

PROTOTIPO DE EQUIPO PARA LA EXTRACCION DE MICRONUTRIENTES EN SUELOS

Brunello D¹, Pérez M², Savio M^{1,3}, Kloster N^{2*}

¹ Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de La Pampa, Santa Rosa, La Pampa, Argentina.

² INTA, Estación Experimental Agropecuaria Anguil, Anguil, La Pampa, Argentina.

³ Instituto de Ciencias de la Tierra y Ambientales de La Pampa (INCITAP), Santa Rosa, La Pampa, Argentina.

* e-mail: kloster.nanci@inta.gob.ar

RESUMEN

Los micronutrientes son aquellos elementos que, si bien son requeridos en muy bajas concentraciones por el vegetal, son indispensables para el normal funcionamiento metabólico de la planta. Entre ellos están el zinc (Zn), cobre (Cu), hierro (Fe) y manganeso (Mn). La etapa de extracción de elementos a partir de la matriz del suelo para su posterior cuantificación es una etapa crítica en cuanto a requerimientos de tiempo y personal en los laboratorios. Aun así, en el mercado prácticamente no existen equipos de laboratorio que se adecúen a las necesidades y características de los ensayos para la evaluación de suelos. En un trabajo previo se desarrolló un prototipo para la extracción de bases intercambiables y capacidad de intercambio catiónico para 24 muestras de suelo en simultáneo, que resultó agilizar la dinámica del trabajo de extracción y ser eficiente en el uso del tiempo en el laboratorio. El objetivo del trabajo actual fue evaluar la aptitud de dicho prototipo para la extracción de Zn, Cu, Fe y Mn de suelo con solución de ácido dietilentriaminopentaacético y trietanolamina (DTPA-TEA). Se utilizó una muestra de referencia interna para la optimización del prototipo para la extracción de micronutrientes y 7 muestras de suelo para el estudio de validación, que incluyó veracidad y precisión. Los resultados de exactitud se analizaron frente al método convencional de agitación, centrifugación y filtración. A partir de los resultados se determinó que la extracción más eficiente se logra utilizando dos alícuotas de 10 mL de extractante en 2 h. Se concluyó que el prototipo es una alternativa exacta para la extracción de Cu en muestras de suelo con DTPA-TEA y podría reemplazar al método convencional. Aunque es necesario ampliar el número de muestras analizadas para sacar conclusiones definitivas respecto de su aptitud para el análisis de Zn, Fe y Mn.

Palabras clave: validación, micronutrientes, extracción.

INTRODUCCION

El desafío más importante, para ecologistas y productores agropecuarios, es mantener el nivel de nutrientes y mejorar la fertilidad (química, física y biológica) de los suelos para incrementar la producción agrícola; es decir para que los vegetales puedan expresar su máxima capacidad genética productiva (Hatch *et al.*, 2002). Las plantas requieren diferentes nutrientes para poder desarrollar sus actividades metabólicas y permitir su crecimiento, los cuales extraen de la solución del suelo por absorción radicular. Los micronutrientes son aquellos elementos que, si bien son requeridos en muy bajas concentraciones por el vegetal, son indispensables para el normal funcionamiento metabólico de la planta. Entre ellos están el zinc (Zn), cobre (Cu), hierro (Fe) y manganeso (Mn), que se encuentran en el suelo en diferentes formas químicas, tales como minerales solubles en agua, adsorbidos, quelatados, formando agregados, o bien formando parte estructural de minerales primarios y secundarios (Sparks, 1996).

Existen diferentes extractantes que permiten tener una idea aproximada del perfil elemental biodisponible en suelos. Los extractantes son soluciones ácidas, básicas y/o sales que actúan facilitando la solubilidad de un



nutriente contenido en el suelo, o bien, reemplazándolo en el complejo de intercambio del suelo y facilitando su disponibilidad en la solución (Alvarez, 2010). Los agentes quelatantes como el ácido etilediaminotetraacético (EDTA) y el ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), son efectivos para extraer los micronutrientes, por lo que se han incluido en extractantes de tipo universal como el EDTA que forma parte de la solución Mehlich 3, o del DTPA utilizado para la extracción de micronutrientes (Sparks, 1996). Este último es el extractante más empleado a nivel nacional en planteos de fertilización de alta tecnología (Barbieri *et al.*, 2017; Gannini-Kurina *et al.*, 2021).

