

RECHERCHE DES NITRATES DANS LES FOURRAGES ET LES ENSILAGES

I. — MISE AU POINT D'UNE MÉTHODE DE DOSAGE DES NITRATES DANS LES FOURRAGES VERTS ET ENSILÉS

Nathalie BOUSSET-FATIANOFF et Ph. GOUET

avec la collaboration technique de Christiane BÈS et Nadine MOUHOUS

*Laboratoire de Microbiologie,
Centre de Recherches de Clermont-Ferrand, I. N. R. A.,
63 - Saint-Genès-Champagnelle*

RÉSUMÉ

Nous nous sommes proposés dans cette étude, de rechercher une méthode spécifique et quantitative de dosage des nitrates dans les fourrages verts ou ensilés. Le principe de la méthode retenue consiste en une solubilisation des nitrates suivie d'une purification des extraits puis de la réduction des nitrates en nitrites par le cadmium. Les nitrites sont déterminés par colorimétrie. Au cours d'essais préliminaires, nous avons pu constater que les déféquants utilisés par GRAU et MIRNA, (1957), de BORGER et JENNEN, (1968), SCHALL et HATCHER, (1968), pour la purification des extraits de fourrages, conduisent à des résultats erronés et qu'une purification par échange d'ions est nécessaire. Par ailleurs, nous avons précisé l'influence de la concentration en ammoniaque et du pH sur la réduction par le cadmium de solutions pures de nitrates de concentrations variables.

La méthode mise au point est décrite et les résultats du dosage des nitrates dans des solutions pures et dans des fourrages frais ou ensilés (sur échantillons frais ou secs lyophilisés), sont rapportés. Ces résultats montrent que la méthode proposée permet de doser les nitrates avec une précision au moins égale à ± 4 p. 100, erreurs d'échantillonnage comprises, lorsque la teneur en $N-NO_3$ dans la matière sèche du fourrage est égale ou supérieure à 5 p.p.m.

La trop faible teneur en nitrites des fourrages frais et des ensilages en fin de conservation est incompatible avec la sensibilité de la méthode utilisée.

INTRODUCTION

Le dosage des nitrates, dont nous discuterons par ailleurs l'intérêt dans le cas des fourrages verts et ensilés (BOUSSET-FATIANOFF *et al.*, 1971), fait appel à une large gamme de techniques chimiques et physico-chimiques. Pour ne citer que celles appli-

quées à des produits végétaux, on trouve successivement : la colorimétrie directe des nitrates (BAKER, 1967 ; JOHNSON et ULRICH, 1950 ; JONES et UNDERDOWN, 1952 ; MORRIS et GONZALÈS MAS, 1958 ; WISEMAN et JACOBSON, 1965), la colorimétrie après réduction en nitrites (de BORGER et JENNEN, 1968 ; LOWE et HAMILTON, 1967 ; WOOLEY, HICKS et HAGEMAN, 1960), la réduction en ammoniac et le dosage de ce dernier (BARKER et VOLK, 1964), la dilution isotopique après réduction en oxyde nitrique (NOMMIK, 1957) et la polarographie (SOUCHAY, 1967 ; WILLETT, PETERSON et MOURY, 1968). Les avantages et les inconvénients de ces méthodes sont abondamment discutés par les auteurs cités. Dans tous les cas, la précision et parfois la spécificité de la méthode sont principalement limitées par la présence de matière organique dans l'échantillon à analyser. Les divers procédés de purification décrits, en particulier pour les méthodes colorimétriques, sont pour la plupart insuffisants ou longs et complexes. Néanmoins, dans le cas des fourrages, souvent pauvres en nitrates, deux méthodes colorimétriques semblent plus satisfaisantes : l'une utilise la formation de dérivés nitrés colorés avec le xylénol (HÉDIN et DUVAL, 1963 ; JONES et UNDERDOWN, 1953), l'autre fait appel à une réduction par le cadmium des nitrates en nitrites lesquels sont dosés par colorimétrie (de BORGER et JENNEN, 1968). Cette dernière nous a paru plus intéressante car moins sensible à la présence de matière organique et dosant simultanément les nitrates et les nitrites.

