identifié comme étant du molybdate de calcium) peut apparaître et doit être éliminé. Dans ce but (1) l'étape de dissolution - re-précipitation en milieu basique visant à former du MAP est répétée c'est la variante A) ou (2) une filtration supplémentaire (0,2 μm) avec élimination du résidu solide est réalisée, c'est la variante B.

Les cristaux de struvite résultant de la précipitation sont dissous et la solution obtenue est mélangée avec de la résine cationique afin d'éliminer les ions magnésium. Enfin, les ions phosphates purifiés sont précipités sous forme de phosphate d'argent en ajoutant du nitrate d'argent en solution de nitrate ammonium. Le précipité obtenu est ensuite filtré. Lors de cette étape, il est important de bien rincer avec de l'eau ultrapure pour éliminer tout le nitrate.

La procédure d'extraction - purification présentée ci-dessus a été testée à la fois sur des solutions synthétiques et sur des extraits de sédiments et de sols prélevés dans la région lémanique.

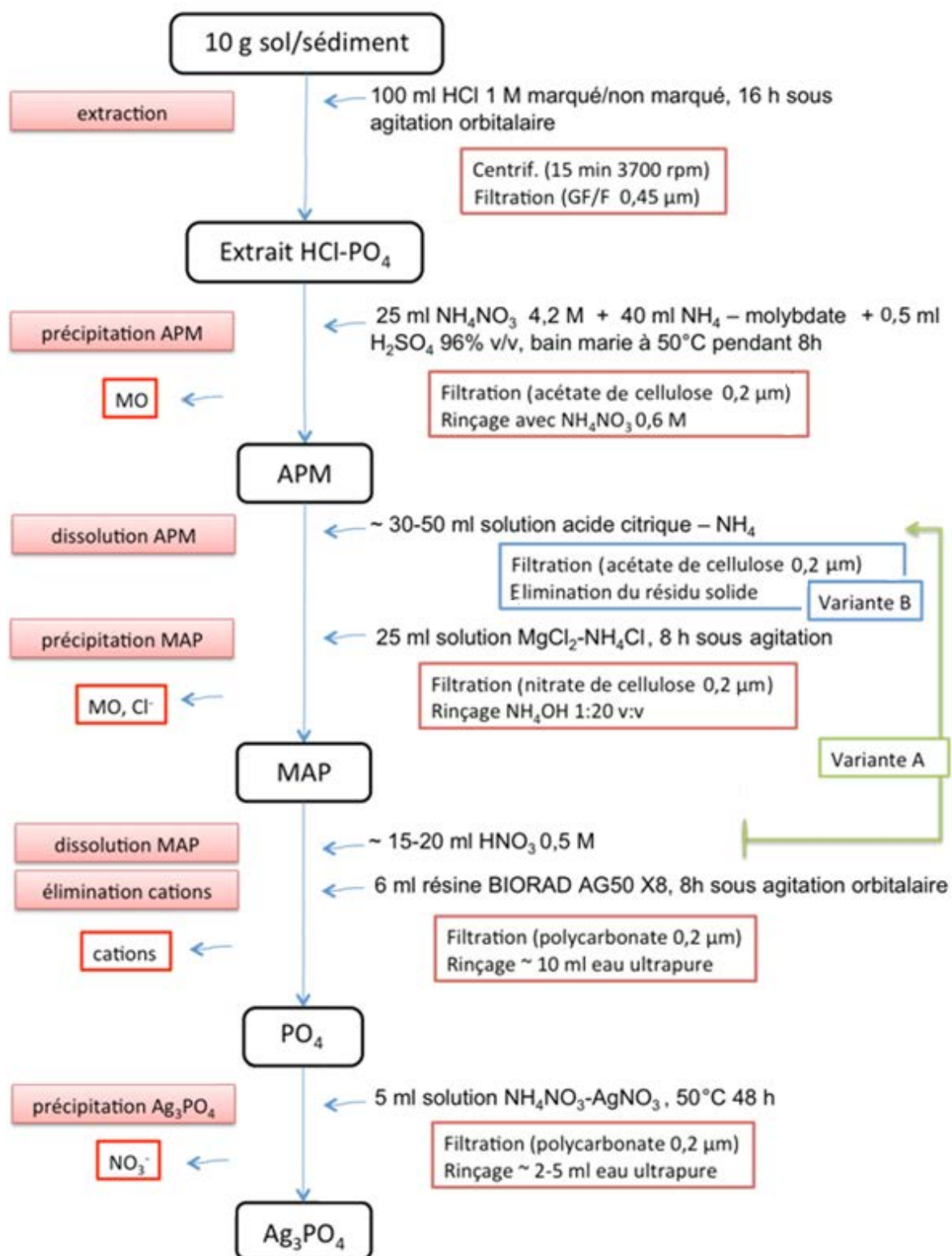


Figure 4. Schéma du protocole d'extraction et de purification des phosphates pour l'analyse isotopique de l'oxygène (Tamburini et al., 2010, modifié) ; APM = phosphomolybdate d'ammonium, MAP = magnésium ammonium phosphate, MO = matière organique.