El procedimiento de extracción de los nutrientes del suelo, para su posterior cuantificación, involucra usualmente una etapa de agitación, centrifugación y/o filtración. O bien se utiliza el método de percolación, haciendo que el extractante pase a través de una masa conocida de suelo (Ciesielski & Sterckeman, 1997). Algunos sistemas de extracción semiautomáticos que funcionan por percolación se han propuesto a nivel nacional (Richter *et al.*, 1982; Kloster *et al.*, 2019) e internacional (Mulvaney *et al.*, 2004; Pansu & Gautheyrou, 2006) para la extracción de bases intercambiables, capacidad de intercambio catiónico y formas de nitrógeno mineral en suelos (Nunes & Mulvaney, 2021). En todos ellos es imprescindible determinar la influencia de parámetros relacionados a la extracción, tales como tamaño de muestra, volumen de extractante, número de etapas y tiempo de extracción, los cuales afectan directamente la exactitud (veracidad y precisión) de las medidas. A su vez, el laboratorio suele seleccionar el método a utilizar de acuerdo a consideraciones prácticas, tales como tiempo, laboriosidad y costo para su ejecución. En un trabajo previo Kloster *et al.* (2019) desarrollaron un prototipo de extracción de bases intercambiables y capacidad de intercambio catiónico para 24 muestras de suelo en simultáneo que resultó agilizar la dinámica del trabajo de extracción y ser eficiente en el uso del tiempo en el laboratorio. El objetivo del trabajo actual fue evaluar la aptitud de dicho prototipo para la extracción de Zn, Cu, Fe y Mn de suelo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de suelo y extracción de micronutrientes

Se tomaron 7 muestras de suelo del horizonte superficial (20 cm) de la región este de La Pampa las cuales se secaron al aire y se tamizaron a 2 mm, para su uso en los ensayos de validación del prototipo. Además, se usó una muestra de referencia interna para los ensayos de optimización del prototipo. La Tabla 1 muestra la caracterización fisicoquímica de las muestras.

Tabla 1. Caracterización fisicoquímica de las muestras de suelo. Los valores en paréntesis indican el mínimo y máximo de cada parámetro.

Fósforo	Materia Orgánica	pH 1:2,5	Arcilla+Limo
mg Kg ⁻¹	(%)		(%)
26,6	1,9	6,7	37
(4,5-50,2)	(1,4-2,9)	(6,4-7,0)	(18-56)

La extracción de micronutrientes se realizó con solución DTPA-TEA, preparada a partir de 15 mL de trietanolamina (TEA), 1,5 g de ácido dietilentriaminopentaacético y 1,47 g de cloruro de calcio dihidratado, ajustando el pH a 7,3 y llevando a volumen de 1 L con agua destilada. Se utilizó el método convencional, que involucra agitación, centrifugación y filtración, como método de referencia para la extracción, la cual se realizó a partir de 10 g de suelo y 20 mL de solución de extracción. Se agitó en agitador vaivén a 120 golpes por minuto durante 2 h, se centrifugó la suspensión y se filtró con papel de filtro tipo banda azul (JP42) para la obtención de un extracto lípido destinado a la cuantificación de microelementos.

Prototipo de equipo para la extracción: optimización de variables y validación

El prototipo se muestra en la Figura 1 (Kloster *et al.*, 2019). Es una cuba rectangular de acrílico con una tapa perforada con 24 posiciones de manera que se pueden analizar esta cantidad de muestras de suelo en simultáneo o solo trabajar con las posiciones necesarias. Sobre la tapa, en cada perforación se colocan las jeringas en las cuales se realiza la extracción de los elementos del suelo utilizando una solución de extracción, mediante percolación. Estas jeringas se preparan previo a su uso con un sistema de filtro que consiste en



pieza de plástico + filtro de papel tipo banda azul + pieza de plástico. En el interior de la cuba hay una gradilla con 24 posiciones para tubos de 50 mL sobre los cuales se recoge la solución procedente de la extracción y una salida de flujo para conectar a una bomba de vacío. Además, entre la tapa y la cuba se ubica una banda de goma para garantizar la efectividad del vacío.