Mise au point par GRAU et MIRNA, (1957) pour l'analyse de la viande, cette méthode a été utilisée et notablement modifiée par plusieurs auteurs qui l'ont appliquée à des produits alimentaires (FOLLET et RATCLIFF, 1963 ; KEN KAMM, Mc KEOOWN et SMITH, 1965 ; MANNING, COULTER et JENNES, 1968), des fourrages (de BORGER et JENNEN, 1968 ; SCHALL et HATCHER, 1968), de l'eau de mer (GRASSHOFF, 1964). Elle consiste en une solubilisation des nitrates et défécation de l'extrait, puis réduction des nitrates en nitrites par le cadmium en milieu ammoniacal. Les nitrites sont dosés par colorimétrie. Les modifications apportées par les différents auteurs portent sur les trois phases du dosage, mais restent souvent inexplicables, principalement en ce qui concerne les conditions de réduction des nitrates en nitrites. Ainsi, la concentration en ammoniacale et le pH du milieu de réduction varient respectivement de 0,09 à 0,39 N et de 8 à 10,4. Ces deux facteurs ainsi que le pouvoir tampon de la solution interviennent dans le maintien du potentiel d'oxydo-réduction (de BORGER et JENNEN 1968 ; GRASSHOFF, 1964). Or, seul l'effet du pH a été étudié et seulement par FOLLET et RATCLIFF, (1963), qui précisent que la réaction n'est quantitative que dans la zone très étroite comprise entre pH 9,5 et 9,7.

Nous nous sommes proposés dans cette étude, de rechercher une méthode spécifique et quantitative de dosage des nitrates dans des fourrages verts et ensilés. Au cours d'essais préliminaires, nous avons pu constater que les déféquants généralement utilisés (de BORGER et JENNEN, 1968 ; GRAU et MIRNA, 1957 ; SCHALL et HATCHER, 1968) aboutissaient à des résultats erronés et qu'une purification par échange d'ions était nécessaire. Par ailleurs, nous avons précisé à partir de solutions pures et pour des colonnes de dimensions données, l'influence de la concentration en ammoniacale et du pH sur la réduction de solutions de nitrates de concentrations variables.

Cette première partie décrit la méthode mise au point et une seconde partie exposera l'origine de la réduction des nitrates dans les ensilages et l'intensité de cette réduction en fonction du traitement technologique subi (BOUSSET-FATIANOFF *et al.*, 1971).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. — Échantillons de fourrages

Les analyses sont effectuées sur des échantillons frais (conservés à -20°C) ou lyophilisés de Luzerne et de Ray-Grass prélevés avant et après ensilage. Lors de la mise en silo, un échantillonnage est effectué sur le fourrage fraîchement récolté et après un préfanage qui élève son taux de matière sèche (MS) à 42-43 p. 100. Pour les ensilages, les échantillons sont représentatifs soit d'une partie, soit de l'ensemble de la masse ensilée. Les premiers sont constitués à la main au cours d'un désilage (entre 5 et 7 mois de conservation) ; les seconds sont prélevés à la sonde (après 5 mois de conservation). La nomenclature utilisée dans les tableaux 3, 4, 5, comporte la nature du traitement de conservation suivie du numéro du silo. Les traitements sont les suivants : élévation du taux de matière sèche par préfanage, acidification minérale par une solution AIV ou par l'acide sulfurique dilué, addition d'un mélange de nitrite de sodium et de formiate de calcium (kofa) ou de ce mélange avec du chlorure de sodium (kofa + NaCl). Les données relatives à la préparation des ensilages : matériel utilisé, doses de conservateurs ajoutés, nombre de répétitions par traitement sont exposés dans la seconde partie du présent mémoire (BOUSSET-FATIANOFF *et al.*, 1971).

