

## PRÁCTICA DE LABORATORIO

### MEDIDA DE VARIABLES INDICADORAS DE LA FERTILIDAD DEL SUELO

La calidad del suelo es uno de los principales condicionantes de la estructura y dinámica de la vegetación a escalas local y regional. El suelo incluye minerales derivados de la roca madre, minerales producto de procesos de meteorización, materia orgánica en distintos estadios de descomposición, aire y agua en los poros, raíces vivas, microorganismos, y fauna detritívora. Todos estos factores son los principales determinantes de la fertilidad para la vegetación, y su importancia relativa depende de las características del clima, roca madre, tipo de vegetación, topografía local y edad del suelo.

De entre los factores anteriores, la humedad o capacidad de retención de agua, y el contenido en materia orgánica y nutrientes (principalmente nitrógeno y fósforo), son los más importantes contribuyentes a la fertilidad del suelo en zonas áridas y semiáridas. En estas zonas, la actividad microbiana encargada de mineralizar e inmovilizar el nitrógeno presente en la materia orgánica del suelo está frecuentemente limitada por la humedad y la temperatura, provocando que el nitrógeno sea el nutriente más limitante para la productividad vegetal en zonas áridas y semiáridas. Además, en estas regiones son comunes los suelos alcalinos ( $\text{pH} > 7$ ). La alcalinidad puede dañar las raíces de las plantas y perjudicar su capacidad para absorber agua y extraer nutrientes esenciales del suelo lo que puede acarrear un crecimiento deficiente de la raíz y de la planta. Los suelos alcalinos se caracterizan por ser ricos en carbonato de calcio, poseer altos niveles de sales solubles y tener altas concentraciones de sodio intercambiable. Una alta presencia de sodio intercambiable puede ocasionar una deficiencia para las plantas de otros micronutrientes a los que reemplaza. Además, en suelos alcalinos, la solubilidad del fósforo disminuye debido que reacciona con el calcio (Ca) formando compuestos insolubles o de baja solubilidad como los fosfatos de calcio. Igualmente, en zonas próximas al mar, la salinidad puede constituir otro importante condicionante para la vegetación.

En esta práctica vamos a realizar las medidas de las siguientes variables para determinar la calidad del suelo de un matorral semiárido de litoral: contenido en materia orgánica, humedad, conductividad eléctrica y pH, alcalinidad y concentración de nitrógeno y fósforo total. En las páginas 12 y 13 se incluye un mapa conceptual simplificado para el desarrollo de todos los análisis (Figura 3).



**Figura 1.** Tamizado de una muestra de suelo.

## METODOLOGÍA

### 1. Humedad

La cantidad de humedad contenida por el suelo se estimará haciendo uso del método gravimétrico. Este método se basa en la pérdida de peso de un volumen conocido de suelo cuando este se deseca.

#### Material necesario

- Muestra de suelo
- Balanza
- Estufa

#### Procedimiento a seguir

El método consta de los siguientes pasos:

1. En campo se toma un volumen conocido de suelo en un recipiente cerrado herméticamente.
2. Pesamos el recipiente con el tapón (**Pi**).
3. Retiramos el tapón del recipiente y secamos la muestra en estufa a 70°C durante al menos 48 horas.
4. Tras ese tiempo, el recipiente con la muestra se deja enfriar en un desecador con gel de sílice hasta que alcance la temperatura ambiente.
5. Cuando alcance la temperatura ambiente se pesa el recipiente con el tapón pesa (**Pf**).
6. La diferencia de peso entre Pi y Pf, mide la humedad contenida en la muestra de suelo.
7. Si se desea expresar el contenido de humedad en porcentaje (%) es necesario conocer el peso del recipiente vacío.
8. Cálculos:

$$\text{humedad (g)} = P_i - P_f$$

$$\% \text{ humedad} = \frac{P_i - P_f}{P_i - \text{Peso recipiente}} \times 100$$

MUESTR A	Pi (g)	Pf (g)	Peso recipiente (g)	Humedad (g)	% humedad

## 2. Contenido en materia orgánica

De los diversos métodos disponibles para la medida de materia orgánica de un suelo, el método gravimétrico consistente en la medida de la pérdida de peso de una muestra de suelo después de la ignición es uno de los más generales y de bajo coste. Este método no está exento de crítica, de hecho, en determinado tipo de suelos con abundancia de sustancias inorgánicas volátiles a altas temperaturas este método no es recomendable.