Evaluation expérimentale du protocole

Campagne de prélèvement - Site d'étude

Les échantillons utilisés pour les tests méthodologiques proviennent de deux bassins versants pilotes adjacents de la région lémanique, le Foron et le Redon, déjà largement décrits antérieurement en terme de transfert, de bilan et de spéciation du phosphore (Feuillade and Dorioz, 1992 ; Dorioz et al., 1998). Il s'agit d'échantillons de sédiments de marais et de rivières et de sols. Les prélèvements en rivière sont réalisés en étiage (mars et septembre, 2012). Les sols et sédiments proviennent pour l'essentiel de l'altération et de l'érosion de matériaux morainiques (dépôts würmiens de roches sédimentaires et cristallines, glacier du Rhône). A ces échantillons s'ajoutent deux sédiments provenant d'une carotte du lac Léman (référence : LEM 10P601A) fourni par le laboratoire EDYTEM (CNRS - Université de Savoie).

Prétraitement de la matrice solide

Après séchage à l'air, les échantillons sont tamisés à 0,2 mm. Les extractions à HCl 1M sont réalisées sur la fraction < 0,2 mm car celle-ci contient à la fois l'essentiel du phosphore présent dans la phase solide des sédiments et sols et constitue la fraction la plus biogéochimiquement active (Poulenard et al., 2008).

Quantification du phosphore extrait dans les matrices solides

Le **Tableau 3** compile les concentrations en PO₄ et phosphore total (P_{tot}) dans les extraits à l'acide issus des différents sédiments et sols étudiés. Les dosages sont effectués après filtration à 0,45µm, selon les procédures Afnor NF EN 1189. L'erreur sur le dosage du PO₄ et du P_{tot} est respectivement de 6% et 7%.

Tableau 3. Concentration en phosphates (PO₄) et phosphore total (P_{tot}) des extraits acides filtrés à 0,45µm ; * sédiments dont le rapport extractant-matrice a été doublé ; nombre de réplicat de 2 à 7 ; STEP : station d'épuration des eaux usées

Code échantillon	Origine des échantillons	Date de prélèvement	PO ₄ mg P.L ⁻¹	P _{tot} mg P.L ⁻¹
Sédiments				
1	Redon amont *	26/03/2012	35,89	40,06
2	Redon amont STEP	06/09/2012	57,95	59,33
3	Redon aval STEP (1)	26/03/2012	63,18	68,20
4	Redon aval STEP (2)	06/09/2012	75,03	77,62
5	Redon, Exutoire *	03/09/2012	41,26	41,90
6	Foron, Exutoire	26/03/2012	50,13	50,18
7	Marais, entrée Est	03/09/2012	46,02	46,84
8	Marais, entrée Ouest	03/09/2012	33,25	34,72
9	Marais, exutoire	03/09/2012	5,54	7,50
10	Carotte sédimentaire, Léman Sédiments récents	nov. 2010	38,97	43,25
11	Carotte sédimentaire, Léman Sédiments anciens	nov. 2010	35,15	34,92
Sols du Redon				
12	Sol cultivé, horizon A, (0-10 cm)	06/09/2012	89,77	95,57
13	Sol cultivé, horizon BC (-100 cm)	06/09/2012	45,77	46,45

Le phosphore extrait à l'acide est constitué en moyenne de plus de 90% de PO_4 , à l'exception de l'extrait provenant de l'échantillon de sédiment de l'exutoire du marais dont le rapport $\text{PO}_4/\text{P}_{\text{tot}}$ est d'environ de 70% ce qui suggère une forte teneur en P-organique (caractéristique reconnue lors de travaux antérieurs). Les concentrations en PO_4 et phosphore total les plus élevées sont détectées dans le sol cultivé, horizon A (0-10 cm), les plus faibles dans les sédiments de l'exutoire du marais. Concernant les sédiments prélevés sur la rivière Redon, il existe globalement une tendance à l'augmentation des concentrations en P extrait de l'amont à l'aval, ce qui correspond bien aux observations faites antérieurement (Dorioz et al., 1998).

Validation des méthodes d'extraction et de purification des phosphates

Une première validation, évoquée précédemment, consiste à tester les possibilités d'artéfacts analytiques dus à l'extraction acide. Pour cela, l'extraction est réalisée en double avec de l'acide non-marqué et marqué à l'eau enrichie en ^{18}O .

- La **procédure de purification** est testée sur :

(1) des solutions synthétiques (K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , Ca_3PO_4) soit en précipitation directe, soit ayant subi l'ensemble de la procédure de purification ; l'objectif est de vérifier le rendement final qui doit être le plus élevé possible et répétable ; un rendement trop faible pourrait en effet indiquer une possibilité de fractionnement des ions phosphates en relation avec une précipitation ou dissolution partielle de ces ions lors d'une ou plusieurs des étapes de purification ;

(2) des extraits de sédiments dopés ou non, présentés par le **Tableau 3** ; ces matrices différant de celles (sols et engrais) étudiées par Tamburini et al. (2010), un test est indispensable pour valider l'application de cette procédure dans notre contexte ; nous nous intéressons à la pureté du produit (qui peut contenir d'autres composés ayant co-précipités avec le phosphate et n'ayant pas été éliminés ultérieurement) et au rendement global de la procédure de purification.

Le dispositif complet mis en place pour valider le protocole d'extraction-purification est présenté schématiquement par la **Figure 5**.