2. — Mode opératoire

a) Solubilisation des nitrates

Par macération au 1/10 pour les fourrages frais et finement hachés et au 1/50 pour les fourrages secs et broyés, dans HCl 0,05 N pendant une nuit à $0-4^{\circ}\text{C}$ et filtration sur filtre plissé.

b) Purification des extraits

Traitement de la résine et préparation des colonnes.

Laver l'amberlite IR 4 B du commerce 4 fois consécutives avec H_2O , HCl N, NaOH 0,5 N. Terminer le lavage par HCl N suivi de HCl 0,05 N.

— Colonnes : diamètre intérieur 1,2 cm ; hauteur : 10 cm, munies de siphons, d'un tampon de laine de verre dans le fond et de réservoirs de 300 ml.

Remplir les colonnes avec la résine sous forme Cl^- dans HCl 0,05 N, sur une hauteur de 6 cm. Passer successivement : 50 ml HCl 0,05 N (5 ml/mn) ; 50 ml NH_4OH N (1-1,5 ml/mn) ; 50 ml H_2O (5 ml/mn) ; 50 ml HCl N (1-1,5 ml/mn) ; 50 ml HCl 0,05 N (5 ml/mn).

Recommencer cette opération 3 fois. Après chaque passage de HCl N la résine gonfle, se tasse, et le débit diminue ; pour éviter cet inconvénient, remettre la résine en suspension sur toute la hauteur de la colonne en agitant doucement avec une tige en Teflon. Les colonnes, prêtes à l'emploi, sont conservées sous HCl 0,05 N.

Traitement des extraits.

Passer sur les colonnes un volume d'extrait contenant entre 15 et 3 500 μg de N-NO_3 (selon les fourrages, nous avons utilisé 20 à 200 ml) à un débit de 1 à 1,5 ml/mn.

Rincer avec 300 ml de HCl 0,05 N, le débit précédent étant maintenu pendant 10 mn, puis augmenté à 5 ml/mn ; jeter l'effluent.

Éluer les nitrates dans une fiole de 100 ml, par 50 ml de NH_4OH N (1 ml/mn) suivis de 50 ml H_2O (5 ml/mn).

Éventuellement, compléter à 100 ml avec H_2O .

Pour régénérer la colonne, éluer les pigments qui restent sur la résine par 100 ml de HCl N (1-2 ml/mn). Éliminer l'excès d'acide par 50 ml HCl 0,05 N (5 ml/mn).

c) Réduction des nitrates.

Traitement du cadmium et préparation des colonnes de réduction.

Laver le cadmium commercial (Merck en grains grossiers) avec H_2O , HCl 0,1 N, H_2O . Agiter environ 50 ml de cadmium avec 100 ml de solution HgCl_2 à 1 p. 100, puis laver avec H_2O , HCl 0,1 N, H_2O .

Les colonnes sont identiques à celles utilisées précédemment, mais munies de réservoirs de 35 ml et de siphons limitant le débit à 3-5 ml/mn ; elles sont remplies sous eau sur une hauteur de 9 cm.

Avant et après chaque usage, passer 2×20 ml H_2O ; 20 ml HCl 0,1 N ; 2×20 ml H_2O ; 20 ml solution ammoniacale (0,3 N en NH_4OH et 0,2 N en HCl). Conserver sous cette solution.

Réduction.

Placer sous le siphon une fiole de 50 ml. Introduire dans le réservoir 20 ml d'éluat ammoniacal contenant les nitrates (environ 0,5 N en NH_4OH et 0,2 N en HCl). Lorsque le réservoir est vide rincer 5 fois avec environ 4 ml de solution ammoniacale 0,3 N ; compléter à 50 ml avec H_2O .

d) *Colorimétrie.*

Dans une fiole de 55 ml, introduire un volume de solution réduite inférieur ou égal à 20 ml et contenant 1 à 7 μg de N- NO_2 ; compléter à 50 ml avec de l'eau. Ajouter 2 ml de solution de sulfanilamide à 1 p. 100 dans HCl à 50 p. 100 ; agiter. Après 3 mn, ajouter 1 ml de solution de N-(1 naphthyl)-éthylènediamine HCl à 0,1 p. 100 dans H_2O : agiter. Après 30 mn, lire au spectrophotomètre à 540 nm.