### Material necesario

- Muestra de suelo
- Tamiz de 1 mm de luz
- Pocillo (resistente a la incineración) o botellas ISO (50 ml)
- Cuchara
- Balanza
- Estufa
- Desecador
- Incinerador/Mufla

### Procedimiento a seguir

El método consta de los siguientes pasos.

1. Tamizar una porción de suelo mediante un tamiz de 1 mm de diámetro de poro sobre un recipiente o papel de aluminio.
2. Tarar una botella ISO de 50 ml (**PESO 1**).
3. Introducir aprox. 5 g de la porción tamizada de suelo en la botella ISO.
4. Secar en estufa a 70°C durante al menos 48 horas, hasta obtener un peso constante.
5. Sacar el pocillo con la muestra seca de la estufa y dejar en un desecador con gel de sílice hasta que alcance la temperatura ambiente.
6. Pesar el pocillo con la muestra seca (**PESO 2**).

(IMPORTANTE: Para agilizar la sesión práctica los pasos 4, 5 y 6 pueden obviarse y estimar el peso seco de la muestra restando el % correspondiente de humedad medido en su muestra gemela)

7. Incinerar la muestra en horno mufla a 550°C durante 5 horas.
8. Dejar enfriar y pesar el pocillo con las cenizas (**PESO 3**).

(IMPORTANTE: Estas cenizas serán utilizadas posteriormente para el análisis de nitrógeno y fósforo total)

9. El peso perdido por la muestra en el proceso de incineración es equivalente a la cantidad de materia orgánica presente en la muestra.
10. Cálculos:

$$\% \text{ mat. orgánica} = \frac{\text{Peso 3} - \text{Peso 2}}{\text{Peso 3} - \text{Peso 1}} \times 100$$

MUESTRA	Peso 1 (g)	Peso 2 (g)	Peso 3 (g)	% mat. orgánica

### 3. CE y pH

Tanto la conductividad eléctrica como el pH del suelo serán medidos mediante una sonda multiparamétrica tras la preparación de una solución. El valor de la CE de la solución resulta un buen indicador de la cantidad de sales fácilmente solubles en la muestra de suelo, mientras que el valor del pH de la solución nos dará información sobre el grado de acidez o alcalinidad de nuestro suelo.

#### Material necesario

- Muestra de suelo
- Tamiz de 1 mm de luz
- Agua destilada
- Probeta 100 ml
- Matraz Erlenmeyer
- Agitador orbital
- Cuchara.
- Medidor de CE
- Medidor de pH

#### Procedimiento a seguir

El método consta de los siguientes pasos.

1. Un volumen (50 ml) de suelo previamente tamizado (tamiz de 1 mm de luz) se pone en un matraz Erlenmeyer de 250 ml.
2. Añadir 100 ml de agua destilada.
3. Mantener el matraz en agitación constante durante 30 minutos con ayuda de un agitador orbital o magnético.
4. Tras ese tiempo dejar reposar la solución durante 10 minutos.
5. Con ayuda de un embudo, filtrar la solución a través de un papel de filtro.

(IMPORTANTE: Esta solución será utilizada posteriormente para el análisis de alcalinidad)

6. Medir la CE y el pH en la solución.

MUESTRA	CE (mS/cm)	pH

#### 4. Alcalinidad

La alcalinidad de un suelo se debe fundamentalmente a su contenido de carbonatos, bicarbonatos e hidróxidos. La muestra se valora con un ácido mineral fuerte hasta pH 8.3 y 4-5, al cual se produce un viraje de color. Al utilizar como indicador la fenolftaleína, el pH 8.3 representa la valoración de todo el hidróxido y la mitad del carbonato, mientras que el pH inferior (4-5) permite la determinación de la alcalinidad total. En esta práctica vamos a medir la alcalinidad total.

##### Material necesario

- Muestra de suelo
- Tamiz de 1 mm de luz
- Agua destilada
- Probeta 100 ml
- Matraz Erlenmeyer
- Agitador orbital
- Cuchara.
- Embudo
- Filtros de papel
- Bureta

##### Preparación de los reactivos necesarios

- **Fenolftaleína.**
- **Indicador mixto** (verde de bromocresol-rojo de metilo): pesar 0.02 g de rojo de metilo y 0.1 g de verde de bromocresol sal sódica y disolverlos en 100 ml de alcohol etílico (95%) o alcohol isopropílico. Almacenar en un frasco de vidrio ámbar.
- **Ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 0.02N:** disolver 20 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N en 1 L de agua ultrapura.

##### Procedimiento a seguir

El método consta de los siguientes pasos.