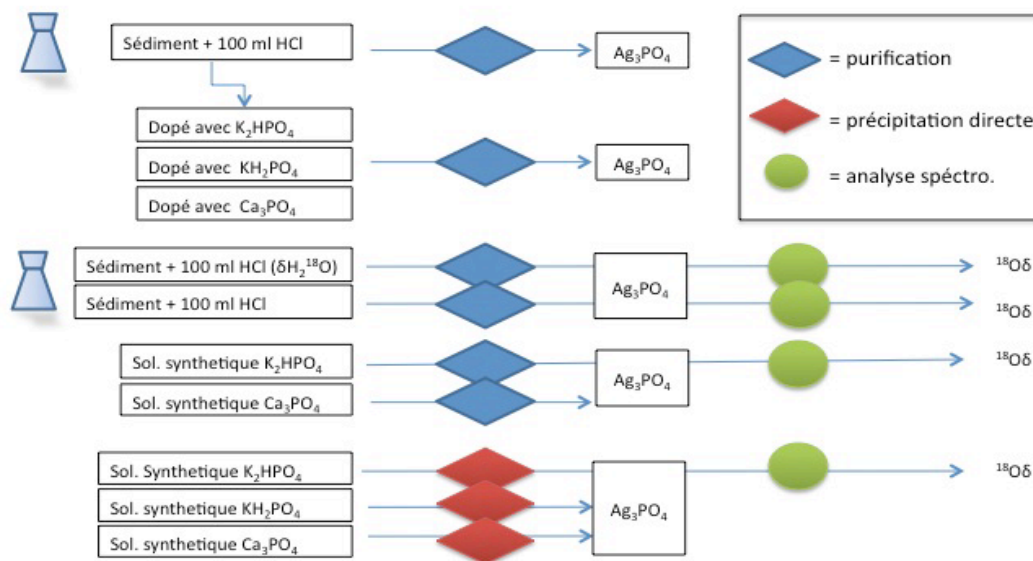


Figure 5. Schéma du protocole de validation de la méthode d'extraction-purification des phosphates.

a) Evaluation de la pureté du phosphate d'argent obtenu à partir de sédiments

La pureté du produit final obtenu à l'issue de la procédure d'extraction-purification est caractérisée sur trois échantillons de sédiments, de la manière suivante :

(1) dosage des ions phosphates après dissolution d'une quantité connue du produit final et comparaison entre cette concentration mesurée et la concentration théorique ;

(2) analyse élémentaire de la teneur en carbone (C) et azote (N) dans le produit final indiquant la présence de matières organiques et de nitrates, principaux composés susceptibles d'apporter des atomes d'oxygène.

Les résultats sont présentés dans le **Tableau 4**.

Tableau 4. Résultats des analyses réalisées pour caractériser la pureté du phosphate d'argent ;
 PO_4 = rapport entre concentration mesurée et théorique ; n = nombre de répliqués pour PO_4 ; C = teneur en carbone (3 répliqués), N = teneur en azote (3 répliqués) ; δ = échantillons extraits à l'HCl enrichi avec $H_2^{18}O$; A = échantillon selon le protocole de la variante A ; B = échantillons traités avec le protocole modifié selon la variante B (cf. Figure 4) ;
 ND : non déterminé.

Code échantillon	PO_4 %	n	C %	N %
<i>Echantillon 6</i>				
6A	96	5	0,99	0,09
6 δ A	98	6	0,84	0,11
6B	ND	-	0,54	0,22
<i>Echantillon 1</i>				

1A	ND	-	1,80	0,08
1δA	97	6	0,75	0,19
1B	ND	-	0,42	0,12
1δB	93	7	0,51	0,11
<i>Echantillon 3</i>				
3A	98	7	0,32	0,00
3δA	ND	1	0,71	0,09
3δB	96	6	0,62	0,08
Médiane	97		0,66	0,10

La valeur médiane de pureté du phosphate d'argent obtenue à l'issue des essais sur sédiments et sols, est égale à 97%, valeur à comparer aux 79% obtenu avec la méthode de McLaughlin (2004) dans les travaux de Guyard (2010) sur des échantillons de sédiments et engrais. La teneur en carbone est généralement inférieure à 1% et celle de l'azote à 0,1%. Ces valeurs sont comparables à celles obtenues par Tamburini dans des échantillons de sols et de plantes (com. pers.) et nettement inférieures à celles observées dans les produits obtenus en utilisant la méthode McLaughlin qui contiennent en moyenne 7% de C et 23-29% de N (Tamburini et al., 2010 ; Angert et al., 2011). Notre taux médian d'azote est inférieur à la valeur de 0,2% trouvée par Angert et al. (2011). Au total, nous obtenons donc de relativement bonnes performances en terme de pureté. En supposant un rapport oxygène / carbone de 1/2 dans la matière organique des sédiments, le rapport entre l'oxygène des ions phosphates et celui des composés organiques est supérieur à 44:1. Le même calcul montre un rapport de 188:1 avec l'oxygène des nitrates. On peut donc négliger la perturbation à l'analyse isotopique apportée par ses résidus.