Pour chaque dilution, lire par rapport à un blanc passé sur colonne de réduction mais non sur résine. Calculer les résultats par rapport à un standard inclus dans chaque série de réduction mais non passé sur résine.

Préparer la solution standard tous les deux jours à partir d'une solution mère de NO_3K dans H_2O :

1 ml de solution mère de NO_3K dans H_2O contenant 110 μg N- NO_3/ml
 20 ml HCl N
 50 ml NH_4OH N
 H_2O q.s.p. 100 ml

3. — *Essais préliminaires*

Au cours d'essais préliminaires sur solutions pures et extraits de fourrages défectueux selon les méthodes respectives de GRAU et MIRNA, (1957), de BORGER et JENNEN, (1968) et SCHALL et HATCHER, (1968), nous avons effectué la réduction et la colorimétrie dans les conditions décrites ci-dessus ; de plus nous avons fait varier le pH et la concentration en ammoniacque du milieu de réduction.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. — *Essais préliminaires sur la réduction des nitrates en solutions pures*

Nous n'avons observé aucune influence du pH (entre 8,5 et 12,6), de la concentration en ammoniacque (0,08 à 2 N), ni de la quantité de nitrates (5 à 5 000 μg de N- NO_3 par colonne) sur la réduction des nitrates par le cadmium. Les pourcentages de récupération, par rapport à une solution pure de nitrite non passée sur cadmium, varient entre 98 et 101 p. 100 dans tous les cas. Ceci permet de supposer que l'optimum de réduction observé à pH 9,6 par FOLLET et RATCLIFF (1963) serait lié non à la phase de réduction mais plutôt à l'influence du pH sur la réaction colorée ultérieure utilisée par ces auteurs.

Les courbes d'étalonnage des nitrates et des nitrites sont superposées et linéaires entre 1 et 15 μg de N- NO_2 dans les 50 ml utilisés pour la coloration.

Au cours de nos analyses et pour le rinçage final de toute la verrerie, nous avons utilisé de l'eau permutée. Par rapport à l'eau et pour la dilution précisée ci-dessus, la valeur des « blancs » était de 0,005 à 0,010 DO.

2. — *Essais préliminaires sur la réduction des nitrates contenus dans les extraits aqueux de fourrages après défécation*

Les méthodes respectives de GRAU et MIRNA, (1957), SCHALL et HATCHER, (1968), et de BORGER et JENNEN, (1968), ont été reprises et, dans chaque cas, l'extrait défectué

et tamponné était soit plus ou moins dilué, sans modifier la concentration en ammoniacque ni le pH final, soit dilué dans une proportion donnée avec une solution de pH 9,6 et de concentration en ammoniacque allant de 0,06 à 0,6 N.

Les résultats obtenus dans le cas de la défécation par l'alumine (de BORGER et JENNEN, 1968), sont présentés dans le tableau 1 et la figure 1.

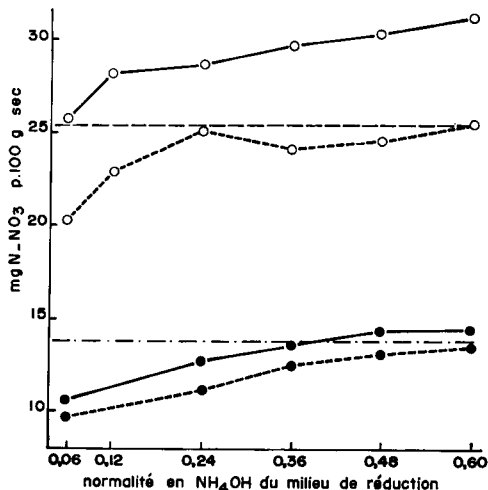


FIG. 1. — Influence de la concentration en NH_4OH des extraits déféqués de luzerne sur la réduction des nitrates et la récupération des surcharges

N- NO_3 dosé dans :