1. Un volumen (50 ml) de suelo previamente tamizado (tamiz de 1 mm de luz) se pone en un matraz Erlenmeyer de 250 ml.
2. Añadir 100 ml de agua destilada.
3. Mantener el matraz en agitación constante durante 30 minutos con ayuda de un agitador orbital o magnético.
4. Tras ese tiempo dejar reposar la solución durante 10 minutos.
5. Con ayuda de un embudo, filtrar la solución a través de un papel de filtro.
6. Medir volumen de solución filtrado.
7. Enrasar una bureta con ácido sulfúrico 0.02N.
8. Añadir dos gotas de fenolftaleína a la solución.
9. Si la muestra se colorea a rosa titular con ácido sulfúrico 0.02 N hasta desaparición de color. Anotar el volumen de solución titulante consumidos. Si el pH de la

muestra no es suficiente para colorearla de rosado al añadir el indicador, reportar como cero la alcalinidad a la fenolftaleína.

10. Para medir la alcalinidad total, añadir 1 ml de indicador mixto (la muestra se coloreará de azul) y titular con ácido sulfúrico 0.02 N hasta color rojo o rosa claro. Anotar el volumen de ácido 0.02N consumido.
11. Para el cálculo de la alcalinidad total el volumen a considerar será la suma del ácido total consumido.
12. Cálculos:

$$\text{Alcalinidad total (mg CaCO}_3\text{/l)} = \frac{A \times N \times 50 \times 1000}{\text{ml de muestra}}$$

Donde:

A = ml de ácido sulfúrico gastados en la titulación

N = normalidad del ácido sulfúrico

MUESTRA	Volumen de la muestra (ml)	Lectura de la bureta (ml)		Volumen de ácido sulfúrico (mL)	Alcalinidad (eq. CaCO <sub>3</sub> , mg/l)
		Inicial	Final		

## 5. Nitrógeno y fósforo Total

Las concentraciones de nitrógeno y fósforo total se estimarán espectrofotométricamente tras una digestión alcalina en autoclave de la muestra. Esta digestión con persulfato alcalino oxida todas las formas de nitrógeno orgánico e inorgánico a nitrato e hidroliza todas las formas de fósforo orgánico e inorgánico a ortofosfato. Un método habitualmente utilizado para el análisis de muestras de agua que también ha demostrado buenos resultados en muestras de sedimento tras su incineración. Este análisis mide todas las formas presentes de nitrógeno (nitratos, nitritos, amonio, y nitrógeno orgánico) y fósforo (ortofosfato, fosfatos condensados, y fosfato orgánico) en la muestra.

### Material necesario

- Muestra de suelo tamizado y seco
- Agua ultrapura
- Botellas ISO (50 ml)
- Balanza
- Horno mufla
- Incinerador/Mufla
- Micropipetas
- Matraces aforados
- Jeringas y agujas
- Porta-filtros para jeringas
- Filtros de fibra de vidrio (0.45  $\mu\text{m}$ )
- Matraces Erlenmeyer
- Cubetas de vidrio de 1 cm
- Cubetas de cuarzo de 1 cm
- Espectrofotómetro
- Autoclave

### Preparación de los reactivos necesarios

#### Reactivos comunes

- **Mezcla oxidante:** en 1 litro de agua ultrapura disolver 50 g de Persulfato potásico ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ), 30 g de ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) y 14 g de hidróxido sódico (NaOH). Conservar a temperatura ambiente y en oscuridad.

(IMPORTANTE: el persulfato puede tardar varias horas en disolverse, por lo que conviene preparar la mezcla oxidante a primera hora de la mañana)

#### Reactivos para N total

- **Ácido sulfúrico concentrado (98%).**

#### Reactivos para P total

- **Mezcla de reactivos:** disolver separadamente 0.1675 g de tartrato de antimonio y potasio ( $\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ ) en 25 ml de agua ultrapura; 4.05 g de

heptamolibdato amónico ((NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O) en 50 ml de agua ultrapura; y enrasar 50 ml de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) hasta 100 ml de agua ultrapura.

Después de haber disuelto los reactivos anteriores separadamente, verterlos en un matraz de 250 ml y enrasar con agua ultrapura. Esta mezcla es estable durante al menos 1 mes si se conserva en frío y en oscuridad.