Afin de vérifier que la totalité des ions chlorures a été éliminée, le surnageant issu de l'étape de précipitation du MAP ainsi que la solution finale, avant l'ajout du réactif combiné à base de nitrate d'argent et d'ammonium en milieu ammoniacal sont analysés en chromatographie ionique. Les résultats montrent la suppression quasi-total des chlorures avec un résiduel en masse de 0,1%.

b) Bilan de la purification et quantification des pertes en phosphates

Les ions phosphates (PO_4) sont les espèces dont la précipitation sous forme de phosphate d'argent est recherchée. En conséquence les opérations de purification sont testées en terme de pertes de PO_4 . Celles-ci sont évaluées sur des sous-échantillons de nos échantillons de référence, certains de ceux-ci étant dopés, et sur des solutions synthétiques (**Figure 5**) à partir des déterminations suivantes :

- (1) le dosage du PO_4 dans l'extrait initial à l'acide ;
- (2) le dosage du PO_4 dans le surnageant obtenu après chaque précipitation y compris la précipitation du phosphate d'argent ;
- (3) le dosage du PO_4 dans l'ensemble des solutions obtenues après la dissolution des précipités et à l'issue du passage sur la résine échangeuse d'ions.

Les pertes de matière spécifique à chacune des étapes de précipitation sont calculées de la manière suivante :

$$P_s = M_{sur}/M_{HCl} * 100 \text{ (Equation 4)}$$

P_s est la **perte spécifique** (%) pour une étape de précipitation donnée ; M_{sur} la masse de P (mg) contenu dans le surnageant lors de cette étape ; M_{HCl} est la masse de P (mg) contenu dans l'extrait initial à l'acide (Tableau 3).

En ce qui concerne, le passage sur la résine cationique et les étapes de dissolution, les pertes sont calculées comme suit :

$$P_r = 100 - P_{sp} - [M-PO_4/M_{HCl} * 100] \text{ (Equation 5)}$$

P_r est la perte spécifique (%) pour une étape de dissolution donnée ou pour un passage sur une résine ; P_{sp} est le cumul de pertes spécifiques des étapes précédentes (%) ; $M-PO_4$ est la masse de P (mg) dans la solution échantillon après dissolution ; M_{HCl} la masse de P (mg) extrait initialement.

Enfin, le produit obtenu à l'issue de la purification est pesé après séchage, afin d'évaluer le **rendement final** en tenant compte de la pureté médiane déterminée précédemment :

$$R = M-Ag_3PO_4/M_{HCl} * 100 \text{ (Equation 6)}$$

R (%) est le rendement final ; $M-Ag_3PO_4$ est la masse de P (mg) dans le produit final en tenant compte de la pureté médiane (Tableau 4) ; M_{HCl} est la masse de P extrait initialement.

Le bilan des opérations de purification pour 9 échantillons naturels (non dopés) est présenté par la Figure 6. La moyenne des pertes cumulées totales s'élève à 24%. Les pertes spécifiques de chacune des trois étapes de précipitation ne dépassent pas 2% ce qui limite probablement le risque que ces étapes introduisent un fractionnement. Cependant la valeur des pertes de l'ensemble des opérations de purification est nettement supérieure au cumul de ces pertes spécifiques. La différence soit 14,9% peut être attribuée aux manipulations physiques-mécaniques de l'échantillon (ex. récupération et re-dissolution des précipités sur les filtres). Ce type de manipulation n'occasionne *a priori* pas de fractionnement isotopique.

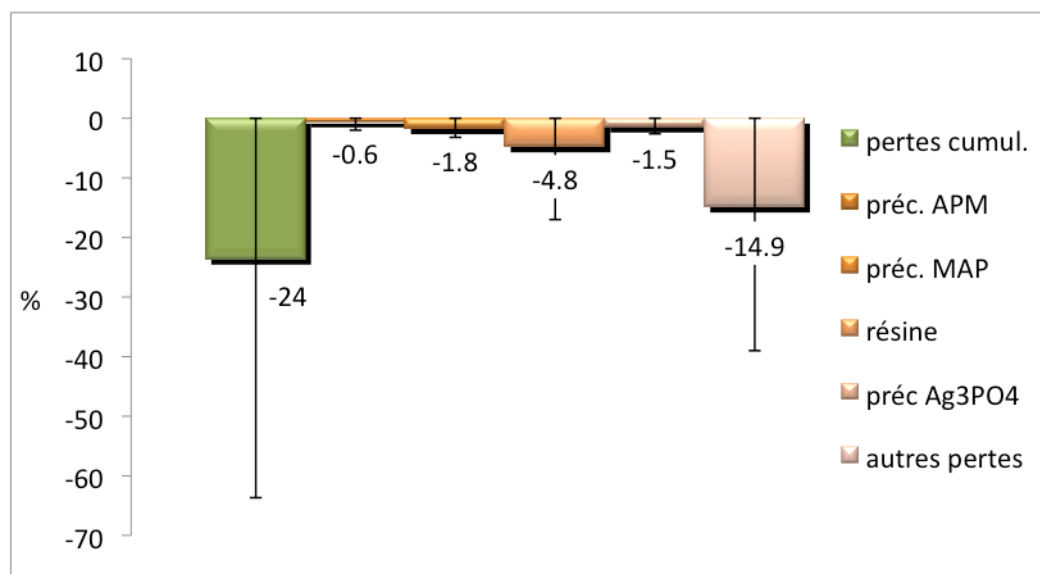


Figure 6. Pertes moyennes totales et pertes moyennes spécifiques de chaque étape de la procédure, au cours de la purification ; mesurées sur neuf échantillons (1, 1δ, 1A, 1B, 3, 3δ, 6, 6δ, 7).