- la luzerne fraîche ●—●
- la surcharge ajoutée à la luzerne fraîche ●- - ●
- la luzerne préfanée ○—○
- la surcharge ajoutée à la luzerne préfanée ○- - ○

Surcharge N- NO_3 ajoutée à :

- la luzerne fraîche —·—
- la luzerne préfanée — —

Le tableau 1 permet d'observer que la quantité de nitrates dosés est d'autant plus élevée que la dilution de l'extrait est importante ; pour une dilution donnée, elle augmente avec la concentration du tampon. La figure 1 confirme ce dernier point et montre que la récupération des surcharges (nitrates ajoutés avant la réduction) est proportionnelle, pour chaque concentration en ammoniacque, à la quantité de nitrates dosés dans le fourrage seul.

Des résultats similaires ont été obtenus dans le cas des deux autres déféquants ; un peu moins accentués avec celui de SCHALL et HATCHER, (1968) ($CdCl_2$, $BaCl_2$ en milieu basique) et un peu plus accentués avec celui de GRAU et MIRNA, (1957) (borax, sulfate de zinc).

3. — Dosage des nitrates dans les extraits de fourrages purifiés par échange d'ions

a) Purification par échange d'ions.

Nous avons recouru à la méthode par échange d'ions de JONES et UNDERDOWN (1953) qui procèdent à la fixation des nitrates en milieu acide (PO_4H_2 , 1 p. 100) sur

l'amberlite IR 4 B forme Cl^- ; après rinçage à l'eau, les nitrates sont élués par de la soude. Des essais sur solutions pures ont montré, contrairement aux résultats de GRASSHOFF, (1964,) qu'en présence de sels de sodium (0,2 N) 75 p. 100 seulement des nitrates sont réduits par le cadmium. De ce fait, nous avons modifié les conditions de fixation et d'éluion des nitrates sur la résine, afin d'obtenir un éluat $\text{NH}_4\text{OH-HCl}$ compatible avec une réduction quantitative. En remplaçant l'acide phosphorique par l'acide chlorhydrique dans la méthode de JONES et UNDERDOWN, (1953), nous avons obtenu des récupérations peu reproductibles (80-100 p. 100) et une abondante formation de bulles dans les colonnes de résine à la fin du rinçage par l'eau. Ces inconvénients sont évités lorsque les nitrates sont fixés sur la résine sous forme Cl^- en solution acide diluée (HCl 0,05 N) ; cette dernière est ensuite utilisée pour le rinçage des colonnes.

TABLEAU I

*Quantités de nitrates dosés (N- NO_3 en mg p. 100 g sec)
en fonction de la dilution de l'extrait à réduire
et de sa concentration en NH_4OH*

	Dilution de l'extrait déféqué tamponné avant réduction	Concentration en NH_4OH de l'extrait à réduire	
		0,06 N	0,24 N
Luzerne fraîche à la mise en silo	—	8,8	12,6
	2	11,8	12,4
	4	12,2	—
	5	13,7	—
Luzerne préfanée à la mise en silo	—	16,6	—
	2	21,7	26,7
	4	25,1	29,6
	5	28,5	—
	10	29,5	—
Ray-Grass préfané à la mise en silo	—	5,7	—
	2	7,4	—
	4	8,3	—
	5	8,6	—

Le volume du rinçage est déterminé en recueillant, pour différents fourrages, tout l'effluent (extrait et lavage) par fractions successives. Après addition d'ammoniaque (concentration finale 0,5 N) une partie aliquote de chaque fraction est passée sur cadmium avec ou sans surcharge de nitrates, puis dosée. Les pourcentages de récupération des surcharges sont reportés dans le tableau 2, où l'on peut voir que la réduction des nitrates en présence d'effluent est quantitative après 200 ml de lavage.

L'éluion de solutions pures de nitrates par différentes quantités d'ammoniaque plus ou moins concentrées (0,5 à 2 N) a permis de définir la quantité minimale en volume et en concentration conduisant à une éluion quantitative.