(IMPORTANTE: el heptamolibdato no se disolverá hasta añadir a la mezcla de reactivos el ácido sulfúrico)

(IMPORTANTE: Al mezclar ácido sulfúrico y agua se producirá una reacción exotérmica. Por lo tanto, el enrase final ha de realizarse una vez el ácido se ha enfriado)

- **Solución reductora:** en un matraz de 250 ml disolver 17.5 g de ácido L-ascórbico (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>), 0.075 g de ácido etilendiamina tetraacético disódico (EDTA-Na<sub>2</sub>) y 1.5 ml de ácido fórmico (CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en 200 ml de agua ultrapura. Enrasar la mezcla a 250 ml con agua ultrapura. Esta mezcla es estable durante al menos 1 mes si se conserva en frío y en oscuridad.

#### Preparación de la recta patrón para N total

1. Preparar una solución con 0.61286 g de NaNO<sub>3</sub> (nitrato sódico) previamente desecado durante al menos 2 horas a 105°C en 1 litro de agua ultrapura (concentración = 0.1 mg N/ml o 100 ppm).
2. Enrasar en matraz aforado.
3. A partir de esa solución preparar al menos 5 puntos de distintas concentraciones siguiendo la tabla:

Volumen tomado (ml)	Aforar hasta (ml)	Concentración (mg/l)
2 ml	500	0.4
4 ml	500	0.8
15	1000	1.5
20	1000	2
15	500	3
20	500	4
25	500	5
30	500	6
50	500	10

4. Una vez preparados los puntos estos se tratan como una muestra.
5. A las absorbancias obtenidas se les restará el valor medio de la absorbancia obtenido por los blancos, y se construirá una gráfica, disponiendo en el *eje x* la concentración de nitrógeno y en el *eje y* el valor de absorbancia correspondiente (ver figura 2). Es conveniente que el valor de R<sup>2</sup> sea superior a 0.99, y nunca inferior a 0.98.

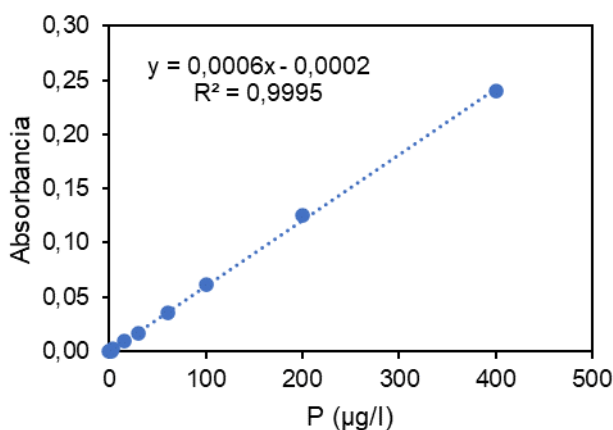
#### Preparación de la recta patrón para P total



1. Preparar una solución con 0.87874 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (fosfato monopotásico o dihidrógenofosfato de potasio) previamente desecado durante al menos 2 horas a  $105^\circ\text{C}$  en 1 litro de agua ultrapura (solución A, concentración =  $200 \mu\text{g P/ml}$ ).
2. Enrasar en matraz aforado.
3. Tomar 10 ml de la solución A y aforar con agua ultrapura hasta 1 litro (solución B, concentración =  $2 \mu\text{g P/ml}$ ).
4. A partir de esas soluciones preparar al menos 5 puntos de distintas concentraciones siguiendo la tabla:

Volumen tomado (ml)	Aforar hasta (ml)	Concentración ( $\mu\text{g/l}$ )
1 ml sol. B	500	4
0.8 ml sol. B	100	16
1.5 ml sol. B	100	30
1.5 ml sol. B	50	60
2.5 ml sol. B	50	100
5 ml sol. B	50	200
0.1 ml sol. A	50	400
0.2 ml sol. A	50	800

5. Una vez preparados los puntos estos se tratan como una muestra.
6. A las absorbancias obtenidas se les restará el valor medio de la absorbancia obtenido por los blancos, y se construirá una gráfica del siguiente tipo, disponiendo en el *eje x* la concentración de fósforo y en el *eje y* el valor de absorbancia correspondiente. Es conveniente que el valor de  $R^2$  sea superior a 0.99, y nunca inferior a 0.98.



**Figura 2.** Recta patrón para el análisis de fósforo total.

### Procedimiento a seguir

El método consta de los siguientes pasos.

1. Introducir aprox. 1 g de suelo seco y tamizado por 1 mm en la botella ISO.
2. Anotar el peso.
3. Incinerar la muestra en horno mufla a  $550^\circ\text{C}$  durante 5 horas.
4. Tras ese tiempo, dejar enfriar.