La optimización de la extracción con el prototipo se realizó con la misma relación suelo:solución que el método convencional, pero modificando dos variables: alícuota de solución de extracción y tiempo de extracción. La alícuota de solución de extracción consistió en añadir el volumen total de solución (20 mL) al comienzo de la etapa de extracción, o en dos alícuotas de 10 mL, con intervalo de 1 h entre ambas. El tiempo de extracción se evaluó en 2 h, que es el tiempo propuesto en la literatura para el método convencional o 1 h, para estudiar la posibilidad de disminuir el tiempo involucrado en la etapa de extracción. Al finalizar el tiempo de extracción se aplicó vacío para obtener el máximo volumen de extracto.

Una vez optimizadas las variables de operación del prototipo se validó su aptitud determinando exactitud, es decir la veracidad y precisión. La veracidad se obtuvo por comparación de los resultados con el método de extracción convencional. Mientras que la precisión se evaluó a partir de la repetibilidad (en la misma tanda de extracción) y de la precisión intermedia (en diferente tanda de extracción / día). Todos los ensayos de optimización se realizaron por sextuplicado, mientras que los ensayos de validación se realizaron por triplicado. Los análisis estadísticos se realizaron con el software Microsoft Office Excel 2007 e INFOSTAT (Di Rienzo *et al.*, 2015). Diferencias significativas entre métodos de extracción se analizaron por comparación de medias aplicando un test t a 95 % de nivel de confianza. La precisión se evaluó a partir del coeficiente de variación (CV) definiendo un límite máximo de 15 % para la admisión del método, de acuerdo al CV obtenido en el método de extracción convencional.

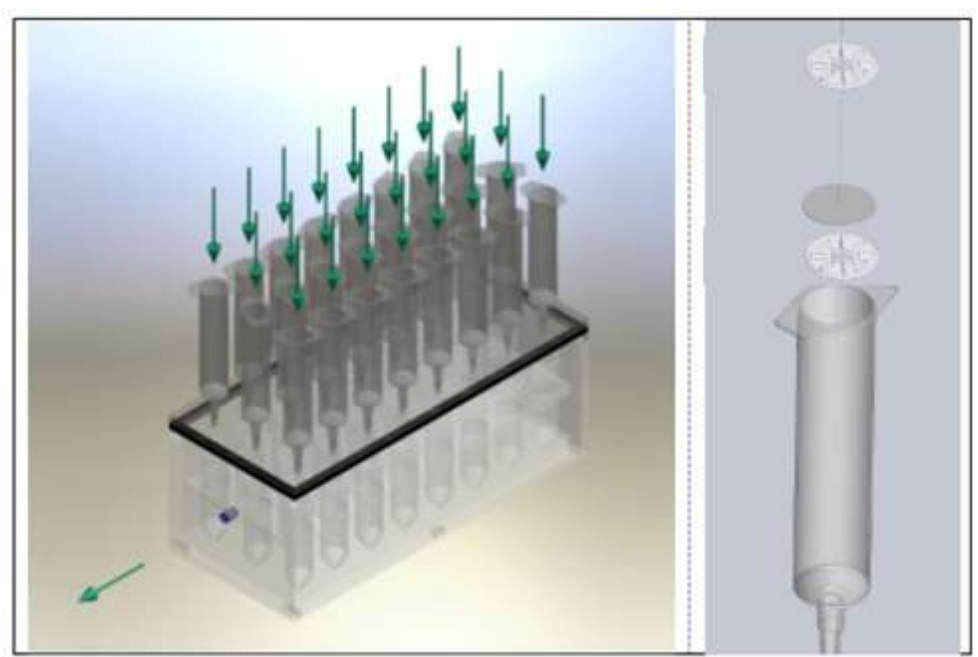


Figura 1. Esquema del prototipo para realizar la extracción de Cu, Fe, Mn y Zn e imagen ampliada del sistema de filtro de las jeringas (Kloster *et al.*, 2019).