Les éluats ammoniacaux de plusieurs extraits sont réduits avec et sans dilution, avec et sans surcharge de nitrates. Dans tous les cas, les résultats sont constants et la récupération des surcharges varie entre 99 et 101 p. 100.

TABLEAU 2

Pourcentage de récupération des nitrates
ajoutés à l'effluent des colonnes d'amberlite

Fractions effluentes		Extraits passés sur résine		
N°	Volume recueilli	Mise en silo Ray-Grass (150 ml)	Ensilage Luzerne (50 ml)	Ensilage Luzerne préfanée (50 ml)
1	Vol. correspondant à celui de l'extrait passé	82	85	81
2	100 ml HCL 0,05 N ..	85	93	94
3	100 ml HCL 0,05 N ..	95	102	98
4	100 ml HCL 0,05 N ..	99	102	101

b) Conditions d'utilisation des colonnes de réduction.

Pour la conservation et le rinçage des colonnes de réduction nous avons retenu une solution ammoniacale relativement concentrée car, pour des concentrations plus faibles, le pouvoir réducteur diminue de 5 à 10 p. 100 lorsque les colonnes ne sont pas utilisées pendant 3 à 4 jours consécutifs. GRASSHOFF, (1964), observe également que le rendement des colonnes de cadmium diminue beaucoup plus rapidement lorsqu'elles sont conservées sous eau que sous ammoniacque diluée.

TABLEAU 3

Récupération des surcharges de nitrates ajoutées aux extraits
avant la purification sur amberlite

Échantillon	Teneur en N-NO ₃ du fourrage (mg % g Sec)	Quantité passée sur résine		% de récupération surcharge NO ₃
		Volume d'extrait en ml	Surcharge N-NO ₃	
Ensilages de Ray grass				
Naturel 2* S	0,2	100	55	97,2
SO ₄ H ₂ 2* S	2,2	100	110	99,4
Kofa 0,3 % 1* { F.....	7,4	100	—	97,6
	—	50	—	99,7
Préfané b* { F.....	3,2	50	—	99,1
	—	100	—	98,1
Ensilages de Luzerne				
AIV 3 F.....	6,3	50	110	98,1
Préfané 9 { F.....	18,8	50	110	97,2
	—	50	—	102,0
	—	50	—	97,0

F = Frais ; S = Sec.

* Analyses effectuées sur des échantillons non représentatifs de l'ensemble du silo.

c) *Colorimétrie des nitrites.*

Nous avons essayé de doser les nitrites sur des extraits aqueux déféqués, mais leur trop faible concentration dans les fourrages frais et ensilés en fin de conservation (3 p.p.m. N-NO₂ p 100 g de matière sèche, d'après nos résultats approximatifs) est incompatible avec la sensibilité de la méthode utilisée, fait déjà noté par d'autres auteurs (de BORGER et JENNEN, 1968 ; WISEMAN et JACOBSON, 1965). Au cours du dosage des nitrates décrit ci-dessus, les nitrites sont totalement détruits pendant la macération et le passage des extraits sur résine en milieu acide (HCl 0,05 N). Dans le cas de fourrages susceptibles de contenir des quantités non négligeables de nitrites, tels des ensilages au cours des premiers jours de la conservation (BARNETT 1953), ce dosage devra être effectué sur des extraits aqueux déféqués.

La réaction colorée des nitrites est conditionnée par l'obtention d'un pH voisin de 1 au moment de l'addition de sulfanilamide. Étant donné la concentration assez élevée en ammoniacque de l'effluent des colonnes de réduction (environ 0,5 N), la plus faible dilution de ce dernier, compatible avec l'emploi de 2 ml de sulfanilamide dans HCl 50 p. 100, est de 20 ml dans 50 ; pour des dilutions plus faibles il faudrait augmenter le volume de sulfanilamide.

d) *Reproductibilité et sensibilité de la méthode proposée pour le dosage des nitrates dans les fourrages.*