(IMPORTANTE: Deben realizarse al menos 2 pruebas en blanco, es decir, conteniendo agua ultrapura más reactivos, para verificar el procedimiento analítico)

5. Añadir 45 ml de agua ultrapura a cada botella.
6. Añadir 6.3 ml de mezcla oxidante.
7. Cerrar las botellas y autoclavar a 120°C durante 30 minutos.
8. Tras ese tiempo, dejar enfriar las botellas hasta temperatura ambiente.
9. Dividir cada muestra en dos alícuotas de 20 ml (una para el análisis de N total y otra para el análisis de P total). Para ello con ayuda de una jeringa traspasar volúmenes de 20 ml de la solución a matraces Erlenmeyer. Si la solución se resuspende filtrar para retirar partículas de sedimento.

Seguir por aquí para N total

10. Añadir 0.34 ml de ácido sulfúrico. Agitar.
11. Medir absorbancia a 220 nm de longitud de onda en cubeta de cuarzo.

(IMPORTANTE: encender la lámpara ultravioleta del espectrofotómetro al menos 15 minutos antes de la primera lectura)

12. Anotar la absorbancia y calcular la concentración de N en la muestra utilizando la recta patrón (ver pasos 17 y 18).
13. Para expresar la concentración con relación al peso de la muestra, el valor obtenido ha de multiplicarse por el volumen de la solución inicial (en este caso 45 ml) y dividirse por el peso de muestra utilizado (en este caso, aproximadamente 1 g):

$$N \text{ total (mg/g)} = \frac{N \text{ total (mg/l)} \times \text{vol. inicial (l)}}{\text{Peso seco muestra (g)}}$$

MUESTRA	ABS	ABS. - Blanco	N total (mg/L)	Volumen de agua utilizado (ml)	Peso muestra (g)	N total (mg/g)
				45 ml		

Seguir por aquí para P total

14. Añadir 0.6 ml de solución reductora. Agitar y esperar 2 minutos.
15. Añadir 0.6 ml de mezcla de reactivos. Agitar y esperar 15 minutos.
16. Medir absorbancia en cubeta de vidrio a 882 nm de longitud de onda.
17. Anotar la absorbancia y calcular la concentración de P en la muestra utilizando la recta patrón.
18. La concentración de P en una muestra se obtendrá despejando x de la ecuación obtenida en la recta patrón. Por ejemplo, utilizando la recta patrón de la figura 2 la concentración de P en la muestra se calcularía como sigue:

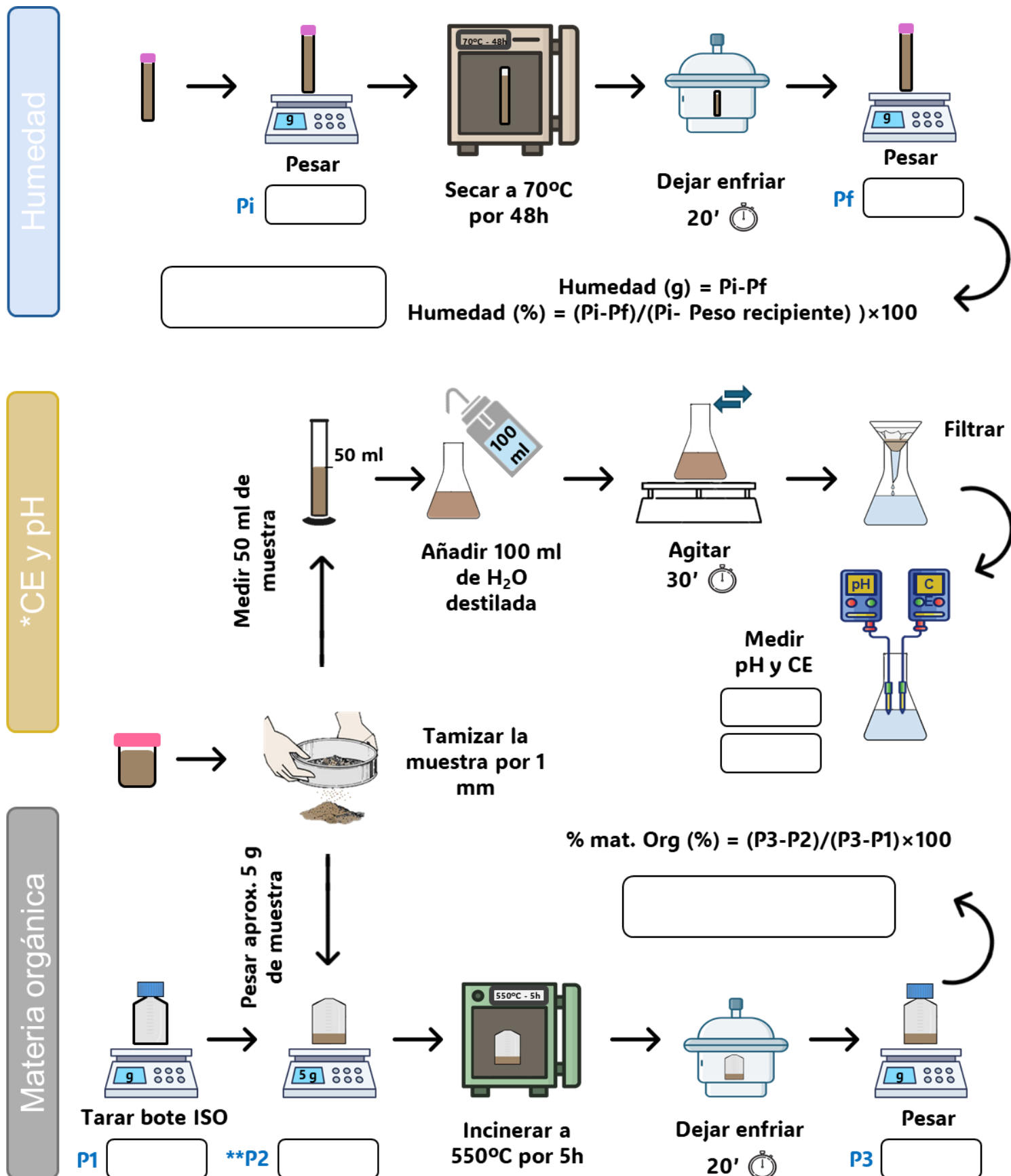
$$P \text{ total } (\mu\text{g/l}) = \frac{\text{Absorbancia} - 0.0006}{0.0002}$$