Les rendements finaux ont été réalisés pour 50 échantillons incluant des solutions synthétiques, sédiments et sols dopés et non dopés (Figure 5). En bref, les rendements sont en général relativement élevés (médiane autour de 80%, écart type 17%) et surtout se différencient peu selon la nature des échantillons traités. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par Tamburini (*com. pers.*) sur des échantillons de sol extraits et purifiés par la même méthode.

A noter également que la variabilité est faible entre triplicats des échantillons des divers sédiments (+/- 5%) et que les variantes A et B n'introduisent pas de différence notable de rendement. Enfin, certains tests sur sédiments donnent des rendements très largement supérieurs 100% ce qui s'explique probablement par la précipitation d'autres composés que le phosphate d'argent (matières organiques, AgCl ou Ag métallique) ; ils ont été répétés.

c. Evaluation du fractionnement lors de l'extraction et la purification des phosphates

Les résultats d'analyses isotopiques du $\delta^{18}O_p$ sont regroupés dans le Tableau 5. On peut relever les faits suivants :

(1) les réplicats donnent des résultats groupés avec une variabilité du même ordre de grandeur que l'erreur de mesure de l'analyse de ratio isotopique par spectrométrie de masse IR-MS ($\Delta\delta = 0,40$) ;

(2) quel que soit l'échantillon, les différences de rendement ne se traduisent pas par des résultats significativement différents sur le plan isotopique ;

(3) sauf une exception sur laquelle nous reviendrons, il n'existe pas de différence significative en termes de signature isotopique entre un échantillon extrait à l'acide marqué et non marqué. Ceci confirme que l'extraction à l'acide n'introduit pas, dans notre gamme d'échantillons, de fractionnement dû à l'hydrolyse de molécules complexes contenant du phosphore ;

(4) les résultats obtenus à partir d'une solution synthétique (K_2HPO_4) subissant toute la procédure de purification sont similaires à ceux obtenus à partir de précipitations directes : l'étape de purification ne modifie donc pas significativement la signature isotopique du $\delta^{18}O_p$;

(5) la variante B (Figure 4) donne parfois des résultats significativement différents de la variante A. C'est le cas pour l'échantillon 1 : les 4 valeurs de $\delta^{18}O_p$ obtenue avec la variante A du protocole sont, bien que proches, significativement différentes des 2 valeurs obtenues avec la variante B. Il existe par ailleurs un écart important entre les 2 échantillons marqués et non marqués traités selon cette variante B. Ceci ne s'observe que sur ce sédiment. Les caractéristiques spécifiques de l'échantillon qui pourraient expliquer ce résultat sont inconnues. Considérant en outre que la perte spécifique de l'étape de filtration supplémentaire de la variante B sur cet échantillon est particulièrement élevé (5-8% de la quantité initiale), il nous a semblé préférable de ne pas retenir cette variante pour les protocoles à venir.

Tableau 5. Résultats des analyses isotopiques du $\delta^{18}\text{O}_p$ du phosphate d'argent produit par la procédure d'extraction et purification des phosphates retenue à partir de sédiments soumis à divers traitements et à partir de solutions synthétiques

Codes échantillon	Particularités de la procédure	Rendements %	$\delta^{18}\text{O}_p$ ‰ (VSMOW)	σ	n
K_2HPO_4	soumis à la procédure de purification	86	23,99	0,41	2
K_2HPO_4	précipitation directe	91	24,50	-	1
Echantillon 1	variante A, essai 1	75	15,05	0,17	3
	variante A, essai 1, marqué (δ)	72	15,28	0,49	3
	variante A, essai 2	57	16,37	0,28	2
	variante A essai 2 marqué (δ)	71	15,48	0,48	3
	variante B	89	12,51	0,19	3
	variante B marqué (δ)	67	14,41	0,52	3
Echantillon 3	variante A	85	15,03	0,11	3
	variante A marqué (δ)	86	15,53	0,12	3
	variante B marqué (δ)	91	15,20	0,02	3
Echantillon 6	variante A	80	12,90	0,02	2
	variante A marqué (δ)	72	12,72	0,55	2
	variante B	66	12,90	0,14	3

δ = échantillon marqué extrait à l'HCl enrichi avec H_2^{18}O ; n = nombre de répliqués ; R rendement en % selon équation 6.

Discussion

La méthode d'extraction et de purification des phosphates modifiée de Tamburini et al. (2010) donne de bons résultats avec nos matériaux, principalement sédimentaires. Les rendements finaux sont relativement élevés avec un bon niveau de pureté du phosphate d'argent ; aucun fractionnement significatif du aux procédures d'extraction purification n'a été observé dans la plupart des tests. Les résultats sont par ailleurs reproductibles.

Malgré l'application de la méthode originelle à une matrice d'échantillon relativement différente, des sédiments carbonatés et un sol calcique, très peu de modifications ont du être apportées à celle-ci. Nous préconisons (1) un tamisage de la matrice solide à 0,2 mm au lieu de 2 mm dans la procédure de référence (2) lors de l'étape d'extraction, l'emploi de 5-10 g de matière, sédiment ou de sol, contre 20-25 g selon le protocole de base (3) de simplifier la procédure de purification en supprimant l'étape initiale d'un traitement avec la résine DAX.