TABLEAU 4

Reproductibilité des résultats pour des macérations différentes

Échantillon	mg N-NO ₃ p. 100 g Sec	Moyenne et écart en p. 100
Mise en silo		
Ray-Grass direct { S ...	7,23	7,10 ± 1,8
S ...	6,96	
Ensilages Ray-Grass		
AIV 2 { S	1,81	1,82 ± 0,5
S	1,83	
Kofa 0,3 p. 100 3 { S.	7,43	7,30 ± 2,5
S.	7,45	
S.	7,10	
Ensilages Luzerne		
Kofa 0,7 p. 100 5 { F.	0,73	0,77 ± 3,9
F.	0,80	
Préfané 10 { F	28,44	27,58 ± 3,1
F	26,72	
AIV 3 { F	6,19	6,30 ± 1,7
F	6,40	
Préfané 9 { F	18,56	18,84 ± 3,4
F	19,35	
F	19,46	
F	17,97	

F = Frais ; S = Sec lyophilisé.

TABLEAU 5

Comparaison des résultats de dosage des nitrates (mg N-NO₃ p. 100 g sec)
sur produit frais et sec (lyophilisé)

Ensilages de Ray-Grass	Macération sur produit		Moyenne et écart en p. 100
	Frais	Sec (lyophilisé)	
AIV 3	5,58	5,12	5,35 ± 4,3
SO ₄ H ₂ 1	4,05	3,98	4,02 ± 1,0
Kofa 0,3 p. 100 1	7,40	7,08	7,24 ± 2,2
Kofa 0,7 p. 100 1	9,22	9,59	9,41 ± 1,9
Préfané b	3,18	2,96	3,07 ± 3,6
Préfané a	2,47	2,40	2,44 ± 1,6

Nous avons obtenu pour des solutions pures, un pourcentage de récupération moyen de $99,5 \pm 1,3$ pour 28 analyses où l'on a fixé de 100 à 5 500 μg de N-NO₃ par colonne de résine. La récupération des surcharges ajoutées à des extraits de fourrages est en moyenne de $98,5 \pm 1,5$ (tabl. 3). La reproductibilité des résultats pour un même extrait analysé en double varie de 0 à ± 2 p. 100 (9 extraits analysés). Les écarts constatés entre macérations différentes d'un même fourrage sur le produit frais, sont plus élevés : $\pm 0,5$ à $\pm 3,9$ p. 100 (tabl. 4). Ils s'accroissent peu lorsque l'on compare, pour un même fourrage, les dosages sur matière fraîche et sur matière sèche lyophilisée (tabl. 5). Ceci est dû probablement à l'hétérogénéité des échantillons.

D'après ces résultats, la méthode utilisée permet de doser les nitrates avec une précision au moins égale à ± 4 p. 100, erreurs d'échantillonnage comprises, lorsque la teneur en N-NO₃ dans la matière sèche du fourrage est égale ou supérieure à 5 p.p.m.

L'ensemble du dosage peut être réalisé en 5 à 7 heures selon le volume d'extrait à purifier ; cette opération est la plus longue (3 à 5 h) mais ne nécessite que très peu de surveillance. Nous avons travaillé sur 6 colonnes de chaque type, mais ce nombre peut être doublé ou triplé, en fonction de celui des échantillons à analyser, sans augmenter sensiblement le temps de manipulation.

Reçu pour publication en avril 1971.

SUMMARY

NITRATES IN FRESH AND ENSILED FORAGES

I. — A METHOD FOR NITRATE DETERMINATION IN FRESH AND ENSILED FORAGES

Nitrates contained in clarified forage extracts were reduced into nitrites on cadmium columns. Nitrites were colorimetrically determined. Results of preliminary assays concerning the conditions of nitrate reduction by cadmium are reported. For forage extracts clarification, the precipitation procedures described by GRAU and MIRNA (1957); de BORGER and JENNEN (1968); SCHALL