19. Para expresar la concentración con relación al peso de la muestra, el valor obtenido ha de multiplicarse por el volumen de la solución inicial (en este caso 45 ml) y dividirse por el peso de muestra utilizado (en este caso, aproximadamente 1 g):

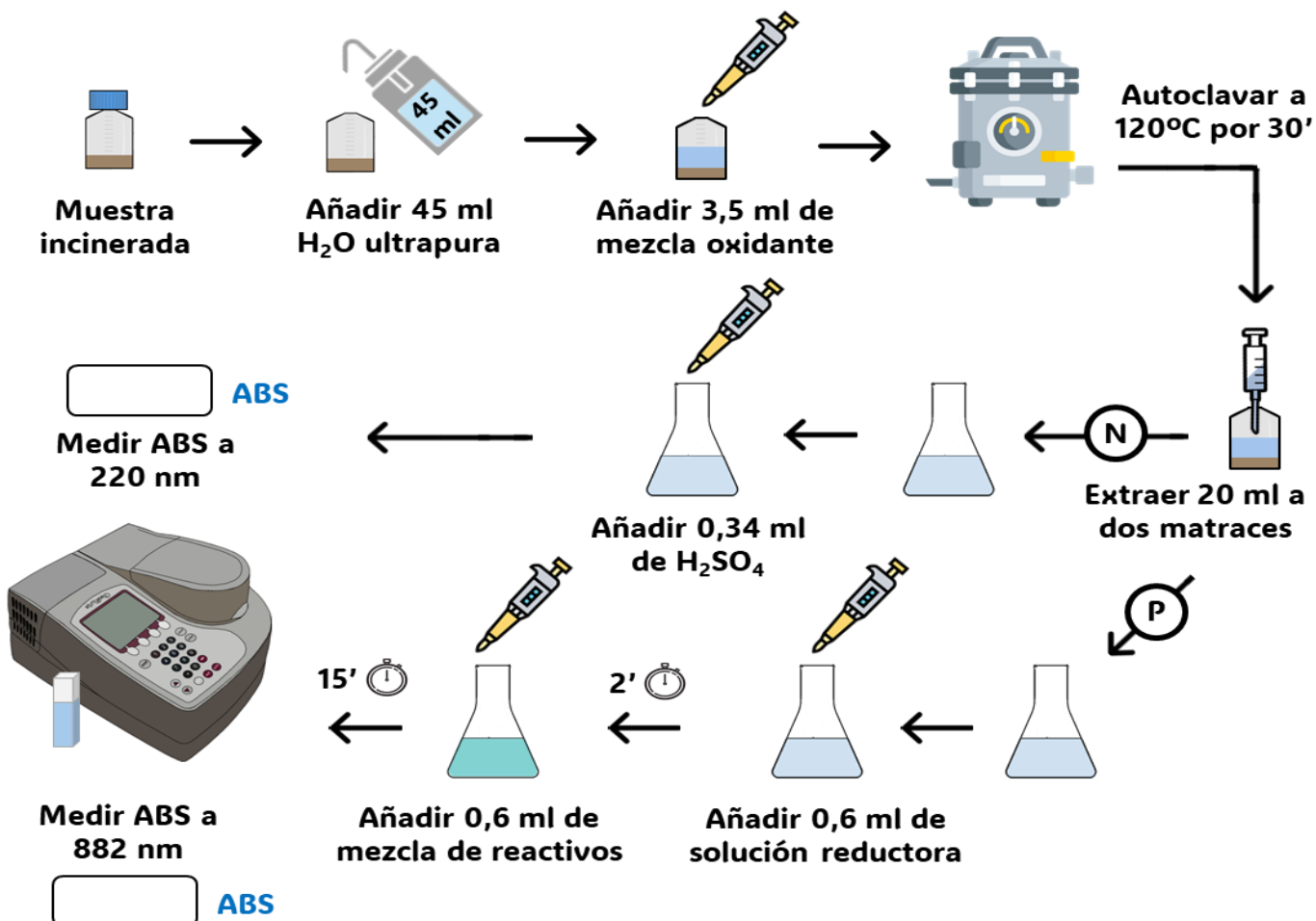
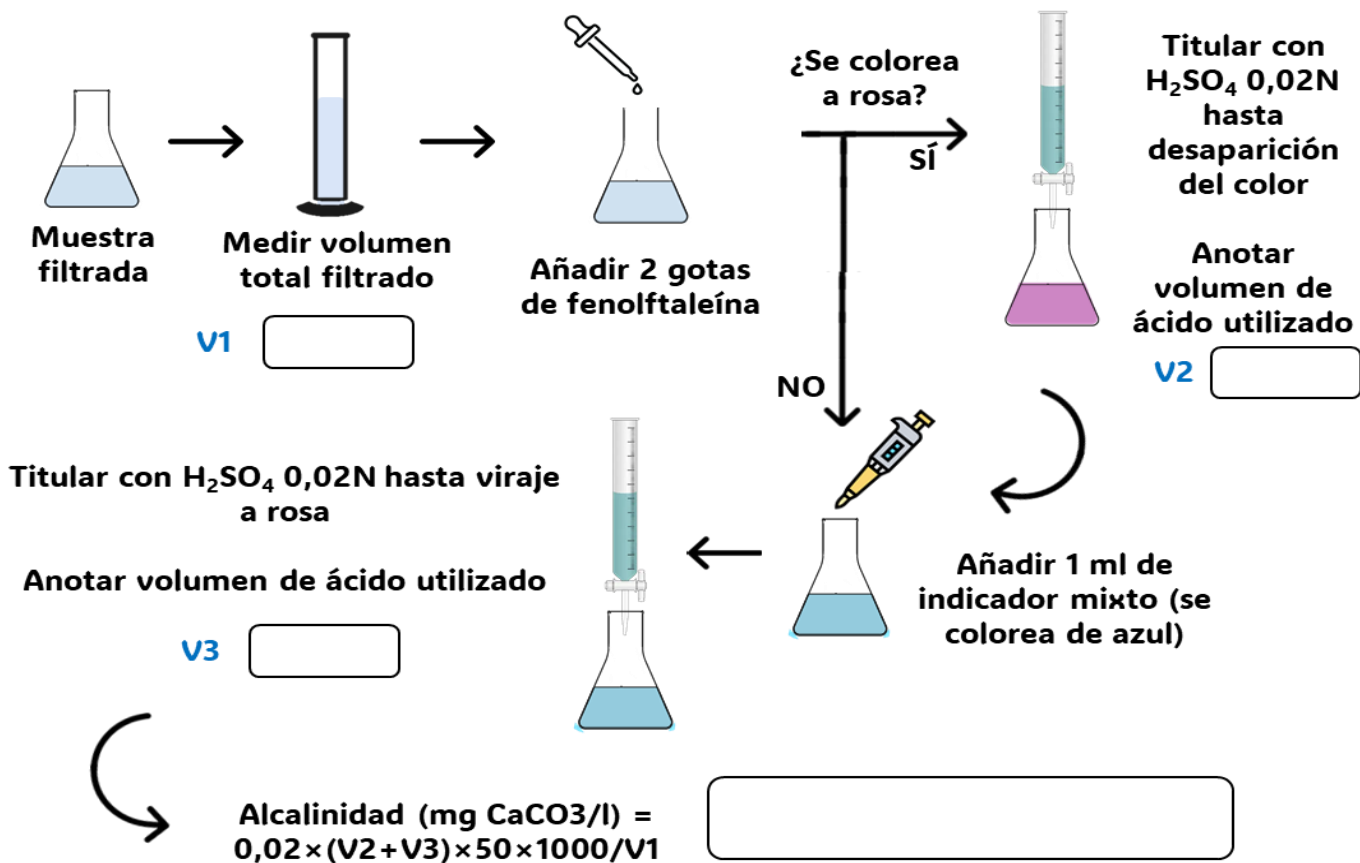
$$P \text{ total } (\text{ppm}) = \frac{P \text{ total } (\mu\text{g/l}) \times \text{vol. inicial (l)}}{\text{Peso seco muestra (g)}}$$