Cuantificación

La cuantificación de Zn, Cu, Fe y Mn en los extractos de suelo se realizó mediante espectrometría de absorción atómica, con un equipo PinAAcle 900H (Perkin Elmer), equipado con software Winlab, con el cual se analizaron los elementos en modo absorción con multilámpara de cátodo hueco. Para ello se realizaron previamente las curvas de calibración, empleando soluciones estándar certificadas Certipure (Merck) 1000 mg L⁻¹, con 6 concentraciones de cada elemento, en tres réplicas independientes.

RESULTADOS Y DISCUSION

En la Tabla 2 se muestran los resultados de optimización del prototipo para las variables número de alícuotas y tiempo de extracción utilizando la muestra de referencia interna. Se observa que la extracción más eficiente de los 4 elementos de interés se obtiene al realizar el procedimiento con dos alícuotas de 10 mL de solución de extracción, un intervalo de 1 h entre cada adición de solución (tiempo de extracción total 2 h) y aplicación de vacío al finalizar el tiempo de extracción. Esto se corresponde con los ensayos de laboratorio, donde se observó que la solución filtra rápidamente una vez que se agrega a la jeringa, disminuyendo los procesos de intercambio de iones que dependen del tiempo de contacto entre el suelo y la solución, lo que explicaría la menor extracción de los elementos en la solución.

Tabla 2. Resultados de análisis para Cu, Fe, Mn y Zn en el estudio de optimización de la cuba de extracción relativo a las variables alícuota de solución de extracción y tiempo de extracción.

Variable		Cu	Fe	Mn	Zn
N° alícuotas	Tiempo de extracción (h)	(mg Kg ⁻¹)			
1	2	0,53	6,5	37,2	1,17
1	1	0,45	5,0	29,6	1,03
2	2	1,07	18,9	43,6	1,97

Una vez optimizado el funcionamiento de la cuba de extracción con la muestra de referencia interna, se procedió a validar su funcionamiento determinando la veracidad y la precisión. Los resultados de veracidad por comparación de métodos de extracción se muestran en la Figura 2. En líneas generales la extracción mediante los dos métodos para los 4 elementos estuvo dentro del mismo orden de magnitud. El test estadístico t para muestras apareadas arrojó que la concentración de Cu determinada por ambos métodos de extracción no presenta valores significativamente diferentes ($p < 0,05$). Mientras que las concentraciones de Zn, Fe y Mn obtenidos por ambos métodos de extracción difieren significativamente. Al observar los desvíos de las réplicas para cada muestra, tanto para el análisis de Zn, como para Fe y Mn, no se observan diferencias significativas entre los resultados en todas las muestras.