Dans la fraction granulométrique inférieure à 0,2 mm, la quantité phosphore extrait à l'acide est en moyenne quatre fois plus élevée que celle obtenue sur la fraction < 2 mm. On s'intéresse ainsi à la fraction réputée la plus active du phosphore particulaire (Dorioz et al., 1998 ; Poulenard et al., 2008). Pour les sédiments contenant une forte teneur en carbonate de calcium l'extraction nécessite d'employer plus d'acide pour extraire le phosphore

dans des conditions équivalentes de pH. Ce type de sédiments requiert en outre, à l'issue de la dissolution du MAP, de répéter l'étape de précipitation du MAP.

D'autres mises au point méthodologiques sont à prévoir en relation avec les perspectives de développement de ces traçages isotopiques du phosphore. L'extraction à l'acide chlorhydrique mise en œuvre dans cette étude ne permet de libérer qu'une fraction du phosphore total des sédiments (ou des sols) mais cette fraction comprend à la fois des formes labiles (susceptibles d'avoir été mobilisées par des processus biologiques) et des formes peu réactives (à l'inverse probablement peu transformées). L'analyse isotopique du $\delta^{18}\text{O}_p$ par fractions granulométriques, en prenant en compte en particulier la fraction colloïdale, ou sur des extraits représentatifs d'autres formes du phosphore (P faiblement adsorbé, P adsorbé sur les oxydes de fer et d'aluminium, etc.) a été très peu explorée mais le mériterait (Zohar et al., 2010). Ce type de procédure présente des difficultés techniques (extraction d'une quantité suffisante de phosphore, échange d'atomes d'oxygène entre les phosphates et l'extractant, interférences dues à la matière organique, etc.). La levée de ces obstacles pourrait se révéler utile dans la perspective de mieux caractériser la fraction du P impliquée dans les transferts entre écosystèmes, les processus écologiques et biogéochimiques. Il existe d'autres enjeux techniques. En ce qui concerne les sols, les matériaux riches en matières organiques acido-solubles pourraient poser des problèmes spécifiques. Il en est de même dans les écosystèmes aquatiques pour la purification des échantillons de matrice liquide à faible teneur en phosphore, la principale difficulté prévisible étant, à partir de gros volumes d'eau, d'isoler une masse suffisante de phosphates (un lac oligotrophe contient moins de $10\mu\text{g P.L}^{-1}$ sous forme PO_4 , la quantité d'eau à traiter serait en conséquence proche de 100 litres).

Conclusions

L'utilisation du $\delta^{18}\text{O}_p$ ouvre probablement des perspectives novatrices et très intéressantes pour l'étude du cycle du phosphore dans les écosystèmes terrestres et aquatiques. Cet outil pourrait contribuer, dans certains cas, à caractériser l'impact de certaines sources de P (notamment les sources diffuses ou la charge interne dans les lacs) ; il pourrait surtout permettre d'aborder des questions concernant la bio-utilisation et le métabolisme du phosphore en milieu aquatique.

Parmi les méthodes d'extraction et de purification des phosphates décrites dans la littérature, le protocole décrit par Tamburini et al. (2010) pour des sols et des engrais a été choisi pour être appliqué à des matériaux sédimentaires et à des sols dont ils proviennent. Notre travail confirme l'intérêt de ce protocole et permet de proposer quelques adaptations :

- (1) ajuster la quantité d'échantillon nécessaire pour obtenir la masse de phosphore nécessaire ($10\text{-}20\mu\text{moles}$ de P) pour développer le protocole d'extraction - purification ;
- (2) ajuster le rapport extractant-matrice lors de l'extraction initiale à l'acide, en fonction de la quantité de carbonate de calcium de l'échantillon ; la concentration dans l'extrait doit atteindre au moins $0,13\text{mM}$ de P.L^{-1} (4 mg P.L^{-1}) ; les formes de P extraites dépendant du pH il est impératif d'atteindre le pH attendu ($< 1 \pm 0,5$).
- (3) vérifier l'absence d'hydrolyse de molécules de P-organique et de formes de P-condensé lors de l'extraction à l'acide avec l'utilisation d'acide marqué (avec eau enrichie à ^{18}O) et non marqués ;
- (4) évaluer la pureté du phosphate d'argent final, en particulier à cause des impuretés telle que la matière organique co-précipitée, les chlorures et nitrates.

Remerciements

Les travaux méthodologiques présentés ont été obtenus dans le contexte d'une collaboration entre la plateforme chimie de l'UMR CARRETEL (Thonon-les-Bains INRA - Université de Savoie, France) et l'ISV - Scuola Sant'Anna (Pise, Italie), avec le soutien d'isotopistes appartenant au Plant Nutrition Group-ETH (Zurich, Suisse), à l'Université Paris 6 (M Sebillo) et à l'IGG-CNR (Pise, Italie). Le Département INRA Ecologie des Forêts, prairies et milieux Aquatiques (EFPA) a financé cette mise au point et les recherches associées ; l'Université de Savoie (CISM) les échanges scientifiques internationaux.

Les auteurs de ce travail tiennent à remercier le Laboratoire EDYTEM (J.P. Jenny), qui a fourni la carotte de sédiments du lac Léman, L. Dallai (IGG CNR, Pise, Italie) pour les analyses au IR-MS, A. Fehri (Univ. Paris 6) pour ses conseils avisés en matière d'isotopes, Ph Quetin (INRA UMR CARRETEL), pour son aide précieuse au niveau des prélèvements. Les remerciements vont aussi à J. Ranger pour sa relecture critique attentive de ce document.