MUESTRA	ABS	ABS. - Blanco	P total ( $\mu\text{g/L}$ )	Volumen de agua utilizado (ml)	Peso muestra (g)	P total (g/g o ppm)
				45 ml		

Figura 3. Diagrama de flujo para el desarrollo de los análisis.



\*Para agilizar la práctica comenzar por la preparación de la muestra para CE y pH y comenzar con la preparación del resto de muestras durante los 30 minutos de agitación. \*\*Si para agilizar la práctica la muestra no se seca, P2 debe ser corregido por su contenido en humedad utilizando el % de humedad estimado en su muestra melliza.



\*\*\*Para el análisis de alcalinidad se utiliza la muestra filtrada para la medida de CE y pH. Además, se proporciona a los alumnos todos los reactivos ya preparados. \*\*\*\*Para el análisis de N y P total se utiliza la muestra incinerada para la estima del contenido en materia orgánica. Además, se proporciona a los alumnos tanto los reactivos como los distintos puntos de la recta patrón ya preparados.

## REFERENCIAS

- Ameel, J. J., Axler, R. P., & Owen, C. J. (1993). Persulfate digestion for determination of total nitrogen and phosphorus in low-nutrient waters. *American Environmental Laboratory*, 10(93), 1-11.
- Andersen, J. M. (1976). An ignition method for determination of total phosphorus in lake sediments. *Water research*, 10(4), 329-331.
- APHA, AWWA, WPCF. 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21<sup>th</sup> Edition. Total organic carbon (TOC): high temperature combustion method. (Method 5310).
- APHA, AWWA, WPCF. 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21<sup>th</sup> Edition. New York. Alkalinity (Method 2320).
- Celaya-Michel, H., & Castellanos-Villegas, A. E. (2011). Mineralización de nitrógeno en el suelo de zonas áridas y semiáridas. *Terra Latinoamericana*, 29(3), 343-356.
- Hoogsteen, M. J., Lantinga, E. A., Bakker, E. J., Groot, J. C., & Tittone, P. A. (2015). Estimating soil organic carbon through loss on ignition: effects of ignition conditions and structural water loss. *European Journal of soil science*, 66(2), 320-328.
- Kovar, J. L., & Pierzynski, G. M. (2009). Methods of phosphorus analysis for soils, sediments, residuals, and waters second edition. *Southern cooperative series bulletin*, 408.
- Patton, C. J., & Kryskalla, J. R. (2003). Methods of analysis by the US Geological Survey National Water Quality Laboratory: evaluation of alkaline persulfate digestion as an alternative to Kjeldahl digestion for determination of total and dissolved nitrogen and phosphorus in water (Vol. 3, No. 4174). US Department of the Interior, US Geological Survey.
- Rosell, R. A., Gasparoni, J. C., & Galantini, J. A. (2001). Soil organic matter evaluation. In R. Lal, J.M. Kimble, B.F. Follett, B.A. Stewart (Eds.), *Assessment Methods for Soil Carbon*, Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, USA (2001), pp. 311-322
- Saunders, W. M. H., & Williams, E. G. (1955). Observations on the determinations of total organic phosphorus in soils. *Journal of Soil Science*, 6(2), 254-267.
- Wetzel, R. G., Likens, G. E., Wetzel, R. G., & Likens, G. E. (1991). Inorganic nutrients: nitrogen, phosphorus, and other nutrients. *Limnological analyses*, 81-105.