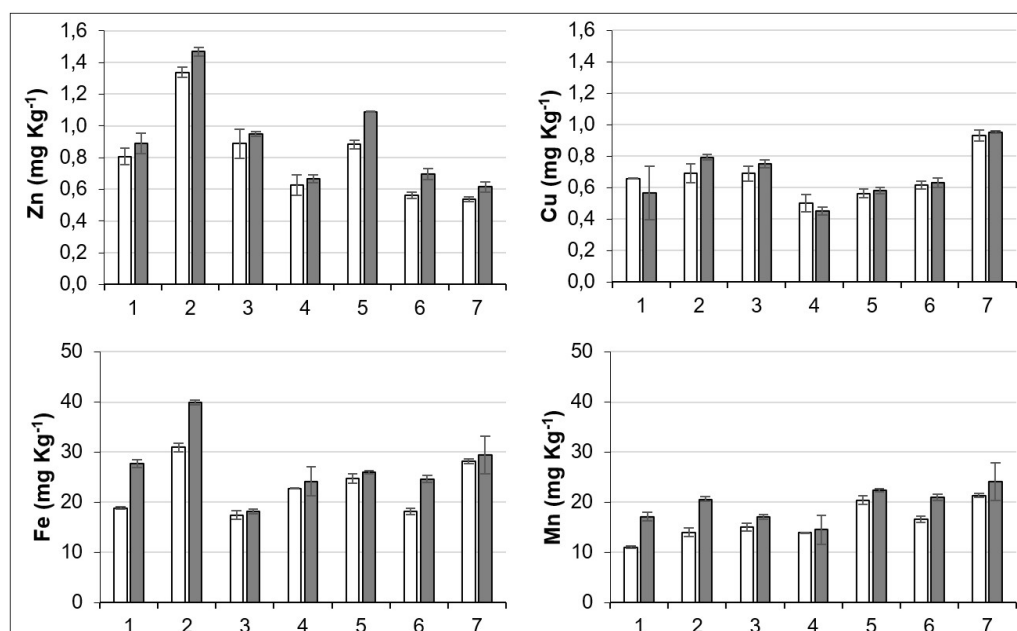


Figura 2. Concentración de Zn, Cu, Fe y Mn en las muestras de suelo (denominadas 1 a 7) obtenidas con el método convencional (serie color blanco) y con el prototipo (serie color gris). Las barras indican el desvío estándar.

Los resultados del estudio de repetibilidad y precisión intermedia mostraron que el prototipo es preciso para la extracción de Cu y Zn ($CV < 15\%$). Aunque mostró mayor variabilidad entre días para la extracción de Fe y Mn ($CV > 15\%$).



CONCLUSIONES

A partir de los resultados exploratorios sobre el funcionamiento del prototipo, se concluye que el mismo es una alternativa exacta para la extracción de Cu en muestras de suelo con DTPA-TEA y podría reemplazar al método convencional. Es necesario ampliar el número de muestras analizadas para sacar conclusiones definitivas respecto de la aptitud del prototipo para el análisis de Zn, Fe y Mn.

BIBLIOGRAFIA

- Barbieri, P; H R Sainz Rosas; N Wyngaard; M Eyherabide; N Reussi Calvo; F Salvagiotti & H E Echeverría. 2017. Can Edaphic Variables Improve DTPA-based Zinc diagnosis in Corn?. *Soil Fertility and Plant Nutrition* 81(3):556-563.
- Ciesielski, H & T Sterckeman. 1997. Determination of cation exchange capacity and exchangeable cations in soils by means of cobalt hexamine trichloride. Effects of experimental conditions. *Agronomie* 17:1-7.
- Di Rienzo, JA; F Casanoves; MG Balzarini; L Gonzalez; M Tablada & CW Robledo. Infostat versión 2015.
- Gannini-Kurina, F; M Balzarini; J Koritschoner; A Rampoldi & S Hang. 2021. Modelos para la conversión de las concentraciones de Fe, Mn, Cu y Zn entre los métodos Mehlich-3 y DTPA-TEA en suelos de Córdoba. *Ciencia del Suelo* 39(2):1-15.
- Alvarez, H F. 2010. Muestreo y metodologías de análisis con fines de fertilidad. Multilab Agroanalítica, Colombia.
- Hatch, D; K Goulding & D Murphy. 2002. Nitrogen. En: *Agriculture, Hydrology and Water Quality*. Edits. Haygarth, P M & S C Jarvis, Wallingford, Oxon, CAB International.
- Kloster, N; M Pérez & F Mazzaferro. 2019. A rapid and simple manifold to study exchangeable cations and cation exchange capacity in 24 soil samples simultaneously. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 50(12):1500-1511.
- Mulvaney, R L; S A Yaremych; S A Khan; J M Swiader & B P Horgan. 2004. Use of diffusion to determine soil cation-exchange capacity by ammonium saturation. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 35(1&2):51-67.
- Nunes, V L & R L Mulvaney. 2021. Controlling organic interference in determination of soil mineral nitrogen. *Soil Science Society of America Journal* 85:919-928.
- Pansu, M J & J Gautheryrou. 2006. Cation exchange capacity. En: *Handbook of soil analysis. Mineralogical, Organic and Inorganic methods*. Springer 709-754.
- Richter, M; M Conti & G Maccarini. 1982. Mejoras en la determinación de cationes intercambiables, acidez intercambiable y capacidad de intercambio catiónico en suelos. *Revista de la Facultad de Agronomía* 3(2):145-155.
- Sparks, D L. 1996. *Methods of soil analysis Part 3 - Chemical methods*. Madison WI: SSSA, American Society of Agronomy.