Références bibliographiques

AFNOR NF EN 1189 (1997) - qualité de l'eau - Dosage du phosphore - Dosage spectrométrique à l'aide du molybdate d'ammonium.

Angert A, Weiner T, Mazeh S, Tamburini F, Frossard E, Bernasconi SM, Sternberg M (2011) Seasonal variability of soil phosphate stable oxygen isotopes in rainfall manipulation experiments. *Geochim Cosmochim Acta* **75** : 4216-4227.

Ayliffe LK, Veeh HH, Chivas AR (1992) Oxygen isotopes of phosphate and the origin of island apatite deposits. *Earth Planet. Sci Lett.* **108**: 119-129.

Blake RE, Neil RO, Garcia GA (1997) Oxygen isotope systematics of biologically mediated reactions of phosphate: I. Microbial degradation of organophosphorus compounds. *Science* **61** : 4411-4422.

Blake RE, Alt JC, Martini AM (2000) Oxygen isotope ratios of PO₄: An inorganic indicator of enzymatic activity and P metabolism and a new biomarker in the search for life. *PNAS* **98** : 2174-2153.

Blake RE, Neil JRO, Surkov AV (2005) Biogeochemical cycling of phosphorus: insights from oxygen isotope effects of phosphoenzymes. *Amer J Sci* **305** : 596-620.

Chang SC, Jackson ML (1958) Soil phosphorus fractions in some representative soils. *J Soil Science* **9, 1** : 109-119.

Colman AS (2002) The oxygen isotope composition of dissolved inorganic phosphate in the marine phosphorus cycle. In *Geology & Geophysics*, Yale University Press: New Haven, CT; p 230.

Colman AS, Blake RE, Karl DM, Fogel ML, Turekian KK (2005) Marine phosphate oxygen isotopes and organic matter remineralization in the oceans. *PNAS* **102** : 13023-13028.

Dorioz JM, Pelletier JP, Benoit P (1998) Physico-chemical properties and bioavailability of particulate phosphorus of various origin in a watershed of Lake Geneva (France). *Water Res* **32** : 2, 275-286

Elsbury KE, Paytan A, Ostrom NE, Kendall C, Young MB, McLaughlin K, Rollog ME, Watson S (2009) Using oxygen isotopes of phosphate to trace phosphorus sources and cycling in lake Erie using oxygen isotopes of phosphate to trace phosphorus sources and cycling in lake Erie. *Environ Sci Technol* **43** : 3108-3114.

Fardeau JC (1993) Le phosphore assimilable des sols : sa représentation par un modèle fonctionnel à plusieurs compartiments. *Agronomie* **13**, 317-331.

Feuillade M, Dorioz JM (1992) Enzymatic release of phosphate in sediments of various origins. *Water Res* **26** : 1195-1201.

Gachon L(1972) Le fractionnement du phosphore labile en relation avec le type de sols. *Ann Agro* **23** : 429 444.

Goldhammer T, Max T, Brunner B, Einsiedl F, Zabel M (2011) Marine sediment pore-water profiles of phosphate d18O using a refined micro-extraction. *Limnol Oceanogr : Methods* **9** : 110-120.

Gruau G, Michèle L, Riou C, Gallacier E, He O (2005) The oxygen isotope composition of dissolved anthropogenic phosphates : a new tool for eutrophication research ? *Water Res* **39** : 232-238.

Guyard N (2010) Contribution des méthodes isotopiques à la détermination des origines du phosphore apporté au Lac Léman. Master 2 Chimie de l'Environnement et du Développement Durable. Université de Savoie.

Hedley MJ, Stewart JWB, Chauhan BS (1982) Changes in inorganic and organic soil phosphorus fractions induced by laboratory incubation. *Soil Sci Soc Amer J* **46**: 970-976.

Jaisi DP, Blake RE (2010) Tracing sources and cycling of phosphorus in Peru Margin sediments using oxygen isotopes in authigenic and detrital phosphates. *Geochim Cosmochim Acta* **74**: 3199-3212.

Karl DM, Tien G (1992) MAGIC: A sensitive and precise method for measuring dissolved phosphorus in aquatic environments . *Limnol Oceanogr* **37** : 105-116.

Lecuyer C, Grandjean P, Sheppard S (1999) Oxygen isotope exchange between dissolved phosphate and water at temperatures < 135 ° C : Inorganic versus biological fractionations. *Geochim Cosmochim Acta* **63** : 855-862.

Liang Y, Blake RE (2006) Oxygen isotope signature of Pi regeneration from organic compounds by phosphomonoesterases and photo-oxidation. *Geochim Cosmochim Acta* **70** : 3957-3969.

Liang Y, Blake RE (2007) Oxygen isotope fractionation between apatite and aqueous-phase phosphate : 20-45° C. *Geochim Cosmochim Acta* **73** : 3782-3794.

Liang Y, Blake RE (2009) Compound and enzyme-specific phosphodiester hydrolysis mechanisms revealed by $\delta^{18}\text{O}$ of dissolved inorganic phosphate: Implications for marine P cycling. *Chem Geol* **238** : 121-133.

Lloyd R M (2012) Oxygen isotope behavior in the Sulfate-Water System *J Geophys Res* **73**, **18** : 5813-6147.