and HATCHER 1968) were compared by failed to give satisfactory results ; thus anion exchange technique is described. Results of nitrate determination in fresh and ensiled forages on either moist or lyophilised samples are reported. The accuracy of the method proposed is within ± 4 p. 100 inclusive of sampling errors, when the $\text{NO}_3\text{-N}$ content in forage dry matter is at least 5 p.p.m.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BAKER A. S., 1967. Colorimetric determination of nitrate in soil and plant extracts with brucine. *J. Agric. Fd. Chem.*, **15**, 802-806.
- BARKER A. V., VOLK R. J., 1964. Determination of ammonium, amide, amino an nitrate nitrogen in plant extracts by a modified Kjeldahl method. *Analyt. Chem.*, **36**, 439-441.
- BARNETT A. J. G., 1953. The reduction of nitrate in mixtures of minced grass and water. *J. Sci. Fd. Agric.*, **4**, 92-96.
- BOUSSET-FATIANOFF Nathalie, GOUET Ph., BOUSSET J., CONTREPOIS M., 1971. Recherche des Nitrates dans les fourrages et les ensilages. II. Origine du catabolisme des nitrates dans les ensilages et intensité de leur dégradation en fonction du traitement technologique. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Bioph.*, **11**.
- DE BORGER R., JENNER A., 1968. Le dosage des nitrates et des nitrites dans les ensilages. *Rev. Agric.*, **8**, 453-469.
- FOLLET M. J., RATCLIFF P. W., 1963. Determination of nitrite and nitrate in meat products. *J. Sci. Fd. Agric.*, **14**, 138-144.
- GRASSHOFF K., 1964. Zur Bestimmung von nitrat in Meer und Trinkwasser. *Kieler Meeresforschungen*, **20**, 5-11.
- GRAU R., MIRNA A., 1957. Über die Bestimmung von nitrit, nitrat und Kochsals in Fleischwaren und Laken. *Z. anal. Chem.*, **158**, 182-189.
- HÉDIN L., DUVAL E., 1963. Recherches sur la présence des nitrates dans les plantes fourragères et prairiales. *Ann. Phys. vég.*, **5**, 29-49.
- JOHNSON C. M., ULRICH A., 1950. Determination of nitrate in plant material. *Analyt. Chem.*, **22**, 1927-1929.
- JONES G. B., UNDERDOWN R. E., 1953. Determination of nitrate in plant material. *Analyt. Chem.*, **25**, 806-808.
- LEN KAMM, McKEOWN G., SMITH D., 1965. New colorimetric method for the determination of nitrate and nitrite content of baby foods. *J. Ass. Off. Anal. Chem.*, **48**, 892-897.
- LOWE R. H., HAMILTON J. L., 1967. Rapid method for determination of nitrate in plant and soil extracts. *J. Agric. Fd. Chem.*, **15**, 359-361.
- MANNING P. B., COULTIER S. T., JENNER R., 1968. Determination of nitrate and nitrite in milk and dry products. *J. Dairy Sci.*, **51**, 1725-1730.
- MORRIS M. P., GONZALES MAS, 1958. Simple colorimetric method for the determination of nitrates in forage crops. *J. Agric. Fd. Chem.*, **6**, 456-457.
- MOMMIK H., 1957. An isotope dilution method for determination of nitrate in plant material. *Acta Agric. Scand.*, **7**, 389-394.
- SCHALL E. D., HATCHER D. W., 1968. Colorimetric determination of nitrates and nitrites in feeds. *J. Ass. Off. Anal. Chem.*, **51**, 763-765.
- SOUCHAY P., 1967. Polarographic determination of inorganic constituents (natural and derived) in foodstuffs. *Chim. Analyt.*, **49**, 496-511.
- WILLETT D. N., PETERSON H. P., MOURY R. J., 1968. A polarographic method for the determination of nitrate in silage. *J. Ass. Off. Anal. Chem.*, **51**, 658-661.
- WISEMAN H. G., JACOBSON W. C., 1965. Determination of nitrate in silages and forages. *J. Agric. Fd. Chem.*, **13**, 36-40.
- WOOLEY J., HICKS G., HAGEMAN R., 1960. Rapid determination of nitrate and nitrite in plant material. *J. Agric. Fd. Chem.*, **8**, 481-482.