Longinelli A, Nuti S (1973) Oxygen isotope measurements of phosphate from fish, teeth and bones. *Earth Planet Sci Lett* **19** : 373-376.

Markel D, Kolodny Y, Luz B NA (1994) Phosphorus cycling and phosphorus sources in lake Kinneret : Tracing by oxygen isotopes in phosphate. *Israel J Earth Sci* **43** : 165-178.

McLaughlin K, Cade-menun BJ, Paytan A (2006a) The oxygen isotopic composition of phosphate in Elkhorn Slough , California : A tracer for phosphate sources. *Estuarine Coastal Shelf Sci* **70** : 499-506.

McLaughlin K, Chavez F, Pennington JT, Paytan A (2006b) A time series investigation of the oxygen isotopic composition of dissolved inorganic phosphate in Monterey Bay, California. *Limnol Oceanogr* **51**: 2370-2379.

McLaughlin K, Paytan A, Kendall C, Silva S (2006c) Oxygen isotopes of phosphatic compounds - Application for marine particulate matter, sediments and soils. *Marine Chem* **98** : 148-155.

McLaughlin K, Silva S, Kendall C, Stuart-williams H, Paytan A (2004) A precise method for the analysis of $\delta^{18}\text{O}$ of dissolved inorganic phosphate in seawater. *Limnol. Oceanogr: Methods* **2** : 202-212.

Paytan A, McLaughlin K Tracing the Sources and Biogeochemical Cycling of Phosphorus in Aquatic Systems Using Isotopes of Oxygen in Phosphate. In. M. Baskaran (ed.) Handbook of Environmental Isotope Geochemistry, Advances in Isotope Geochemistry, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2011.

Pfahler V, Durr-Auster T, Tamburini F, Bernasconi SM, Frossard E. (2013) ^{18}O enrichment in phosphorus pools extracted from soybean leaves. *New Phytologist* **197** : 186-193.

Poulenard J, Dorioz JM et Elsass F (2008) Analytical electron-microscopy fractionation of fine and colloidal particulate-phosphorus in riverbed and suspended sediments. *Aquat Geochem* **14**, **3** : 193-210.

Rafter P A., DiFiore, PJ. Sigman, Daniel M. (2013) Coupled nitrate nitrogen and oxygen isotopes and organic matter remineralization in the Southern and Pacific Oceans *J Geophys Res Oceans* **118** : 4781-4794.

Ruttenberg C (1992) Development of a sequential extraction method for different forms of phosphorus in marine sediments. *Limnol and Oceanogr* **37**: 1460-1482.

Ruttenberg KC, Ogawa NO, Tamburini F, Briggs RA, Colasacco ND, Joyce E. (2009) Improved , high-throughput approach for phosphorus speciation in natural sediments via the SEDEX sequential extraction method. *Limnol and Oceanogr: Methods* **7**: 319-333.

Shemesh A, Kolodny Y, Luz B (1988) Isotope geochemistry of oxygen and carbon in phosphate and carbonate of phosphorite francolite. *Gechim Cosmochim Acta* **52** : 2565-2572.

Tamburini F, Bernasconi SM, Angert A., Weiner T, Frossard E (2010) A method for the analysis of the $\delta^{18}\text{O}$ of inorganic phosphate extracted from soils with HCl. *Eur J Soil Sci* **61**: 1025-1032.

Tamburini F, Pfahler V, Bunemann EK, Guelland K, Bernasconi SM Frossard E (2012) Oxygen isotopes unravel the role of microorganisms in phosphate cycling in soils. *Environ Sci Technol* **46** : 5956–5962.

Venneman TW, Fricke HC, Blake RE, O'Neil JR, Colman A (2002) Oxygen isotope analysis of phosphates: a comparison of techniques for analysis of Ag_3PO_4 . *Chemical Geology* **185** : 321-336.

Williams JDH, Jaquet J-M, Thomas RL (1976) Form of phosphorus in the surficial sediments of lake Eris. *J Fish res Board Can* **33** : 413-429.

Williams JDH, Mayer T, Nriagu JO (1980) Extractability of phosphorus from phosphate minerals common in soils and sediments. *Soil Sci Soc Am Proc* **44** : 462-465.

Weiner T, Mazeh S, Tamburini F, Frossard E, Bernasconi SM, Chiti T, Angert A (2011) A method for analyzing the $\delta^{18}\text{O}$ of resin-extractable soil inorganic phosphate. *Rapid Commun Mass Spectrom* **25** : 624-628.

Young MB, McLaughlin K, Kendall K, Stringfellow W, Rollog M, Elsbury K, Donald E, Paytan A (2009) Characterizing the oxygen isotopic composition of phosphate sources to aquatic ecosystems. *Environ Sci Technol* **43** : 5190-5196.

Zazzo A, Lecuyer C, Mariotti A (2004) Experimentally-controlled carbon and oxygen isotope exchange between bioapatites and water under inorganic and microbially-mediated conditions. *Geochim Cosmochim Acta* **68** : 1-12.

Zohar I, Shaviv A, Young M, Kendall C, Silva S, Paytan A (2010) Geoderma Phosphorus dynamics in soils irrigated with reclaimed waste water or fresh water - A study using oxygen isotopic composition of phosphate. *Geoderma* **159**: 109-121.